

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL**

**BIORREMEDIAÇÃO DE SEDIMENTO ESTUARINO  
CONTAMINADO POR ÓLEO DIESEL COM O USO DE  
BIOSSURFATANTE**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Débora Missio Bayer**

**Recife, PE, Brasil  
2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**BIORREMEDIAÇÃO DE SEDIMENTO ESTUARINO  
CONTAMINADO POR ÓLEO DIESEL COM O USO DE  
BIOSSURFATANTE**

**por**

**Débora Missio Bayer**

**Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de  
Pós-Graduação em Engenharia Civil, Área de Concentração em  
Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, da Universidade Federal  
de Pernambuco (UFPE-PE),  
como requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre em Engenharia Civil**

**Orientador: Prof. PhD. Mário Takayuki Kato  
Co-orientador: Prof. Dr. Alessandra Carla Oliveira Chagas Spinelli**

**Recife, PE, Brasil**

**2010**

**B357b**

**Bayer, Débora Missio**

Biorremediação de sedimento estuarino contaminado por óleo diesel com o uso de biossurfatante / Débora Missio Bayer. – Recife: O Autor, 2010.

88 f.; il., gráfs., tabs.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, 2010.

Inclui Referências Bibliográficas e Anexos.

**1. Engenharia civil. 2. Biorremediação. 3. HPAs . 4. Sedimento. 5. Óleo Diesel. I. Título.**

**UFPE**

**624 CDD (22. ed.)**

**BCTG/2010-074**

**BIORREMEDIAÇÃO DE SEDIMENTO ESTUARINO  
CONTAMINADO POR ÓLEO DIESEL COM O USO DE  
BIOSSURFATANTE**

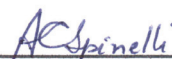
**Débora Missio Bayer**

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DE PERNAMBUCO, COMO PARTE INTEGRANTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA  
CIVIL.



---

Mario Takayuki Kato  
Orientador, Ph. D.



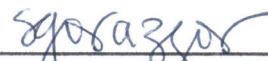
---

Alessandra Carla Oliveira Chagas Spinelli  
Co-Orientador, D. Sc.



---

Adriana Ururahy Soriano  
Examinador Externo, D. Sc.



---

Sália Gavazza dos Santos Pessoa  
Examinador Interno, D. Sc.

Recife, PE  
Fevereiro de 2010

## AGRADECIMENTOS

Aqui deixo um agradecimento especial a todas as pessoas que me aconselharam, motivaram, ajudaram e colaboraram nesta etapa de vida e construção deste trabalho.

Ao meu marido Fábio, que me ajudou muito nesta trajetória e foi meu maior motivador, pelo amor, pelo carinho, pela compreensão, por acreditar em mim, por estar sempre presente nos momentos difíceis, por fazer a diferença na minha vida. Você é muito especial!

À minha família, pela compreensão, pelos incentivos, principalmente por entenderem meus momentos de ausência e ansiedade.

Ao meu orientador, professor Mário Kato, pela orientação, pelos ensinamentos e por confiar em mim e nas minhas decisões. Muito Obrigada.

À professora Alessandra Carla, minha co-orientadora, pelas iniciativas, pelo coleguismo, pelos ensinamentos e principalmente pela amizade.

À professora Sávia Gavazza, por colaborar com a pesquisa, pelos ensinamentos, pelos encontros e discussões que me fizeram amadurecer, pela confiança que depositastes em mim e pela amizade.

Aos grandes amigos Renata e Marquinhos, que nos “adotaram” em Recife, nos convidaram para participar de suas famílias e nos deram a oportunidade de conhecer e de conviver com a Mariana, uma princesa. Aos amigos Cristiane e Paulinho, pela amizade e pelo incentivo. Muito obrigada.

Aos colegas de equipe: Luiz Galdino, Daniele Campos, Daniele Silva, Jadson, Ernesto, Cesar, Alfredo, Otávio e Mitsue, colegas de trabalhos e amigos que se dedicaram e, somente com a ajuda e colaboração de todos, este trabalho pôde ser concluído.

Aos colegas de mestrado e amigos do LSA, pelo apoio, pelos momentos divertidos e de descontração.

À Universidade Federal de Pernambuco, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, pela oportunidade de realizar o meu trabalho.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, pela bolsa concedida, pois sem esta não seria possível a realização do trabalho.

À rede Reline e aos seus consultores pelo apoio financeiro e intelectual à pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, à Petrobrás, à Agência Nacional de Petróleo e à FINEP pelo apoio financeiro à pesquisa.

## **RESUMO**

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil  
Universidade Federal de Pernambuco

### **BIORREMEDIAÇÃO DE SEDIMENTO ESTUARINO CONTAMINADO POR ÓLEO DIESEL COM O USO DE BIOSSURFATANTE**

AUTORA: DÉBORA MISSIO BAYER

ORIENTADOR: MARIO TAKAIUKI KATO

Data e Local da Defesa: Recife, 25 de fevereiro de 2010.

Acidentes com derrames de petróleo ou seus derivados em ambientes sensíveis, como os estuários, provocam um grande impacto ambiental. A limpeza dessas áreas contaminadas necessita de cuidados e de tecnologias que reduzam os efeitos do contaminante no meio ambiente. Nesse sentido, tecnologias biológicas de degradação dos hidrocarbonetos, em processos chamados de biorremediação, são apontadas como eficazes no tratamento de áreas degradadas. Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos no intuito de elucidar os processos degradativos dos hidrocarbonetos, aeróbios e anaeróbios, e as tecnologias de biorremediação. O presente trabalho avaliou dois tratamentos de biorremediação, atenuação natural e atenuação natural incentivada, em condições laboratoriais, de um sedimento estuarino contaminado com óleo diesel. Como forma de incentivo buscou-se uma maior biodisponibilidade do contaminante, com o uso de um biossurfatante. Foram monitorados parâmetros físico-químicos e biológicos durante 111 dias de tratamento. A avaliação da degradação foi realizada através do acompanhamento dos 16 hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) considerados prioritário pela *U.S. Environmental Protection Agency* (U.S.EPA, 2009). A quantificação das bactérias heterotróficas totais indicou um possível período de adaptação da microbiota à contaminação. Dentre os 16 HPAs quantificados, o naftaleno apresentou uma maior percolação na coluna, uma vez que a contaminação foi realizada no topo da mesma. Isso pode ser atribuído a sua maior solubilidade em água, 31 mg/L. Os HPAs de menor peso molecular apresentaram uma maior oscilação de concentração nos primeiros 45 dias de tratamento, enquanto que os de maior peso molecular apresentaram comportamentos semelhantes, com processos de disponibilização mais tardia e significativas reduções do T62 para o T111. Foi possível observar indícios de remoção de 82% do composto pireno no tratamento de atenuação natural nos 111 dias estudados. No tratamento de atenuação natural incentivada observou-se uma redução gradual até o T62, porém no T111 ocorre uma nova disponibilização do contaminante, no entanto do T0 até o T111 ocorre uma remoção de 36% do pireno. De uma maneira geral, o somatório dos 16 HPAs, para ambos os tratamentos nas amostras de superfície, teve redução em sua concentração após o T62, período esse com um significativo crescimento no número de bactérias heterotróficas. Bons indícios de degradação anaeróbia foram observados nos tratamentos adotados, porém não foram verificadas diferenças entre os tratamentos, ou seja, o biossurfatante não solubilizou os HPAs a níveis significativos à biodegradação, como o esperado.

**Palavras-chave:** Biorremediação, HPAs, sedimento, óleo diesel.



**ABSTRACT**

Master Dissertation  
Post Graduation Program in Civil Engineering  
Federal University of Pernambuco

**BIOREMEDIATION OF CONTAMINATED ESTUARINE  
SEDIMENT BY DIESEL WITH THE USE BIOSURFACTANT**

AUTHOR: Débora Missio Bayer

ADVISOR: Mário Takayuki Kato

Date and Place of defence: Recife, February 25th 2010.

Oil spill causes major impact on the estuaries environment. The cleaning of contaminated areas needs technologies that reduce the effects of the contaminant in the environment. In this sense, the application of biological technologies is an effective alternative to clean hydrocarbon contaminated areas. Several studies have been performed to elucidate the hydrocarbon biodegradation, and to evaluate the efficiency of bioremediation technologies. This study evaluated two bioremediation treatments, natural attenuation and natural attenuation encouraged, under laboratory conditions of sediments contaminated with oil diesel. Bioavailability of contaminant was improved through the use of a biosurfactant. The physical, chemical, and biological parameters were monitored during 111 days of treatment. The degradation evolution was monitored by the analyses of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) considered a priority by the U.S. Environmental Protection Agency (USEPA, 2009). The total heterotrophic bacteria quantification indicated the occurrence of an initial period of microbial adaptation. Among the 16 quantified PAHs, naphthalene showed higher leaching in the column, since the contamination was performed on top of it. This can be attributed to its greater solubility in water, 31 mg / L. The concentration of the low-molecular-weight PAHs oscillated over the 45 days initial. The high-molecular-weight PAHs was contamination later available and significant reductions of the T62 to T111. Evidence of degradation was possible observe in pyrene by 82% depletion in natural attenuation treatment. In natural attenuation encouraged treatment the pyrene concentration oscillated, but reduction was 36%. Even good evidence of degradation was observed during the period of monitoring, no difference was found between two treatments proposed. The incentives though biosurfactant amendment was unefficient probably due to the low concentration employed.

**Keywords:** Bioremediation, PAHs, sediments, oil diesel.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação dos hidrocarbonetos com alguns exemplos. _____	17
Figura 2. Vias periféricas de degradação de alguns compostos aromáticos para Benzoil-CoA. _____	23
Figura 3. Esquema do procedimento adotado para homogeneização das amostras de sedimento. [a] 48 amostras coletadas em campo; [b] separação das 48 amostras em três partes: superfície (0-10 cm), meio (10-20 cm) e fundo (20-30 cm); [c] homogeneização das amostras de superfície, meio e fundo; [d] perfil de solo remontado após homogeneização; [e] perfis prontos. _____	31
Figura 4. Instalações físicas do esquema experimental. [a] caixas d'água de 5 mil litros para armazenagem de água do mar em laboratório; [b] aquários com tubulação de entrada e saída d'água e entrada de ar; [c] bancada de apoio; [d] caixa d'água de 500 litros para água de rejeito. _____	33
Figura 5. Esquema experimental com apresentação das triplicatas de tratamento. [a] tratamento de atenuação natural; [b] tratamento de atenuação natural incentivada. ____	34
Figura 6. Diagrama de Shepard (1954) _____	40
Figura 7. Resultados do monitoramento da temperatura do sedimento nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111). _____	42
Figura 8. Resultados do monitoramento pH no sedimento nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111). _____	43
Figura 9. Resultados do monitoramento do potencial redox no sedimento nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111). _____	44
Figura 10. Resultados da concentração de carbono orgânico total no sedimento nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111). _____	46
Figura 11. Resultados da concentração de nitrogênio total no sedimento _____	48
Figura 12. Resultados da concentração de fósforo total no sedimento _____	48
Figura 13. Resultado da quantificação das bactérias heterotróficas totais nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T62 e T111). _____	51
Figura 14. Monitoramento do naftaleno nos tratamentos estudados _____	57
Figura 15. Monitoramento do acenafteno nos tratamentos estudados _____	57
Figura 16. Monitoramento do acenaftileno nos tratamentos estudados _____	58
Figura 17. Monitoramento do fluoreno nos tratamentos estudados _____	58
Figura 18. Monitoramento do fenantreno nos tratamentos estudados _____	59
Figura 19. Monitoramento do antraceno nos tratamentos estudados _____	59
Figura 20. Monitoramento do fluoranteno nos tratamentos estudados _____	60
Figura 21. Monitoramento do pireno nos tratamentos estudados _____	60

Figura 22. Monitoramento do benzo(a)antraceno nos tratamentos estudados _____	61
Figura 23. Monitoramento do criseno nos tratamentos estudados _____	61
Figura 24. Monitoramento do benzo(b)fluoranteno nos tratamentos estudados _____	62
Figura 25. Monitoramento do benzo(k)fluoranteno nos tratamentos estudados _____	62
Figura 26. Monitoramento do benzo(a)pireno nos tratamentos estudados _____	63
Figura 27. Monitoramento do dibenzo(a,h)antraceno nos tratamentos estudados _____	63
Figura 28. Monitoramento do benzo(g,h,i)perileno nos tratamentos estudados _____	64
Figura 29. Monitoramento do indeno(1,2,3-c,d)pireno nos tratamentos estudados _____	64
Figura 30. Relação entre o somatório dos 16 HPAs e o número de bactérias heterotróficas totais no tratamento de atenuação natural _____	66
Figura 31. Relação entre o somatório dos 16 HPAs e o número de bactérias heterotróficas totais no tratamento de atenuação natural incentivada _____	67
Figura 32. (Anexo) Gráfico da distribuição granulométrica das amostras de sedimento de caracterização da superfície, do meio e do fundo. _____	88

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos HPAs estudados quanto à sua periculosidade, toxicidade e carcinogenicidade. _____	18
Tabela 2. Relação entre o processo microbiano e o potencial redox. _____	24
Tabela 3. Valores ambientais críticos para a atividade microbiana no solo _____	26
Tabela 4. Caracterização do biossurfatante utilizado no tratamento de atenuação natural incentivada. _____	35
Tabela 5. Resultados da análise de granulometria da caracterização dos sedimentos de superfície, meio e fundo, de acordo com a escala de Wentworth. _____	40
Tabela 6. Relações entre o carbono orgânico total, o nitrogênio total e o fósforo total nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111). _____	47
Tabela 7. Solubilidade dos HPAs prioritários em água (25°C) _____	53
Tabela 8. Resultado da avaliação dos parâmetros físico-químicos da água do mar ____	69
Tabela 9. Distribuição granulométrica das amostras de sedimento de caracterização da superfície (a), do meio (b) e do fundo (c). _____	87

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CMC	Concentração micelar crítica
C:N:P	Relação carbono, nitrogênio e fósforo
HPA	Hidrocarboneto poliaromático
ITOPF	<i>The International Tanker Owners Pollution Federation Limited</i>
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
UFC	Unidade formadora de colônias
U.S.EPA	<i>U.S. Environmental Protection Agency</i>

## **LISTA DE ANEXOS**

Anexo 1	
Parecer de caracterização do óleo diesel utilizado no experimento _____	85
Anexo 2	
Parecer de caracterização granulométrica do sedimento _____	87

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>15</b>
2.1	Ambiente estuarino	15
2.2	Óleo diesel e sua composição química	16
2.3	Degradação dos hidrocarbonetos	19
2.3.1	Degradação aeróbia	21
2.3.2	Degradação anaeróbia	21
2.4	Microrganismos degradadores de hidrocarbonetos	26
2.5	Biorremediação	27
2.6	Biossurfatante	28
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>30</b>
3.1	Coleta e caracterização do sedimento	30
3.2	Concepção física do experimento de remediação	32
3.3	Tratamentos de remediação	33
3.4	Contaminação e caracterização do óleo diesel	34
3.5	Biossurfatante	35
3.6	Amostragem e monitoramento do sedimento e da água	35
3.6.1	Amostragem do sedimento	35
3.6.1.1	Quantificação dos parâmetros físico-químicos no sedimento	36
3.6.1.2	Quantificação das bactérias heterotróficas totais do sedimento	37
3.6.2	Amostragem da água	37
3.6.2.1	Quantificação dos parâmetros físico-químicos na água do mar	37
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>39</b>
4.1	Sedimento estuarino	39
4.1.1	Análise granulométrica	39
4.1.2	Temperatura	41
4.1.3	pH e potencial redox	43
4.1.4	Carbono orgânico total, nitrogênio total e fósforo orgânico total	45
4.1.5	Monitoramento das bactérias heterotróficas totais	49
4.1.6	Biodegradação dos HPAs	52
4.2	Água	68
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>SUGESTÕES</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>73</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Acidentes envolvendo derrames de petróleo ou de seus derivados constituem uma das principais fontes poluidoras dos ecossistemas marinhos e costeiros. De acordo com *The International Tanker Owners Pollution Federation Limited - ITOPF (2009c)*, o número de acidentes envolvendo derrames de óleo tem reduzido significativamente nos últimos anos. No entanto, dos anos 70 até meados de 2008, cerca de 4 milhões de toneladas de óleo foram derramados.

