


---

BACHARELADO EM ECOLOGIA

---

**Gerson Felipe da Costa Filho**

Biodegradação de Óleos Derivados do Petróleo e de  
Origem Vegetal Estimulada por Biossurfactantes em  
Meio Aquoso e Monitoramento de sua Toxicidade

A large, abstract graphic in the bottom half of the page, consisting of overlapping light blue and white geometric shapes that form a stylized, multi-faceted pattern.

Rio Claro  
2011

GERSON FELIPE DA COSTA FILHO

Biodegradação de Óleos Derivados do Petróleo e de Origem Vegetal Estimulada por Biossurfactantes em Meio Aquoso e Monitoramento de sua Toxicidade

Orientador: Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia

Co-orientador: M. Sc. Paulo Renato Matos Lopes

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

Rio Claro  
2011

620.1122 Costa Filho, Gerson Felipe da  
C837b Biodegradação de óleos derivados do petróleo e de origem vegetal  
estimulada por biossurfactantes em meio aquoso e monitoramento de sua  
toxicidade / Gerson Felipe da Costa Filho. - Rio Claro : [s.n.], 2011  
64 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  
Co-Orientador: Paulo Renato Matos Lopes

1. Biodegradação. 2. Biorremediação. 3. Bartha. 4. Respirometria. 5.  
Óleo mineral. 6. Óleo semi-sintético. 7. Óleo de soja. I. Título.

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

## Agradecimentos

Ao Prof. Ederio Dino Bidoia pela confiança, paciência e ensinamentos que levarei por toda minha vida.

À minha mãe, Vanda Lucia Dornelas, por ter acreditado incondicionalmente em mim desde o início, pelo amor que sempre me ofereceu e pelos conselhos que sem eles eu não seria nada do que sou hoje. Amo você.

À minha irmã, Paula Felipe da Costa, pela ajuda nos momentos difíceis, por ser sempre minha grande parceira e por um milhão de outras coisas.

Aos meus irmãos Pakito, Zeca e Terts que me ajudaram e me aturaram em TODOS os momentos. Vocês são mesmo especiais.

Ao meu co-orientador Paulo Renato Matos Lopes pela grande ajuda ao longo desse projeto.

Aos Técnicos do Laboratório, Lú, Fátima e Beto pela ajuda, ensinamentos e paciência ao longo do trabalho.

Ao Programa de Formação de Recursos Humanos (PRH-05) da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, pela bolsa de estudos, por todo apoio financeiro e pelos cursos oferecidos.

Às minhas queridas amigas Xeninha e Ticiane pelos conselhos, pela ajuda, incentivo, pelos cadernos, enfim, sem vocês eu nunca iria me formar.

Aos grandes parceiros Caramelo, Dudu, Pantoja, Pagode, Bixano que são amigos para a vida.

Às minhas grandes parceiras Laurinha e Mari, obrigado pelas caronas, baladas, almoços, enfim jamais me esquecerei de vocês.

Aos meus veteranos pela melhor recepção que já tive e pela ajuda ao longo do curso.

Aos meus Bixos que espero não ter atormentado muito.

À República Madrugas pelo amor e receptividade com todos. Aprendi e irei aprender muito ainda nesta casa.

À grande turma de Ecologia de 2007. Vocês são demais.

E por fim um obrigado especial a minha namorada Carla Silva Oliveira pelo amor, carinho, compreensão, respeito que teve comigo ao longo deste trabalho e por toda minha vida. Amo você.

---

Não há saber mais ou saber menos: Há saberes diferentes.  
(Paulo Freire)

Sábio é aquele que conhece os limites da própria ignorância.  
(Sócrates)

É triste pensar que a natureza fala e que o gênero humano não a  
ouve.  
(Victor Hugo)

---

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>12</b>
3.1	Aspecto legislativo	12
3.2	Água	12
3.3	Solo e Micro-organismos	13
3.4	Óleo lubrificante automotivo	15
3.5	Óleo lubrificante automotivo usado	17
3.6	Biodiesel	17
3.7	Rerrefino	18
3.8	Efeitos nocivos ao meio ambiente	19
3.9	Efeitos nocivos à saúde humana	19
3.10	Biodegradação	20
3.11	Biorremediação microbiana	22
3.12	Estudos sobre biorremediação de hidrocarbonetos	24
3.13	Bioestimulação	27
3.14	Respirometria	29
3.15	Toxicidade	30
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>32</b>
4.1	Material	32
4.1.1	Solo	32
4.1.2	Tipos de óleos lubrificantes automotivos estudados	32
4.1.3	Tipo de óleos vegetais usados	33
4.1.4	Microrganismos	33
4.1.5	Organismos-teste	33
4.1.6	Respirômetro de Bartha e Pramer	33
4.1.7	Reagentes utilizados no ensaio de respirométrico	34
4.1.8	Meios de Cultura	36
4.1.9	Equipamentos e vidraria	36

		6
4.1.10	Inóculo do solo	37
4.1.11	Inóculo de <i>Bacillus subtilis</i>	37
4.1.12	Inóculo aquoso	37
4.1.13	Quantificação do CO <sub>2</sub>	38
4.1.14	Composição dos sistemas respirométricos	38
4.1.15	Cálculo do CO <sub>2</sub> produzido nos respirômetros	38
4.1.16	Testes de Toxicidade	39
4.1.17	Forma de análise de resultados	39
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>41</b>
5.1	Biodegradação do óleo lubrificante automotivo mineral (novo e usado) e semi-sintético (novo e usado), Biodiesel puro (100%) e comercial (2% de biodiesel e 98% de diesel) e de óleos vegetal derivado da soja (novo e usado) em meio aquoso com ou sem adição de <i>Bacillus subtilis</i>	41
5.1.1	Quantificação do CO <sub>2</sub> acumulado nos ensaios respirometricos sem <i>Bacillus subtilis</i> ao longo dos 90 dias de tratamento.	41
5.1.2	Quantificação do CO <sub>2</sub> acumulado nos ensaios respirometricos com <i>Bacillus subtilis</i> ao longo dos 90 dias de tratamento.	42
5.2	Toxicidade	45
5.3	Início do tratamento	45
5.3.1	Germinação com sementes de alface ( <i>Lactuca sativa</i> )	45
5.3.2	Germinação com sementes de rúcula	47
5.3.3	Final do tratamento	49
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O grande desenvolvimento industrial das últimas décadas vem introduzindo diversos poluentes ao meio ambiente, trazendo graves conseqüências pela contaminação do ar, do solo e da água. Entre estes contaminantes, encontra-se o petróleo, o qual é a principal fonte de combustível atual, e seu uso, produção, transporte e armazenamento apresentam-se como uma fonte em potencial de poluição (BATTERSBY, 2000).

Atualmente, no mundo, são consumidos anualmente cerca de 42 milhões de toneladas de óleo refinado, gerando 22 milhões de toneladas de óleo usado, dos quais apenas um milhão é refinada novamente, ou seja, 4,5%. O Brasil consome anualmente cerca de 900.000 m<sup>3</sup> de óleo lubrificante e gera de 250.000 a 300.000 m<sup>3</sup> de óleo usado, das quais são novamente refinados em torno de 110.000 m<sup>3</sup> e o restante geralmente é queimado ou despejado na natureza (LOPES, 2006). Da mesma forma, os óleos vegetais e biodiesel são descartados indiscriminadamente, acarretando danos consideráveis ao meio ambiente, agravando-se ainda mais em decorrência de seu crescente consumo.

Os óleos em geral são fortes contaminantes ambientais, classificados como resíduos perigosos (Classe I) segundo a norma da ABNT por conterem metais e compostos altamente tóxicos. Segundo Atlas et al. (1991), pequenas quantidades de óleo são suficientes para trazer danos consideráveis ao meio ambiente pois, somente um litro de óleo é capaz de acabar com o oxigênio de 1 milhão de litros d'água, ao formar, em um curto período de tempo, uma fina camada que bloqueia a passagem de ar e luz sobre a superfície de 1000 m<sup>2</sup>, impedindo assim, a realização de fotossíntese e a respiração dos seres vivos ali presentes.

Os microrganismos desempenham funções únicas e essenciais na manutenção dos ecossistemas da biosfera, sendo componentes de cadeias alimentares e de ciclos biogeoquímicos (SCHIMEL, 1995; MYERS, 1996), uma dessas funções é a biorremediação, que promove a degradação dos contaminantes, por meio da respiração microbiana (bactérias, fungos e leveduras), contribuindo para a manutenção do equilíbrio ecológico. Neste processo, são necessários três fatores: contato entre o microrganismo e a substância a ser degrada; condições ambientais favoráveis para que o microrganismo realize a degradação e; o microrganismo deve ser capaz de realizar a degradação ou transformação da substância (DOMINGUES, 2007).

Existem inúmeras técnicas para descontaminar os ambientes, porém poucas são tão eficientes quanto à biorremediação, que emerge como uma técnica de baixo custo, menos agressiva e a mais adequada para manutenção do equilíbrio ecológico (ROSATO, 1997). Prince (1993) cita casos que

foram aplicadas técnicas de biorremediação e após um ano houve uma redução de 90% da contaminação enquanto regiões não tratadas tiveram apenas 15% de redução dos contaminantes.

No processo de biodegradação, há alguns procedimentos que auxiliam na melhora de sua eficiência. Dentro deste contexto encontra-se a bioestimulação, técnica que promove um enriquecimento do meio pela adição de nutrientes a fim de favorecer uma maior população de microrganismos, aumentando, conseqüentemente, a taxa de degradação. Os nutrientes mais usados são o nitrogênio (N) e o fósforo (P), pois estão ligados intimamente ao metabolismo microbiano (MORGAN e WATKINSON, 1989). Os níveis desses compostos são estimados em razões de C/N (carbono e nitrogênio) e, desta forma, variam de acordo como composto a ser biodegradado. Portanto, antes da adição de nutrientes, é necessário realizar estudos para indicar qual a dosagem mais correta, visando o sucesso da biodegradação e sua realização em grande escala (MONTAGNOLLI, 2008).

Outra técnica é o bioaumento ou bioaugmentação, a ser aplicado nesse trabalho, a qual pode ser definida como a introdução de microrganismos selecionados para incrementar a população microbiana (MARIANO, 2006). Estes microrganismos são selecionados de acordo com sua especificidade metabólica, no caso de degradação de hidrocarbonetos.

Em certos ambientes, há um domínio de determinados tipos de microrganismos para degradação de derivados de petróleo. Em ambientes aquáticos, bactérias e leveduras parecem ser os agentes degradantes dominantes, enquanto que em ambientes terrestres fungos e bactérias detêm esse papel (BALBA et al., 1998). Além de degradarem os hidrocarbonetos, algumas bactérias possuem uma característica muito importante para a indústria, a capacidade de transformar certas substâncias em derivados de hidrocarbonetos, por exemplo, fenóis, carvão, lignina ou óleo cru (BICCA et al., 1999).

As bactérias possuem uma enorme flexibilidade para a utilização de diferentes compostos como o carbono em seu metabolismo, por isso são fundamentais ao sucesso da biodegradação. Assim que ocorre a contaminação por hidrocarbonetos, na maioria dos ambientes, algumas comunidades de microrganismos já estão realizando a sua degradação. Sabe-se que este processo não é realizado por apenas uma espécie bacteriana e sim por um consórcio de microrganismos e, com isso, certas bactérias exigem a presença de outras, cuja atividade enzimática pode liberar certas substâncias no meio extracelular, como os biossurfactantes. Estes compostos facilitam a quebra das cadeias mais longas dos hidrocarbonetos, agindo como emulsificante que permite o catabolismo por outros táxons de dentro da comunidade (VASILEVA-TONKOVA e GALABOYA, 2002). Ao analisar esse comportamento de cooperação, podem ser utilizadas técnicas de isolamento para selecionar comunidades que degradem mais rapidamente o poluente, contribuindo para a maior eficiência do bioaumento.

Em experimentos de biodegradação, o método respirométrico de Bartha e Pramer encontra-se como uma boa alternativa (PAGGA, 1997), pois já está descrito e padronizado pela NT L6.350 da CETESB (1990). Esta metodologia consiste em determinar a taxa de CO<sub>2</sub> liberado por microrganismos no processo de degradação de compostos orgânicos por análise química, utilizando respirômetros (BARTHA e PRAMER, 1965). Esta metodologia é capaz de produzir resultados rápidos, visando testes em grande escala e com diferentes tipos de hidrocarbonetos. Assim, considerando que há uma correlação entre a geração de CO<sub>2</sub> e a biodegradação da matéria orgânica no solo (SIVIERO, 1990), é possível estudar a viabilidade de diferentes métodos de biorremediação, antes que sejam utilizados em escalas maiores (BALBA et al., 1998).

Testes toxicológicos também se tratam de uma importante ferramenta no estudo de biorremediação. Essa avaliação toxicológica permite verificar, pela utilização de bioindicadores (organismos teste), se a transformação dos compostos inicialmente tóxicos a biota de fato reduziu o potencial sua toxicidade no ambiente contaminado (CETESB, 1990). Wang et al. (1990) revelaram que, no processo de biodegradação realizado por microrganismos, pode ocorrer uma diminuição na toxicidade ou uma transformação da substância inicial em outra mais tóxica.

Aliados à biorremediação, os surfactantes constituem um grupo de compostos químicos extremamente importantes para a indústria por agirem como tensoativos. A maioria deles, porém, é de natureza química e apresenta alguma toxidez aos seres vivos. Com o crescimento da preocupação ambiental, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente, há atualmente uma procura de surfactantes de origem biológica a partir de fontes renováveis e/ou resíduos agroindustriais como alternativas aos produtos existentes (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Estes compostos de origem microbiana são denominados biossurfactantes.

A limpeza de ambientes aquáticos e terrestres contaminados por petróleo, a remoção da borra oleosa de tanques de estocagem, a remoção de metais pesados de solos e córregos, assim como um aumento geral nos processos de recuperação de óleo de reservatórios (MEOR), são possíveis aplicações dos biossurfactantes (COLLA, 2003).

Diversos organismos têm a capacidade de sintetizar surfactantes, como bactérias e leveduras, constituindo uma classe importante de compostos para a indústria (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Os biossurfactantes são capazes de emulsificar o óleo, diminuindo assim o tamanho das suas gotas, o que propicia um aumento da superfície de contato com os microrganismos degradantes que reduz o tempo de degradação dessas substâncias.

Dentre estes microrganismos, o *Bacillus subtilis* destaca-se pela produção de surfactina a partir de diferentes fontes de carbono. Este biossurfactante, pertencente à classe de lipopeptídios e lipoproteínas, é capaz de emulsificar substratos hidrofóbicos (hidrocarbonetos), promovendo um maior contato entre os microrganismos e o óleo (BARROS et al., 2007). Assim, a utilização do *B. subtilis* favorece uma maior biodegradação.

A maioria dos surfactantes comercializados é sintetizada quimicamente a partir de derivados de petróleo com uma produção de mais de 3 milhões de toneladas por ano (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Estes surfactantes sintéticos são utilizados em indústrias petroquímicas, cosmética, de higiene e limpeza, sendo que este utiliza a maior parte para a produção de detergentes (BARROS et al., 2007).

Os biossurfactantes apresentam vantagens quando comparados aos surfactantes químicos, como: baixa toxicidade, maior biodegradabilidade, produção a partir de substratos renováveis, capacidade de modificação estrutural através da engenharia genética e estabilidade em diferentes valores de pH e temperatura (BARBOSA et al., 2007).

Deste modo, ensaios de respirometria com auxílio de biossurfactantes e a avaliação de toxicidade são importantes para decidir qual o método mais eficiente a ser empregado na descontaminação de ambientes contaminados por vários tipos de óleos.

## 2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo estudar a biodegradação de óleos derivados do petróleo (lubrificantes e combustível) e de origem vegetal em meio aquoso otimizada pela adição de *Bacillus subtilis* (bioaumento) e monitorar sua toxicidade antes e após a ação microbiana. Os óleos a serem analisados serão: automotivo mineral novo e usado, automotivo semi-sintético novo e usado, diesel comercial (2% de biodiesel), biodiesel 100% e vegetal novo e usado.

### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Aspecto legislativo**

Os óleos lubrificantes se deterioram com o uso, perdendo sua função, devendo ser substituído. Estes são contaminantes perigosos e devem ter um destino adequado, evitando uma maior contaminação dos ambientes naturais.

No Brasil, segundo a Resolução n.º. 362/05 do CONAMA (Anexo n.º. A), esses resíduos devem ser recolhidos para rerrefino junto com o óleo residual das embalagens, conhecido como óleo acabado. De acordo com o parágrafo único do Art. 7 desta resolução, o MMA (Ministério do Meio Ambiente) e o MME (Ministério de Minas e Energia) deverão estabelecer, ao menos anualmente, o percentual mínimo de coleta de óleo lubrificante usado ou contaminado, não inferior a 30%, em relação ao óleo lubrificante acabado comercializado.

O rerrefino e a coleta são realizados por empresas cadastradas na Agência Nacional do Petróleo (ANP) e a mesma, na Portaria n.º 125 (Anexo B) ainda determina: (1) o estabelecimento que comercializa óleo lubrificante acabado no varejo, diretamente ao consumidor tem o dever de entregar um recipiente vazio ao consumidor, próprio para recolhimento do óleo usado ou contaminado, indicando o local onde o mesmo deverá ser entregue; (2) todos os produtores e importadores deverão promover campanhas publicitárias de esclarecimento à população sobre recolhimento, coleta e potenciais de risco causado pelo derramamento ou destino inadequado de óleo lubrificante usado ou contaminado.

#### **3.2 Água**

No processo produtivo de diversas substâncias ocorre a liberação de inúmeros resíduos e na sua maioria são descartados diretamente em ambientes aquáticos causando fortes impactos negativos na biota dos ecossistemas atingidos.

Embora a água seja abundante no planeta, é importante salientar que a sua disponibilidade para o homem é pequena. A maior parte da água existente na Terra (97,5%) é salgada e inadequada ao uso, a água doce corresponde a pouco mais de 2,5% do volume total desse recurso, mas 69,5% dela apresentam-se congelada e 30,1% encontram-se no subsolo. Enfim, apenas uma pequena parcela da água existente (0,27%) se apresenta sob uma forma facilmente utilizável pelo homem, em rios e lagos.

A contaminação das águas superficiais pelos derivados de petróleo gera um agravante maior devido à baixa compatibilidade às propriedades físicas do meio e do contaminante. Grande parte das substâncias que compõem os óleos lubrificantes automotivos apresenta propriedades apolares enquanto

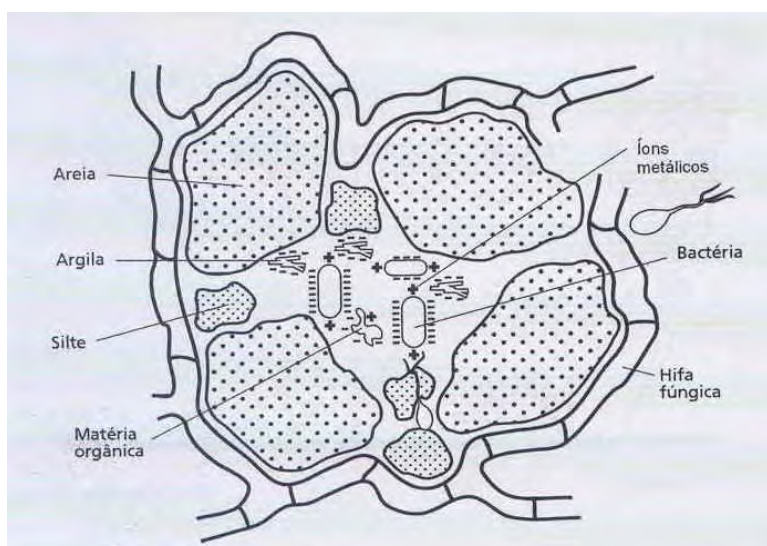
os microrganismos têm maior interação com substratos polares devido à utilização da água como veículo e meio de sobrevivência. Conseqüentemente, em muitos tratamentos remediadores a utilização de surfactantes se fazem necessários. Eles permitem a emulsificação com o aprisionamento de oxigênio na emulsão e também a interação na interface microrganismos/substrato (MARIANO, 2006).