Dados divulgados mostram que 35% dos derrames com quantidades entre 7 e 700 toneladas ocorrem durante operações rotineiras, como carga e descarga; no entanto, derrames maiores que 700 toneladas têm como causas principais as colisões e encalhamentos, atingindo 63% dos casos (ITOPF, 2009b). Apesar dos grandes acidentes muitas vezes ocorrerem longe da costa, a mancha de óleo ou a emulsão óleo-água acaba atingindo o litoral.

O litoral, mais do que qualquer outra região marinha, é exposto aos efeitos de um derrame de petróleo ou de seus derivados, sendo esse o lugar onde tendem a se acumular. Áreas rochosas e praias arenosas que estão expostas a ação de ondas e da maré tendem a limpar rapidamente o óleo derramado (ITOPF, 2009a) e, essa remoção pode ser auxiliada com emprego de técnicas como: limpeza natural, remoção manual, uso de materiais absorventes, bombeamento a vácuo, *skimmers*<sup>1</sup>, jateamento com água a diferentes pressões, jateamento com areia, corte da vegetação, queima *in situ*, trincheiras, remoção de sedimentos, biorremediação e produtos dispersantes (CANTAGALLO et al., 2007). Porém as áreas estuarinas, berço dos manguezais, são mais sensíveis e necessitam uma atenção especial.

O manguezal é um ecossistema costeiro de transição entre o meio terrestre e marinho. As comunidades de mangue são compostas por espécies que sobrevivem a inundações variáveis, uma vez que essa região é sujeita ao regime de marés. Esse ecossistema é vital devido a sua grande biodiversidade e por ser o berçário de muitas espécies.

Nessas condições, os tratamentos biológicos como a biorremediação aparecem de maneira promissora para uma gama de contaminantes orgânicos, como o petróleo e

---

<sup>1</sup> Skimmers são equipamentos desenvolvidos para remover o contaminante em fase livre, utilizando discos giratórios e cordas absorventes (CANTAGALLO et al., 2007).



seus derivados, e com bons resultados (BALBA et al., 1998; BENTO et al., 2005; ROSA & TRIGUIS, 2007). Porém, segundo Balba et al. (1998), apesar de promissor e das imensas vantagens, o tratamento biológico de um solo contaminado é um grande desafio. Isto se deve à heterogeneidade dos contaminantes, que pode estar na forma sólida, líquida ou gasosa, além de livre ou adsorvido na matéria orgânica; ao poder inibidor ou tóxico que altas concentrações de hidrocarbonetos conferem aos microrganismos; às grandes variações ambientais a que estão submetidos, além de ser um processo lento e sujeito a restrições regulamentares.

Em Pernambuco, a Zona Industrial Portuária de Suape representa risco ao ambiente estuarino, em função da instalação, até 2011, de uma refinaria que irá processar o óleo pesado do Brasil e da Venezuela. Dos 200 mil barris diários que serão processados por essa refinaria, 60% será de óleo diesel. Outras indústrias do setor petroquímico também se encontram em fase de instalação. Dessa maneira, o estudo de um tratamento que seja capaz de atuar na biorremediação de possíveis áreas contaminadas com petróleo ou seus derivados, como é o caso de manguezais e zonas estuarinas de Suape, se faz relevante. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho é avaliar a remediação de um sedimento estuarino contaminado por óleo diesel em condições laboratoriais, através dos processos de atenuação natural e atenuação natural incentivada com o uso de biossurfactante, para aumentar a biodisponibilidade dos contaminantes.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Acidentes com derrames de óleo em ambientes sensíveis, como os estuários, provocam um grande impacto no ecossistema. A limpeza dessas áreas contaminadas necessita de cuidados e de tecnologias que reduzam os efeitos desse óleo no meio ambiente. Nesse sentido, tecnologias biológicas de degradação dos hidrocarbonetos, em processos chamados de biorremediação, associadas a medidas prévias de contenção, são apontadas como adequadas no tratamento de áreas degradadas uma vez que sugere medidas naturais de tratamento. Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos no intuito de elucidar os processos degradativos dos hidrocarbonetos, aeróbios e anaeróbios, e as tecnologias de biorremediação.

Nos itens a seguir são apresentados alguns conceitos a cerca desses processos, das tecnologias de biorremediação, bem como o uso de uma alternativa de tratamento através do aumento da biodisponibilidade do contaminante.

### **2.1 Ambiente estuarino**

Os estuários são regiões onde ocorre o encontro de um rio com o mar, caracterizando uma foz litorânea (MIRANDA et al., 2002). Esses ambientes são de transição entre o meio terrestre e marinho. Segundo Miranda et al. (2002), em condições naturais, os estuários são considerados mais ricos do que os rios e oceanos adjacentes, uma vez que apresentam altas concentrações de nutrientes.

O manguezal é um ecossistema costeiro que ocorre em estuários, característico de regiões tropicais e subtropicais (QUEIROZ E CELINO, 2008). Segundo esses autores, o manguezal, por estar sujeito ao regime de marés, possui algumas peculiaridades que inferem características específicas, como variações extremas de potencial hidrogeniônico (pH) e de potencial redox, além de condições permanentemente redutoras nos sedimentos.

Esse ecossistema é vital devido a sua grande biodiversidade e por ser o berçário de muitas espécies. No entanto, esses ambientes são vulneráveis a ação do homem, pois: são locais adequados para a instalação de portos; são férteis e podem produzir grandes

quantidades de matéria orgânica; constituem uma via de acesso ao continente e suas águas são renovadas periodicamente pela influência da maré (MIRANDA et al., 2002).

De acordo com Queiroz e Celino (2008), na costa brasileira são frequentes os derrames de petróleo e de seus derivados e lançamento de efluentes industriais, sem o tratamento adequado, que atingem os manguezais.

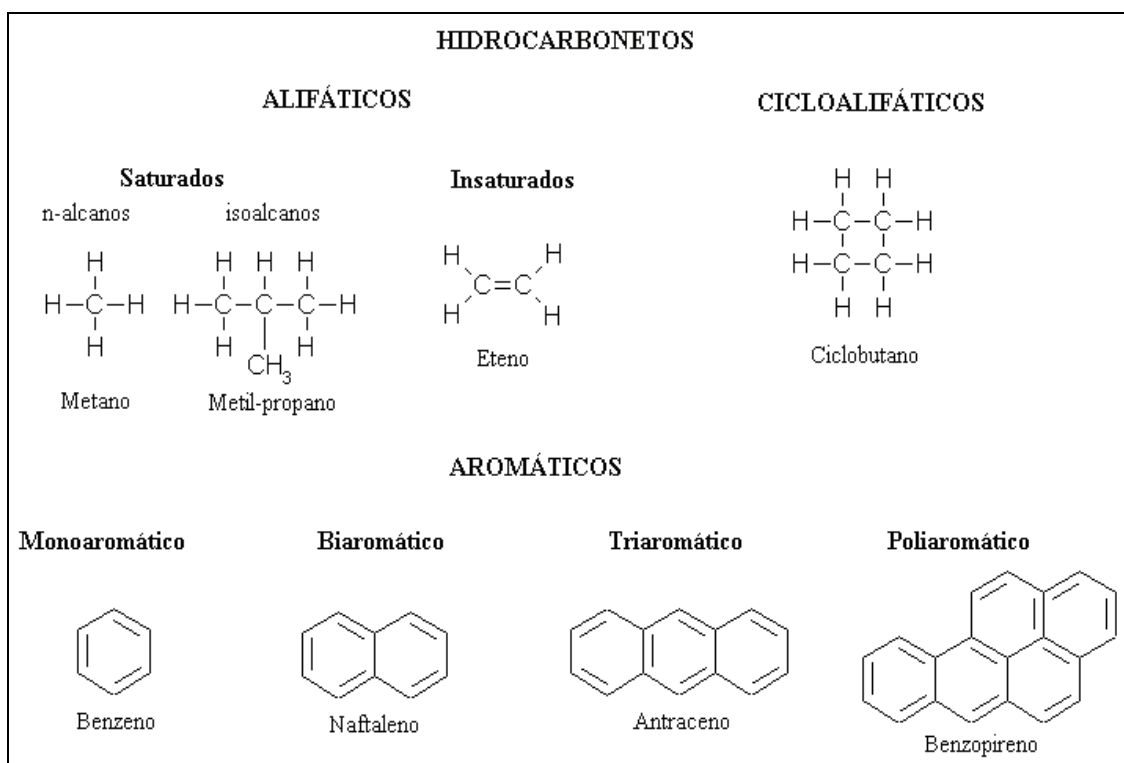
## **2.2 Óleo diesel e sua composição química**

O óleo diesel é um derivado do petróleo formado basicamente por hidrocarbonetos. Os hidrocarbonetos são moléculas que possuem apenas átomos de carbono e hidrogênio em sua composição. Outros átomos como de enxofre, de nitrogênio e de oxigênio podem ser encontrados no óleo diesel em menores quantidades, assim como alguns metais traços como vanádio, níquel, sódio, cálcio, cobre e urânio (BENTO, 2005). Segundo Mazzuco (2004), na composição do óleo diesel, aproximadamente 40% dos hidrocarbonetos são alifáticos, 39% cicloalifáticos, 20% aromáticos e o restante são resinas e asfaltenos.

Os hidrocarbonetos alifáticos podem ser saturados ou insaturados. Os saturados apresentam apenas ligações simples e sua cadeia pode ser linear, os n-alcenos, ou ramificada, os isoalcenos. Os alifáticos insaturados são característicos por possuírem a cadeia aberta e apresentam ligações duplas ou triplas entre os átomos de carbono. Os cicloalifáticos diferenciam-se dos alifáticos por possuírem cadeia fechada ou cíclica.

Os hidrocarbonetos aromáticos são aqueles que possuem pelo menos um anel benzênico em sua molécula podendo ser designados como monoaromáticos, diaromáticos, triaromáticos ou poliaromáticos, de acordo com o número de anéis que apresentam: um, dois, três ou mais de três, respectivamente.

Na Figura 1 é apresentada a classificação dos hidrocarbonetos e alguns exemplos.



**Figura 1. Classificação dos hidrocarbonetos com alguns exemplos.**

Os hidrocarbonetos aromáticos, em função de sua estrutura molecular, são considerados quimicamente estáveis e participam preferencialmente de reações de substituição (SYKES, 1985), podendo então persistir no ambiente.













Além disso, de maneira geral, os hidrocarbonetos são hidrofóbicos, ou seja, apresentam baixa solubilidade em água, mas alta afinidade lipofílica, o que os tornam potenciais participantes das cadeias tróficas. Os poliaromáticos (HPAs), especificamente, apresentam sua solubilidade em água diminuída com o aumento do número de anéis benzênicos (MAZZUCO, 2004), ampliando significativamente seu risco de persistência ambiental.

Em ambientes naturais, a solubilidade pode ser facilitada por um composto mais miscível, de natureza orgânica, sendo esse processo conhecido como “efeito de co-solvência” (BANERJEE & YALKOWSKY, 1988 apud. CORDAZZO et al., 1999). Esse efeito pode promover o aumento da pluma de contaminação além do ponto inicial de contaminação. Um exemplo do “efeito de co-solvência” ocorre em um derrame da gasolina brasileira, que contém etanol, em um ambiente aquático. Os hidrocarbonetos

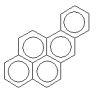
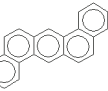
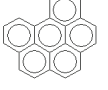
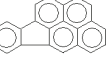
monoaromáticos da gasolina são miscíveis em alcoóis primários que, por sua vez, são altamente solúveis em água. Isso promove a transferência de compostos da gasolina para a água, em que o etanol atua como co-solvente (FERNANDES & CORSEUIL, 1996).

Dentre os hidrocarbonetos citados, cabe destacar os hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs), em que a *U.S. Environmental Protection Agency* (U.S.EPA, 2009) lista 16 HPAs como poluentes prioritários para o monitoramento ambiental (Tabela 1), sendo que alguns são considerados possíveis carcinogênicos (U.S.EPA, 1993; BALBA et al., 1998; IARC, 1998, ABNT NBR 10004, 2004), teratogênicos e mutagênicos (FRONZA, 2006; ABNT NBR 10004, 2004).

**Tabela 1. Classificação dos HPAs estudados quanto à sua periculosidade, toxicidade e carcinogenicidade.**

HPAs	Estrutura Química	USEPA	ABNT	IARC
Naftaleno		Prioritário	Confere Periculosidade/ Tóxico	Possível carcinogênico
Acenafteno		Prioritário	Não mencionado	Não classificável
Acenaftileno		Prioritário	Não mencionado	Não mencionado
Fluoreno		Prioritário	Não mencionado	Não classificável
Fenantreno		Prioritário	Não mencionado	Não classificável
Antraceno		Prioritário	Não mencionado	Não classificável
Fluoranteno		Prioritário	Confere Periculosidade/ Tóxico	Não classificável
Pireno		Prioritário	Não mencionado	Não classificável
Benzo(a)antraceno		Prioritário	Confere Periculosidade/ Tóxico	Possível carcinogênico
Criseno		Prioritário	Confere Periculosidade/ Tóxico	Não mencionado
Benzo(b)fluoranteno		Prioritário	Confere Periculosidade	Possível carcinogênico
Benzo(k)fluoranteno		Prioritário	Confere Periculosidade	Possível carcinogênico

**Tabela 1. Classificação dos HPAs estudados à sua periculosidade, toxicidade e carcinogenicidade.**

HPAs	Estrutura Química	USEPA	ABNT	IARC
Benzo(a)pireno		Prioritário	Confere Periculosidade/ Tóxico	Carcinogênico
Dibenzo(a,h)antraceno		Prioritário	Confere Periculosidade/ Tóxico	Provável carcinogênico
Benzo(g,h,i)perileno		Prioritário	Não mencionado	Não classificável
Indeno(1,2,3-cd)pireno		Prioritário	Confere Periculosidade/ Tóxico	Possível carcinogênico

FONTE: ABNT NBR 10004 (2004), U.S.EPA (2009), IARC (2009).

NOTA: U.S.EPA – *Environmental Protection Agency*: Prioritário – classificado como prioritário no monitoramento ambiental; ABNT NBR 10004:2004 Resíduos Sólidos - Classificação: Confere periculosidade – confere risco à saúde pública e ao meio ambiente, Tóxico – provoca efeitos adversos (tóxico, carcinogênico, mutagênico, teratogênico ou ecotoxicológico); IARC – *International Agency for Research on Cancer*: Carcinogênico - carcinogênico para humanos, Provável carcinogênico - provável carcinogênico para humanos, Possível carcinogênico - possível carcinogênico para humanos, Não classificável - não classificável como carcinogênico para humanos, Provável não carcinogênico - provável não carcinogênico para humanos.