### 3.3 Solo e Micro-organismos

O solo é formado por três fases: líquida, gasosa e sólida. A fase líquida compreende a solução do solo, onde se encontram em suspensão elementos químicos e moléculas solúveis. A fase gasosa é composta pelos gases presentes na atmosfera, porém em diferentes proporções (MOREIRA, 2006). Estes gases circulam entre as partículas do solo os quais também são originários de processos bioquímicos, como a respiração (ZILLI *et al.*, 2003). A fase sólida é formada por partículas minerais (areia, silte e argila), raízes de plantas, populações de organismos macros e microscópios com metabolismo ativo ou dormente, e materiais orgânicos em vários estágios de decomposição.

A área superficial específica dos constituintes minerais e orgânicos do solo pode variar de menos de  $0,01 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  (areia e resíduos orgânicos) até mais de  $800 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  (óxidos de ferro), variam também, em capacidades de trocas catiônicas e sua porosidade é outro parâmetro importante relacionado não só ao conteúdo de água e gases no solo como também à disponibilidade de espaços para os macro e microrganismos (MOREIRA, 2006). Esta porosidade permite, também, uma maior permeabilidade do solo e de materiais de superfície. Quanto maior a permeabilidade mais fácil é a distribuição dos nutrientes e do receptor de elétrons em solos contaminados. Evidentemente, estas condições tendem a ampliar a extensão da contaminação (MARIANO, 2006).

Os microrganismos ocupam em torno de 0,5% do espaço poroso do solo podendo aumentar em solos rizoféricos (MOREIRA, 2006). Poros com alguns micrômetros (2 a 6  $\mu\text{m}$ ) são adequados para a presença de bactérias, enquanto fungos necessitam de poros maiores como está mostrado na Figura 1 (MOREIRA, 2006).



**Figura 1** - Localização dos constituintes minerais, bactérias e fungos no solo (Fonte: MOREIRA, 2006).

As bactérias são os microrganismos presentes em maior número no solo, mas também se pode encontrar fungos, protozoários e algas (METTING, 1993). Possuindo a maior diversidade enzimática encontrada na Terra, estes microrganismos mineralizam a matéria orgânica que pode resultar na formação de humos e compostos secundários. Em solos tropicais, as altas temperaturas facilitam este processo, sendo necessária uma reposição do carbono oxidado, para que o solo não perca a fertilidade (LYON e BUCKMAN, 1943). Às baixas temperaturas diminuem-se a fluidez e a permeabilidade da membrana celular, que controla o transporte de nutrientes (e contaminantes) entre o meio exterior e o interior da célula microbiana. (USEPA, 1995).

A biomassa microbiana do solo, com sua atividade avaliada pela evolução de  $\text{CO}_2$  *in situ* ou em laboratório, também tem sido utilizada como indicativo da condição ambiental. Os métodos de avaliação da biomassa microbiana do solo são bastante variados, mas, de forma geral, permitem a avaliação do *pool* de carbono e, também, de outros nutrientes contidos nos microrganismos. A razão entre o  $\text{CO}_2$  evoluído e o *pool* de carbono da biomassa microbiana fornece o quociente metabólico ( $q\text{CO}_2$ ), que indica o estado metabólico dos microrganismos e pode ser utilizado como indicador de estresse ou estabilidade do ecossistema (DE-POLLI E GUERRA, 1997).

Análises da biomassa microbiana fornecem apenas uma estimativa quantitativa da diversidade de microrganismos, não considerando sua composição, ou a estrutura das comunidades microbianas. Assim, compreende-se ser necessário agregar ao conhecimento da biomassa microbiana informações sobre seus aspectos qualitativos, de forma a permitir uma avaliação mais adequada da qualidade de um solo (ZILLI *et al.*, 2003).

### 3.4 Óleo lubrificante automotivo

Os óleos lubrificantes automotivos são substâncias utilizadas para lubrificar e aumentar a vida útil do motor. Os óleos lubrificantes básicos (principal constituinte do óleo lubrificante automotivo acabado), em função da fonte ou do processo pelo qual são produzidos, podem ser denominados, como (MMA, 2006):

- *Óleos lubrificantes básicos minerais* – obtidos através da destilação e do refino do petróleo sendo classificados em parafínicos ou naftênicos, dependendo do tipo de hidrocarboneto predominante em sua composição;
- *Óleos lubrificantes básicos sintéticos* – produzidos através de reações químicas, obtendo-se produtos com propriedades adequadas às funções lubrificantes;
- *Óleos lubrificantes compostos ou semi-sintéticos* – constituídos pela mistura de dois ou mais tipos de óleos básicos. Em geral, os básicos sintéticos têm como vantagens sobre os básicos minerais, maior estabilidade térmica e à oxidação, melhor propriedade a baixas temperaturas e menor volatilidade. Em contrapartida, os básicos minerais são muito mais baratos do que os sintéticos.

Atualmente, do total de óleo lubrificante comercializado, os sintéticos ainda abrangem uma pequena porcentagem de venda, pois o mercado é ainda dominado pelos óleos de base mineral (BASU *et al.*, 1998 e WRIGHT *et al.*, 1993).

Dentre os componentes dos óleos lubrificantes encontram-se os hidrocarbonetos poliaromáticos os quais são identificados como carcinogênicos e, como os óleos minerais apresentam uma maior concentração na sua composição, também se tornam mais danosos quando expostos aos seres vivos, entre eles o homem (COTTON *et al.*, 1977).

Assim, de acordo com Wright (1992) tem-se uma clara vantagem do óleo sintético sobre o mineral, pois, durante sua fabricação, sua composição pode ser controlada e ele pode apresentar-se ausente de hidrocarbonetos poliaromáticos. Outra vantagem apresentada pelo autor é o desenvolvimento de novas tecnologias para o produto final, como uma maior biodegradabilidade, maior resistência a temperaturas elevadas e alto desempenho.

Para Battersby (2000), como na maioria dos lubrificantes, é pouco prático identificar a composição química do óleo lubrificante automotivo. Seus componentes podem apresentar taxas de degradação diferentes e são poucos solúveis em água limitando a biodegradação pela baixa disponibilidade de material dissolvido (BRAGA *et al.*, 2002; OTENIO, 2002).

Entretanto, para o óleo lubrificante podemos citar algumas de propriedades (MMA, 2006):

- *Viscosidade* - dificuldade com que o óleo lubrificante automotivo escoar. Quanto mais viscoso for um lubrificante, mais difícil de escorrer, portanto, será maior a sua capacidade de manter-se entre duas peças móveis, fazendo a lubrificação das mesmas. A viscosidade dos lubrificantes não é constante, ela varia com a temperatura. Quando esta aumenta, a viscosidade diminui e o óleo lubrificante automotivo escoar com mais facilidade;
- *Índice de viscosidade* - mede a variação da viscosidade com a temperatura;
- *Densidade* - indica a massa de um volume de óleo lubrificante automotivo a uma determinada temperatura. Sua alteração pode indicar contaminação ou deterioração de um lubrificante.

Várias são as classificações dos óleos lubrificantes automotivos (MMA, 2006; TAVARES, 2006), sendo que as principais são: SAE, da Society of Automotive Engineers e API, da American Petroleum Institute.

- a) Classificação SAE: estabelecida pela Sociedade dos Engenheiros Automotivos dos Estados Unidos, classifica os óleos lubrificantes pela sua viscosidade, que é indicada por um número. Quanto maior este número, mais viscoso é o lubrificante. São divididos em três categorias:

Óleos lubrificantes de Verão: SAE 20, 30, 40, 50, 60

Óleos lubrificantes de Inverno: SAE 0W, 5W, 10W, 15W, 20W, 25W

Óleos lubrificantes multiviscosos (inverno e verão): SAE 20W-40, 20W-50, 15W-50

- b) Classificação API: estabelecida pelo Instituto Americano de Petróleo. Ela é a mais aceita internacionalmente (Tabela 1) e estabelece uma codificação que, em geral, é constituída por duas letras.

A primeira letra pode ser S ou C e representa a aplicação automotiva: S (Spark Ignition ou Service) refere-se a óleos lubrificantes para motores de veículos leves a gasolina ou álcool; C (Compression Ignition ou Commercial) refere-se a óleos lubrificantes para motores do ciclo DIESEL (veículos pesados).

A segunda letra indica o desempenho do óleo lubrificante automotivo em relação ao tipo do motor.

**Tabela 1** - Grupos de óleos lubrificantes básicos, segundo a API (Fonte: TAVARES, 2006)

<b>Grupo</b>	<b>índice de viscosidade</b>	<b>teor de saturados (%)</b>	<b>teor de enxofre (%)</b>
<b>1</b>	80 < x < 120	< 90	> 0,03
<b>2</b>	80 < x < 120	> Ou = 90	< ou = 0,03
<b>3</b>	> ou =120	> ou = 90	< ou = 0,03
<b>4</b>	todas as polialfaolefinas		
<b>5</b>	todos os óleos básico não incluídos nos Grupos 1 a 4		

### 3.5 Óleo lubrificante automotivo usado

O óleo lubrificante usado ou contaminado se constitui, ao mesmo tempo, em resíduo perigoso tóxico (Classe 1, segundo a NBR 10004 da ABNT) e em matéria prima destinada ao setor industrial (TAVARES, 2006).

Os óleos lubrificantes automotivos usados, segundo Tavares, 2006, contêm produtos resultantes da deterioração parcial dos óleos em uso, tais como compostos oxigenados (ácidos orgânicos e cetonas), compostos aromáticos polinucleares de viscosidade elevada, resinas e lacas. Além dos produtos de degradação do básico, afirma o autor, estão presentes no óleo usado os aditivos (fenóis, compostos de zinco, de cloro, de enxofre ou de fósforo) adicionados no processo de formulação de lubrificantes e que não foram consumidos, metais pesados de desgaste dos motores e das máquinas lubrificadas (chumbo, cromo, bário e cádmio) e contaminantes diversos. Sua queima indiscriminada, sem tratamento prévio de desmetalização, gera emissões significativas de óxidos metálicos, além de outros gases tóxicos, como a dioxina e óxidos de enxofre, finaliza o autor.

### 3.6 Biodiesel

O emprego de óleos vegetais como combustível é conhecido desde os primórdios do motor a diesel. Em 1900, em uma exposição em Paris, Rudolf Diesel mostrou ao público um motor (que leva o seu nome até hoje) funcionando com óleo de amendoim.

As aplicações do diesel fóssil têm grande destaque nas áreas de transporte e de geração de energias térmica e elétrica. Quando submetido ao funcionamento de motores térmicos, o biodiesel apresenta um comportamento satisfatório e é visto como um excelente substituto do diesel convencional. Além disso, o fato de o biodiesel ser miscível ao diesel fóssil levou muitos países a testar misturas binárias de biodiesel/petrodiesel, formando o “ecodiesel” (PARENTE, 2003), que resultou na redução não apenas do consumo de combustível fóssil como também dos impactos ambientais por ele causados.

Entretanto, é importante lembrar que tais misturas não se caracterizam como sendo estritamente biodiesel, recebendo uma denominação de acordo com seu respectivo percentual de biodiesel. Assim, para uma mistura de 2 % de biodiesel em diesel de petróleo, a denominação é B2; para a mistura de 25 %, B25, e assim por diante (BIOCOMBUSTÍVEIS, 2007).

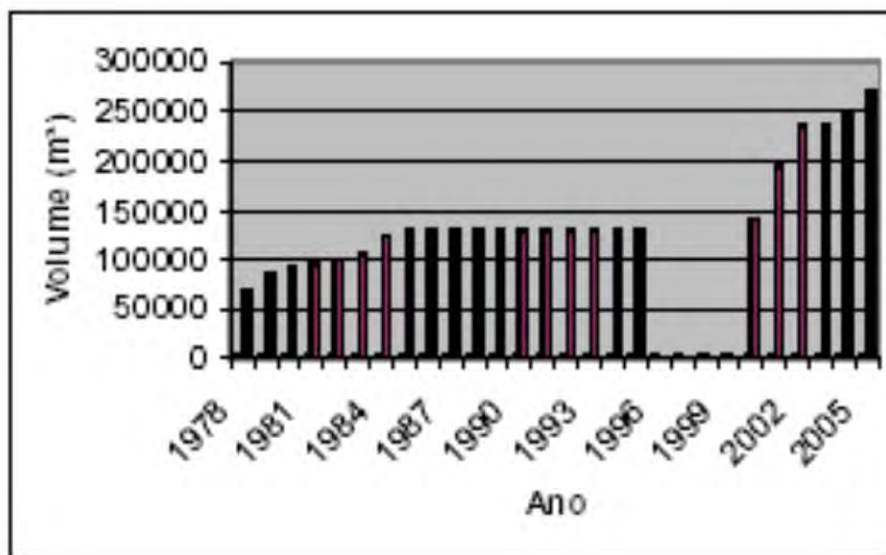
Os motores alimentados com o combustível híbrido têm, aproximadamente, o mesmo desempenho de quando são movidos a diesel de petróleo puro. Quando a adição do biodiesel é da ordem de 2 a 5 % (B2 e B5), observa-se uma melhoria no funcionamento das máquinas devido ao aumento da lubrificidade. Porém, quando essa fração de biodiesel aumenta (B50, por exemplo) é notada uma pequena queda na potência. Isso ocorre porque alguns elementos químicos que contribuem com o poder calorífico do diesel fóssil não estão presentes no biodiesel e para compensar a perda de energia, é notada a necessidade de um ligeiro aumento de consumo (BIOCOMBUSTÍVEIS, 2007).

Países como a Alemanha, França e Itália já possuem programas bem desenvolvidos para a produção e uso do biodiesel. O Brasil, que já apresenta experiência no ramo de biocombustíveis através do PROALCOOL, tem novamente a colaboração da empresa Petrobras no através do PNPB que visa contribuir para o sucesso do Programa Federal de Biodiesel aprovado em 2004 que autoriza, desde 2005, a comercialização de biodiesel misturado ao diesel fóssil. Em janeiro de 2008, a mistura de 2 % de biodiesel ao diesel convencional tornou-se obrigatória. Em julho de 2009, este percentual passou para 3 %, sendo que o aumento deste percentual para 5 %, que era previsto para 2013, foi antecipado pelo governo federal e já se encontra no mercado nacional.

### **3.7 Rerrefino**

O rerrefino é um processo industrial que transforma o óleo lubrificante automotivo usado em óleo lubrificante básico, principal matéria-prima na fabricação do óleo lubrificante acabado (MMA, 2006).

Dados relativos a 2004 revelaram que a coleta nesse ano foi de 240 milhões de litros, ou seja, em torno de 24,0% (MMA, 2006). Apesar de não atingido a determinação de 30% do volume total do óleo lubrificante acabado conforme recomenda a Resolução CONAMA 362/2005, nosso país tem muito a comemorar, pois a coleta de óleo lubrificante usado aumentou cerca de 300% nos últimos 26 anos (Figura 2), passando de 14 para 38 coletores segundo dados do ano de 2005 da ANP (TAVARES, 2006).



**Figura 2** - Coleta de óleo lubrificante usado nos últimos 26 anos no Brasil (Fonte: TAVARES, 2006).

### 3.8 Efeitos nocivos ao meio ambiente

A melhor maneira do usuário de veículo automotivo evitar o desperdício e a poluição por óleo lubrificante automotivo é fazer a troca em local especializado e licenciado para este fim, onde o óleo lubrificante automotivo usado deve ser adequadamente recolhido e encaminhado para o destino adequado, conforme legislação ambiental vigente.

O óleo lubrificante automotivo pode causar intoxicação na fauna aquática pela presença de compostos como o tolueno, o benzeno e o xileno, entre outros ou agir obstruindo fisicamente os tecidos, causando asfixia e danos subletais, por impregnar na pele, nas brânquias ou em outras partes vitais e acessórias, sendo outro risco comum o impedimento da realização de diversas funções metabólicas da fauna aquática, como respiração, alimentação, excreção, homeostase, localização e movimentação (como as nadadeiras de peixes), entre outras limitações (MMA, 2006).

### 3.9 Efeitos nocivos à saúde humana

Os compostos químicos existentes nos óleos lubrificantes usados, principalmente, os metais pesados, produzem efeitos diretos sobre a saúde humana e vários deles são cancerígenos. O contato e a exposição aos óleos lubrificantes provocam lesões na pele, segundo MMA, 2006, e o risco à saúde do trabalhador depende da relação homem-produto, que é minimizado quando as instruções de segurança são seguidas corretamente. Mecânicos e auxiliares que são expostos ao óleo lubrificante automotivo ou ao óleo lubrificante automotivo usado de cárter, devem evitar o contato prolongado na pele e a inalação de gases (MMA, 2006).

### 3.10 Biodegradação

Um importante mecanismo de remoção de compostos químicos orgânicos (RÉGIS, 2000; KATAOKA, 2001; BUNDY *et al.*, 2002 e INAZAKI, 2003) e inorgânicos (GARNHAM *et al.*, 1992 e GUPTA *et al.*, 2001 *apud* NAVARRETE, 2006) de ambientes naturais é a biodegradação. Ela consiste na transformação destes compostos mediante a atividade metabólica dos microrganismos, resultando eventualmente na formação de gás carbônico e água (CRIVELARO, 2005).

Estes microrganismos podem ser nativos, exógenos ou geneticamente modificados (CUNHA e LEITE, 2000). A biodegradação requer a interação de muitos grupos de microrganismos diferentes, tais como algas, bactérias e fungos (MELO e AZEVEDO, 1997), que trabalhem juntos ou sequencialmente na degradação dos compostos (RÉGIS, 2000). Entre os gêneros de algas e cianobactérias mais comumente observados como degradadores desses compostos, pode-se citar: *Ocellularia* sp., *Agmellum*, *Selenastrum* e *Clorella*, entre os fungos: *Cunninghamella* e *Phanerochaete* (MELO e AZEVEDO, 1997) e entre as bactérias: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Vibrio* e *Xanthobacter* (CERNIGLIA, 1984; MAHAFFEY *et al.*, 1988; NARRO *et al.* 1992 e BARBIERI, 1994 *apud* MELO e AZEVEDO, 1997).

Em ambientes aquáticos e terrestres, os microrganismos são os principais agentes da biodegradação de moléculas, incluindo hidrocarbonetos, como por exemplo, petróleo sendo que bactérias e leveduras parecem ser os degradadores dominantes nos ecossistemas aquáticos, enquanto que fungos e bactérias são os principais degradadores em ambientes terrestres (BALBA *et al.*, 1998).

A biotransformação de um composto orgânico pode alterar a toxicidade, a forma e a mobilidade do composto original (RÉGIS, 2000). Quase todos os compostos orgânicos podem ser degradados biologicamente se houver condições físicas e químicas adequadas aos microrganismos (RÉGIS, 2000; SILVA, 1977 e INAZAKI, 2003). As condições para que a biodegradação ocorra são, basicamente, três: (1) o microrganismo deve estar próximo ao composto orgânico, (2) o composto orgânico deve estar disponível ao microrganismo e (3) o microrganismo deve ter a capacidade de participar em alguma parte do processo de biodegradação ou transformação retirando energia para si (RÉGIS, 2000). Para o cumprimento dessas condições aos compostos mais difíceis de serem biodegradados deve-se proceder a uma seleção de microrganismos adequados a metabolização do substrato sendo que em alguns casos é necessária a adição de substâncias que funcionem como pontes e direcionadoras do microrganismo ao substrato (BUNDY *et al.*, 2002; OTENIO, 2002 e KATAOKA, 2001).

A utilização de hidrocarbonetos pelos microrganismos é altamente dependente da natureza química dos compostos existentes na mistura de derivados de petróleo e das condições ambientais. Entretanto, as condições ambientais de nível biótico e abiótico tais como temperatura, pH, concentração de nutrientes inorgânicos e metais, predatismo e parasitismo são difíceis de ser obtidos em testes laboratoriais (BENGTSSON e ZERHOUNI, 2003).