### 2.3 Degradação dos hidrocarbonetos

A degradação de uma mistura de hidrocarbonetos, seja na forma de petróleo ou de seus derivados, baseia-se em mudanças em sua composição, sejam elas resultantes de reações químicas ou bioquímicas. Quando se trata de um processo de degradação em que os microrganismos possuem o papel principal, esse é denominado biodegradação.

Em ambientes naturais, a biodegradação do petróleo e de seus derivados é complexa, dependente de sua natureza, da natureza das comunidades microbianas e de vários fatores ambientais que influenciam na atividade dessas comunidades (SPAIN et al., 1980; ATLAS, 1981; BAUER & CAPONE, 1985).

Existem diversos estudos em relação à degradação de hidrocarbonetos, alguns relacionados a hidrocarbonetos isolados e outros a misturas complexas. Os hidrocarbonetos saturados como os *n*-alcanos são considerados, por alguns autores, como os mais rapidamente biodegradados (ATLAS, 1981; ZOBEL 1946), enquanto os isoalcanos, como os isoprenóides, apresentam uma maior resistência ao ataque microbiano associada ao radical metila (FALL et al., 1979).

Os cicloalifáticos são resistentes ao ataque microbiano, persistindo no meio ambiente (PERRY, 1979). De acordo com Atlas (1981), cadeias com até seis anéis condensados são suscetíveis à biodegradação. No entanto, já foi reportado o uso de cicloalcanos como substrato em situações de co-oxidação (BEAM & PERRY, 1974; PERRY, 1979).

A co-oxidação ocorre quando um determinado hidrocarboneto em uma mistura, que isoladamente não seria degradado, é enzimaticamente atacado por microrganismos que são capazes de degradar outros hidrocarbonetos contidos nessa mistura (HORVATH, 1972). A grande quantidade de potenciais substratos primários em uma mistura de hidrocarbonetos fornece condições quimicamente favoráveis à co-oxidação (ATLAS, 1981).

Assim como os cicloalifáticos, os hidrocarbonetos aromáticos e, especialmente, os poliaromáticos, são estruturas capazes de sofrer biodegradação, porém são mais resistentes ao ataque enzimático (ATLAS, 1981). No entanto, avaliar fenômenos como a co-oxidação, em ambientes naturais, torna-se muito complicado devido à vasta diversidade microbiana e aos interferentes ambientais (ATLAS, 1981).

De acordo com Spain et al. (1980), fatores como temperatura, pH, salinidade, oxigênio dissolvido, concentração de nutrientes, tipo e fonte de inóculo, estrutura química e concentração do composto e grau de adaptação dos microrganismos para degradar este composto interferem significativamente no processo de degradação dos hidrocarbonetos. Segundo esses autores, a adaptação dos microrganismos pode ocorrer rapidamente a partir de três caminhos: (a) indução ou expressão de enzimas específicas não presentes nas populações antes da exposição ao novo composto; (b) seleção de novas capacidades metabólicas produzidas por mudanças genéticas e, ainda (c) acréscimo no número de organismos capazes de catalisar uma transformação em particular.

Por isso, a velocidade da biodegradação dos hidrocarbonetos difere muito de comunidades adaptadas para não adaptadas (SPAIN et al., 1980). Assim, é de suma importância, a relação desses compostos com microrganismos tolerantes, ou adaptados, e que sejam capazes de degradá-los (BAUER & CAPONE, 1985).

### 2.3.1 Degradação aeróbia

A degradação aeróbia de hidrocarbonetos vem sendo amplamente estudada (BOETHLING & ALEXANDER, 1979; BARNSLEY, 1983, 1988; BAUER & CAPONE, 1985; ARVIN et al., 1989; BENTO et al., 2005, CHAGAS-SPINELLI, 2007), em que condições favoráveis de oxigênio, temperatura e nutrientes maximizam a degradação desses hidrocarbonetos (KORDA et al., 1997).

O metabolismo de degradação pode ser separado em duas vias, a periférica e a central (HEIDER & FUCHS, 1997). As vias periféricas transformam uma grande quantidade de compostos aromáticos em alguns poucos aromáticos intermediários centrais. As enzimas desta via, muitas vezes codificadas por genes em plasmídeos, são mais ou menos específicas para determinados substratos de crescimento e são geralmente induzidas pelo próprio substrato. Os intermediários centrais produzidos, geralmente são preparados para a clivagem do anel aromático, em que no metabolismo aeróbio ocorre com a eliminação de substituintes no anel aromático e introdução de hidroxilas. Essa preparação é executada por uma variedade de mono e dioxigenases, em que a clivagem do anel aromático ocorre pela incorporação de oxigênio no anel aromático (TAYLOR et al., 1970; HEIDER & FUCHS, 1997, KARTHIKEYAN & BHANDARI, 2001).

A quebra do anel benzênico pode ocorrer na posição *meta* ou *orto*, em que o metabolismo subsequente de produtos não aromáticos em metabólitos comuns, como acetil-CoA e succinato, formam a chamada via central (HEIDER & FUCHS, 1997).

Na via central, a indução de diferentes enzimas pode ser controlada pela indução seqüencial por vários substratos e intermediários de degradação, bem como, pode coordenar a indução por apenas um substrato (HEIDER & FUCHS, 1997).

Em resumo, o metabolismo aeróbio de degradação é baseado na bioquímica do oxigênio, ou seja, no ciclo de Crebs.

### 2.3.2 Degradação anaeróbia

Há um grande interesse no estudo do transporte e disposição dos HPAs em meios subsuperficiais, em que os ambientes são microaeróbios ou anaeróbios. Porém, se



conhece muito pouco sobre a degradação anaeróbia desses compostos, principalmente em solos e águas subterrâneas contaminadas, sendo a degradação aeróbia muito mais explorada (HEALY & YOUNG, 1979; KARTHIKEYAN & BHANDARI, 2001).

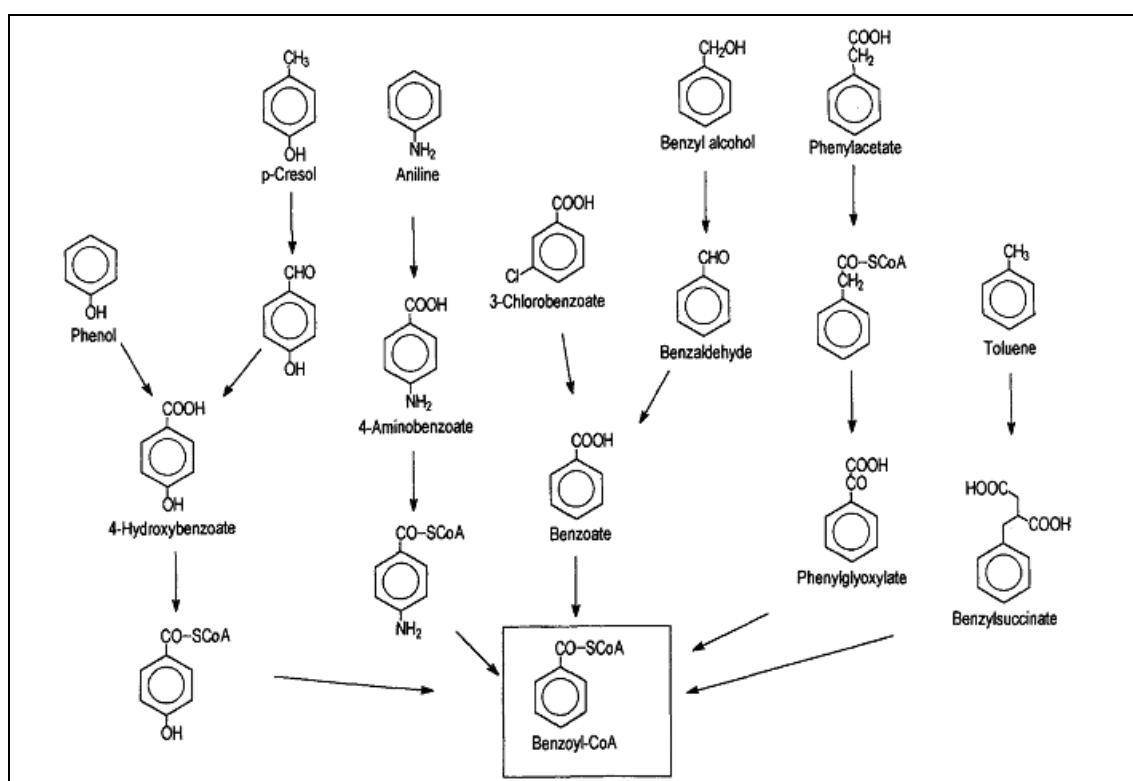
Um dos pioneiros no estudo da biodegradação de compostos aromáticos, sob condições anaeróbias, foi o trabalho desenvolvido por Tarvin e Buswell (1934). A degradação encontrada por esses autores foi confirmada, mais tarde, por Clarck e Fina (1952, apud. TAYLOR et al., 1970). Já em 1970, Taylor et al. em suas pesquisas, obtiveram a mineralização do carbono orgânico associado ao benzoato para CO<sub>2</sub>, por nitrato redução, indicando o rompimento do anel benzênico e degradação sob condições anaeróbias. Nesse trabalho, utilizando microrganismos facultativos, os autores mostraram que a rota de degradação dos compostos aromáticos aeróbia e anaerobiamente, por nitrato redução, eram um pouco distintas e independentes.

Nos últimos anos, têm-se encontrado muitos trabalhos na tentativa de elucidar a degradação anaeróbia de compostos aromáticos (BAUER & CAPONE, 1985; BEDESSEM et al., 1997; COATES et al., 1996a, 1996b, 1997; MECKENSTOCK et al., 2000; MIHELICIC & LUTHY, 1988a, 1988b; EVANS et al., 1991b; HEIDER & FUCHS, 1997; ZHANG & YOUNG, 1997, ROCKNE & STRAND, 1998; ROCKNE et al., 2000; KARTHIKEYAN & BHANDARI, 2001), pois a anaerobiose pode ocorrer em qualquer ambiente em que exista déficit de oxigênio molecular. Na natureza, ambientes como solos saturados, sedimentos, aterros, lagoas anaeróbias, águas doces e águas subterrâneas são propensos a ocorrência de ambientes anóxicos ou anaeróbios. Sedimentos provenientes de ambientes estuarinos, como o estudado na presente pesquisa, são exemplos desse tipo de condição natural.

Em muitos processos de biodegradação dos HPAs, o anel benzênico é catabolizado por mono ou dioxigenases e, portanto, avançaria somente se houvesse oxigênio dissolvido disponível. Porém, em condições de desnitrificação, de sulfato redução ou de metanogênese o rompimento do anel benzênico ocorre por outras rotas degradativas (KARTHIKEYAN & BHANDARI, 2001).

Em 1997, Heider e Fuchs publicaram um trabalho a fim de elucidar as vias que permitem que as bactérias utilizem os compostos aromáticos na ausência de oxigênio. Os autores sugerem que, de maneira análoga à degradação aeróbia, existam duas vias de degradação, a periférica e a central, envolvendo enzimas como as CoA ligases, as oxidoredutases e as decarboxilases na transformação anaeróbia dos compostos

aromáticos. Além disso, reações de carboxilação, desidroxilação redutora, desaminação redutora, desalogenação redutora, oxidação de grupos carboximetil, oxidação da metila, *o*-desmetilação, hidroxilação *trans* e descarboxilação foram apresentadas como possíveis vias periféricas de reações metabólicas que ocorrem durante o processo de transformação anaeróbia. Este ataque redutor ao anel aromático central implica em intermediários diferentes dos que ocorrem por rotas aeróbias. Na Figura 2, são apresentadas as vias periféricas de degradação de alguns compostos aromáticos à Benzoil-CoA.



**Figura 2.** Vias periféricas de degradação de alguns compostos aromáticos para Benzoil-CoA.

FONTE: (HEIDER e FUCHS, 1997)

A avaliação dos receptores e doadores de elétrons é um fator determinante na diversidade metabólica dos microrganismos, pois são eles que conduzem ao tipo de processo que irá ocorrer (BERRY et al., 1987). De acordo com Karthikeyan e Bhandari (2001), a degradação aeróbia dos HPAs em solos e águas subterrâneas conduz, frequentemente, a uma rápida depreciação do oxigênio dissolvido e isso, eventualmente,

a uma redução no potencial redox. Essa redução no potencial redox pode resultar em condições favoráveis para o crescimento de microrganismos desnitrificantes, sulfato redutores ou metanogênicos (KARTHIKEYAN & BHANDARI, 2001). Segundo Berry et al. (1987), muitas vezes é necessário uma cadeia de associações de microrganismos anaeróbios para que ocorra a completa mineralização da matéria orgânica. Na Tabela 2 são apresentadas algumas das reações de oxido-redução relacionando o processo microbiológico e o potencial redox.

**Tabela 2. Relação entre o processo microbiano e o potencial redox.**

Processo	Reação (doador + acceptor de elétrons)*	Tipo fisiológico	Potencial Redox (mV)
Respiração	$MO + O_2 \rightarrow CO_2$	Aeróbio	700-500
Desnitrificação	$MO + NO_3^- \rightarrow N_2 + CO_2$	Anaeróbio Facultativo	300
Fermentação	$MO \rightarrow$ ácidos orgânicos (ex. acetato, propanato e butirato)	Anaeróbio Facultativo ou Obrigatório	
Sulfato Redução	$MO (or H_2) + SO_4^{2-} \rightarrow H_2S + CO_2$	Anaeróbio Obrigatório	-200
Próton Redução	$MO (C_4 - C_8 AG) + H^+ \rightarrow H_2 + acetato (propanato) + CO_2$	Anaeróbio Obrigatório	
Metanogênese	$CO_2 + H_2 \rightarrow CH_4$	Anaeróbio Obrigatório	< -200
	$Acetato \rightarrow CO_2 + CH_4$	Anaeróbio Obrigatório	< -200

FONTE: Adaptado de BERRY et al. (1987).

NOTA: \* MO: matéria orgânica; AG: ácidos graxos

Na ausência do oxigênio outros compostos são utilizados como aceptores finais de elétrons, determinados a partir do potencial redox do meio (RISER-ROBERTS, 1998). A utilização do nitrato como acceptor final de elétrons na oxidação da matéria orgânica é conhecido como processo de desnitrificação. Compostos como os hidrocarbonetos oxigenados, intermediários no processo de degradação de petróleo e de seus derivados, são facilmente degradados sob condições de desnitrificação (KARTHIKEYAN & BHANDARI, 2001).

Bauer e Capone (1985) não obtiveram bons resultados em relação à degradação em ambiente anóxico, com sedimento marinho, dos HPAs naftaleno e antraceno com adições de glicose e nitrato. Segundo os autores, a adição desses compostos teve pouco efeito sob a degradação, mesmo quando a mesma era aeróbia. Mihelcic e Luthy (1988a) obtiveram a degradação do naftol, do naftaleno e do acenafteno em sistemas solo-água e em condições de desnitrificação, sendo os mesmos reduzidos a níveis não detectáveis em 16, 45 e 40 dias, respectivamente.

Em condições de excesso de nitrato, Mihelcic e Luthy (1988b) obtiveram a degradação do naftaleno e do acenafteno em sistemas solo-água com microrganismos desnitrificantes em menos de nove semanas de experimento. Nesse trabalho, os autores observaram um período de aclimatação, de 12 a 36 dias, antes do início da degradação nos ensaios realizados com solos que não haviam sido contaminados no passado, tempo esse não existente nos solos que já haviam tido algum tipo de contaminação por HPAs. Outros trabalhos, como os de Evans et al. (1991a, 1991b) e de McNally et al. (1998), apresentaram processos de degradação de HPAs em condições de desnitrificação.