Os fatores ambientais que afetam a velocidade de biodegradação são:

- *Teor de oxigênio* - Em quase todos os casos, a presença de oxigênio é fundamental para a efetiva biodegradação do óleo, uma vez que as etapas iniciais do catabolismo envolvem a oxidação dos substratos por oxigenases. A decomposição anaeróbia de hidrocarbonetos do petróleo ocorre muito lentamente. Alguns compostos, como benzoato, hidrocarbonetos clorados, benzeno, tolueno, xileno, naftaleno e acenafteno são degradados na ausência de oxigênio (ATSDR, 1999; OUDOT, 1998 e ROSATO, 1997);
- *pH* - O pH ideal para a biodegradação é próximo da neutralidade (6 a 8). Para a maioria das espécies, o pH ótimo é ligeiramente alcalino, ou seja, pouco maior que 7 (PEDROZO, 2002);
- *Teor de água* - O teor de água do solo contaminado afeta a biodegradação dos óleos devido à dissolução dos componentes residuais, à ação dispersora da água e pelo fato de ser necessária para o metabolismo microbiano. Este teor também afeta a locomoção microbiana, a difusão do soluto, o suprimento do substrato e a remoção dos produtos do metabolismo. Os teores ótimos de umidade encontram-se entre 50 a 70% da capacidade retentora de água (CETESB, 1990);
- *Temperatura* - Todas as transformações biológicas são afetadas pela temperatura. Em geral, conforme a temperatura se eleva, a atividade biológica tende a aumentar até a temperatura em que ocorre desnaturação enzimática. A temperatura também influencia a biodegradação pelo efeito na natureza física e química do petróleo, a qual ocorre numa faixa de temperatura relativamente grande, de 0 a 70°C. Em geral, à baixa temperatura, a viscosidade do óleo aumenta, a volatilização dos hidrocarbonetos de cadeia curta é minimizada, assim como a atividade enzimática e a velocidade de biodegradação.

A velocidade de biodegradação também é afetada pelo volume de produto liberado para o meio ambiente. A velocidade de biodegradação no solo é razoavelmente independente da concentração do óleo, quando o volume liberado para o meio representa 0,5 a 1% do volume de solo (EASTCOTT *et al.*, 1989 *apud* NAVARRETE, 2006). Entretanto, conforme as concentrações de óleo aumentam, a velocidade de degradação de primeira ordem diminui e a meia vida da biodegradação do óleo se eleva e,

finalmente, quando a concentração do óleo atinge condições de saturação no solo (30 a 50% de óleo), a biodegradação cessa (EASTCOTT *et al.*, 1989 *apud* NAVARRETE, 2006).

Metais pesados podem influenciar a biodegradação de substâncias orgânicas por alterar a atividade ou a população microbiana. Vários elementos, como o chumbo, cádmio, níquel, cromo, cobre e zinco, foram estudados demonstrando esta ação (FRANKENBERGER, 1992).

Entretanto, vários metais são essenciais para as atividades microbianas, mas em concentrações excessivas podem causar toxicidade (BETTIOL e CAMARGO, 2000). Segundo Cardoso e Chasin (2001) os estudos realizados em áreas contaminadas com cádmio e outros metais constataram inibição quanto à mineralização do nitrogênio e fósforo e diminuição na diversidade de fungos. Os modelos estatísticos aplicados nesses estudos mostraram que dentre os metais estudados o cobre foi o que apresentou maior toxicidade com relação aos fenômenos descritos.

### **3.11 Biorremediação microbiana**

Dentre as novas estratégias para atenuar o efeito ambiental causado pela poluição das águas por hidrocarbonetos derivados de petróleo a biorremediação, para Rosato (1997), emerge como a mais barata, menos agressiva e mais adequada para manutenção do equilíbrio ecológico. Esse destaque deve-se ao fato de que a degradação dos resíduos no meio ambiente por microrganismos utiliza-se do próprio potencial de reação dessas substâncias, pois estes seres utilizam-se delas como sendo fonte de energia.

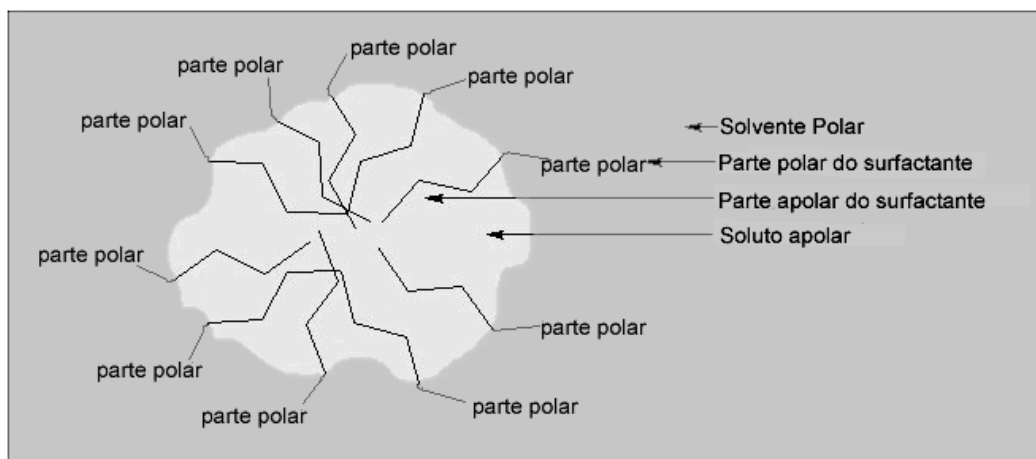
A esta capacidade microbial de degradação, denominou-se biodegradação e, à técnica de utilização desta capacidade para remediação ambiental, chamou-se biorremediação. Moreira (2006) define, ainda, *Biorremediação* como estratégia ou processo que emprega microrganismos ou suas enzimas para destoxificar contaminantes no solo ou outros ambientes.

As técnicas de biorremediação podem ser realizadas no local do derrame (*in situ*) ou fora deste (*ex situ*), envolvendo inúmeros procedimentos tais como: biorremediação passiva, bioventilação, “landfarming”, compostagem, bioaugmentação (introdução de microrganismos especializados na degradação do poluente) e bioestimulação (introdução de substâncias que estimulem o crescimento microbiano), segundo Pereira e Lemos, 2004. Porém, é de suma importância usar certos critérios na opção por biorremediação, pois se deve levar em conta a complexidade do ambiente e a concentração e complexidade dos contaminantes (LANDIS e YU, 1995).

Os microrganismos em sistemas hídricos geralmente vivem na interface óleo-água, de onde eles atacam as moléculas do óleo (BROCK e MADINGAN, 1991); e como demonstrado por Zobbel (1969),

a oxidação microbiana é maior quando as moléculas de hidrocarboneto estão em íntimo contato com a água, papel realizado por surfactantes.

Os surfactantes realizam o processo de micelização quando em contato com água junto a um soluto apolar, como os hidrocarbonetos, pois as moléculas do surfactante procuram se arranjar de modo a minimizar a repulsão entre grupos hidrofóbicos e a água (ALLINGER *et al.*, 1990). Os lubrificantes são formados, em sua maior parte, por compostos apolares e os microrganismos possuem maior interação com substratos polares devido à utilização da água como solvente e meio de sobrevivência. Desta maneira, o surfactante permite a emulsificação com o aprisionamento de oxigênio na emulsão e também a interação na interface microrganismos/substrato. No processo de micelização, as moléculas do surfactante agrupam-se em torno do óleo por suas extremidades apolares, enquanto suas extremidades polares interagem com a água (Figura 4).



**Figura 3** - Micelas formadas pelo surfactante em contato com um soluto apolar (óleo lubrificante) e um solvente polar (água).

O emprego de culturas mistas acontece quando microrganismos e enzimas degradam de forma seqüencial produtos naturais ou xenobióticos recalcitrantes. As vantagens de utilização de cultivos mistos podem ser apresentadas sob vários aspectos: maior produtividade, maior estabilidade, maior número de combinações genéticas, e redução na demanda da engenharia genética (BHATNAGAR e FATHEPURES, 2000).

Individualmente, os microrganismos podem apenas metabolizar pequenas porcentagens de hidrocarbonetos (BRITTON, 1984), mas consórcios de populações com ampla capacidade enzimática são capazes de decompor misturas complexas de hidrocarbonetos (AUSTIN *et al.*, 1977; ATLAS, 1981, 1995; LEAHY e COLWELL, 1990 e OUDOT e DUTRIEUX, 1989).

### 3.12 Estudos sobre biorremediação de hidrocarbonetos

Lopes (2006) realizou um ensaio de respirometria de um meio aquoso contaminado por óleos lubrificantes automotivos do tipo mineral, sintético e usado na proporção 95:5 de meio e contaminante utilizando-se do Tween 80<sup>®</sup> como surfactante. Após sucessivas quantificações de CO<sub>2</sub> produzido em cada ensaio, observou-se que a taxa de CO<sub>2</sub> produzida foi maior o ensaio contendo óleo lubrificante automotivo usado e o ensaio com o segundo maior nível de produção foi aquele que continha óleo lubrificante automotivo semi-sintético, seguido do ensaio contendo óleo lubrificante mineral e, por fim, o ensaio controle no qual continha apenas água destilada. O autor concluiu que o óleo usado possui uma maior eficiência de biodegradação em meio aquoso quando comparado aos demais tipos (acabados), ou seja, aqueles que ainda não foram devidamente utilizados no motor automobilístico.

Crivelaro (2005) realizou um estudo de biodegradação, utilizando-se dos respirômetros de Bartha e Pramer, de resíduos provenientes das refinarias de petróleo (borra oleosa) e destilarias de fermentação etanólica (vinhaça) usadas de maneira associada. Os tratamentos foram constituídos de solo, borra oleosa nas concentrações 7 e 14% (m/m), e ajuste da umidade do solo com e sem presença de vinhaça.

As maiores eficiências de biodegradação e incorporação de carbono no solo ocorreram nos tratamentos com vinhaça que provocou um aumento expressivo de microrganismos, principalmente fungo, visto que pode ter servido como fonte de nutrientes para os mesmos.

Hencklein (2005) buscou a estabilização de solo de “landfarming”, utilizando o método respirométrico de Bartha e Pramer para verificar a fase em que se encontrava concluindo que o solo “landfarming” utilizado se encontrava estabilizado sendo, assim, a biodegradação ocorreu sem a adição de outros materiais. Quanto à toxicidade, o solo mostrou-se tóxico à planária (*Girardia tigrina*).

Bengtsson e Zerhouni (2003) confirmaram que as principais razões para a lenta biodegradação de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (PAH) no solo corresponde à ausência de um substrato para o crescimento dos microrganismos e a bioviabilidade do PAH no solo. Mostraram também que a adição de certos substratos de carbono como óleo de refinaria e a adição de água como solvente facilitam a biodegradação.

Bundy *et al.* (2002) estudaram o efeito da adição de óleo diesel na microbiota e simularam a biorremediação da comunidade microbiológica em três diferentes tipos de solo. Os resultados indicaram que a contaminação por diesel não resultou no desenvolvimento de perfis semelhantes da comunidade

microbiológica concluindo, portanto, que há diferentes potenciais microbióticos para degradar hidrocarbonetos em diferentes tipos de solos.

Otenio (2002) aplicou o processo eletrolítico no pré-tratamento de água, avaliando sua ação sobre microrganismos da água do Rio das Cinzas no Serviço Autônomo de Água e Esgoto (SAAE) de Bandeirantes, Paraná. Houve uma fase experimental aplicando a eletrólise sobre bactérias *Legionella pneumophila* simulando contaminações encontradas em águas de torres de resfriamento eliminando 90% da espécie. Esta fase foi ampliada com testes de biodegradação, onde a bactéria *Pseudomona putida* CCMI852 foi desenvolvida em meio líquido com componentes da gasolina Benzeno, Tolueno, e Xileno e suas misturas. O tratamento eletrolítico mostrou-se efetivo na eliminação de bactérias heterotróficas e de indicadores coliformes totais e fecais da água bruta do Rio das Cinzas, Bandeirantes, Paraná. A fase experimental mostrou que o processo eletrolítico é efetivo também sobre bactérias resistentes. Nos ensaios de biodegradação, confirmou-se a caracterização genotípica da bactéria que possibilita a biodegradação de Tolueno e Xileno e suas misturas e a não biodegradação de Benzeno. Com o trabalho, concluiu ainda, que a presença do Benzeno nas misturas inibe a ação da bactéria sobre o Tolueno e Xileno.

Silva *et al.* (2002), analisaram a presença dos micropoluentes BTEX (Benzeno, Tolueno, Etileno e Xilenos) para avaliar a qualidade da água de poço de algumas residências do bairro Brisa Mar, Itajaí-RJ, após dois anos da ocorrência de um vazamento de gasolina do tanque de armazenamento de combustível. Foram estudados também os possíveis mecanismos de atenuação natural (biodegradação intrínseca) envolvendo aceptores de elétrons. Os resultados mostram que ainda havia vestígios de BTEX na água consumida pela população local e que a disponibilidade tanto de  $O_2$  e  $NO_3^-$  contribuiu para a biodegradação do BTEX, porém o nitrato pode causar doenças como metamoglobinemia e câncer.

Kataoka (2001) investigou a degradação de resíduo proveniente de refinaria de petróleo denominado borra oleosa. O resíduo foi submetido à biodegradação utilizando-se microrganismos isolados de áreas que estavam sendo expostas a este tipo de material. O acompanhamento da biodegradação foi realizado mediante utilização do ensaio de respirometria e de cromatografia gasosa. Os dados obtidos com a evolução de  $CO_2$  nos respirômetros de Bartha indicaram que os resíduos podem ter importante aumento na taxa de biodegradação com a inoculação de microrganismos adequadamente selecionados.

Cunha e Leite (2000) avaliaram a biodegradação de gasolina em microcosmos constituídos de solo. Os microrganismos capazes de crescer na presença de gasolina foram isolados do solo e vários sistemas de tratamento foram testados usando tanto as espécies isoladas quanto *Pseudomonas putida*

obtida de coleção de cultura. O sistema de tratamento constituído somente da microflora autóctone apresentou valores médios de degradação de 50%. A associação de *Pseudomonas alcaligenes*, *Burkholderia cepacia* e a microflora indígena do solo mostraram percentuais significativos.

Régis (2000) avaliou a biodegradação do efluente de uma indústria química produtora de antioxidante para borracha frente à eletrólise em diferentes tempos de exposição. Os resultados apontaram uma diminuição de toxicidade, do efluente bruto, com o tempo de 20 min ao *Saccharomyces cerevisiae*. O autor concluiu que a eletrólise é um método eficaz no tratamento de efluentes acelerando a biodegradabilidade através da diminuição do tempo de adaptação e latência dos microrganismos ao efluente.

Del'arco e França (1999) estudaram a biodegradação de óleo cru em sedimentos arenosos. Os autores viram que compostos com cadeias ramificadas são degradados mais lentamente do que os seus compostos análogos em cadeias retas. Além destes, compostos aromáticos também parecem ser mais recalcitrantes que seus semelhantes em cadeias cíclicas não-aromáticas. Os autores confirmam a idéia de que os componentes do petróleo apresentam diferentes suscetibilidades ao ataque microbiano. Este trabalho também mostra que a introdução de culturas mistas (obtidas a partir de "landfarming") no sedimento arenoso acrescido de óleo cru aumentou a biodegradação com relação aos tratamentos que continham somente organismos autóctones do resíduo (óleo cru). No mesmo estudo, mas com relação à utilização de culturas mistas de microrganismos para biodegradação, constataram uma redução de 42,9% da fração pesada do óleo em 28 dias quando fosfato e nitrogênio foram adicionados. Na presença apenas da flora nativa esse valor foi de 11,9%. O resultado demonstra a importância de utilização de culturas adaptadas para a maior eficiência de biodegradação dos poluentes e no processo de biorremediação.

Siviero (1999) estudou a aplicação de várias taxas de areia fenólica em respirômetros de Bartha mantidos à temperatura de 28°C e avaliou a biodegradação deste resíduo. Durante o experimento, determinou-se UFC/mL de bactérias, fungos e actinomicetos adaptados ao fenol do solo presente nos respirômetros. Também foi quantificada a produção de CO<sub>2</sub> devido à biodegradação dos compostos orgânicos incorporados na areia fenólica. A taxa de aplicação que corresponde a 18,6 mg de fenol/kg de solo foi a que apresentou maior eficiência de remoção do fenol, chegando à média de 89%. O pesquisador concluiu que o resíduo sólido denominado areia fenólica poderia ser disposto no solo, num sistema piloto de tratamento, em condições controladas, com acompanhamento dos fatores físico-químicos, microbiológicos e toxicológicos.

Ururahy *et al.* (1998) estudaram a viabilidade técnica do tratamento biológico de borra oleosa através de estímulo de microrganismos nativos, em escala de bancada. Tendo a borra oleosa como única

fonte de carbono e energia, tais populações de microrganismos foram capazes de crescer. Concentrações de 5% (v/v) e 10% (v/v) foram estudadas sendo observadas maiores densidades microbianas na primeira condição e inibição pelo substrato e/ou efeito tóxico na segunda. Comprovou-se com o experimento, a importância da aeração sobre a atividade microbiana, assim como sobre a biodegradação do resíduo. No procedimento de identificação houve predominância de bactérias do gênero *Pseudomonas* e de leveduras dos gêneros *Candida* e *Rhodotorula*.

Segundo Rosato (1997), uma aplicação de 5% de hidrocarbonetos ao solo forneceu os melhores resultados de biodegradação para todas as classes de compostos. A adição de glicose e extrato de leveduras aumentou a biodegradação até 70%. Usando-se essas bactérias no solo, houve aumento da degradação durante 30 dias de 40% para 70%.

Dibble e Bartha (1979) avaliaram e aperfeiçoaram os parâmetros ambientais do processo de *landfarming*. A biodegradação foi monitorada pela evolução de CO<sub>2</sub> e análise periódica dos hidrocarbonetos residuais. A biodegradação ocorreu com maior eficiência na faixa de umidade de 30 a 90%, pH de 7,5 a 7,8, temperatura superior a 20°C, taxa de C:P de 800:1 sendo que a adição de micronutrientes não foi benéfica. Eles utilizaram várias concentrações para seus efluentes concluindo que a taxa de biodegradação máxima no solo foi alcançada com uma concentração ao redor de 5% e com capacidade de campo de 50 a 70%. Quanta ao pH, valores extremos inibem a maioria dos processos de degradação por microrganismos sendo que, fungos são menos afetados com valores de pH mais baixos do que bactérias.

### 3.13 Bioestimulação

O processo de bioestimulação consiste em introduzir nutrientes na forma de fertilizantes orgânicos ou inorgânicos em um sistema contaminado, o que causa o aumento na população de microrganismos nativos. Os microrganismos podem ou não ter como alvo os hidrocarbonetos como fonte de alimento. Contudo, os hidrocarbonetos são, supostamente, degradados mais rapidamente do que no processo de degradação natural, devido à elevação do número de microrganismos causado pelo aumento dos níveis de nutrientes (SARKAR *et al.* 2005 *apud* OLIVEIRA e LEMOS, 2005). Nitrogênio e fósforo são nutrientes mais utilizados nos processos de bioestimulação já que estimulam o crescimento das populações microbianas. O nitrogênio está intimamente relacionado ao metabolismo dos microrganismos. Estudos realizados com fungos mostraram que para 100 unidades de carbono degradado são necessárias, em média, 3 a 4 unidades de nitrogênio (PEREIRA e LEMOS, 2004).

O acréscimo de fertilizantes em derrames de óleo tem encabeçado avanços na biodegradação (BRASSERES *et al.*, 1993; OLIVIERI *et al.*, 1976; PRINCE, 1993). A fase orgânica dos fertilizantes são gradualmente metabolizadas, liberando vagarosamente nitratos e fosfatos no meio, os quais se tornam gradualmente assimiláveis pelas bactérias (ATLAS e BARTHA, 1973; LADOUSSE e TRAMIER, 1991).

Oliveira e Lemos (2005) estudaram as condições de biodegradação de um solo contaminado por petróleo utilizando fungos filamentosos e as técnicas de bioaugmentação e bioestimulação. Os resultados mostraram que a adição das fontes de nitrogênio (extrato de levedura e uréia) nas proporções 100:10 beneficiou o percentual de biodegradação em relação à amostra controle que não continha nitrogênio extra. Entretanto, o melhor resultado foi obtido com a utilização da uréia com nutriente.