Existem outros aceptores finais de elétrons utilizados por grupos específicos de microrganismos, como o ferro e o sulfato. No processo de ferro redução ocorre a oxidação do ferro, Fe(III), quando uma fonte de carbono e energia está disponível (KARTHIKEYAN & BHANDARI, 2001). Lovley e Phillips (1987) estudaram a inibição da sulfato redução e da produção de metano pela adição de ferro. Nesse trabalho, os autores demonstraram que quando o ferro está presente no sedimento de água doce na forma apropriada, as bactérias redutoras de ferro desviam o fluxo de elétrons em uma via que difere da redução de sulfato e produção de metano, embora haja populações sulfato redutoras e metanogênicas potencialmente ativas, o que se deve principalmente aos níveis energéticos das reações de oxi-redução dos compostos envolvidos.

No entanto, em sedimentos marinhos, Coates et al. (1996a) demonstraram que a adição de ferro não interfere no processo de sulfato redução nem na degradação de hidrocarbonetos, mas reiteram a viabilidade da degradação anaeróbia de hidrocarbonetos por sulfato redução (COATES et al., 1996a, 1996b, 1997).

## 2.4 Microrganismos degradadores de hidrocarbonetos

No estudo da biodegradação de compostos aromáticos diversos microrganismos foram identificados como degradadores de hidrocarbonetos. De acordo com Atlas (1981) diversos grupos de bactérias e fungos tem se mostrado capazes de realizar esse tipo de degradação.

Os gêneros mais comuns apontados como degradadores de hidrocarbonetos são: *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Candida* e *Sporobolomyces*, (ATLAS, 1981).

Os organismos mais numerosos no solo e no sedimento são as bactérias (TORTORA et al., 2005) e alguns fatores ambientais críticos afetam as suas atividades no solo, conforme se verifica na Tabela 3. De acordo com o Corseuil (1994), os estudos de biodegradação além de focar em condições apropriadas de receptores de elétrons e nutrientes, devem dar mais atenção à possível necessidade de se aumentar as populações microbianas autóctones, para assegurar que as concentrações de biomassa sejam suficientemente altas para confirmação das taxas de degradação do contaminante.

**Tabela 3. Valore ambientais críticos para a atividade microbiana no solo**

Fator ambiental	Nível ótimo
Oxigênio	Metabolismo aeróbio: maior do que 0,2 mg/L de oxigênio dissolvido; porosidade mínima de 10%. Metabolismo anaeróbio: menor do que 0,2 mg/L de oxigênio dissolvido; porosidade menor que 1%
Nutrientes	Nitrogênio, fósforo e outros nutrientes suficientes para não limitar o crescimento microbiano (C:N:P relação sugerida 120:10:1)
Umidade	Solos insaturados: 25-85% da capacidade de campo, -0,01MPa; poderá afetar a transferência de oxigênio no solo (condição aeróbica) Solos saturados: a água poderá afetar a taxa de transferência de oxigênio e, conseqüentemente as taxas de degradação aeróbicas
pH	5,5 – 8,5
Potencial Redox	Aeróbios e anaeróbios facultativos: maior que 50 mV Anaeróbios: menor que 50 mV
Temperatura	15-45°C (mesofílicos)

FONTE: (USEPA, 1996)

## 2.5 Biorremediação

As atividades humanas na produção, transporte e estocagem de petróleo e de seus derivados inevitavelmente envolvem riscos de derrames, tais riscos podem ser minimizados, mas não conseguem ser eliminados (BALBA et al., 1998).

A biorremediação é um conjunto de tecnologias que utiliza microrganismos no intuito de otimizar a eficiência de remoção natural dos contaminantes. Essa técnica tornou-se uma alternativa atraente na limpeza de petróleo e de seus derivados, pois é um sistema simples de manter, aplicável em grandes áreas, possui uma boa relação custo-benefício além da possibilidade de ocasionar a remoção total do contaminante (BENTO et al., 2005).

As técnicas de biorremediação podem ser classificadas de acordo com os tratamentos e local de aplicação. A classificação de acordo com o local de aplicação é denominada *in situ*, quando a execução do tratamento é realizada na área contaminada, ou *ex situ*, quando o tratamento é aplicado fora da área degradada.

De acordo com os tratamentos, a biorremediação pode ser composta por técnicas como a atenuação natural, o bioestímulo, o bioaumento e a fitorremediação. A atenuação natural constitui-se dos processos de degradação que ocorrem naturalmente, sem a intervenção do homem, no ambiente contaminado. A técnica de bioestímulo tem por objetivo favorecer/estimular o crescimento da população microbiana existente no meio. Este estímulo pode ser através do aumento da biodisponibilidade do contaminante, da redução da toxicidade, da otimização da umidade, dos nutrientes, do oxigênio e, ainda, pela introdução de substratos que estimulam a atividade degradativa da biota nativa (SEABRA, 1997).

O bioaumento é uma técnica em que ocorre a introdução de microrganismos capazes de degradar o contaminante no solo. Esses microrganismos podem ser provenientes de culturas de estoque ou serem isolados de outras áreas anteriormente contaminadas. A técnica da fitorremediação utiliza o sistema vegetal e sua microbiota para promover a degradação do contaminante.

A escolha da técnica de biorremediação a ser empregada depende de diversos fatores, tais como: concentração do contaminante, densidade populacional de microorganismos degradadores e potencial de degradação (BENTO et al., 2005). De acordo com Bento et al. (2005), para garantir uma aplicação prática, qualquer processo de biorremediação deve demonstrar que a remoção dos contaminantes é o principal efeito da biodegradação e que a taxa de degradação é maior do que a taxa natural de descontaminação.

## **2.6 Biossurfatante**

Os tensoativos ou surfatantes são moléculas anfipáticas, constituídas por porções hidrofílicas e hidrofóbicas, que em função da presença desses dois grupos tendem a se distribuir nas interfaces de fases fluidas com diferentes graus de polaridade, como óleo/água e água/óleo. Essa propriedade os torna capazes de reduzir a tensão superficial ou interfacial, quando presentes na concentração micelar crítica (CMC), formando microemulsões. Nessa condição, os hidrocarbonetos são capazes de se solubilizarem em água e vice versa (BANAT, 1995; DESAI & BANAT, 1997).

Os surfatantes químicos têm sido usados pela indústria petroquímica para auxiliar na limpeza em derrames de óleos e para aumentar a recuperação de petróleo de reservatório, porém esses compostos não são biodegradáveis e podem ser tóxicos ao meio ambiente (BANAT, 1995).

Os biossurfatantes são moléculas biológicas com propriedades similares aos surfactantes químicos, porém sua maior vantagem sobre os surfatantes químicos é a aceitação ecológica, uma vez que são biodegradáveis e, deste modo, evitam problemas como toxicidade e acumulação no meio ambiente (BANAT, 1995; SIM et al., 1997).

De acordo com Desai e Banat (1997), os biossurfatantes são classificados de acordo com sua composição química e sua origem microbiana, como: glicerídeos; lipopeptídeos e lipoproteínas; ácidos graxos, fosfolipídios e lipídios neutros; biossurfatantes poliméricos e biossurfatantes particulados. Dentre esses, cabe destacar os glicerídeos, uma das classes mais conhecida e mais estudadas que inclui os raminolipídeos.

Em geral, a degradação dos hidrocarbonetos é influenciada pela sua biodisponibilidade, no entanto os mesmos são pouco solúveis em água. Além disso, os hidrocarbonetos são facilmente absorvidos em frações de argila ou húmus no solo e, passam muito lentamente para a fase aquosa, onde são metabolizadas pelos microorganismos. Nesse sentido, os biossurfatantes atuam no intuito de aumentar a solubilidade desses hidrocarbonetos e melhorar a sua a biodisponibilidade, podendo assim acelerar a degradação (BARDI et al., 2000).

A aplicação de surfatantes como auxiliares à técnicas de biorremediação em solos contaminados por óleo cru foi avaliada por Millioli (2009). Nesse trabalho, o autor destacou a importância de se verificar o período de aplicação do surfatante e de sua concentração, uma vez que o autor constatou que a aplicação de ramnolipídio em uma contaminação recente não foi muito benéfica, provavelmente pela alta concentração de óleo e pela toxicidade do biossurfatante. Além disso, o autor testou diversas concentrações de surfatantes e verificou que a adição de 4 mg/g de ramnolipídio apresentou maior remoção, cerca de 50%, dos hidrocarbonetos totais de petróleo, sendo, ainda, observada uma tendência em se alcançar uma remoção ainda maior num período superior a 45 dias de tratamento.



### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

Neste capítulo serão apresentados os procedimentos utilizados no experimento de biorremediação de um sedimento de manguezal contaminado com óleo diesel. O estudo objetivou a avaliação de dois tratamentos de biorremediação, atenuação natural e atenuação natural incentivada através da adição de biossurfatante, em condições laboratoriais. Os tratamentos foram realizados em triplicata e como forma de incentivo buscou-se uma maior biodisponibilidade do contaminante. Foram monitorados parâmetros físico-químicos e biológicos durante os 111 dias de tratamento.

A avaliação da degradação foi realizada através do acompanhamento dos 16 hidrocarbonetos poliaromáticos considerados prioritário pela *U.S. Environmental Protection Agency* (U.S.EPA, 2009).

Este trabalho faz parte de um projeto intitulado “Biorremediação de sedimento estuarino contaminado por hidrocarbonetos poliaromáticos provenientes de derrame de óleo cru e óleo diesel e alterações sortivas”, em que foram avaliadas outras variáveis como o nível de adsorção dos HPAs no sedimento (dados não publicados); identificação dos microrganismos degradadores com uso da técnica de biologia molecular (dados não publicados); avaliação dos níveis de toxicidade após os tratamentos adotados no sedimento em ambas as contaminações (TORREIRO, 2010).

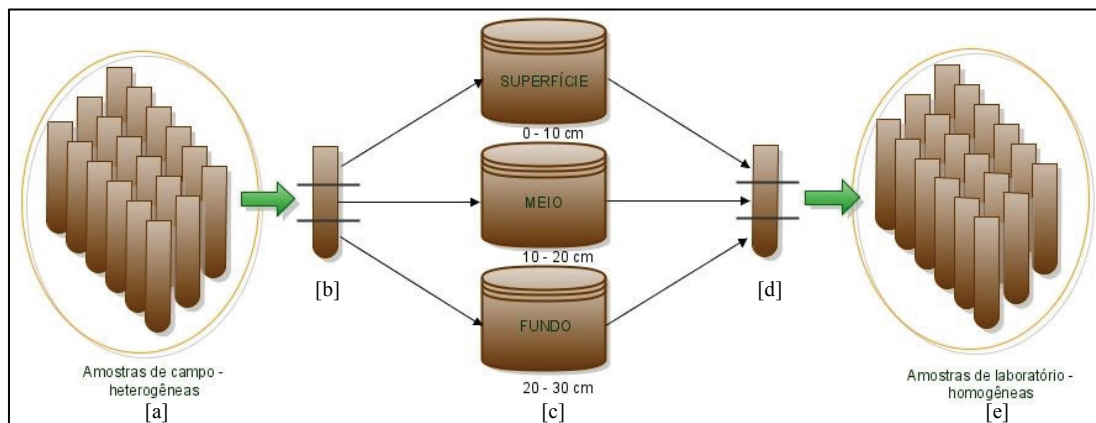
#### **3.1 Coleta e caracterização do sedimento**

O sedimento utilizado no experimento é proveniente de um manguezal da Ilha de Cocaia localizada a aproximadamente 40 km de Recife, capital do estado de Pernambuco, próximo ao Porto de Suape. A coleta foi realizada no dia 08 de junho de 2009, com auxílio de um testemunho de aço com 50 mm de diâmetro e 300 mm de altura, em local isento de contaminação por petróleo ou derivados.

Em campo, cada perfil de amostra foi medido longitudinalmente e particionado em três alturas, cada uma com 10 cm, denominadas superfície, meio e fundo. A amostra de superfície era correspondente aos primeiros 10 cm de profundidade e, assim, sucessivamente para as amostras de meio e fundo. A medida que os perfis eram coletados e divididos, as amostras foram colocadas em recipientes de 15 litros, sendo

um recipiente para cada tipo de amostra. Essas foram tampadas com papel filme, acondicionadas no gelo e encaminhadas para o laboratório.

No laboratório, as amostras contidas em cada recipiente foram devidamente homogeneizadas. Após a homogeneização, os perfis foram remontados em colunas de vidro com 60 mm de diâmetro externo e 300 mm de altura com fundo aberto. A sequência deste procedimento pode ser visto na Figura 3.



**Figura 3. Esquema do procedimento adotado para homogeneização das amostras de sedimento. [a] 48 amostras coletadas em campo; [b] separação das 48 amostras em três partes: superfície (0-10 cm), meio (10-20 cm) e fundo (20-30 cm); [c] homogeneização das amostras de superfície, meio e fundo; [d] perfil de solo remontado após homogeneização; [e] perfis prontos.**

As 48 colunas contendo os perfis de solo foram revestidas externamente por um tecido escuro, a fim de evitar a fotodegradação e perda das frações finas do sedimento pelo fundo da coluna. Em seguida, foram acondicionadas em aquários com 30 cm de largura, 30 cm de profundidade e 35 cm de altura. Cada aquário continha 8 colunas.

A caracterização físico-química dos sedimentos de superfície, de meio e de fundo foi realizada no Laboratório de Saneamento Ambiental, departamento de Engenharia Civil da UFPE com análise dos parâmetros: carbono orgânico total, nitrogênio total e fósforo total, conforme metodologias apresentadas no Item 3.6.1.1. As análises de granulometria foram realizadas no Laboratório de Química de Interfaces, do Departamento de Engenharia de Minas da UFPE, com o auxílio do equipamento *Mastersizer* 2000. Esse equipamento mede o tamanho das partículas, ou mais especificamente, a distribuição dos diferentes tamanhos de partículas em uma amostra através da difração de raio laser.

### **3.2 Concepção física do experimento de remediação**

O experimento de remediação foi concebido com dois tratamentos, um de atenuação natural e outro de atenuação natural incentivada, apresentados no item 3.3. Cada unidade de tratamento era formada por um aquário contendo 8 colunas de perfis de solo. Os tratamentos foram realizados em triplicata, totalizando 6 aquários.

Os aquários foram colocados em local protegido da chuva. Os mesmos possuíam uma coluna d'água de 30 cm, sendo essa uma água salina proveniente da praia de Barra do Sirinhaém, Pernambuco, previamente filtrada. Um terço dessa água era substituído em intervalos de 12 horas. Além disso, os aquários foram aerados com auxílio de um compressor de ar e pedra de aquário, para facilitar a distribuição do ar. Alguns detalhes podem ser vistos na Figura 4 [b]

A água salina utilizada no experimento era armazenada em duas caixas d'água de fibra de vidro de 5 mil litros, Figura 4 [a], sendo ambas interligadas e uma delas aerada ininterruptamente durante o experimento. A água de rejeito do experimento era conduzida a uma caixa d'água de 500 litros, Figura 4 [d], onde permanecia por um determinado período para posterior descarte.