Coelho (2005) avaliou a eficiência do uso de suportes para fixação do fertilizante agrícola NPK a fim de obter melhor dissolução na água do mar durante o processo de biorremediação e, assim, otimizando o tempo de tratamento e a quantidade de fertilizante utilizada na aceleração da biodegradação dos principais componentes do petróleo. Os resultados mostraram que o uso do fertilizante NPK foi eficiente no processo de biorremediação. A evaporação do poluente foi responsável pela redução de 35% da massa de óleo derramada e aproximadamente 50% dos compostos foram reduzidos por biorremediação.

Baptista *et al.* (2005) avaliaram a biodegradação do petróleo em solo argiloso durante 45 dias de ensaios. Os ensaios foram conduzidos em biorreatores aeróbios de leito fixo, com 300 g de solo contaminado à temperatura ambiente e com vazão de ar de 6L/h. As deficiências nutricionais foram corrigidas com 2,5% (p/p) de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e com 0,035% (p/p) de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . O monitoramento foi realizado em função da produção de  $\text{CO}_2$ , da remoção da matéria orgânica, de óleos e graxas e de hidrocarbonetos totais de petróleo, além de bactérias heterotróficas totais e hidrocarbonoclasticas, no início e após 45 dias. Nos biorreatores onde houve maior crescimento de bactérias hidrocarbonoclasticas e maior produção de  $\text{CO}_2$ , obtiveram-se os melhores percentuais de remoções de matéria orgânica (50%), óleos e graxas (37%) e hidrocarbonetos totais de petróleo.

Trindade *et al.* (2005) observaram que altas concentrações de poluentes, mesmo em solos há muito tempo contaminados pelos mesmos, pode afetar a população microbiana inibindo o processo de biodegradação. Eles compararam a eficiência de biodegradação entre um solo recém contaminado e outro há quatro anos contaminado depois de aplicadas técnicas de bioestimulação e adição de populações microbianas convenientes (bioaugmentação). Ambos solos foram contaminados com 5,4% de

hidrocarbonetos de petróleo totais (TPHs) obtendo melhores resultados no solo contaminado há quatro anos sujeito a bioestimulação e a bioaumentação.

Pereira e Lemos (2004) estudaram as condições de biodegradação dos fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *Penicillium corylophilum* avaliando o emprego de três fontes de nitrogênio bem como a capacidade de produção de surfactantes por ambos agentes biodegradadores. Os melhores resultados foram obtidos com a adição de uréia, a qual resultou numa eficiência de biodegradação de 17,7% para o *Aspergillus niger* e 20,1% para *Penicillium corylophilum*.

Estudos realizados por Gray *et al.* (2000) mostraram que o acréscimo de nutrientes como nitrogênio, fosfato, oxigênio e enxofre não limitam a remoção final dos hidrocarbonetos, e os resultados ainda mostram que a incapacidade de 75 a 85% das culturas ativas em degradar as maiores classes de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) deve-se a indisponibilidade desses compostos aos microrganismos.

LaDousse e Tramier (1991) conseguiram uma biodegradação de até 60% em tratamentos com fertilizantes quando comparados à taxa de 38% de biodegradação nas amostras que não sofreram adição de fertilizantes.

### 3.14 Respirometria

A respiração da comunidade microbiana do solo tem sido utilizada como indicador de atividade biológica em seu perfil, constituindo-se numa ferramenta importante para avaliar o potencial de biodegradação de compostos orgânicos nele dispostos. O ensaio de respirometria consiste na determinação da quantidade de CO<sub>2</sub> gerado no processo de degradação da matéria orgânica. Considera-se que há uma correlação entre a geração de CO<sub>2</sub> e a biodegradação da matéria orgânica no solo (SIVIERO, 1999).

A Norma Técnica L6.350 da CETESB (1990), considera que a medida de CO<sub>2</sub> produzida nos respirômetros pode ser efetuada em sistemas de análise em fluxo contínuo ou em sistemas fechados sendo os sistemas de fluxo contínuo constituídos por câmaras de incubação, por onde se faz passar um fluxo de ar isento de CO<sub>2</sub>, sendo o ar efluente borbulhado em solução alcalina para remover o CO<sub>2</sub> produzido pela respiração dos microrganismos. O gás carbônico gerado seria então medido, por método químico. A utilização do respirômetro de Bartha tornou-se freqüente em pesquisas relacionadas principalmente com a degradação de lodos de esgoto no solo provenientes de estações de tratamento de esgoto doméstico e industrial (CASARINI *et al.*, 1988; GUERRA, 2005 e NUVOLARI, 1996).

Bartha e Pramer (1965) realizaram ensaios utilizando frascos biométricos em um estudo comparativo para verificar a geração acumulada de CO<sub>2</sub> durante 19 dias em frascos contendo 50 g de solo e 500 ppm das seguintes substâncias: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); glicose; azida e fenol. A mistura solo-fenol foi a que apresentou maior geração de 33 CO<sub>2</sub> e a solo-azida a menor, concluindo-se que a azida na concentração testada apresenta toxicidade aos microrganismos do solo.

### 3.15 Toxicidade

A toxicidade é uma propriedade inerente aos agentes químicos que produzem efeitos danosos a um organismo quando este é exposto, durante certo tempo, a determinadas concentrações (BERGMAN *et al.*, 1986 *apud* NAVARRETE, 2006). Assim, a toxicidade de um agente é dada em função da sua concentração e da duração da exposição. Sob este aspecto, qualquer substância pode ser considerada potencialmente tóxica aos seres vivos (DUFFUS, 1983).

A poluição do solo é causada principalmente por derramamentos acidentais e mau armazenamento de resíduos. A biorremediação é um método efetivo para diminuir a presença de compostos tóxicos no ambiente. Este método visa promover a degradação de compostos para produtos mais simples de ocorrência comum no ambiente, porém, durante o processo, produtos mais tóxicos podem ser gerados. A formação de compostos tóxicos e/ou mutagênicos durante o tratamento pode ser monitorada mediante avaliações da toxicidade (CETESB, 2006).

Navarrete (2006) avaliou a capacidade de comunidades de algas alóctones na detoxicação do solo de *landfarming* de refinaria de petróleo. Amostras das misturas solo de *landfarming*: solo de cerrado bem como os respectivos extratos solubilizados foram submetidas, em intervalos de 45 dias após a inoculação algal, a avaliações toxicológicas empregando minhoca *Eisenia foetida* (Oligochaeta) e sementes de *Eruca sativa* (Crucífera) nas amostras de solo e *Daphnia similis* (Cladocera) e *Girardia tigrina* (Tricladida) nas amostras de extratos solubilizados.

Inazaki *et al.* (2001) avaliaram a toxicidade do composto 1,2-diidro-2,2,4-trimetilquinoleína polimerizada, presente no efluente de uma indústria de produtos químicos. Foram testadas soluções preparadas com o composto, em diferentes concentrações (1;5;10;20;30 e 40 ppm), sendo que o grupo controle foi tratado com água potável. Para cada tratamento utilizou-se 3 placas de Petri, as quais continham papel de filtro, além de cinquenta sementes de *Eruca sativa* em estado dormente. As soluções-teste foram utilizadas para umedecer o papel de filtro, colocando-se inicialmente 1,5 mL de cada solução em cada placa de Petri. Após 24h adicionou-se 1 mL de cada concentração nas respectivas placas, para a manutenção da umidade. Ao final de 48 horas observou-se a taxa de germinação das

sementes. O grupo controle obteve taxa de germinação de 88,66%. As concentrações de 1 e 5 ppm não apresentaram diferença significativa, obtendo-se taxa de germinação de 86% e 84% respectivamente. A partir da concentração de 10 ppm houve inibição no processo de germinação (74,66%), sendo que na concentração de 40 ppm houve 6% de germinação. Os autores concluíram que o teste utilizando sementes de *Eruca sativa* é eficiente no monitoramento da toxicidade quando este composto está presente.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Solo

O solo utilizado nos ensaios de biodegradação é do tipo arenoso com granulometria máxima de 1,41 mm obtido em obras de construção civil da cidade de Rio Claro/SP. A escolha pelo tipo arenoso se deu já que esta é a característica das margens e rios e por sua propriedade mais favorável para o transporte de nutrientes e oxigenação.

#### 4.1.2 Tipos de óleos lubrificantes automotivos estudados

Os óleos lubrificantes semi-sintético e mineral foram comprados no varejo em um posto de combustível localizado na cidade de Rio Claro-SP os quais seguem, abaixo, as especificações:

- a) Óleo Lubrificante Mineral: Texaco-Havoline- SAE 20W-50 (SJ);
- b) Óleo Lubrificante Semi-sintético: Texaco-Havoline – SAE 15W-40 (API SL/CF);
- c) Biodiesel comercial (2% de Biodiesel e 98% de diesel) da Petrobrás Distribuidora.

Os óleos lubrificantes automotivos usados (semi-sintético e o mineral) foram obtidos em um centro de lubrificação na cidade de São Paulo, no bairro São Miguel Paulista em uma loja especializada chamada Carburatork, o óleo foi coletado quando os proprietários foram trocar o óleo dos seus carros e foi perguntado qual o óleo que eles utilizavam e os mesmos confirmaram um uso de óleo lubrificante semi-sintético e mineral em seus respectivos carros. O óleo usado foi proveniente de trocas de lubrificantes de automóveis.

A Sociedade dos Engenheiros Automotivos (SAE) é quem classifica o grau de viscosidade dos lubrificantes aceitos pelas montadoras e pelos próprios fabricantes. De acordo com a instituição, os óleos lubrificantes são divididos em dois grupos: os de “verão”, cuja viscosidade é medida a altas temperaturas (SAE 20, SAE 30, SAE 40, SAE 50 e SAE 60); e os de “inverno” (winter, em inglês), identificados pela letra W com viscosidade medida a baixas temperaturas (SAE 0W, SAE 5W, SAE10W, SAE 15W, SAE 20W e SAE 25W) se comportam como óleos mais “finos” (como os de inverno) no momento da partida do motor, oferecendo assim boa lubrificação e menor resistência ao movimento das peças quando o conjunto está frio. Um exemplo é o SAE 10W/40 que, em baixas temperaturas, se comporta como um produto SAE 10W, facilitando a partida a frio. Em altas, se

comporta como um produto SAE 40, garantindo uma película lubrificante suficientemente espessa para proteção dos componentes.

Comparando um óleo SAE 25W/40 com um SAE 25W/50, pode-se dizer que a baixas temperaturas (ou na partida a frio) eles têm a mesma fluidez, porém a altas temperaturas o óleo SAE 20W/50 forma uma película mais grossa do que um lubrificante SAE 20W/40.

#### **4.1.3 Tipo de óleos vegetais usados**

Óleo de soja Liza Novo

Óleo de soja Liza usado

Biodiesel puro de soja da marca, Caramuru Alimentos S. A.

#### **4.1.4 Microrganismos**

Os microrganismos foram advindos do próprio solo onde se enterrava o inóculo base, localizado atrás do Departamento de Bioquímica e Microbiologia da UNESP - Rio Claro (22° 05' e 22° 40' S, 47° 30' e 47° 55' W).

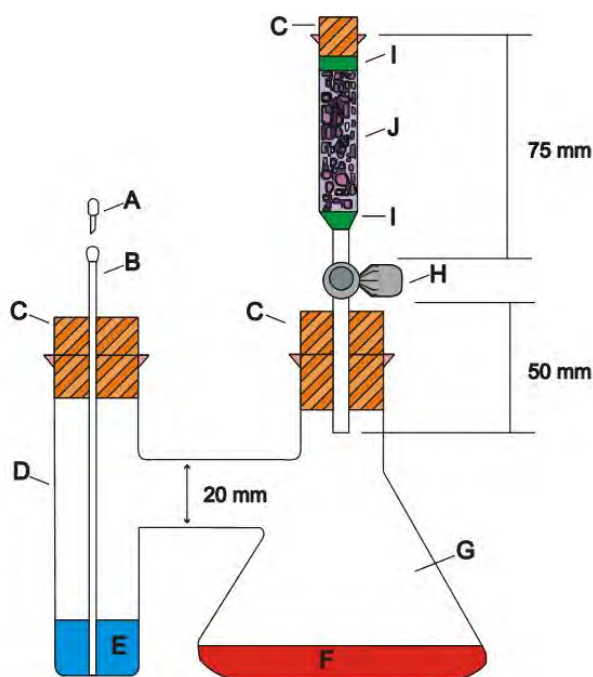
#### **4.1.5 Organismos-teste**

Empregaram-se sementes de *Eruca sativa* (rúcula - Crucífera) e de *Lactuca sativa* (alface) como organismos-teste em bioensaios de toxicidade.

#### **4.1.6 Respirômetro de Bartha e Pramer**

A respiração da comunidade microbiana do solo tem sido utilizada como indicador da atividade biológica em seu perfil, constituindo-se uma ferramenta importante para avaliação do potencial de biodegradação de compostos orgânicos nele disposto. Em vista da baixa solubilidade em água de alguns lubrificantes, normalmente o método respirométrico, que pode medir tanto a evolução do CO<sub>2</sub> quanto à de O<sub>2</sub>, é indicado (CETESB, 1990; BATTERSBY, 2000). Através das medidas de CO<sub>2</sub> produzido durante o período de incubação (diferença entre a produção com resíduo e a do controle correspondente) é possível estimar, os tempos de indução para o início da biodegradação, a velocidade máxima e a fração de resíduo que foi degradado. (CETESB, 1990).

A metodologia utilizada para acompanhar a biodegradação do óleo foi seguida conforme Norma Técnica L6350 (CETESB, 1990) a qual recomenda respirômetros padrão Bartha. A Figura 4, abaixo, ilustra o modelo utilizado:



**Figura 4** - Esquema de um respirômetro de Bartha. A: Tampa da cânula. B: Cânula de diâmetro entre 1 e 2 mm. C: Rolha de borracha. D: Braço lateral de diâmetro ~ 40 mm e altura ~ 100 mm. E: Solução de KOH. F: Solo. G: Frasco Erlenmeyer (250 mL). H: Válvula. I: Suporte com lã de vidro ou algodão. J: Filtro de ascarita de diâmetro ~ 15 mm e altura ~ 40 mm.

#### 4.1.7 Reagentes utilizados no ensaio de respirométrico

##### 4.1.7.1 Água isenta de $CO_2$

Transferiu-se para um béquer de 1000 mL a quantidade desejada de água destilada e levou-se ao bico de Bunsen sobre tela de amianto. Ferveu-se a água até a ebulição durante 30 minutos, evidenciando a redução da solubilidade dos gases no líquido. Transcorrido este período, esperou-se o resfriamento em recipiente com filtro de cal soldada para utilização da água na coleta de dados dos respirômetros.

##### 4.1.7.2 Solução de hidróxido de potássio (KOH - 0,2 M)

Dissolveram-se 11,2 g de KOH em 1000 mL de água isenta de  $CO_2$ . Guardou-se a solução em recipiente plástico, com filtro de ascarita. Padronizou-se, utilizando 100 mL de solução 0,200 N de ftalato ácido de potássio, com duas gotas de indicador vermelho de metila e calculou-se a normalidade real do KOH ( $N_{KOH}$ ), através da expressão:

$$N_{KOH} = \frac{100 \times 0,200}{V_2}, \text{ onde:}$$

$$V_2$$

100 = volume em mL de ftalato ácido de potássio utilizado;

0,200 = normalidade do ftalato de potássio;

$V_2$  = volume em mL de KOH gasto na viragem de vermelho para amarelo.

#### 4.1.7.3 Solução padrão de ftalato ácido de potássio ( $C_6H_4COOKCOOH$ - 0,2 M)

Secou-se o ftalato ácido de potássio em estufa a 110-120°C por 30 minutos e esfriou-se em dessecador até temperatura ambiente. Em seguida, foram pesados 40,86 g de ftalato e transferido a um balão volumétrico de 1000 mL. Completou-se o volume deste com água destilada isenta de  $CO_2$  e armazenou a solução em recipiente de vidro.

#### 4.1.7.4 Solução de ácido clorídrico (HCl - 0,1 M)

Transferiu-se 8,5 mL de HCl concentrado para um balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume com água destilada. Padronizou-se contra 100 mL de solução de carbonato de sódio 0,1 M, usando-se 2 gotas de alaranjado de metila como indicador, e calculando-se a normalidade real do HCl.

$N_{HCl} = \frac{100 \times 0,1}{V_2}$ , onde:

$V_2$

100 = volume em mL de carbonato de sódio utilizado na titulação;

0,1 = normalidade do carbonato de sódio;

$v_2$  = volume em mL de HCl gasto na viragem de amarelo para vermelho.

#### 4.1.7.5 Solução padrão de carbonato de sódio ( $Na_2CO_3$ - 0,1 M)

Secou-se o carbonato de sódio a 200°C por uma hora e esfriou-o em dessecador até temperatura ambiente. Posteriormente, foram pesados 5,30 g de carbonato de sódio e transferido a um balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume deste com água destilada isenta de  $CO_2$  e armazenou a solução em recipiente de vidro.

#### 4.1.7.6 Solução de cloreto de bário ( $BaCl_2$ - 0,1 M)

Dissolveram-se 12,2 g de cloreto de bário e completou-se o volume para 1000 mL com água destilada isenta de  $CO_2$  e guardou-se em recipiente de plástico.

#### 4.1.7.7 Solução indicadora de fenolftaleína

Dissolveram-se 0,2 g de fenolftaleína em 60 mL de etanol e completou-se com água destilada para 100 mL, sob agitação constante. A solução foi filtrada em algodão, quando houve formação de precipitado.

#### 4.1.8 Meios de Cultura

Os meios de cultura foram preparados de acordo com o Manual Difco Laboratories (1984):

- Meio Plate Count Agar (PCA)

Triptona \_\_\_\_\_ 5,0 g  
Extrato de levedura \_\_\_\_\_ 2,5 g  
Glicose \_\_\_\_\_ 1,0 g  
Ágar \_\_\_\_\_ 15,0 g  
Água destilada \_\_\_\_\_ 1000 mL

- Meio Bushnell-Hass (BH)

Sulfato de magnésio \_\_\_\_\_ 0,2 g  
Cloreto de cálcio \_\_\_\_\_ 0,02 g  
Fosfato de potássio monobásico \_\_\_\_\_ 1 g  
Fosfato dibásico \_\_\_\_\_ 1 g  
Nitrato de amônia \_\_\_\_\_ 1 g  
Cloreto férrico \_\_\_\_\_ 0,05 g

#### 4.1.9 Equipamentos e vidraria

Agitador magnético da marca Fisaton

Balança semi-analítica da Gehaka modelo BG 440

Balança analítica da Chyo modelo JK 200

Frascos de Bartha

Peneira de 1.41 mm da Elates

Placas de Petri

Contador de colônias da Tecnal modelo CP600

Shaker da Catel

Câmara de Germinação Tipo B.O.D. da Marconi modelo MA403

Estufa da Nova Ética

Suporte universal

Dessecador

#### 4.1.10 Inóculo do solo

Na preparação do inóculo do solo foram misturados 100 mL de água destilada, 1 mL de Tween 80<sup>®</sup> e 50 mL de uma mistura proporcional dos óleos utilizados (6,25 mL de cada tipo óleo). Assim, esta solução foi colocada em um saco plástico contendo 3 kg de areia homogeneizada e peneirada com peneiras de 1,41 mm da Élates (solo). Em seqüência, foram feitos pequenos furos no saco para permitir trocas gasosas e o fluxo de microrganismos do solo e do meio contaminado no interior do saco, que foi enterrado a uma profundidade aproximada de 20 centímetros. O material permaneceu no solo por 20 dias, período no qual ocorre seleção de microrganismos especializados na degradação dos óleos em análise (LOPES e BIDOIA, 2010).

#### 4.1.11 Inóculo de *Bacillus subtilis*

Para os ensaios respirométricos foi utilizado um inóculo de *Bacillus subtilis* disponível em culturas mantidas em meio de ágar nutriente (NA) a 10°C. Os microrganismos presentes no meio serão reativados por 48 h e, posteriormente inoculados em 50 mL de meio BH (Tabela 2) por 48 h a 35°C para crescimento. Após este período, a cultura de *B. subtilis* obtida será utilizada no preparo do “inóculo aquoso”.