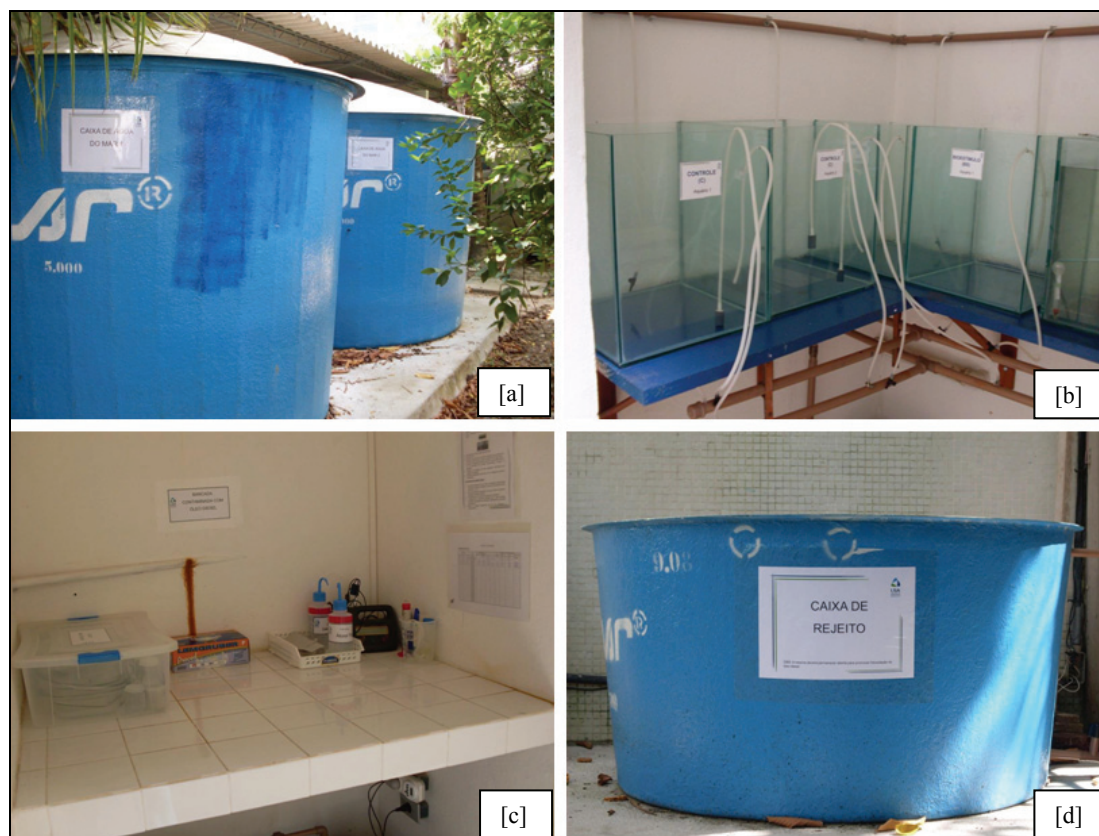


Figura 4. Instalações físicas do esquema experimental. [a] caixas d'água de 5 mil litros para armazenagem de água do mar em laboratório; [b] aquários com tubulação de entrada e saída d'água e entrada de ar; [c] bancada de apoio; [d] caixa d'água de 500 litros para água de rejeito.

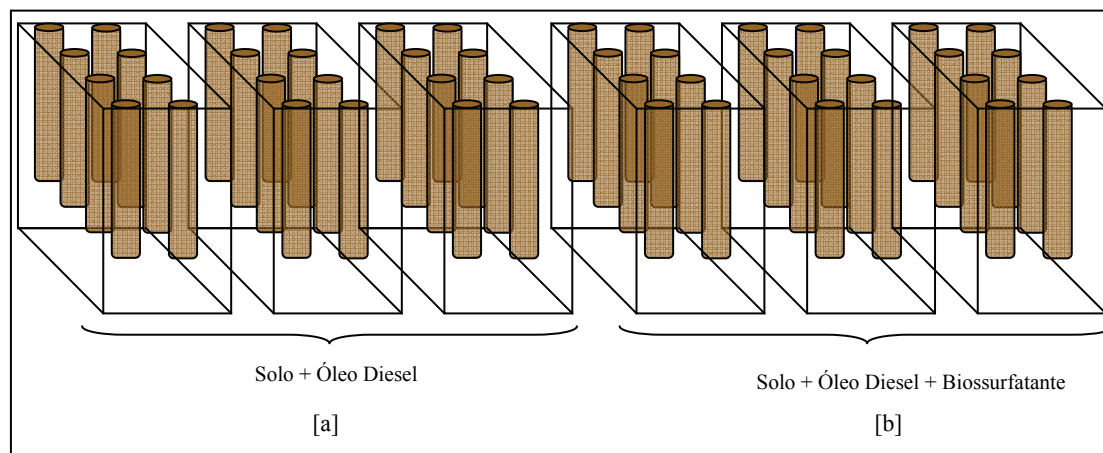
### 3.3 Tratamentos de remediação

Dentre as técnicas de remediação amplamente estudadas optou-se, nesse trabalho, pelo estudo da aplicação de biossurfatante, como um possível catalisador da biodegradação. Um segundo tratamento foi avaliado com o intuito de verificar a degradação que ocorre naturalmente no meio, sem a interferência do biossurfatante.

Os tratamentos foram concebidos da seguinte maneira:

- Atenuação Natural: cada unidade de tratamento foi composto por um aquário contendo 8 colunas com perfis de sedimento. O sedimento recebeu uma contaminação por óleo diesel.
- Atenuação Natural Incentivada: semelhante ao de atenuação natural, porém acrescido de biossurfatante.

Na Figura 5 é apresentado um esquema dos tratamentos.



**Figura 5. Esquema experimental com apresentação das triplicatas de tratamento. [a] tratamento de atenuação natural; [b] tratamento de atenuação natural incentivada.**

### 3.4 Contaminação e caracterização do óleo diesel

A contaminação do sedimento com óleo diesel foi realizada no topo da coluna, simulando um derrame. O volume de óleo diesel utilizado foi de 40 mL por coluna, uma carga de aproximadamente  $1,06 \text{ mL.cm}^{-2}$ . A quantidade de contaminação é aproximadamente a mesma utilizada por Barahona et al. (2004) e Chagas-Spinelli (2007).

O óleo diesel utilizado no experimento foi adquirido em um posto de combustíveis de autorizado Petrobrás (Posto BR). O mesmo possui 3% de biodiesel, conforme a lei nº 11.097 de 13 de Janeiro de 2005, que fixa a introdução de 5% em volume de biodiesel no óleo diesel, com crescimento progressivo a partir de 2% em 8 anos.

A caracterização do óleo diesel foi realizada no Laboratório de Combustíveis, do departamento de Engenharia Química da UFPE. O laudo com os resultados pode ser visto no Anexo 1.

### 3.5 Biossurfatante

À adição do biossurfatante teve por objetivo promover uma maior biodisponibilidade do contaminante, o óleo diesel. A produção do biossurfatante foi feita no LSA/DEC/UFPE, conforme metodologia apresentada por Silva et al. (2009). O biossurfatante produzido é classificado como glicerídeo, do tipo ramnolípido.

Em cada coluna foram adicionados 35 mL de solução biossurfatante, o que representa 0,04 g de ramnolípido por coluna de sedimento. A concentração de ramnolípido utilizada foi limitada pela capacidade produtiva do biossurfatante em laboratório. A adição do biossurfatante foi realizada no topo da coluna, semelhante a contaminação.

A concentração de ramnolípido na solução foi obtida pelo método fenol-ácido sulfúrico descrita por Dubois et al. (1956). Além disso, foram verificadas a concentração micelar crítica (CMC) e a emulsificação. A CMC foi obtida através de diluições seqüenciais do biossurfactante e medições da tensão superficial. A emulsificação foi determinada de acordo com Cooper e Goldenberg (1987) adaptado por Fernandes et al. (2007). As características do biossurfatante são apresentadas na Tabela 4.

**Tabela 4. Caracterização do biossurfatante utilizado no tratamento de atenuação natural incentivada.**

Parâmetro	Unidade	Concentração
Ramnolípido	g/L	1,04
CMC	g/L	0,13
Emulsificação	%	66,67

### 3.6 Amostragem e monitoramento do sedimento e da água

#### 3.6.1 Amostragem do sedimento

A coleta do sedimento foi realizada com a retirada de uma coluna de cada aquário em intervalos de tempo pré-determinados. Na seqüência, os perfis das colunas eram novamente separados em superfície, meio e fundo com o auxílio de espátulas de

inox, uma para cada altura, em bandejas de vidro. As alturas eram homogeneizadas individualmente com o auxílio de uma colher de inox e preparadas para as análises posteriores.

As amostras foram coletadas ao longo dos 4 meses de experimento, totalizando 5 coletas nos tempos: 0<sup>2</sup>, 21<sup>o</sup>, 45<sup>o</sup>, 62<sup>o</sup> e 111<sup>o</sup> dias de tratamento. As demais colunas, que permaneceram nos aquários, serão coletadas em tempos posteriores durante execução do projeto citado anteriormente e, portanto seus resultados não serão apresentados no presente trabalho.

Após cada coleta as amostras eram acondicionadas conforme as exigências de cada análise.

#### 3.6.1.1 Quantificação dos parâmetros físico-químicos no sedimento

Os HPAs foram determinados pelo método USEPA 8270 (USEPA, 2004) e quantificado no Laboratório de Meio Ambiente do Centro de Tecnologias do Gás (CTGás/SENAI/RN). A amostra de sedimento foi estocada em 4°C até a execução das análises. O procedimento para quantificação dos HPAs envolveu a extração de uma alíquota, a partir de 10 g de sedimento, usando *extractor soxhlet* e diclorometano como solvente. O eluente limpo foi obtido, posteriormente, usando uma coluna cromatográfica de sílica-alumina de 40 cm, com diclorometano e n-hexano como solventes. Os 16 HPAs foram identificados e quantificados através de cromatografia gasosa por espectrometria de massa (CG-MS)

As demais análises em sedimento foram determinadas no Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA), do Departamento de Engenharia Civil da UFPE.

O pH e o potencial redox foram monitorados através do método potenciométrico. O carbono orgânico total foi realizado conforme metodologia descrita por Loring e Ratala (1992). Nesse método o carbono orgânico presente no sedimento é oxidado pelo dicromato de potássio. Posteriormente o excesso de dicromato é titulado com sulfato ferroso amoniacal.

---

<sup>2</sup> Este tempo refere-se a 7 dias após a contaminação do sedimento com óleo diesel e imediatamente antes do início do incentivo com biossurfatante. Esta foi a primeira coleta e considerada como a caracterização do sedimento contaminado em estudo. A contagem para as demais coletas são a partir desta.

A concentração de nitrogênio total foi obtida conforme metodologia descrita por Alves et al. (1999). Nesse procedimento foi realizada a digestão da amostra com ácido sulfúrico concentrado seguida da destilação com hidróxido de sódio e da titulação ácida.

O fósforo total foi obtido pela extração em mufla e metodologia colorimétrica, conforme descrito por Grasshoff et al. (1999) e Protazio et al. (2004).

### 3.6.1.2 Quantificação das bactérias heterotróficas totais do sedimento

As análises microbiológicas foram realizadas nos instantes 0, 62° e 110° dias de tratamento com a quantificação das bactérias heterotróficas totais. Para remover a microbiota do sedimento foram colocados 5 g de sedimento em um erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de solução salina 0,9% (NaCl) estéril. Os frascos foram mantidos sob agitação de 200 rpm por 20 min, em temperatura ambiente. Do sobrenadante foram realizadas 5 diluições em série seguidas do plaqueamento, através da técnica de *pour plate*, das últimas 3 diluições. O meio utilizado para promover o crescimento dos microrganismos foi o meio sólido TSA (*Tryptic Soy Agar*). As placas foram incubadas a 30°C ± 1°C por 48 horas e as colônias quantificadas.

### 3.6.2 Amostragem da água

A coleta da água dos aquários era realizada no instante que antecedia a coleta de sedimento, com a retirada de 3 litros de água de cada aquário. Do volume total, 1 litro era acidificada a pH 2, para conservação das características, e mantida em geladeira. Os outros 2 litros da amostra eram acondicionados em geladeira para análises que não necessitavam de fixação. Toda a coleta era realizada em recipiente de vidro âmbar para garantir que não houvesse interferências nos constituintes.

#### 3.6.2.1 Quantificação dos parâmetros físico-químicos na água do mar

As análises físico-químicas da água do mar foram realizadas no LSA/DEC/UFPE.



O pH e o potencial redox foram monitorados através do método potenciométrico, assim como o oxigênio dissolvido (OD), a salinidade e a condutividade.

Os parâmetros óleos e graxas (O&G), nitrogênio total e sulfato tiveram suas concentrações obtidas conforme metodologia descrita no *Standard methods for examination of water and wastewater* (1999). O fósforo total, método colorimétrico, e o nitrito, método colorimétrico ou da sulfanilamida, foram obtidos conforme metodologias descritas por Grasshoff et al. (1999).

As análises de tensão superficial foram realizadas no Laboratório de Tecnologia Mineral, do Departamento de Engenharia de Minas da UFPE.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

Este capítulo apresenta os resultados e discussões do experimento de biorremediação no sedimento estuarino contaminado por óleo diesel, como: caracterização granulométrica do sedimento, alguns parâmetros físico-químicos e microbiológicos importantes no processo de biodegradação e os resultados do monitoramento dos 16 HPAs. Além disso, são apresentados os resultados do monitoramento da água.

### **4.1 Sedimento estuarino**

Nas seções a seguir são apresentados os resultados obtidos a partir do experimento realizado, o que inclui a análise da granulometria, o número de bactérias heterotróficas totais e os parâmetros físico-químicos: temperatura, pH, Eh, carbono orgânico total, nitrogênio total e fósforo total e HPAs.

#### **4.1.1 Análise granulométrica**

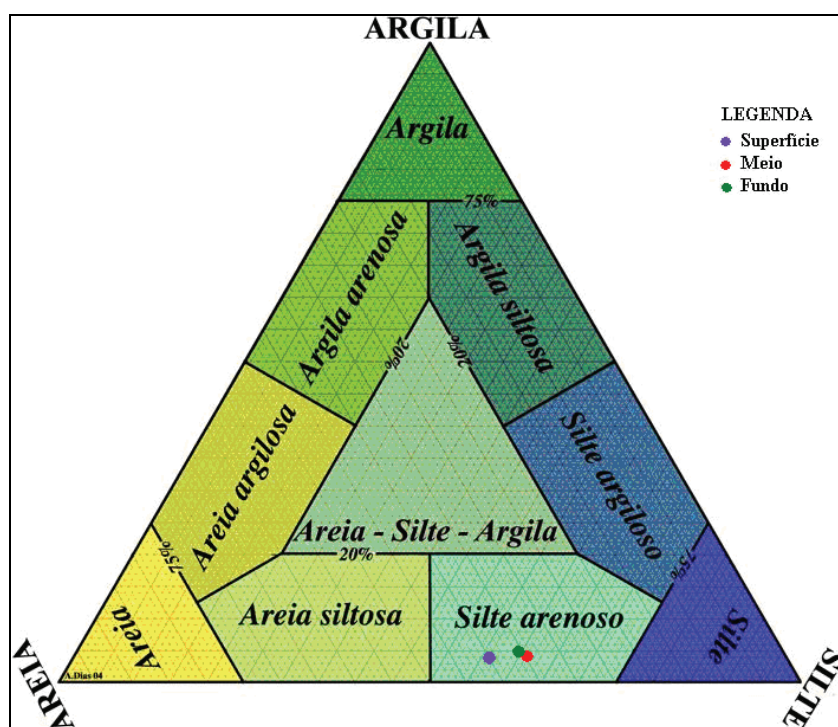
A análise granulométrica foi realizada por difração de raio laser no sedimento *in natura*, o que permitiu classificar os sedimentos de superfície, meio e fundo de acordo com a Escala de Wentworth. Uma síntese dos resultados é apresentada na Tabela 5. Os resultados completos da análise de granulometria estão no Anexo 2.

Em sedimentos marinhos, as partículas de areia, embora tenham ausência de coesão secas, aderem umas às outras devido à tensão superficial do filme de água que as envolve quando úmidas. As partículas de silte e de argila apresentam coesão mesmo quando secas. Outra propriedade que distingue as classes texturais do solo é a porosidade, muito elevada nos cascalhos e areias, porém muito pequena nos siltes e nas argilas (DIAS, 2004).

**Tabela 5. Resultados da análise de granulometria da caracterização dos sedimentos de superfície, meio e fundo, de acordo com a escala de Wentworth.**

Nome dos agregados (Escala de Wentworth)	Dimensões ( $\mu\text{m}$ )	Volume (%)		
		Superfície	Meio	Fundo
Colóides	< 1	1,0	0,8	0,8
Argila	<3,90625	3,6	3,0	3,2
Silte	3,90625 – 62,5	60,4	56,1	59,8
Areia muito fina	62,5 – 125,0	31,6	36,9	33,8
Areia fina	125,0 – 250,0	2,01	3,1	2,3
Areia média	250,0 – 500,0	0,4	-	-
Areia grossa	500,0 – 1000,0	0,9	-	-
Areia muito grossa	1000,0 – 2000,0	-	-	-

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 7, as amostras de superfície, meio e fundo possuem granulometria semelhante, com predomínio de partículas siltosas. Conforme o diagrama de Shepard (1956, *apud*. DIAS, 2004), Figura 6, as amostras são classificadas como silte-arenoso.



**Figura 6. Diagrama de Shepard (1954)**  
Fonte: (DIAS, 2004)

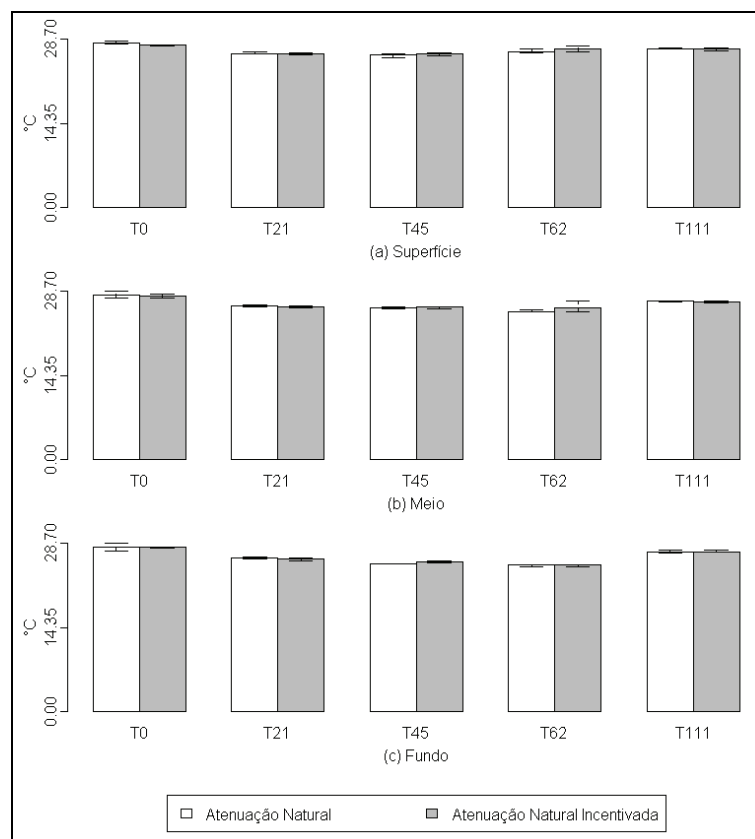
As propriedades físicas do solo são responsáveis pelos mecanismos de atenuação física de poluentes, possibilitando ainda condições para que os processos de atenuação química e biológica possam ocorrer (CETESB, 2010). Os solos siltosos são constituídos predominantemente por partículas de silte, que são pequenas e leves. Os poros desses solos são diminutos e apresentam baixa permeabilidade, implicando em uma baixa percolação de contaminantes.

#### 4.1.2 Temperatura

Os efeitos da temperatura sob a degradação dos hidrocarbonetos são interativos com outros fatores, tais como a qualidade da mistura de hidrocarbonetos e a composição das comunidades microbianas (ATLAS, 1981). Além disso, a temperatura tem influência na viscosidade do óleo e, de certa forma, sobre a sua biodisponibilidade (MARGESIN & SCHINNER, 2001). Assim, segundo Atlas (1981), a temperatura muitas vezes não é o principal fator limitante para a degradação de hidrocarbonetos no ambiente, exceto no que se refere a fatores como o estado físico do petróleo.

O metabolismo microbiano também é afetado pela temperatura e, conseqüentemente, a taxa de biodegradação (AISLABIE et al., 2006). Ward e Brock (1976) verificaram que temperaturas acima de 25°C eram ideais para a biodegradação de hidrocarbonetos em lagos. Dibble e Bartha (1979) concluíram que temperaturas acima de 20°C são as ideais para biorremediação, por *landfarming*, em um lodo/solo gerado no processo de refino do petróleo.

No presente trabalho, a média geral da temperatura dos tratamentos foi de 26°C. Os resultados são apresentados na Figura 7.



**Figura 7. Resultados do monitoramento da temperatura do sedimento nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111).**

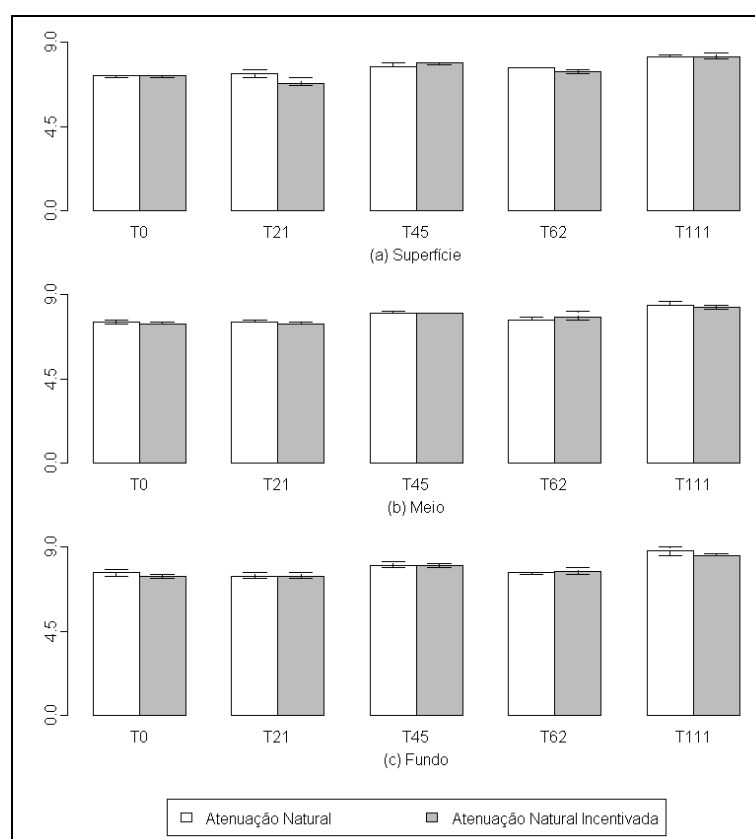
Durante os 111 dias de tratamento não houve grandes variações de temperatura no sedimento ao longo do tempo e nem com a profundidade. De acordo com os limites ambientais críticos apresentados na Tabela 3 as amostras indicam um ambiente mesofílico. A maioria dos microrganismos cresce dentro de variações limitadas de temperatura, sendo que há somente 30°C de diferença entre a temperatura máxima e mínima de crescimento. Considerando a faixa ideal de crescimento, os microrganismos não apresentam bom crescimento nas temperaturas extremas, pois temperaturas acima da máxima podem tornar inativos os sistemas enzimáticos da célula, isso devido à desnaturação da enzima (TORTORA et al., 2005).

De acordo com os dados apresentados a temperatura não foi um fator limitante a biodegradação.

### 4.1.3 pH e potencial redox

Os organismos devem manter um equilíbrio entre os ácidos e as bases, pois as reações bioquímicas são extremamente sensíveis, mesmo em pequenas alterações de acidez ou alcalinidade dos ambientes em que elas ocorrem (TORTORA et al., 2005). Segundo Margesin e Schinner (2001) a mineralização de hidrocarbonetos é favorecida por valores de pH próximos a neutralidade.

Dibble e Bartha (1979) indicaram valores ideais de pH para a degradação de hidrocarbonetos em solo/lodo de 7,5 e de 7,8. Os valores de pH verificados no processo de biodegradação do presente trabalho são apresentados na Figura 8.

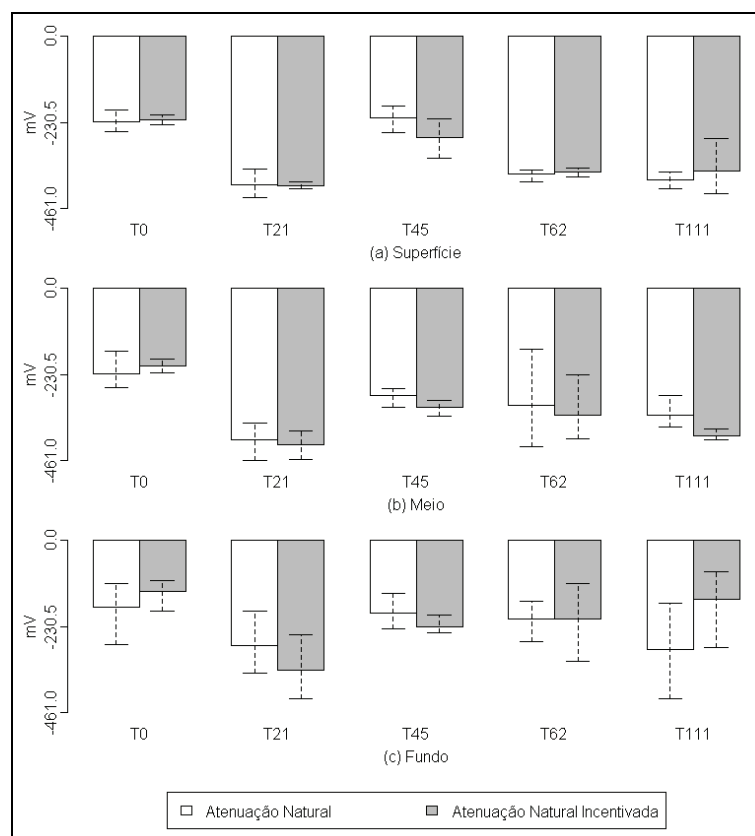


**Figura 8. Resultados do monitoramento pH no sedimento nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111).**

NOTA: As colunas referem-se ao valor médio das réplicas de tratamento, com indicações dos valores de máximo e de mínimo obtidos.

Como pode ser visto na Figura 8, os valores de pH variaram entre 6,7 e 9,0. Em média, os valores de pH da superfície, meio e fundo foram de 7,5; 7,8 e 7,9, respectivamente, ao longo do tratamento. Conforme a Tabela 3 os valores de pH mantiveram-se dentro dos limites ambientais críticos em 96% das amostras avaliadas.

Ambientes anaeróbios são indicados, conforme Tabela 3, quando o potencial redox está abaixo de 50 mV, em que aceptores de elétrons alternativos ao oxigênio, como ferro, nitrato, manganês ou sulfato atuam como aceptores finais de elétrons. Os resultados de potencial redox verificados ao longo do experimento e da profundidade são apresentados na Figura 9.



**Figura 9. Resultados do monitoramento do potencial redox no sedimento nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111).**

NOTA: As colunas referem-se ao valor médio das réplicas de tratamento, com indicações dos valores de máximo e de mínimo obtidos.

Todos os valores obtidos de potencial redox foram menores que -110 mV. Conforme Tabela 2, valores de potencial redox de aproximadamente -200 mV indicam

um processo de sulfato redução. Coates et al. (1996a, 1996b, 1997) verificaram que em sedimentos marinhos ocorre a degradação de hidrocarbonetos por sulfato redução. De acordo com Karthikeyan e Bhandari (2001), a rápida depreciação do oxigênio, do nitrato e do ferro em sedimentos marinhos e a abundância de sulfato na água do mar indicam a utilização do sulfato como acceptor final de elétrons. As altas concentrações de sulfato na água do mar foram confirmadas através de análises realizadas na água utilizada nos tratamentos de biorremediação, média de 1244,88 mg/L. Esses resultados podem ser verificados na Tabela 8.

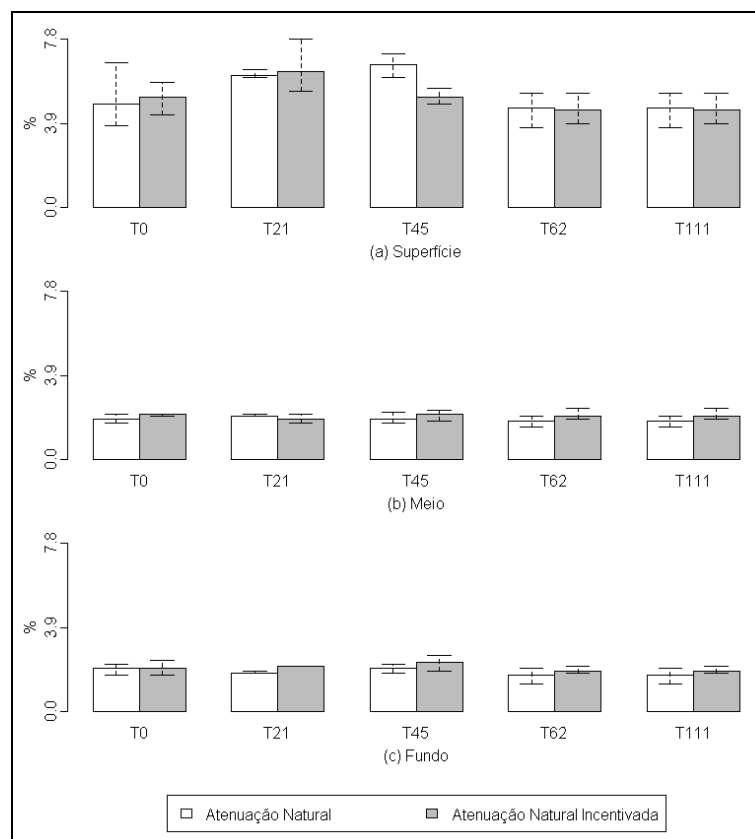
De acordo com Berry et al. (1987), valores de potencial redox inferiores a -200 mV indicam a ocorrência de processos metanogênicos. Em 75,5% das amostras de sedimento do tratamento de atenuação natural apresentaram valores de potencial redox abaixo de -200 mV e, no tratamento de atenuação natural incentivada, em 82,2%. Segundo Riser-Robert (1998) quando existe uma limitação de doador de elétrons (hidrocarbonetos), as bactérias redutoras de sulfato podem afastar as metanogênicas do substrato disponível, mesmo com baixas concentrações de sulfato (< 1 mg/L). Porém, com abundância de doadores de elétrons as metanogênicas podem sequestrar o fluxo de elétrons, mesmo com concentrações de sulfato suficientes para apoiar a sulfato redução. De acordo com observado, principalmente nos tempos T21, T62 e T111, existem indicativos da ocorrência de um processo metanogênico de degradação.