**Tabela 2** – Componentes do meio BH (Bushnell-Hass)

Componentes	Concentração (g L <sup>-1</sup> )
MgSO <sub>4</sub>	0,200
CaCl <sub>2</sub>	0,020
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,000
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,000
FeCl <sub>3</sub>	0,050
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,000

#### 4.1.12 Inóculo aquoso

O meio líquido adicionado nos respirômetros foi denominado “inóculo aquoso”. Seu procedimento metodológico será adaptado de Lopes e Bidoia (2010). Em seu preparo, misturou-se 1 kg do inóculo do solo, 50 mL de inóculo de *B. subtilis*, 75 mL de Tween 80<sup>®</sup> e 1500 mL de água destilada. Esta solução foi muito bem homogeneizada e o meio líquido transferido para os frascos respirométricos foi obtido próximo a superfície da mistura.

#### 4.1.13 Quantificação do CO<sub>2</sub>

A quantificação do CO<sub>2</sub> foi obtida pela titulação da solução de KOH do braço lateral com uma solução de HCl, utilizando-se de BaCl<sub>2</sub> para precipitação de íons carbonato e fenolftaleína como solução indicadora. Os níveis de dióxido de carbono podem ser calculados e representados em função do tempo de incubação (BALBA et al.,1998).

#### 4.1.14 Composição dos sistemas respirométricos

Foram realizados 8 sistemas respirométricos em duplicata, os quais apresentarão 99 mL de inóculo aquoso e 1 mL do óleo a ser estudado (Tabela 3).

**Tabela 3** – Composição dos sistemas respirométricos

	Composto	Abreviação	Inóculo aquoso (mL)	Composto (mL)
<b>Sistema 01</b>	Óleo lubrificante semi-sintético novo	SSN	99	1
<b>Sistema 02</b>	Óleo lubrificante semi-sintético usado	SSU	99	1
<b>Sistema 03</b>	Óleo lubrificante mineral novo	MN	99	1
<b>Sistema 04</b>	Óleo lubrificante mineral usado	M.U	99	1
<b>Sistema 05</b>	Óleo diesel comercial (2% de biodiesel)	B 2	99	1
<b>Sistema 06</b>	Biodiesel 100%	B 100	99	1
<b>Sistema 07</b>	Óleo vegetal de soja novo	VN	99	1
<b>Sistema 08</b>	Óleo vegetal de soja usado	VU	99	1

Também, foi realizado o ensaio controle (C), formado por 99 mL do inóculo aquoso e 1 mL de água destilada. Assim, todos os respirômetros foram hermeticamente fechados e incubados a 28 °C.

#### 4.1.15 Cálculo do CO<sub>2</sub> produzido nos respirômetros

A quantificação de CO<sub>2</sub> produzido nos respirômetros foi gerada a partir do volume gasto de HCl na titulação do KOH. A quantidade de CO<sub>2</sub> gerada em cada respirômetro foi calculada em mg, pela seguinte equação:

$$G_{CO_2} = (A-B) \times 50 \times f_{HCl} \times 0,044 \quad , \text{ onde:}$$

$G_{CO_2}$  = geração de gás carbônico;

A = volume gasto de HCl 0,1 N gasto, em mL, na titulação do branco;

B = volume de HCl 0,1 N gasto, em mL, na titulação da amostra;

50 = fator para transformar equivalente em  $\mu\text{mol}$  de  $\text{CO}_2$ ;

$f_{(\text{HCl})}$  = fator do HCl 0,1 N;

0,044 = fator para transformar  $\mu\text{mol}$  em mg de  $\text{CO}_2$ .

O acúmulo de  $\text{CO}_2$  permite quantificar a biodegradação dos diferentes tipos de óleos. Com esses dados será possível evidenciar do acúmulo de  $\text{CO}_2$  pelo tempo de incubação, que permite determinar qual óleo será o mais biodegradável e quais as condições ideais para o processo.

#### **4.1.16 Testes de Toxicidade**

Os ensaios toxicológicos foram realizados no início e ao final do tratamento utilizando-se de sementes de rúcula (*Eruca sativa*) e sementes de alface (*Lactuca sativa*) e seu método foi adaptado de Guerra (2009).

##### **4.1.16.1 Teste de toxicidade com sementes de *Eruca sativa* (rúcula) e *Lactuca sativa* (alface)**

Foram utilizadas como sistema-teste duas espécies vegetais, *Lactuca sativa* (alface) e *Eruca sativa* (rúcula), onde foram testadas as soluções provenientes dos frascos de Bartha antes e após o tratamento de biorremediação. Os teste foram feitos em duplicatas contendo 50 sementes cada. As sementes serão distribuídas uniformemente em placa de Petri, sobre papel de filtro previamente esterilizado. A cada placa será adicionada 3,5 mL de solução testada, que serão acondicionadas em câmara climática (Incubadora de DBO) a  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , ao abrigo de luz. O controle negativo será composto por água mineral e controle positivo por  $\text{ZnSO}_4$  0,05 N.

A contagem das sementes germinadas foi realizada em intervalos de 24 horas, e serão consideradas germinadas as sementes que apresentarem 2 mm de protusão da radícula. E cada semente germinada será removida após a contagem.

Os teste toxicológicos foram realizados antes e após tratamento.

#### **4.1.17 Forma de análise de resultados**

Foram utilizados os softwares Microsoft Excel e Origin 6.0 para a formação de um banco de dados, a partir do qual serão realizadas análises descritivas por meio de gráficos e tabelas.

Para os testes de toxicidade utilizou-se a fórmula de Abbott (NAKANO, 1981), com adaptações, que fornece a porcentagem da eficiência da germinação (%E). Abaixo segue a fórmula adaptada:

$\%I = (C - T) / C \times 100$ , onde:

$\%I$  = porcentagem de inibição

$C$  = nº de sementes germinadas no controle

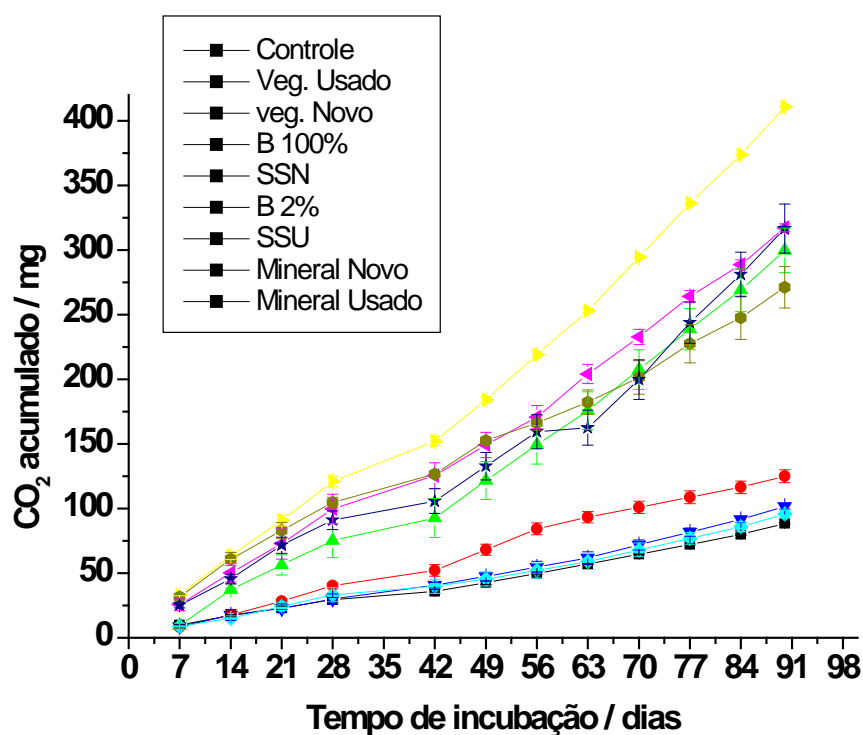
$T$  = nº de sementes germinadas no tratamento

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Biodegradação do óleo lubrificante automotivo mineral (novo e usado) e semi-sintético (novo e usado), Biodiesel puro (100%) e comercial (2% de biodiesel e 98% de diesel) e de óleos vegetal derivado da soja (novo e usado) em meio aquoso com ou sem adição de *Bacillus subtilis*

#### 5.1.1 Quantificação do CO<sub>2</sub> acumulado nos ensaios respirometricos sem *Bacillus subtilis* ao longo dos 90 dias de tratamento.

A partir da Figura 5 e da Tabela 4 e da Tabela 5 pode-se observar a melhor biodegradação do óleo lubrificante automotivo mineral usado (MU), seguido pelo óleo lubrificante mineral novo (MN), seguido pelo óleo lubrificante semi-sintético usado (SSU) e logo em seguida pelo Biodiesel comercial (B 2%), seguido pelo óleo lubrificante semi-sintético novo (SSN), seguido pelo Biodiesel puro (B 100%), seguido pelo óleo vegetal novo (VN) e depois pelo óleo vegetal usado (VU) e por fim, como esperado, o ensaio Controle obteve o menor acúmulo de CO<sub>2</sub>.



**Figura 5** - Gás carbônico (CO<sub>2</sub>) acumulado quantificado em respirômetros de Bartha e Pramer sem o Inóculo de *Bacillus Subtilis*, em meio aquoso, durante 90 dias.

**Tabela 4** – Quantificação de gás carbônico, em mg, resultante da respiração microbiana dos diferentes ensaios sem *B. subtilis* do experimento realizado ao longo de 90 dias

Dia	C-1	C-2	B100-1	B100-2	B2-1	B2-2	VN-1	VN-2	VU-1	VU-2	MN-1	MN-2	MU-1	MU-2	SSN-1	SSN-2	SSU-1	SSU-2
7	10,3	9,68	7,04	9,24	7,48	11,22	9,46	8,14	9,24	8,58	30,36	20,9	33,44	32,56	29,92	33,44	23,1	27,5
14	6,38	8,14	8,8	10,34	28,6	27,28	11,22	6,6	6,16	6,16	27,06	22,22	33,44	27,94	25,96	32,56	18,7	21,56
21	5,06	6,82	10,78	10,56	12,54	25,74	4,4	5,5	5,94	12,32	27,5	17,82	28,16	25,96	20,9	23,1	23,54	28,82
28	6,16	6,6	11,88	12,1	13,42	24,2	7,7	6,82	6,6	11,66	26,18	27,28	29,92	30,36	23,98	19,58	18,48	20,24
42	6,6	5,94	9,24	14,3	15,62	19,36	9,46	12,1	6,38	6,6	24,2	27,28	30,8	31,68	24,42	19,58	12,32	17,16
49	6,82	6,6	16,28	15,84	29,48	28,6	7,48	5,94	5,72	5,72	23,76	23,76	31,02	33,22	28,38	23,54	25,96	28,16
56	7,48	7,04	15,62	16,5	27,28	27,72	8,14	6,38	6,16	6,82	20,68	22,44	34,76	34,98	18,26	8,8	24,2	29,26
63	7,7	6,82	9,24	8,8	26,62	26,18	7,26	7,04	6,6	7,48	31,68	34,98	33,22	34,76	20,02	12,32	2,64	3,52
70	7,92	7,26	7,26	7,92	31,24	32,56	9,46	10,56	9,9	7,92	27,28	30,14	39,6	43,12	22,44	15,62	35,42	38,94
77	8,14	7,04	7,7	8,14	30,58	31,9	9,46	10,34	9,68	8,14	29,92	32,78	42,02	41,36	27,94	24,2	43,56	44,66
84	7,92	7,26	7,7	7,48	29,48	31,02	9,24	10,34	9,68	8,14	23,76	25,52	37,62	37,62	22,22	18,04	35,86	38,5
90	8,58	8,58	8,58	8,8	30,14	31,24	9,9	10,34	10,56	9,24	27,94	29,04	36,96	36,96	22,88	24,42	33,88	37,18

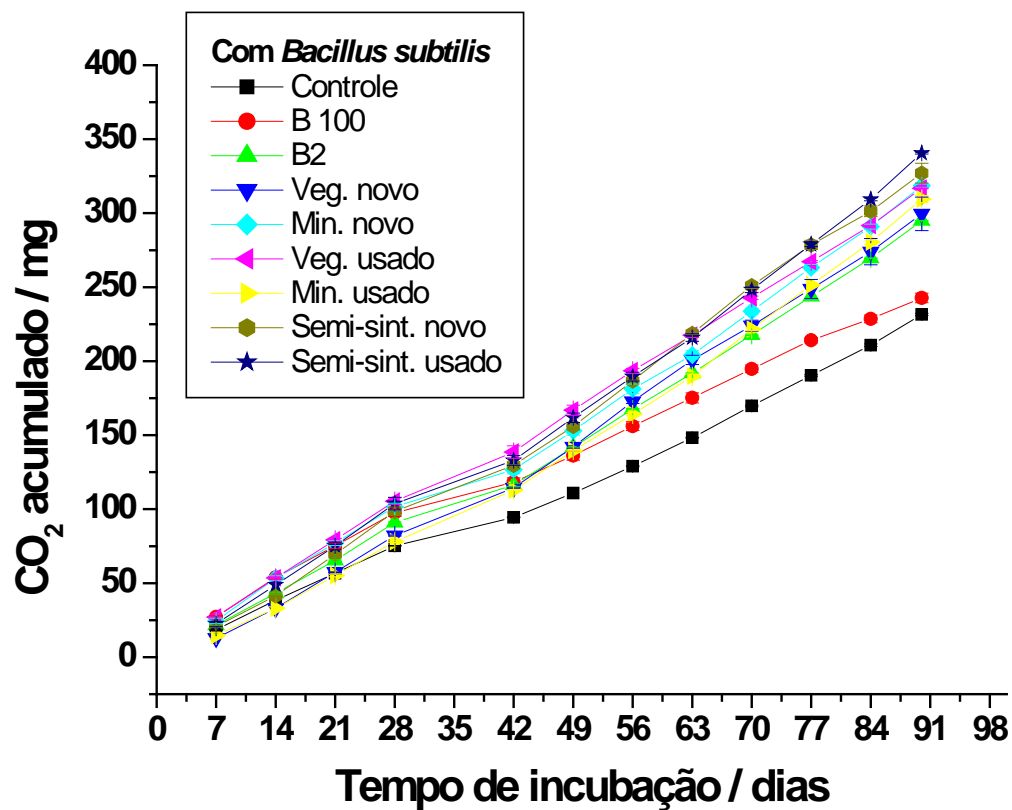
**Tabela 5** – Quantificação de gás carbônico acumulado, em mg, resultante da respiração microbiana dos diferentes ensaios Sem *B. subtilis* do experimento realizado ao longo de 90 dias

Dias	Controle	B 100%	B 2%	VN	VU	MN	MU	SSN	SSU
7	10,01	8,14	9,35	8,8	8,91	25,63	33	31,68	25,3
14	17,27	17,71	37,29	17,71	15,07	50,27	63,69	60,94	45,43
21	23,21	28,38	56,43	22,66	24,2	72,93	90,75	82,94	71,61
28	29,59	40,37	75,24	29,92	33,33	99,66	120,89	104,72	90,97
42	35,86	52,14	92,73	40,7	39,82	125,4	152,13	126,72	105,71
49	42,57	68,2	121,77	47,41	45,54	149,16	184,25	152,68	132,77
56	49,83	84,26	149,27	54,67	52,03	170,72	219,12	166,21	159,5
63	57,09	93,28	175,67	61,82	59,07	204,05	253,11	182,38	162,58
70	64,68	100,87	207,57	71,83	67,98	232,76	294,47	201,41	199,76
77	72,27	108,79	238,81	81,73	76,89	264,11	336,16	227,48	243,87
84	79,86	116,38	269,06	91,52	85,8	288,75	373,78	247,61	281,05
90	88,44	125,07	299,75	101,64	95,7	317,24	410,74	271,26	316,58

### 5.1.2 Quantificação do CO<sub>2</sub> acumulado nos ensaios respirométricos com *Bacillus subtilis* ao longo dos 90 dias de tratamento.

A partir da Figura 6 e da Tabela 6 e da Tabela 7 pode-se observar a melhor biodegradação do óleo lubrificante automotivo semi-sintético usado (SSU), seguido pelo óleo lubrificante semi-sintético novo (SSN), seguido pelo óleo vegetal usado (VU) e logo em seguida pelo óleo lubrificante automotivo mineral novo (MN), seguido pelo óleo lubrificante automotivo mineral usado (MU), seguido pelo óleo

vegetal novo (VN), seguido pelo Biodiesel comercial (B2) e depois pelo Biodiesel puro (B100) e por fim, como esperado, o ensaio Controle obteve o menor acúmulo de CO<sub>2</sub>.



**Figura 6** - Gás carbônico (CO<sub>2</sub>) acumulado quantificado em respirômetros de Bartha e Pramer sem o Inóculo de *Bacillus Subtilis*, em meio aquoso, durante 90 dias.

**Tabela 6** – Quantificação de gás carbônico, em mg, resultante da respiração microbiana dos diferentes ensaios Com *B. subtilis* do experimento realizado ao longo de 90 dias

Dia	C1	C2	B100-1	B100-2	B2-1	B2-2	VN-1	VN2	VU-1	Vu-2	MN-1	MN-2	M U-1	M U-2	SSN-1	SSN-2	SSU-1	SSU-2
7	18	18,92	26,4	27,94	20,68	22,44	12,76	12,76	22,66	26,4	27,06	27,06	12,76	16,5	21,34	20,24	20,68	24,2
14	20,5	19,58	26,18	27,28	21,78	21,56	20,24	20,24	29,26	28,6	26,4	26,62	19,14	17,6	20,68	20,68	28,16	24,64
21	18,7	17,6	20,9	21,78	22,44	21,78	24,64	24,2	23,54	23,76	24,86	26,62	22,44	22	26,4	29,7	28,82	23,76
28	18,3	18,92	21,56	23,1	25,52	25,74	24,86	24,64	23,76	25,3	24,86	27,28	23,1	22,44	27,28	30,8	30,36	26,84
42	19,4	19,14	20,24	21,12	25,08	25,74	31,68	32,56	24,64	25,3	31,24	35,2	35,2	34,54	34,32	27,72	28,16	30,14
49	16,1	16,72	17,82	18,04	26,18	24,64	27,06	28,38	26,18	26,62	29,04	27,5	26,62	26,84	26,18	26,62	28,82	29,04
56	17,8	18,48	20,02	19,8	25,52	26,18	33	28,6	27,94	28,6	28,38	24,86	25,96	23,1	31,02	30,36	27,5	27,94
63	19,8	18,7	18,7	19,58	24,86	23,76	29,7	26,4	23,54	22,44	24,2	23,76	26,18	25,08	32,12	31,9	25,96	26,84
70	21,8	21,12	20,46	18,7	26,18	25,52	23,76	22,44	30,14	28,82	25,74	25,08	31,24	32,56	33,44	31,02	31,68	33
77	20,7	20,68	20,02	18,7	25,52	26,4	27,5	22,22	29,48	29,48	24,86	23,98	28,82	30,8	28,82	26,4	30,36	31,02
84	20,7	20,02	13,64	15,18	25,96	25,74	27,72	22,66	28,16	27,28	25,08	23,76	27,5	30,36	23,32	22,22	29,92	31,02
90	20,7	20,9	13,64	14,74	25,3	25,3	27,94	23,1	28,16	27,06	25,3	24,86	28,16	30,14	28,82	22,66	30,8	31,46

**Tabela 7** – Quantificação de gás carbônico acumulado, em mg, resultante da respiração microbiana dos diferentes ensaios Com *B. subtilis* do experimento realizado ao longo de 90 dias

C	B100	B2	VN	VU	MN	M U	SSN	SSU
30	27,17	21,56	12,76	24,53	27,06	14,63	20,79	22,44
38,5	53,9	43,23	33	53,46	53,57	33	41,47	48,84
56,7	75,24	65,34	57,42	77,11	79,31	55,22	69,52	75,13
75,2	97,57	90,97	82,17	101,64	105,4	77,99	98,56	103,73
94,5	118,25	116,4	114,29	126,61	138,6	112,86	129,58	132,88
111	136,18	141,8	142,01	153,01	166,9	139,59	155,98	161,81
129	156,09	167,6	172,81	181,28	193,5	164,12	186,67	189,53
148	175,23	192	200,86	204,27	217,5	189,75	218,68	215,93
170	194,81	217,8	223,96	233,75	242,9	221,65	250,91	248,27
190	214,17	243,8	248,82	263,23	267,3	251,46	278,52	278,96
211	228,58	269,6	274,01	290,95	291,7	280,39	301,29	309,43
232	242,77	294,9	299,53	318,56	316,8	309,54	327,03	340,56

## 5.2 Toxicidade

## 5.3 Início do tratamento

### 5.3.1 Germinação com sementes de alface (*Lactuca sativa*)

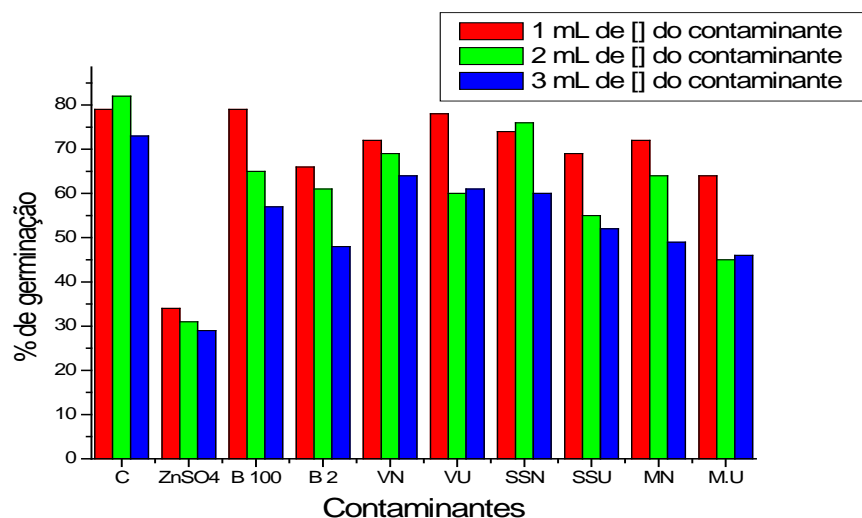
A Figura 7 e as Tabelas 8 e 9 ilustram os resultados dos testes de germinação de sementes de alface com 1mL, 2mL e 3 mL de concentração de cada hidrocarboneto, antes da realização do tratamento.