#### 4.1.4 Carbono orgânico total, nitrogênio total e fósforo orgânico total

O carbono é um dos elementos mais importantes para o crescimento microbiano. Ele é essencial para a síntese de todos os compostos orgânicos necessários para a viabilidade celular, sendo considerado o elemento estrutural básico para os seres vivos (TORTORA et al., 2005).

A Figura 10 apresenta os valores de carbono orgânico total das amostras de superfície, meio e fundo ao longo do tempo.





**Figura 10. Resultados da concentração de carbono orgânico total no sedimento nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111).**

NOTA: As colunas referem-se ao valor médio das réplicas de tratamento, com indicações dos valores de máximo e de mínimo obtidos.

Como a contaminação por óleo diesel foi realizada no topo da coluna e, o óleo diesel é constituído basicamente por hidrocarbonetos, a concentração de carbono orgânico total nas amostras de superfície são maiores que nas amostras de meio e fundo.

Como podem ser observadas na Figura 10, as amostras de superfície no T0 indicaram concentrações de 4,8% e 5,1 % para o parâmetro de carbono orgânico total nos tratamentos de atenuação natural e atenuação natural incentivada, respectivamente. Essas concentrações são semelhantes à verificada por Chagas-Spinelli (2007) em seu trabalho, em que uma concentração de 4,8 %, para o mesmo parâmetro, foi encontrada em um solo argiloso após contaminação por óleo diesel ( $40 \text{ g.kg}^{-1}$ ).

Observando os valores de máximo e mínimo nas amostras de superfície, no tratamento de atenuação natural incentivada, nos tempos T0 e T21 a faixa de concentração de carbono não teve grandes variações, porém no T45 ocorre uma redução

de 19%, em média, na concentração de carbono. Para o tratamento de atenuação natural, as concentrações para esse parâmetro permaneceram em uma mesma faixa até o T45 e, uma redução de 30% ocorreu apenas no T62.

No entanto, não foram observadas diferenças entre os tratamentos, uma vez que as concentrações para esse parâmetros no T62 e no T111 são semelhantes em ambos os tratamentos. Além disso, não houve variações significativas de carbono nas amostras de meio e de fundo ao longo do tempo, indicando a pouca percolação do óleo diesel na coluna no período estudado.

Para a síntese celular os microrganismos necessitam, além do carbono, outros elementos. A escassez de nutrientes minerais como nitrogênio e fósforo pode limitar o crescimento de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos em águas ou solos (BARTHA, 1986).

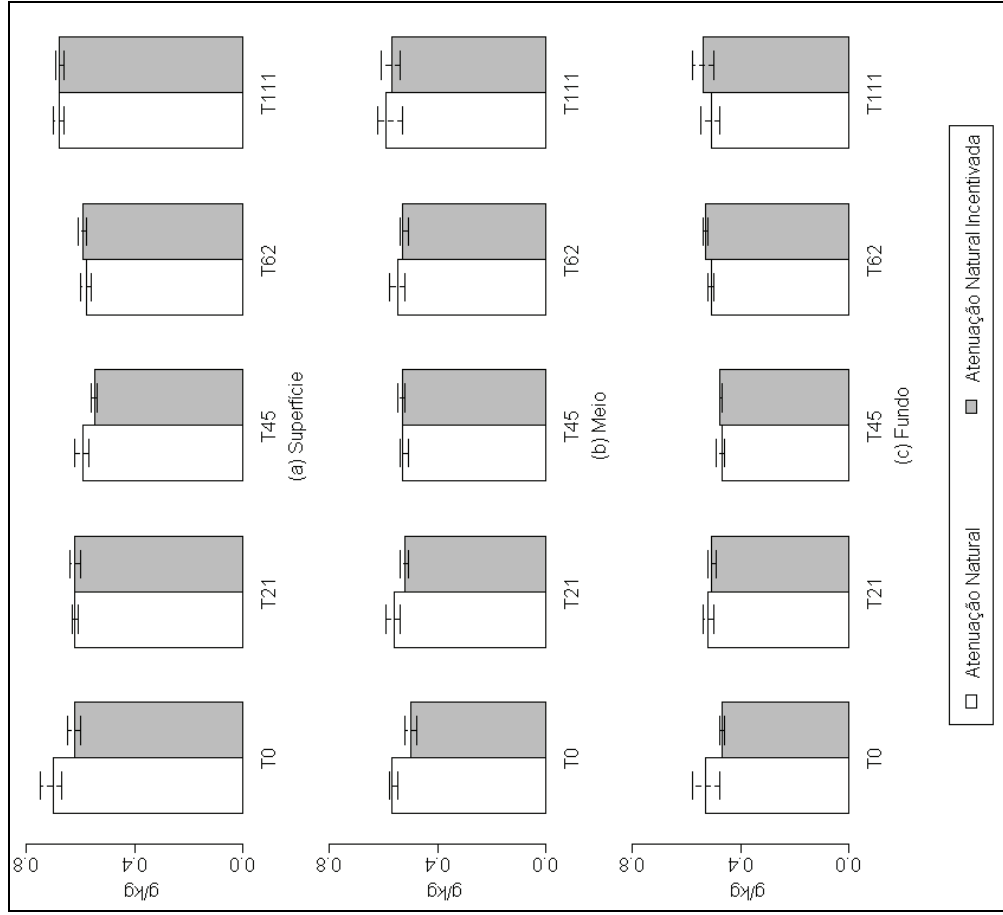
As Figuras 11 e 12 mostram as concentrações dos nutrientes: nitrogênio total e fósforo total, respectivamente, verificados nos tratamentos de biorremediação.

Durante os 111 dias de tratamento não houve variações significativas nas concentrações de nutrientes. Não há indícios de que esse fator tenha limitado o crescimento de microrganismos, possíveis degradadores, uma vez que se observou um aumento significativo no número de colônias de bactérias heterotróficas totais nas amostras ao longo do experimento, como pode ser verificado no Item 4.1.5.

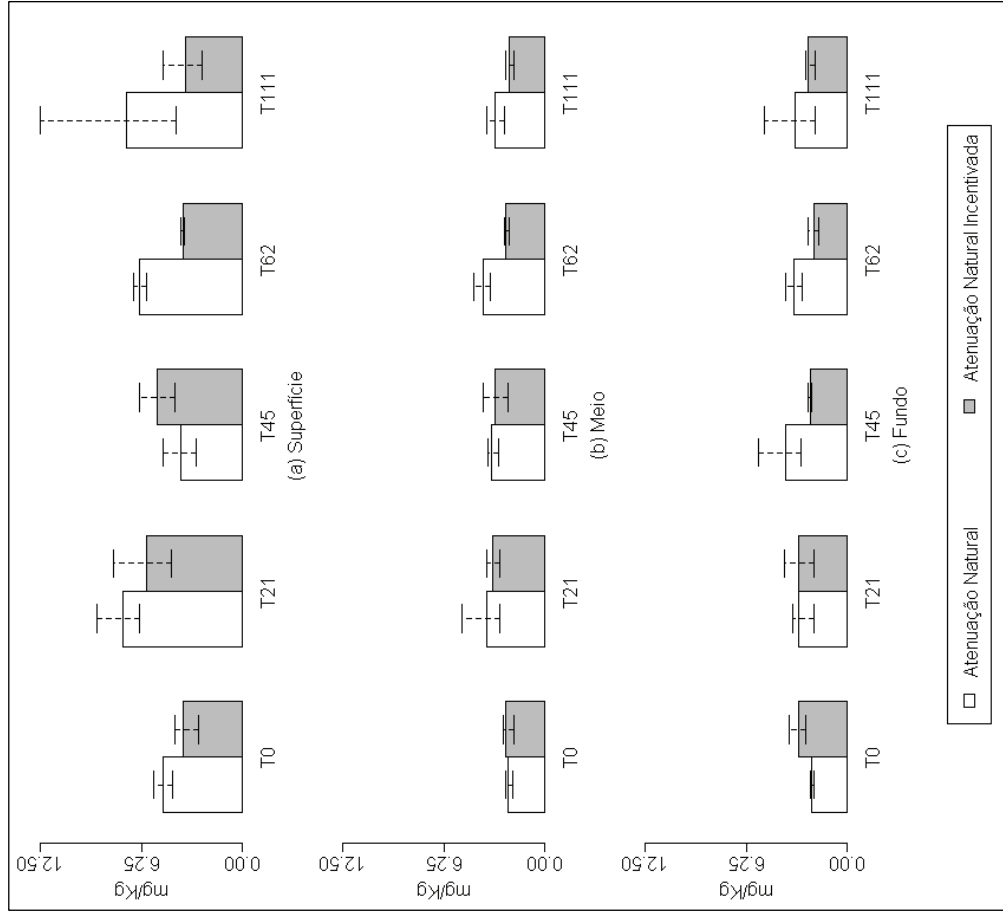
O metabolismo microbiano necessita de um fornecimento ideal de macro e micronutrientes (USEPA, 1996). As relações de C:N:P observadas no trabalho são apresentadas na Tabela 6.

**Tabela 6. Relações entre o carbono orgânico total, o nitrogênio total e o fósforo total nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111).**

Tratamento	Amostra	Relação C:N:P				
		T0	T21	T45	T62	T111
Atenuação Natural	Superfície	100:1,48:0,01	100:1,01:0,01	100:0,90:0,01	100:1,25:0,01	100:1,46:0,01
	Meio	100:3,05:0,01	100:2,77:0,02	100:2,75:0,02	100:3,04:0,02	100:3,25:0,02
	Fundo	100:2,58:0,01	100:2,88:0,02	100:2,37:0,02	100:2,93:0,02	100:2,94:0,02
Atenuação Natural Incentivada	Superfície	100:1,24:0,01	100:0,97:0,01	100:1,07:0,01	100:1,33:0,01	100:1,52:0,01
	Meio	100:2,40:0,01	100:2,77:0,02	100:2,57:0,02	100:2,60:0,01	100:2,82:0,03
	Fundo	100:2,33:0,02	100:2,42:0,01	100:2,13:0,01	100:2,75:0,01	100:2,83:0,03



**Figura 11. Resultados da concentração de nitrogênio total no sedimento nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111).** NOTA: As colunas referem-se ao valor médio das réplicas de tratamento, com indicações dos valores de máximo e de mínimo obtidos.



**Figura 12. Resultados da concentração de fósforo total no sedimento nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111).** NOTA: As colunas referem-se ao valor médio das réplicas de tratamento, com indicações dos valores de máximo e de mínimo obtidos.

A USEPA (1996) sugere relações de 120:10:1 para a atividade microbiana no solo. SPEECE (1996, apud. LÉO, 2002) comenta que a escassez de algum dos nutrientes pode afetar o crescimento dos diferentes grupos de bactérias e afetar todo o processo anaeróbio, e sugere uma relação C:N:P em valores aproximados de 500:5:1.

No entanto, relações nutricionais muito superiores as recomendadas foram verificadas nos tratamentos, porém nem sempre o fator limitante à biodegradação dos hidrocarbonetos são os nutrientes. Alguns autores defendem que as concentrações de nutrientes, ou seja, as relações C:N:P, devem ser compatíveis com a solubilidade dos hidrocarbonetos, ou seja, com a fração biodisponível (ATLAS, 1981). No entanto, as concentrações de fósforo total detectadas foram muito baixas. Nesses casos, um ajuste nutricional seria indicado para garantir que esse fator não se tornasse um fator limitante à biodegradação.

Na Figura 13 pode ser observado o crescimento das bactérias heterotróficas totais, o que sugere que as relações nutricionais sejam compatíveis com a quantidade de carbono biodisponível. Além disso, um crescimento maior é observado no tratamento de atenuação natural incentivada, o que justificaria a maior redução na concentração de fósforo nesse tratamento ao longo do tempo.

O uso da adição de nutrientes como bioestímulo tem sido estudado por diversos pesquisadores (JORGENSEN et al., 1998; BARAHONA et al., 2004; ROSA & TRIGUIS, 2007; CHAGAS-SPINELLI, 2007) com bons resultados. Porém, Atlas (1981), Fedorak e Westlake mostraram que sem a adição de nutrientes os hidrocarbonetos aromáticos são mais facilmente atacados por microrganismos marinhos e do solo do que os hidrocarbonetos saturados, enquanto que a adição de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, estimulam a degradação de hidrocarbonetos saturados mais do que de aromáticos.

#### 4.1.5 Monitoramento das bactérias heterotróficas totais

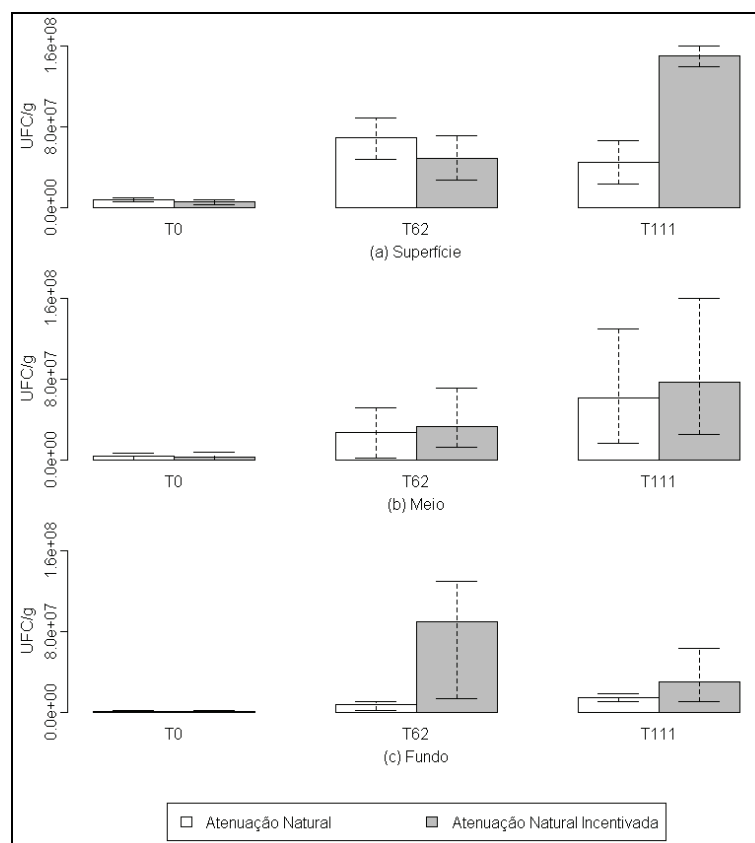
A diversidade de microrganismos no solo é extremamente elevada. Dentre os três domínios, Bacteria, Archaea e Eucaria, o mais predominante no solo pode ser considerado o domínio das bactérias (TORTORA et al., 2005).

A eficiência em um processo de biorremediação está associada à adaptação da população de microrganismos ao consumo do contaminante. A habilidade de uma

comunidade microbiana se adaptar a um composto xenobionte e o tempo necessário para esse processo de adaptação é o principal fator que define a persistência desse composto à degradação. O período adaptativo é funcionalmente definido como um aumento na taxa de degradação com o tempo de exposição a uma substância química (AELION et al., 1987).

Durante esse período de adaptação, segundo Aelion et al. (1987), pode ocorrer um processo seletivo de comunidades degradadoras, refletindo em um processo mais rápido de mineralização. No entanto, essa adaptação reflete em um retardo na degradação do contaminante, que segundo Corseuil (1994), varia inversamente com o número de microrganismos degradadores inicialmente presentes, o que sugere a necessidade da obtenção de concentrações críticas de biomassa.