**Tabela 8** – Taxa de germinação em porcentagem das sementes alface antes do início do tratamento

	<b>Taxa de germinação (%)</b>		
	<i>1ml</i>	<i>2ml</i>	<i>3ml</i>
<b>Controle</b>	79	82	73
<b>ZnSO<sub>4</sub> 2</b>	34	31	29
<b>B 100</b>	79	65	57
<b>B2</b>	66	61	48
<b>VN</b>	72	69	64
<b>VU</b>	78	60	61
<b>SSN</b>	74	76	60
<b>SSU</b>	69	55	52
<b>MN</b>	72	64	49
<b>M.U</b>	64	45	46

**Tabela 9** – Número de sementes germinadas de alface nas 3 concentrações dos contaminantes, antes do tratamento

		Número de sementes germinadas														
		1 mL					2 mL					3 mL				
		24	48	72	96	120	24	48	72	96	120	24	48	72	96	120
<b>Controle</b>	<b>1</b>	12	10	9	5	5	12	10	8	8	6	10	8	9	5	4
	<b>2</b>	11	9	7	7	4	11	8	8	7	4	11	10	7	6	3
<b>ZnSO4</b>	<b>1</b>	7	6	2	0	2	6	5	2	0	1	5	5	2	2	1
	<b>2</b>	10	6	1	0	0	8	5	2	2	0	5	6	2	0	1
<b>B100</b>	<b>1</b>	13	12	9	5	2	10	8	7	2	2	8	9	6	3	2
	<b>2</b>	11	10	8	5	4	11	8	9	6	2	10	9	5	3	2
<b>B2</b>	<b>1</b>	10	7	7	4	3	11	9	4	3	1	10	8	3	3	0
	<b>2</b>	12	8	7	5	3	11	9	6	4	3	11	5	4	2	2
<b>VN</b>	<b>1</b>	11	9	5	4	5	12	9	5	5	2	11	9	7	5	1
	<b>2</b>	12	10	6	7	3	12	11	5	4	4	11	8	8	5	0
<b>VU</b>	<b>1</b>	14	8	7	7	4	12	9	5	2	2	12	9	5	2	2
	<b>2</b>	11	9	7	7	4	10	7	7	5	1	12	10	7	2	0
<b>SSN</b>	<b>1</b>	11	9	8	5	5	12	11	9	4	4	11	7	5	5	2
	<b>2</b>	12	9	7	4	4	12	10	7	5	2	9	7	6	4	4
<b>SSU</b>	<b>1</b>	9	8	7	7	3	10	7	6	3	3	8	8	7	5	2
	<b>2</b>	10	8	7	5	5	8	7	5	3	3	10	5	5	2	0
<b>MN</b>	<b>1</b>	12	10	7	5	3	9	9	6	6	3	8	7	7	3	1
	<b>2</b>	10	7	7	5	6	11	9	5	3	3	11	7	3	1	1
<b>MU</b>	<b>1</b>	9	7	7	5	3	8	8	4	2	2	8	7	5	2	3
	<b>2</b>	10	9	7	4	3	9	7	3	1	1	8	7	2	2	2



**Figura 7** - Porcentagem de sementes germinadas de alface em 1 mL, 2mL e 3mL de concentração dos contaminantes estudados.

### 5.3.2 Germinação com sementes de rúcula

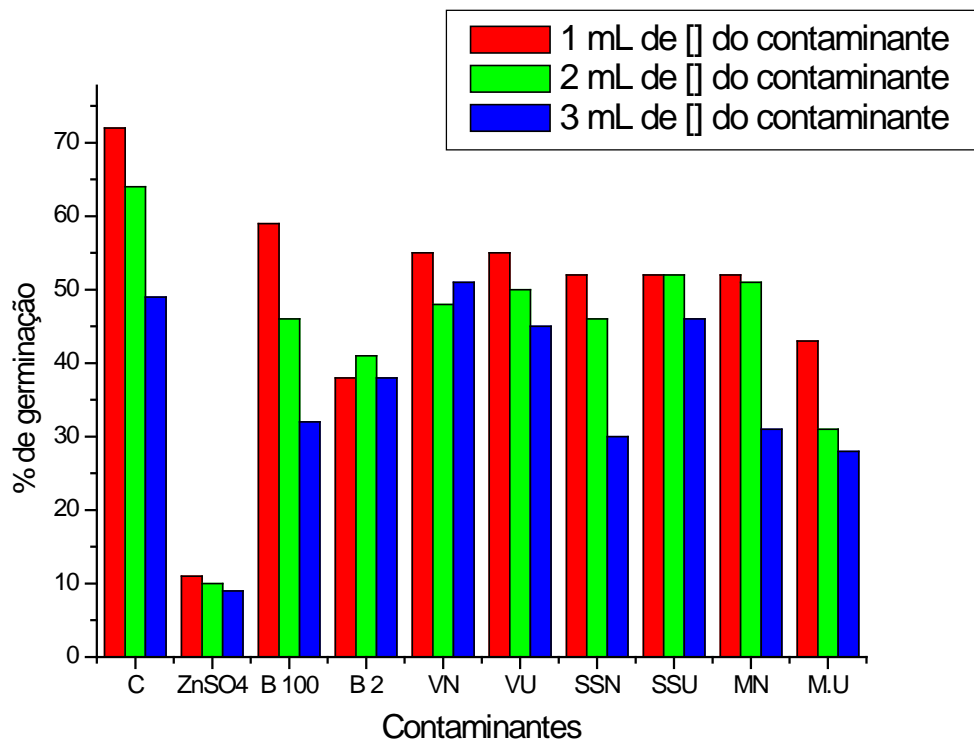
A Figura 8 e a Tabelas 10 e 11 ilustram os resultados dos testes de germinação de sementes de rúcula com 1 mL, 2 mL e 3 mL de concentração de cada hidrocarboneto, antes da realização do tratamento.

**Tabela 10** – Taxa de germinação em porcentagem das sementes de rúcula antes do início do tratamento

	<b><u>Taxa de germinação (%)</u></b>		
	<i>1ml</i>	<i>2ml</i>	<i>3ml</i>
<b>Controle</b>	72	64	49
<b>ZnSO<sub>4</sub> 2</b>	11	10	9
<b>B 100</b>	59	46	32
<b>B2</b>	38	41	38
<b>VN</b>	55	48	51
<b>VU</b>	55	50	45
<b>SSN</b>	52	46	30
<b>SSU</b>	52	52	46
<b>MN</b>	52	51	31
<b>M.U</b>	43	31	28

**Tabela 11** – Número de sementes germinadas de rúcula nas 3 concentrações dos contaminantes, antes do tratamento

		<b>Número de sementes germinadas</b>														
		<b>1 mL</b>					<b>2 mL</b>					<b>3 mL</b>				
		<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>	<b>120</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>	<b>120</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>	<b>120</b>
<b>Controle</b>	<b>1</b>	11	9	9	5	3	10	7	7	6	2	11	7	3	4	1
	<b>2</b>	12	8	7	6	2	9	9	6	5	3	9	6	4	2	2
<b>ZnSO4</b>	<b>1</b>	3	2	2	0	1	1	2	1	1	0	1	2	2	0	0
	<b>2</b>	4	0	2	1	1	1	1	3	0	0	1	0	2	1	0
<b>B100</b>	<b>1</b>	8	9	5	7	1	7	5	6	3	3	5	4	4	1	1
	<b>2</b>	9	8	9	2	1	7	7	4	2	2	7	6	2	2	0
<b>B2</b>	<b>1</b>	9	6	3	3	1	8	7	4	3	0	6	6	5	3	0
	<b>2</b>	6	5	1	2	2	7	5	5	2	0	7	4	5	0	2
<b>VN</b>	<b>1</b>	10	6	4	3	3	9	8	5	2	2	9	8	5	2	2
	<b>2</b>	8	9	6	4	2	8	5	5	3	1	9	7	7	2	0
<b>VU</b>	<b>1</b>	11	8	6	3	3	9	7	4	4	1	9	5	5	0	1
	<b>2</b>	7	7	5	3	2	7	8	6	2	2	7	6	7	4	1
<b>SSN</b>	<b>1</b>	5	6	8	5	3	5	7	3	4	3	3	6	6	2	2
	<b>2</b>	7	7	5	3	3	5	6	4	6	3	4	3	1	2	1
<b>SSU</b>	<b>1</b>	8	5	5	2	2	7	8	5	2	1	6	8	5	2	1
	<b>2</b>	9	6	7	4	4	10	8	7	4	0	8	6	3	0	1
<b>MN</b>	<b>1</b>	9	8	5	3	3	7	8	6	3	2	6	6	3	1	0
	<b>2</b>	7	7	4	5	1	7	5	5	5	3	5	3	4	3	0
<b>MU</b>	<b>1</b>	7	4	5	2	2	4	6	3	2	0	5	5	5	1	0
	<b>2</b>	11	5	5	2	0	8	7	0	1	0	5	2	3	1	0



**Figura 8** - Porcentagem de sementes germinadas de rúcula em 1 mL, 2 mL e 3 mL de concentração dos contaminantes estudados.

### 5.3.3 Final do tratamento

#### 5.3.3.1 Germinação de sementes de alface

##### 5.3.3.1.1 Sem *Bacillus subtilis*

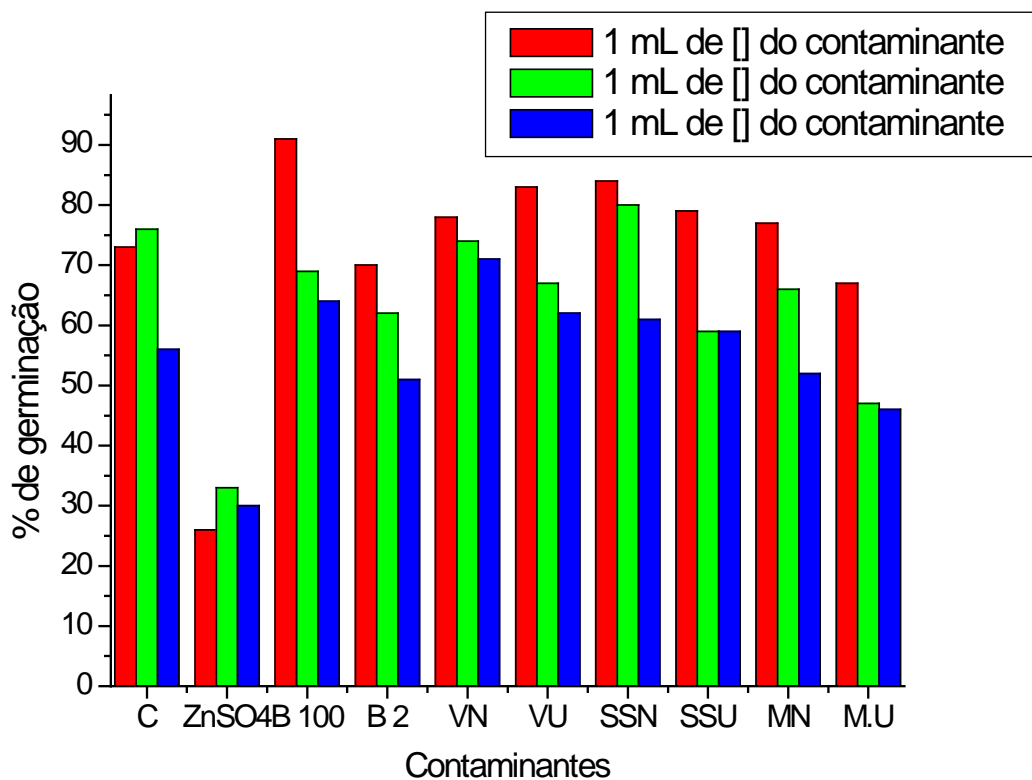
A Figura 9 e a Tabela 12 e 13 ilustram os resultados dos testes de germinação de sementes de alface com 1 mL, 2 mL e 3 mL de concentração de cada hidrocarboneto, *sem adição de B. subtilis*, ao final do tratamento.

**Tabela 12** – Taxa de germinação em porcentagem das sementes de alface ao final do tratamento sem *Bacillus subtilis*

	<b>Taxa de germinação (%)</b>		
	<i>1ml</i>	<i>2ml</i>	<i>3ml</i>
<b>Controle</b>	73	76	56
<b>ZnSO<sub>4</sub> 2</b>	26	33	30
<b>B 100</b>	91	69	64
<b>B2</b>	70	62	51
<b>VN</b>	78	74	71
<b>VU</b>	83	67	62
<b>SSN</b>	84	80	61
<b>SSU</b>	79	59	59
<b>MN</b>	77	66	52
<b>M.U</b>	67	47	46

**Tabela 13** – Número de sementes germinadas de Alface nas 3 concentrações dos contaminantes ao final do tratamento (90 dias), sem adição do inóculo de *Bacillus subtilis*

		<b>Sem <i>Bacillus subtilis</i></b>														
		<b>1 mL</b>					<b>2 mL</b>					<b>3 mL</b>				
		<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>	<b>120</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>	<b>120</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>	<b>120</b>
<b>Controle</b>	<b>1</b>	10	11	9	5	5	8	9	9	8	6	8	7	5	4	4
	<b>2</b>	11	7	6	4	5	10	9	8	4	5	6	8	6	5	3
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	<b>1</b>	8	5	2	0	2	7	4	2	0	1	5	5	3	2	0
	<b>2</b>	11	7	0	0	1	9	6	2	1	1	6	7	2	0	0
<b>B100</b>	<b>1</b>	14	13	11	6	3	11	10	7	3	2	9	9	5	5	3
	<b>2</b>	12	11	10	7	4	12	8	8	5	3	11	10	6	3	3
<b>B2</b>	<b>1</b>	11	8	7	4	2	11	10	5	4	1	10	8	5	2	1
	<b>2</b>	13	9	8	6	2	12	11	6	2	0	11	6	3	3	2
<b>VN</b>	<b>1</b>	11	10	5	6	5	13	8	7	5	2	13	11	7	2	3
	<b>2</b>	14	11	7	7	2	14	10	6	6	3	12	10	9	3	1
<b>VU</b>	<b>1</b>	15	9	7	8	3	13	10	6	3	2	10	9	4	3	2
	<b>2</b>	12	10	8	6	5	11	10	7	2	3	11	11	6	4	2
<b>SSN</b>	<b>1</b>	12	11	7	8	5	14	11	8	5	3	12	9	5	3	1
	<b>2</b>	13	10	8	5	5	12	10	9	4	4	10	7	6	5	3
<b>SSU</b>	<b>1</b>	10	9	7	8	4	11	8	6	4	3	9	8	6	4	3
	<b>2</b>	11	8	10	6	6	9	7	5	4	2	10	6	5	5	3
<b>MN</b>	<b>1</b>	13	11	6	5	4	11	9	6	4	2	10	8	5	3	1
	<b>2</b>	10	8	9	5	6	12	10	5	4	3	11	6	5	2	1
<b>MU</b>	<b>1</b>	10	8	7	5	2	9	8	4	3	1	9	6	5	4	1
	<b>2</b>	11	9	8	3	4	10	6	2	2	2	8	5	3	3	2



**Figura 9** - Porcentagem de sementes germinadas de alface em 1 mL, 2 mL e 3 mL de concentração dos contaminantes estudados ao final do tratamento sem a adição do Inóculo de *Bacillus subtilis*.

#### 5.3.3.1.2 Com *Bacillus subtilis*

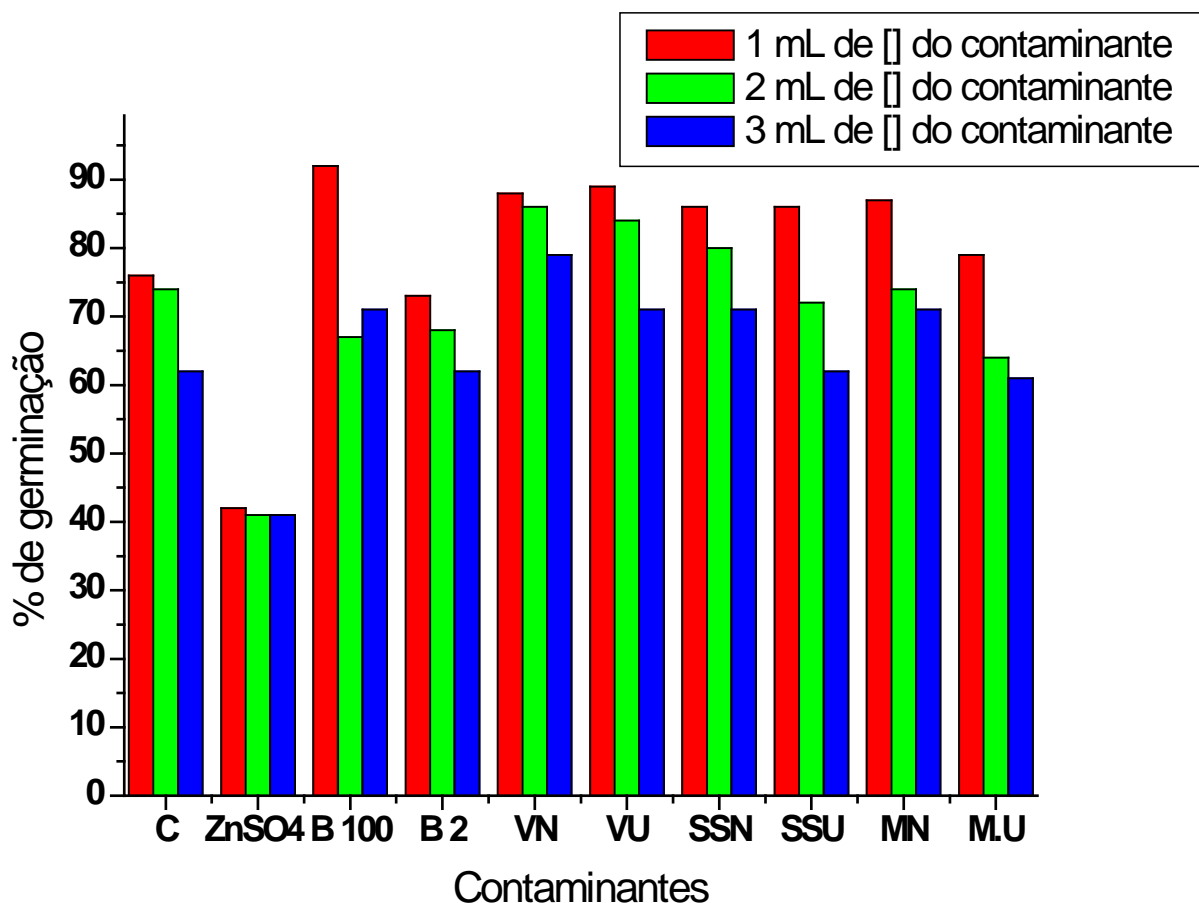
A Figura 10 e as Tabelas 14 e 15 ilustram os resultados dos testes de germinação de sementes de alface com 1 mL, 2 mL e 3 mL de concentração de cada hidrocarboneto, com a adição de *B. subtilis*, ao final do tratamento.

**Tabela 14** – Taxa de germinação em porcentagem das sementes de alface ao final do tratamento com adição do inoculo de *Bacillus subtilis*

	<b>Taxa de germinação (%)</b>		
	<i>1ml</i>	<i>2ml</i>	<i>3ml</i>
<b>Controle</b>	76	74	62
<b>ZnSO<sub>4</sub> 2</b>	42	41	41
<b>B 100</b>	92	67	71
<b>B2</b>	73	68	62
<b>VN</b>	88	86	79
<b>VU</b>	89	84	71
<b>SSN</b>	86	80	71
<b>SSU</b>	86	72	62
<b>MN</b>	87	74	71
<b>M.U</b>	79	64	61

**Tabela 15** - Número de sementes germinadas de Alface nas 3 concentrações dos contaminantes, ao final do tratamento (90 dias) com a adição do inóculo de *Bacillus subtilis*.

		<b>Com <i>Bacillus subtilis</i></b>														
		<b>1 mL</b>					<b>2 mL</b>					<b>3 mL</b>				
		<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>	<b>120</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>	<b>120</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>	<b>120</b>
<b>Controle</b>	<b>1</b>	11	10	9	6	5	9	10	8	6	5	9	6	5	6	4
	<b>2</b>	9	8	7	5	6	11	9	7	5	4	7	8	7	6	4
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	<b>1</b>	9	6	4	1	2	9	5	5	2	0	9	5	5	3	0
	<b>2</b>	10	8	0	1	1	8	7	3	1	1	8	6	3	1	1
<b>B100</b>	<b>1</b>	15	11	10	7	5	10	9	7	4	3	10	8	7	6	4
	<b>2</b>	12	12	9	6	5	11	7	8	5	3	11	9	7	7	2
<b>B2</b>	<b>1</b>	10	9	8	5	3	10	11	6	5	2	11	9	6	3	2
	<b>2</b>	11	10	7	7	3	13	10	7	3	1	12	8	4	4	3
<b>VN</b>	<b>1</b>	12	11	8	6	5	12	10	9	7	5	13	11	8	5	2
	<b>2</b>	13	11	9	7	6	13	11	8	6	5	12	11	10	4	3
<b>VU</b>	<b>1</b>	14	10	8	7	5	14	11	8	7	5	13	10	5	3	4
	<b>2</b>	13	11	9	7	5	12	9	6	8	4	11	9	6	6	4
<b>SSN</b>	<b>1</b>	13	11	9	5	7	14	10	5	6	5	12	10	6	5	2
	<b>2</b>	14	9	8	4	6	15	12	5	3	5	11	8	7	6	4
<b>SSU</b>	<b>1</b>	11	10	8	9	5	12	9	8	6	3	11	8	9	3	2
	<b>2</b>	13	9	9	7	5	10	11	6	5	2	10	7	7	3	2
<b>MN</b>	<b>1</b>	13	12	7	6	5	12	11	7	4	6	11	10	6	6	1
	<b>2</b>	11	10	8	8	7	10	10	7	3	4	13	10	5	6	3
<b>MU</b>	<b>1</b>	12	9	10	6	2	12	9	6	5	2	10	10	6	5	3
	<b>2</b>	11	11	8	5	5	11	8	6	4	1	9	6	6	6	0



**Figura 10** - Porcentagem de sementes germinadas de alfaca em 1 mL, 2 mL e 3 mL de concentração dos contaminantes estudados ao final do tratamento com a adição do Inóculo de *Bacillus subtilis*.

### 5.3.3.2 Germinação de sementes de rúcula

#### 5.3.3.2.1 Sem *Bacillus subtilis*

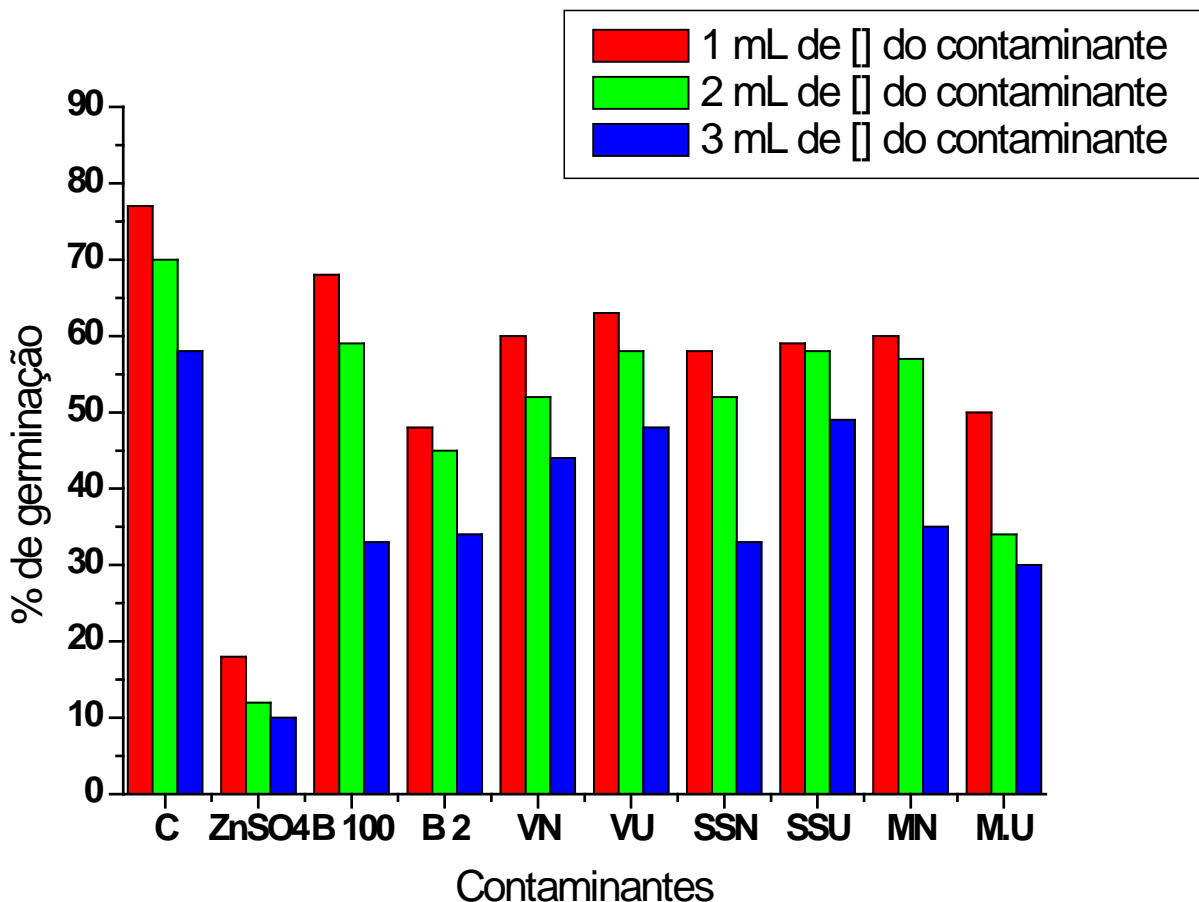
A Figura 11 e as Tabelas 16 e 17 ilustram os resultados dos testes de germinação de sementes de rucula com 1 mL, 2 mL e 3 mL de concentração de cada hidrocarboneto, *sem adição de B. subtilis*, ao final do tratamento.

**Tabela 16** - Taxa de germinação em porcentagem das sementes de rúcula ao final do tratamento sem a adição do inóculo de *Bacillus subtilis*

	<b>Taxa de germinação (%)</b>		
	<i>1ml</i>	<i>2ml</i>	<i>3ml</i>
<b>Controle</b>	77	70	58
<b>ZnSO<sub>4</sub> 2</b>	18	12	10
<b>B 100</b>	68	59	33
<b>B2</b>	48	45	34
<b>VN</b>	60	52	44
<b>VU</b>	63	58	48
<b>SSN</b>	58	52	33
<b>SSU</b>	59	58	49
<b>MN</b>	60	57	35
<b>M.U</b>	50	34	30

**Tabela 17** - Número de sementes germinadas de rúcula nas 3 concentrações dos contaminantes ao final do tratamento (90 dias), sem adição do inóculo de *Bacillus subtilis*

		<b>Sem <i>Bacillus subtilis</i></b>														
		<b>1 mL</b>					<b>2 mL</b>					<b>3 mL</b>				
		<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>	<b>120</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>	<b>120</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>	<b>120</b>
<b>Controle</b>	<b>1</b>	12	9	7	5	5	10	9	10	6	2	10	6	8	3	3
	<b>2</b>	11	10	8	6	4	12	6	7	4	4	11	7	5	3	2
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	<b>1</b>	3	3	1	2	0	2	2	0	1	2	0	3	1	0	1
	<b>2</b>	0	4	2	2	1	1	1	0	3	1	0	1	2	2	0
<b>B100</b>	<b>1</b>	10	10	8	5	2	8	8	5	5	2	7	3	3	1	0
	<b>2</b>	11	8	9	3	2	9	6	4	3	3	8	5	2	2	2
<b>B2</b>	<b>1</b>	10	7	3	3	1	8	7	4	3	2	8	5	4	1	0
	<b>2</b>	7	7	6	2	2	8	6	3	3	1	7	4	5	0	0
<b>VN</b>	<b>1</b>	11	5	5	5	2	10	8	5	3	1	8	9	6	3	0
	<b>2</b>	8	10	7	4	3	9	6	4	4	2	11	8	5	4	0
<b>VU</b>	<b>1</b>	12	9	6	4	4	10	8	5	3	2	10	6	5	2	0
	<b>2</b>	8	8	7	2	3	9	7	7	4	3	9	6	6	3	1
<b>SSN</b>	<b>1</b>	5	7	9	5	4	6	8	4	4	5	3	6	8	2	2
	<b>2</b>	8	7	6	3	4	6	6	5	5	3	3	4	2	3	0
<b>SSU</b>	<b>1</b>	9	6	6	3	2	8	8	6	2	2	7	8	5	4	1
	<b>2</b>	10	8	5	5	5	11	8	8	5	0	9	6	5	2	2
<b>MN</b>	<b>1</b>	10	9	6	4	3	9	8	6	3	2	7	6	3	1	1
	<b>2</b>	8	6	7	5	2	9	6	6	5	3	5	5	4	2	1
<b>MU</b>	<b>1</b>	8	5	6	3	1	6	6	3	1	1	6	5	5	0	1
	<b>2</b>	11	6	7	2	1	9	5	2	1	0	5	3	4	0	1



**Figura 11** - Porcentagem de sementes germinadas de rúcula em 1 mL, 2 mL e 3 mL de concentração dos contaminantes estudados ao final do tratamento sem a adição do Inóculo de *Bacillus subtilis*.

#### 5.3.3.2.2 Com *Bacillus subtilis*

A Figura 12 e as Tabelas 18 e 19 ilustram os resultados dos testes de germinação de sementes de rúcula com 1 mL, 2 mL e 3 mL de concentração de cada hidrocarboneto, com a adição de *B. subtilis*, ao final do tratamento.

**Tabela 18** - Taxa de germinação, em porcentagem, das sementes de rúcula ao final do tratamento com a adição do inóculo de *Bacillus subtilis*

	<b>Taxa de germinação (%)</b>		
	<i>1ml</i>	<i>2ml</i>	<i>3ml</i>
<b>Controle</b>	68	70	60
<b>ZnSO<sub>4</sub> 2</b>	26	20	17
<b>B 100</b>	76	58	48
<b>B2</b>	53	48	38
<b>VN</b>	69	56	51
<b>VU</b>	67	53	48
<b>SSN</b>	62	52	47
<b>SSU</b>	61	44	51
<b>MN</b>	57	53	43
<b>M.U</b>	55	36	30

**Tabela 19** - Número de sementes germinadas de Rúcula nas 3 concentrações dos contaminantes, ao final do tratamento (90 dias) com a adição do inóculo de *Bacillus subtilis*.

		<b>com <i>Bacillus subtilis</i></b>														
		<b>1 mL</b>					<b>2 mL</b>					<b>3 mL</b>				
		<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>	<b>120</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>	<b>120</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>	<b>120</b>
<b>Controle</b>	<b>1</b>	10	11	8	4	4	11	7	11	6	4	10	7	6	3	3
	<b>2</b>	10	8	6	5	2	9	10	6	3	3	11	9	4	4	3
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	<b>1</b>	5	3	2	0	1	3	3	1	1	0	4	2	2	0	0
	<b>2</b>	7	4	2	2	0	5	4	1	1	1	2	5	1	1	0
<b>B100</b>	<b>1</b>	13	9	10	5	1	10	9	6	2	1	7	8	4	4	2
	<b>2</b>	11	10	9	6	2	12	7	6	4	1	10	7	5	2	0
<b>B2</b>	<b>1</b>	9	6	5	2	1	9	8	3	3	0	8	7	4	1	1
	<b>2</b>	11	7	5	5	2	10	8	5	2	0	9	5	2	1	0
<b>VN</b>	<b>1</b>	10	9	4	4	3	11	6	5	2	1	11	9	5	1	0
	<b>2</b>	13	11	8	6	1	12	8	8	3	0	9	9	6	1	0
<b>VU</b>	<b>1</b>	14	8	6	6	3	11	9	4	2	2	11	8	2	0	1
	<b>2</b>	10	9	5	3	3	11	7	4	3	0	12	7	6	1	0
<b>SSN</b>	<b>1</b>	10	9	5	2	4	11	7	3	1	1	12	7	4	2	1
	<b>2</b>	10	9	7	4	2	11	9	6	2	1	7	8	4	2	0
<b>SSU</b>	<b>1</b>	8	8	5	5	2	9	8	4	4	0	11	7	5	3	1
	<b>2</b>	10	9	9	2	3	9	5	4	1	0	12	7	3	2	0
<b>MN</b>	<b>1</b>	11	10	5	2	2	10	8	5	2	1	7	7	3	1	1
	<b>2</b>	8	7	7	3	2	9	8	2	6	2	9	5	4	4	2
<b>MU</b>	<b>1</b>	9	8	4	4	4	6	7	4	1	1	7	5	2	3	0
	<b>2</b>	9	9	5	2	1	8	5	1	3	0	5	4	2	0	2

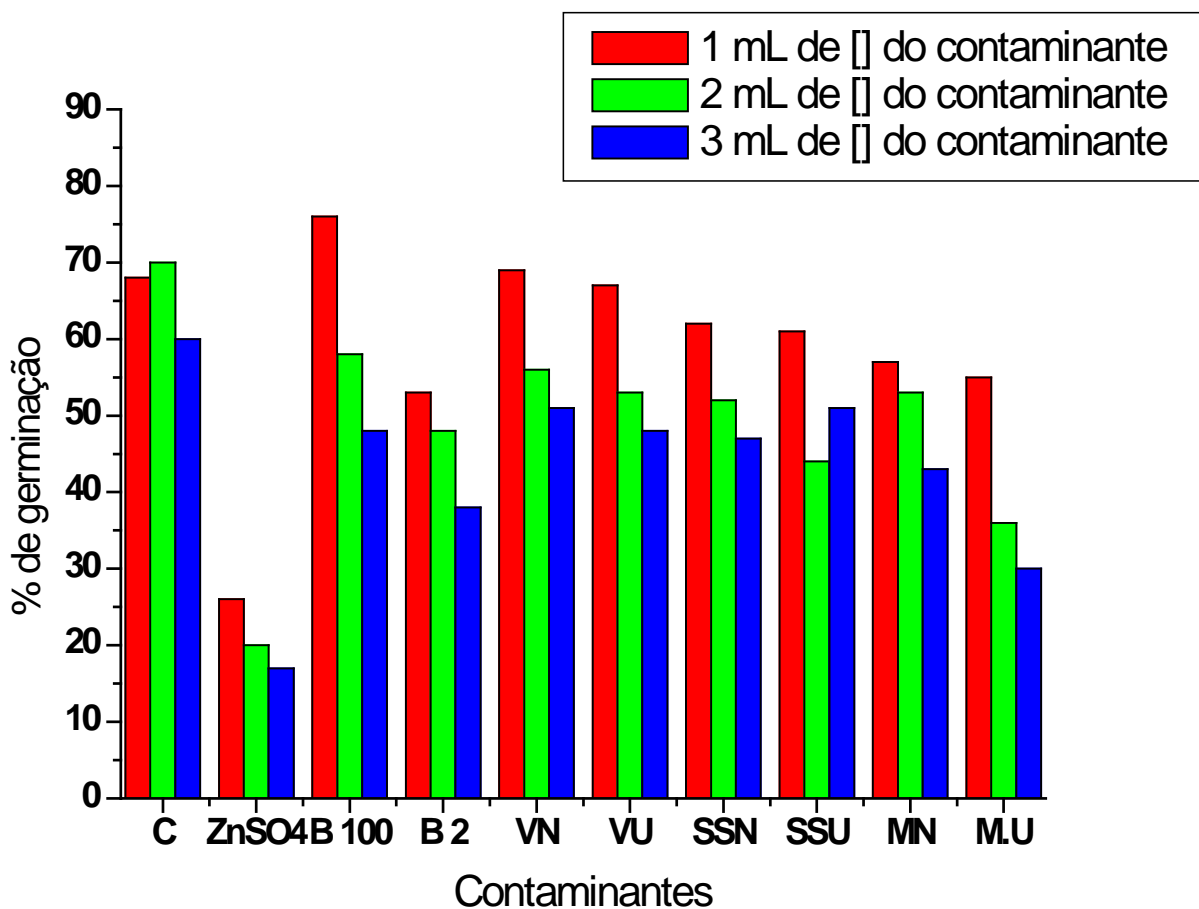


Figura 12: Porcentagem de sementes germinadas de rúcula em 1mL, 2mL e 3mL de concentração dos contaminantes estudados ao final do tratamento com a adição do Inóculo de *Bacillus subtilis*.

## 6 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos no estudo da biodegradação dos óleos, tanto no método de Bartha como por colorimetria, foi possível constatar quais óleos foram mais facilmente degradados.

Os ensaios contendo o Controle, o Biodiesel puro, o óleo vegetal novo e o óleo vegetal usado obtiveram uma melhor biodegradabilidade com a adição do Inóculo de *Bacillus subtilis* enquanto o óleo lubrificante automotivo mineral usado e os óleos lubrificantes semi-sintético novo e usado obtiveram melhor biodegradabilidade sem a adição do Inóculo de *Bacillus subtilis*. Por fim, o biodiesel comercial e o óleo lubrificante mineral novo não apresentaram diferenças significativas da sua biodegradação.

O estudo também permitiu verificar que, de fato, a biorremediação é um mecanismo válido para tratar ambientes afetados negativamente por poluentes.

Com relação aos testes toxicológicos podemos concluir que a *Lactuca sativa* (alface) não se mostrou um bom organismo teste para o ensaio em questão, sua alta taxa de germinação em todas as concentrações dos óleos dificulta estabelecer alguma conclusão, apesar da germinação diminuir um pouco com o aumento da concentração do contaminante esse decaimento pode não ser pela toxicidade e sim pelas condições da semente (taxa natural de germinação).

Já os testes com sementes *Eruca sativa* (rúcula) se mostrou mais eficaz, apesar de que nas concentrações de 1mL não se pode notar diferenças significativas na toxicidade entre os óleos.

Nos ensaios contendo 2 mL e 3 mL de concentração antes e após o tratamento mostrou que o óleo mineral usado é o mais tóxico, isso demonstra que devemos o descarte desse óleo deve ser feito de maneira adequada.

O Biodiesel puro (B100) se mostrou mais tóxico ao final do tratamento nas concentrações de 2 mL e 3 mL, isso se deve provavelmente ao fato de que a biodegradação desse óleo pode ter gerado alguma substância mais tóxica e isso dificultou ainda mais a germinação.

O biodiesel comercial (B2) não mostrou grandes diferenças na toxicidade, entretanto no ensaio de 2 mL antes do tratamento mostrou uma menor toxicidade em relação ao final do tratamento e o ensaio de 3 mL do tratamento sem *B. subtilis* sem mostrou o menos tóxico em relação aos outros ensaios desse óleo.

O óleo vegetal novo se mostrou menos tóxico no ensaio de 2 mL antes do tratamento e ensaio de 3 mL o menos tóxico foi o que não recebeu o inoculo de *B. subtilis*. O óleo vegetal usado (VU); o óleo lubrificante semi-sintético novo (SSN); o óleo mineral usado (M.U) e o óleos mineral novo (MN)

se mostraram menos tóxicos antes do tratamento em ambas as concentrações, isso se deve ao fato da biodegradação gerar, provavelmente, alguma substância que dificulta a germinação.

O óleo lubrificante semi-sintético usado (SSU) se mostrou menos tóxico na concentração de 2 mL após o tratamento com a adição de *B. subtilis* e na concentração de 3 mL e menos tóxico foi o ensaio antes do tratamento, apesar que não houve grandes diferenças entre os testes.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLINGER, N. L. et al; **Química Orgânica**; 2ª Ed.; Editora Guanabara Dois, Rio de Janeiro, 1990.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT – **NBR 14283 Resíduos em solo** – Determinação da Biodegradação pelo método respirométrico, 1999.
- ATLAS, R. M.; HOROWITZ, A.; KRICHEVSKY, M. Response of microbial population to environmental disturbance. *Microbial Ecology*, Vol. 22, pág.1157-1165, 1991.
- ATLAS, R. M. Bioremediation of Petroleum Pollutants. **International biodeterioration and Biodegradation**, v. 35, n. 1-3, p. 317-327, 1995.
- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. Stimulated biodegradation of oil slicks using oleophilic fertilizers. **Environ. Sci. Technol.**, n. 7, p.538-541, 1973.
- AUSTIN, B.; CALOMIRIS, J.J.; WALKER, J.D.; COLWELL, R.R. Numerical taxonomy and ecology and petroleum degrading bacteria. **Applied e Environmental microbiology**, v.34, p. 60-68, 1977.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. ATSDR. Toxicological profile for ethylbenzene. Atlanta, 1999.
- BALBA, M. T.; AL. AWADHI, N.; AL. DAHER, R. Biorremediation of Oil – Contaminated Soil: Microbiologics Methods for Feasibillite, Assessement and Field, Evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, Vol.32. pág. 3155-164, 1998.
- BAPTISTA, S.J.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.D.C. Production of CO<sub>2</sub> in crude oil bioremediation in clay soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48, p. 249-255, 2005.
- BARBIERI, S.M. **Estudos da Biodegradação de compostos aromáticos por linhagens bacterianas**. Dissertação de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 213 p., 1944.
- BARBOSA, S. P. P; CAMINHA M. C. C.; PAZ M. C. F. Identificação da Microbiota Bacteriana Autóctone de Efluentes Petroquímicos no Município de Fortaleza. **II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica João Pessoa - PB** – 2007.
- BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; MARÓSTICA JUNIOR, M.R.; PASTORE, G.M. Surfactina: Propriedades Químicas, Tecnológicas e Funcionais para Aplicação em Alimentos. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 2. pág. 409-414, 2007
- BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Science**, Vol.100, n. 1, pág.68-70, 1965.

- BASU, B.; SINGH, M. P.; KAPUR, G. S.; NAZAKATI ALI; SASTRY, M. I. S.; JAIN, S. K.; SRIVASTAVA, S. P.; BHATNAGAR, A. K. Prediction of biodegradability of mineral based oils from chemical composition using artificial neural networks. **Tribology International**, v. 31, n. 4, p. 159-168, 1998.
- BATTERSBY, N. S. The biodegradability and microbial toxicity testing of lubricants – some recommendations. **Chemosphere**, Vol. 41, pág. 1011-1027, 2000.
- BENGTSSON, G.; ZERHOUNI, P. Effects of carbon substrate enrichment and DOC concentration on biodegradation of PAHs in soil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 608-617, 2003.
- BETTIOL, W.; CAMARGO, O.A. (Ed.). **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto**. Jaguariúna: EMBRAPA, 2000.
- BHATNAGAR, L., FATHEPURE, B.Z. Mixed cultures in detoxification of hazardous waste. In: ZEIKUS, G., JOHNSON, E.A. (Org.) **Mixed cultures in biotechnology**. New York: McGraw-Hill, p. 293-340, 1991.
- BIOCOMBUSTÍVEIS. Perguntas e respostas sobre este novo mercado. Rio de Janeiro: [S.n.], 2007. 50p. Disponível em: <[http://www2.petrobras.com.br/petrobras/portugues/pdf/Cartilha\\_Biocombustiveis.pdf](http://www2.petrobras.com.br/petrobras/portugues/pdf/Cartilha_Biocombustiveis.pdf)>. Acesso em: 09 AGO. 2011.
- BICCA, F.C.; FLECK, L.C.; AYUB, M.A. Production of Biosurfactant by Hydrocarbon Degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia**, Vol.30, n.3, 1999.
- BRASSERES, A., EYRAUD, P., LADOUSSE, A; TRAMIER, B. Enhancements of spilled oil biodegradation by nutrients of natural origin. In: **Proceedings, 1993 International Oil Spill Conference**, p.495-501, 1993. American Petroleum Institute, Washington, DC, USA
- BRAGA, B. et al. **Introdução à Engenharia Ambiental**. São Paulo: Prentice Hall, 2002.
- BRITTON, L. N. Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. In: GIBSON, D. T. (Ed), **Microbial Degradation of Organic Compounds**, Marcel Dekker Inc., New York, 1984.
- BROCK, T. D.; MADINGAN, M. T. **Biology of Microorganisms**, 6<sup>th</sup> edition. Prentice-hall, New Jersey, 1991.
- BUNDY, J.G.; PATON, G.I.; CAMPBELL, C.D. Microbial communities in different soil types do not converge after diesel contamination. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 276-288, 2002.
- CARDOSO, M.N.L.; CHASIN, A.M.A. **Ecotoxicologia do cádmio e seus compostos**. (série Cadernos de Referência Ambiental), v.6. Salvador, 2001.

- CASARINI, D. C. P.; MACEDO, R. M.; CUNHA, R. C. de A.; MAUGER, J. C. O. The development of assessment techniques to evaluate the biodegradation of oily sludge in a landfarm system. **Water Science Technology**, v. 20, n. 10, p. 231-236, 1988.
- CERNIGLIA, C.E. Microbial Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Advances in Applied Microbiology**, v. 30, p. 31-69, 1984.
- CETESB, Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. “Solos – Determinação da Biodegradação de resíduos – Método respirométrico de Bartha”. São Paulo: Norma Técnica L6.350, 1990. 15p.
- CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Relatório de Estabelecimento de Valores Orientados para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo**. Disponível em: <[www.cetesb.sp.gov.br/solo/relatórios.asp](http://www.cetesb.sp.gov.br/solo/relatórios.asp)>. Acesso em 23 agosto 2011.
- COELHO, M.F. **Estudo do uso de fertilizantes NPK imobilizado na biorremediação de derrames de petróleo no mar: simulação em laboratório**. Monografia de Conclusão de Curso. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Macaé, Rio de Janeiro, 36p., 2005.
- COLLA L.M. Obtenção e Aplicação de Biossurfactantes. **Vetor**, Rio Grande, Vol.13. pág.85-103, 2003.
- COTTON, F. O.; WISHMAN, M. L.; GOETZINGER, J. W.; REYNOLDS, J. W. Analysis of 30 used motor oils. **Hydrocarb. Proc.**, v. 22, p. 131-140, 1977.
- CRIVELARO, S.H. **Associação de borra oleosa de refinaria de petróleo e vinhaça visando a biodegradação**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 62 p., 2005.
- CUNHA, C.D.; LEITE, S.G.F., Gasoline biodegradation in different soil microcosms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 45-49, 2000. ISSN 1517-8382.
- DE-POLLI, H.; GUERRA, J. G. M. **Determinação do carbono da biomassa microbiana do solo: método de fumigação-extração**. Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1997. 10 f. (Embrapa- CNPAB. Documentos, 37).
- DEL'ARCO, J.P.; FRANÇA, F.P. Biodegradação de óleo cru em sedimento arenoso. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 44, p. 87-92, 1999.
- DIBBLE, J.T.; BARTHA, R. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil slidege. **Appl. Environmental Microbiology**. V. 37, p.729-739, 1979.
- DIFCO. Difco Manual. **Difco Laboratories**, Detroit, 1984.
- DOMINGUES, R. F. **Estudo da biodegradação de efluente oleoso automotivo**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 66 págs., 2007.

- DUTKA, B. Short-term root elongation toxicity bioassay. Methods for toxicological analysis of Waters, wastewaters and sediments. National water research institute (NWRI), *Environment Canada*, Burlington, 1989.
- DUFFUS, J.H. **Toxicologia Ambiental**. Barcelona: Omega, 173p., 1983.
- FRANKENBERGER, W.T. The need for laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons. In: CALABRESE, E.; KOSTECKI, P. (Ed.). **Hydrocarbon contaminated soils and groundwater**. Chelsea, MI: Lewis Publishers, v.2, p.237 - 293, 1992.
- GARNHAM, G. W.; CODD, G. A.; GAAD, G. M. Kinetics of uptake and intracellular location of cobalt, manganese and zinc in the estuarine green alga *Chlorella salina*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v. 37, n. 2, p. 270 - 276, mai 1992.
- GUPTA, V. K.; SHRIVASTAVA, A. K.; JAIN, N. Biosorption of chromium (VI) from aqueous solutions by green algae Spirogyra species. **Water Res.**, New York, v. 35, p. 4079 - 4085, 2001.
- GUERRA, R. C. **Caracterização e biodegradação de lodo de estações de tratamento de água para descarte em aterro sanitário**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biciências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.
- GUERRA, R. C. Estudo do lodo gerado em reator biológico, pelo tratamento da água de produção do petróleo, no terminal marítimo Almirante Barroso, Município de São Sebastião, SP, visando sua disposição final. 2009. 126f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biciências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- GRAY, M. R.; BANERJEE, D. K.; DUDAS, M. J.; PICKARD, M. A. Protocols to enhance biodegradation of hydrocarbon contaminants in soil. **Biorem. J.**, Philadelphia, v. 4, n. 4, p. 249-257, 2000.
- HENCKLEIN, F.A. Estabilização de “landfarming” de refinaria de petróleo e aplicabilidade em solos arenosos de baixos teores de carbono. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, SP, 61 p., 2005.
- INAZAKI, T. H. Avaliação da biodegradação de efluentes com substâncias persistentes antes e após tratamento eletrolítico para proposta de tratamento físico-biológico alternativo. 2003. 120f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada)- Instituto de Biciências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- KATAOKA, A.P.A.G. Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microorganismos isolados de “landfarming”. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, SP, 202p., 2001.

- LADOUSSE, A.; TRAMIER, B. Results of 12 years of research in spilled oil bioremediation: Inipol EAP 22. *In: Proceedings of the 1991 International Oil Spill Conference*, American Petroleum Institute, Washington, DC, p. 577-581, 1991.
- LANDIS, W.G.; YU, M. **Introduction to environmental toxicology: Impacts of chemicals upon ecological systems**. Boca raton: CRC Press, 1995.
- LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews**, v. 54, p. 305-315, 1990.
- LOPES, P. R. M. **Estudo da Biodegradação de Efluente Oleoso Automotivo de Diferentes Origens em Meio Aquoso**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 112 f., 2006.
- LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Evaluation of the Biodegradation of Different Types of Lubricant Oils in Liquid Medium. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, *in press*, 2010.
- LYON, T. L.; BUCKMAN, H. O. **The nature and properties of soil**. 4<sup>th</sup>. ed. New York: Macmillian, 1943.
- MARIANO, A.P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. Tese de Doutorado (Geociências e Meio Ambiente) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 162 f. 2006.
- MAHAFFEY, W.R.; GIBSON, D.T.; CERNIGLIA, C.E. bacterial oxidation of Chemical Carcinogens: Formation of Polycyclic Aromatic Acids from Benz[a]anthracene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n.10, p. 2415-2423, 1988.
- MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1997.
- METTING, F. B. Jr. Structure and physiological ecology of soil microbial communities. In: METTING, F. B. Jr. (Ed.) **Soil microbial ecology**, New York: Marcel Dekker, 1993, cap.1, p.3-25.
- MMA. Ministério do Meio Ambiente. **Gestão de óleo lubrificante automotivo usado em oficinas automotivas**. Projeto programa piloto para a minimização dos impactos gerados por resíduos perigosos. Pernambuco, 46p., 2006.
- MONTAGNOLLI, R.N. **Biodegradação de óleos lubrificantes automotivos e óleos vegetais em meio aquoso**. 151f. Trabalho de Conclusão de Curso (bacharelado - Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.
- MOREIRA, F.M.S. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. 2<sup>a</sup> edição. Lavras: Editora UFLA, 2006.
- MORGAN, P.; WATKINSON R.J. Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment. **Crit. Rev. Biotechnol**, Vol. 8, págs. 305–333, 1989.

- MYERS. Environmental services of biodiversity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Vol.93. nº7. pág.2764-2769, 1996.
- NARRO, M.L.; CERNIGLIA, C.E.; BAALEN, C.V.; GIBSON. Metabolism of Phenanthrene by the Marine Cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 1351-1359, 1992.
- NAKANO, O.; NETO, S.S.; ZUCCHI, R.A. **Entomologia econômica**. Piracicaba: Livroceres, 1981. 314p. NITSCHKE, M; PASTORE G.M. Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações. *Química Nova*, Vol 25, nº 5, pág. 772-776. 2002.
- NAVARRETE, A.A. **Algas na desintoxicação do solo de landfarming de refinaria de petróleo**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 100 p., 2006.
- NUVOLARI, A. **Aplicação de lodo de esgotos municipais no solo: ensaios de respirometria para avaliar a estabilidade do lodo**. UNICAMP, Faculdade de Engenharia Civil, Campinas SP. 158 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos e Saneamento). 1996.
- OLIVIERI, R., BACCHIN, P., ROBERTIELLO, A., ODDO, N., DEGEN, L.; TONOLO, A. (1976). Microbial degradation of oil spills enhanced by a slow-release fertilizer. **Appl. Environ. Microbiol.** n. 31, p.629-634, 1976
- OLIVEIRA, S.D.; LEMOS, J.L.S. Biodegradação de petróleo de solo areno-argiloso por fungo filamentosos. In: **XIII Jornada de Iniciação Científica - CETEM**, Rio de Janeiro, 2005
- OTENIO, M.H. Aplicação do processo eletrolítico no tratamento de águas e estudos de biodegradação de gasolina. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, SP, 87p., 2002.
- OU DOT, J.; MERLÍN, F.X.; PINVIDIC, P. Weathering rates of oil components in a bioremediation experiment in estuarine sediments. **Marine Environ. Res.**, Barking, v.45, n.2, p.113-125, 1998.
- OU DOT, J.; DUTRIEUX, E. Hydrocarbon weathering and biodegradation in a tropical estuarine ecosystem. **Marine Environmental Research**, v. 27, p. 195-213, 1989.
- PAGGA, U. **Testing biodegradability with standardized methods**. *Chemosphere*, Vol. 35, nº 12, pág. 2953-2972, 1997.
- PARENTE, E. J. S. Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado, Fortaleza: [S.n.], 2003. 66 p. Disponível em: <<http://www.tecbio.com.br/artigos/Livro-Biodiesel.pdf>>. Acesso em: 09 AGO. 2011.
- PEDROZO, M.F.M. et al. **Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo**. Salvador: Centro de Recursos Ambientais, 246p. 2002.

- PEREIRA, L.T.C.; LEMOS, J.L.S. Degradação de hidrocarbonetos de petróleo por *Aspergillus niger* e *Penicillium corylophilum*. In: **XII Jornada de Iniciação Científica - CETEM**, Rio de Janeiro, 2004.
- PRINCE, R.C. Petroleum spill bioremediation in marine environments. **Critical Reviews in Microbiology**, Philadelphia, Vol. 19, p. 217-242, 1993.
- RÉGIS, G. Tratamento eletrolítico das águas residuárias de uma indústria produtora de antioxidante de borracha visando sua biodegradação. Tese de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, SP. 117p., 2000.
- ROSATO, Y. B. Biodegradação do Petróleo. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. de, eds. **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, Cap. 14, pág. 307-334, 1997.
- SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATA, R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, v.136, p.187-195, 2005.
- SCHIMMEL. Ecosystem consequences on microbial diversity and community structure. **Ecol. Stud.** Vol.113. pág.239-54. 1995.
- SILVA, M.O.S.A. Análises **físico-químicas para controle de estações de tratamento de esgotos**. São Paulo: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB, 226p., 1977.
- SILVA, R.L.B.; BARRA, C.M.; MONTEIRO, T.C.N.; BRILHANTE, O.M. A study on groundwater contamination with fuels and potential public health impact in Itaguaí, Rio de Janeiro State, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v.18, p.1599-1607, 2002. ISSN 0102-311X.
- SIVIERO, A. R. **Avaliação da biodegradação em solo de resíduos de fundição de areia fenólica- utilizando o método respirométrico**. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 107 f. 1999.
- TAVARES, P. Relatório do Grupo de Monitoramento Permanente da Resolução CONAMA 362/2005. Brasília, 19p., 2006.
- TRINDADE, P.V.O.; SOBRAL, L.G.; RIZZO, A.C.L.; LEITE, S.G.F.; SORIANO, A.U. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. **Chemosphere**, v. 58, p. 515-522, 2005.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. USEPA. Office of Compliance. Office of Enforcement and Compliance Assurance. Profile of the petroleum refining industry. Washington, 1995.
- URURAHY, A.F.P.; MARINS, M.D.M.; VITAL, R.L.; GABARDO, I.T.; PEREIRA JR, N. Effect of aeration on biodegradation of petroleum waste. **Revista de Microbiologia**, v. 29 n. 4, p. 254-258.

- VASILEVA-TONKOVA, E.; GALABOVA, D. Hydrolytic Enzymes and Surfactants of Bacterial Isolates from Lubricant-Contaminated Wastewater. **Z. Naturforsch**, Vol.28, série C, 2002.
- WANG, X.; YU, W.; BARTHA, R. Effect of bioremediation on polycyclic aromatic hydrocarbons by in soil. **Environmental e Science Tecnology**, Vol. 24, pág. 1086-1089, 1990.
- ZILLI, J. R.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. **Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo**. Cadernos de Ciência e Tecnologia, Brasília, v. 20, n. 3, p.391-411, set./dez. 2003.
- ZOBELL, C. E. Action of microorganisms on hydrocarbons. **Bacteriological Reviews**, v. 10, p. 1-49, 1946.
- WRIGHT, M. A.; TAYLOR, F.; RANGLES, S. J.; BROWN, D. E.; HIGGINS, I. J. Biodegradation of a synthetic lubricant by *Micrococcus roseus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 1072-1076, 1993.
- WRIGHT, M. A. **Biodegradation of synthetic ester-based lubricants**. PhD thesis. Cranfield Institute of Technology, Cranfield, United Kingdom. 1992.

**Biodegradação de Óleos Derivados do Petróleo e de Origem Vegetal  
Estimulada por Biossurfactantes em Meio Aquoso e Monitoramento de  
sua Toxicidade**

---

Orientador: Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia

---

Co-Orientador: M. Sc. Paulo Renato Matos Lopes

---

Aluno: Gerson Felipe da Costa Filho