A quantificação das bactérias heterotróficas foi realizada com o objetivo de verificar o processo adaptativo e de crescimento dos microrganismos autóctones, após a contaminação do sedimento por óleo diesel. A Figura 13 apresenta a quantificação das bactérias heterotróficas totais nos tempos T0, T62 e T111 dias de tratamento.



**Figura 13. Resultado da quantificação das bactérias heterotróficas totais nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T62 e T111).**

NOTA: As colunas referem-se ao valor médio das réplicas de tratamento, com indicações dos valores de máximo e de mínimo obtidos.

O baixo número de bactérias heterotróficas totais obtidos no T0, correspondente a 7 dias após a contaminação com óleo diesel, pode ser atribuído a fatores como o impacto causado pela contaminação por óleo diesel no topo da coluna, amostras de superfície, e a fatores ambientais, uma vez que o sedimento foi transferido de um ambiente natural para o laboratório.

Os valores observados para o T62 nas amostras de superfície indicou um crescimento de 790% para o tratamento de atenuação natural e de 640% para o de atenuação natural incentivada. Esse crescimento pode ser o reflexo da adaptação das comunidades microbianas autóctones ao contaminante. Entre o tempo T62 e T111 houve uma redução de 36% no tratamento de atenuação natural e um crescimento de 210% no de atenuação natural incentivada. No T62 a amostra de fundo apresentou uma quantidade 50% maior no tratamento de atenuação natural incentivada em relação ao de

atenuação natural, assim como uma quantidade 30% maior foi observada no T111 na amostra de superfície do tratamento de atenuação natural incentivada em relação ao de atenuação natural.

Esse crescimento pode estar relacionado com a redução na concentração de fósforo verificada nesse período na atenuação natural incentivada e mencionado anteriormente, porém os parâmetros como temperatura, pH e potencial redox não apresentaram variações entre os tratamentos.

Uma diferença de aproximadamente 100 mV é observada nas amostras de fundo no T111 entre os tratamentos. Isso pode indicar uma mudança no processo de biodegradação, conseqüentemente das comunidades microbianas. Porém essa interferência não foi sentida em relação a quantidade de bactérias heterotróficas totais até o tempo analisado. Segundo Riser-Roberts (1998) a degradação da matéria orgânica a dióxido de carbono e metano, processo metanogênico, envolve a interação entre as bactérias heterotróficas e diversas outras bactérias específicas como: bactérias hidrolíticas, que catabolizam o principal componente da biomassa; bactérias acetogênicas que catabolizam o produto da atividade do primeiro grupo; bactérias homoacetogênicas, que catabolizam compostos com multicarbonos à ácido acético; bactérias metanogênicas.

Apesar de não ter ocorrido variações nas concentrações de carbono orgânico total, alguns hidrocarbonetos, como o naftaleno em maiores quantidades e outros em menores, dados apresentados a seguir no Item 4.1.6, foram quantificados em amostras de meio e fundo. Isso pode estar relacionado a adaptação dos microrganismos a esses compostos e aumento da biomassa, suficientemente para início de processos de degradação.

#### 4.1.6 Biodegradação dos HPAs

O perigo potencial para a saúde de um composto xenobiótico é função de sua persistência no ambiente, bem como a toxicidade da classe química. A persistência é dependente da taxa de biotransformação, que influencia a forma do composto, do tempo de residência e da mobilidade desses compostos no ambiente de subsuperfície (AELION et al., 1987).

Os poluentes orgânicos, como os HPAs, oriundos de uma contaminação em solo são submetidos a processos como: volatilização; solubilização em água; sorção; degradação física, química ou biológica; incorporação em organismos ou plantas. Esses processos são dependentes das propriedades físico-químicas do contaminante, do tipo e estrutura do solo e da sua atividade biológica (BRÄNDLI et al., 2004).

O número de anéis na molécula de HPAs tende a provocar variações nas suas propriedades físico-químicas. Sua solubilidade em água e volatilidade diminui com o aumento no número de anéis aromáticos. Além disso, a capacidade de adsorção aumenta com o aumento do número de anéis, assim como o potencial de acumulação com a diminuição da biodegradabilidade (BRÄNDLI et al., 2004). A Tabela 7 apresenta os valores de solubilidade dos 16 HPAs prioritários em água.

**Tabela 7. Solubilidade dos HPAs prioritários em água (25°C)**

HPA	Solubilidade em água (mg/L)
Naftaleno	31,00
Acenafteno	3,80
Acenaftileno	3,93
Fluoreno	1,90
Fenantreno	1,10
Antraceno	0,045
Fluoranteno	0,24
Pireno	0,123
Benzo(a)antraceno	0,011
Criseno	0,002
Benzo(b)fluoranteno	0,0015
Benzo(k)fluoranteno	0,0008
Benzo(a)pireno	0,0028
Dibenzo(a,h)antraceno	0,0006
Benzo(g,h,i)perileno	0,00026
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,062

FONTE: (MACKAY et al., 1992 apud. BRÄNDLI, 2004; IPCS, 1998)

Nas Figuras de 14 a 29 são apresentados os resultados do monitoramento dos 16 HPAs prioritários.



O naftaleno apresentou uma maior percolação ao longo da coluna durante os 111 dias de tratamento, como pode ser observado na Figura 14, alcançando a amostra de fundo aos 45 dias de tratamento. Isto pode ser atribuído à sua maior solubilidade em água, 31 mg/L, uma vez que as concentrações de naftaleno nas amostras de fundo são muito superiores as de acenafteno, de acenaftileno e de fluoreno que possuem a mesma quantidade de anéis aromáticos, porém solubilidades muito inferiores. As concentrações desses compostos durante os primeiros 45 dias de tratamento tiveram algumas oscilações significativas, principalmente nas amostras de superfície. O acenafteno no T21, principalmente no tratamento de atenuação natural, apresentou concentração superior a do T0, enquanto que no tratamento de atenuação natural incentivada o mesmo comportamento foi verificado entre os tempos T21 e T45.

O acenaftileno apresentou um comportamento semelhante ao acenafteno no tratamento de atenuação natural nos tempos T21 e T45. No fluoreno foi observada uma alta concentração no T0 seguido de uma redução no T21, em ambos os tratamentos, porém no tratamento de atenuação natural a concentração do fluoreno aumenta novamente no T45. Essa dinâmica dificulta a obtenção de eficiências de remoção, uma vez que a biodisponibilidade do contaminante para a degradação é controlada por processos de aprisionamento e liberação do contaminante do solo para a água (CHAGAS-SPINELLI, 2007).

O acenafteno e o fluoreno foram detectados, em baixas concentrações, nas amostras de meio e de fundo de ambos os tratamentos no T21, exceto o acenafteno na amostra de fundo da atenuação natural incentivada. O acenaftileno não infiltrou até as amostras de fundo, porém foi encontrado na amostra de meio, na atenuação natural, no T45. O fenantreno, o antraceno e o fluoranteno, com 3 anéis aromáticos, contaminaram as amostras de meio no T21, sendo que apenas o fluoreno não foi detectado nas amostras de fundo.

Como podem ser observadas na Figura 20 as concentrações de fluoranteno, para ambos os tratamentos, tiveram significativas reduções do T0 para o T21, não sendo mais detectadas no T45 e T62 nas amostras de superfície. No T111 uma pequena concentração de fluoranteno foi verificada no tratamento de atenuação natural incentivada e nenhuma concentração nos tempos T45, T62 e T111 para as amostras de meio e fundo para ambos os tratamentos. Isso pode ser um indicativo da biodegradação do fluoranteno.

Na avaliação do comportamento do contaminante nas amostras de superfície, meio e fundo do sedimento deve ser considerado a dinâmica do sistema, uma vez que a contaminação foi realizada no topo da coluna, o que induz a infiltração do contaminante ao longo do perfil, e que os processos de biodegradação são função da sua biodisponibilidade. De acordo com Dias (2004), os fenômenos de adsorção são comuns em solos argilosos e siltosos, porém muito raros em arenosos. O sedimento utilizado no experimento é caracterizado por uma significativa fração de silte, tanto nas amostras de superfície quanto nas de meio e de fundo. Além disso, sedimentos de manguezal são ricos em matéria orgânica, que acumulam HPAs devido a sua hidrofobicidade (CHAGAS-SPINELLI, 2007).

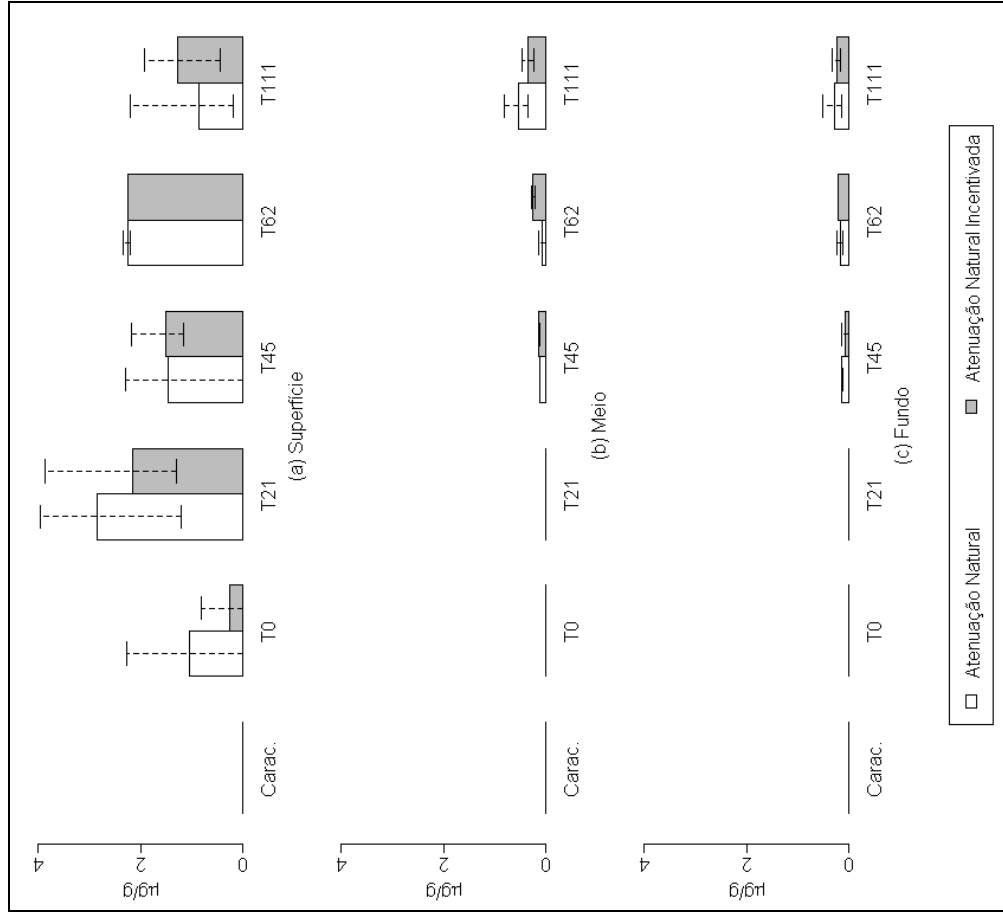
O pireno foi encontrado em amostras de meio no T0, no tratamento de atenuação natural, persistindo nesse até o T111, quando não foi mais detectado. Nas amostras de superfície, para esse composto, não foram observadas oscilações como nos compostos discutidos anteriormente. No tratamento de atenuação natural ocorre uma redução gradual de concentração, enquanto que valores praticamente constantes são observados nas amostras de meio do T0 até o T62 e, no T111 ausência. Dessa maneira, podem-se considerar indícios de uma remoção de 82% do composto pireno no tratamento de atenuação natural nos 111 dias observados. No tratamento de atenuação natural incentivada observa-se uma redução gradual até o T62, porém no T111 ocorre uma nova disponibilização do contaminante, porém do T0 até o T111 ocorre uma remoção de 36% do pireno. Chaga-Spinelli (2007), através de degradação aeróbica, obteve uma remoção para o composto pireno de 90,3% para o tratamento de *landfarming*, 82,1% para o de bioestímulo, com adição de nutrientes, e 72,7% para o de bioestímulo mais bioaumento.

Os resultados verificados até o momento demonstram não ocorrer diferenças entre os tratamentos adotados.

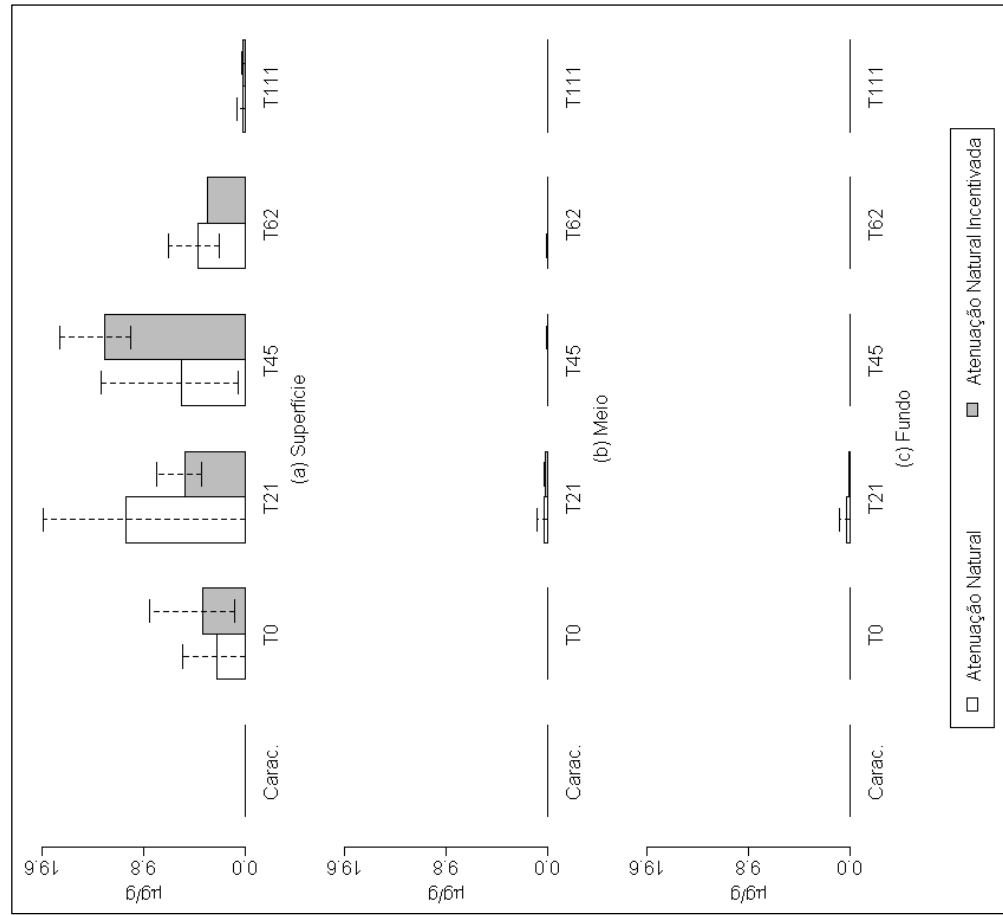
O benzo(a)antraceno e o benzo(a)pireno não foram detectados em amostras de fundo em nenhum dos tempos analisados. Concentrações de criseno não foram quantificadas em nenhuma amostra de meio e de fundo. O benzo(b)fluoranteno e o benzo(k)fluoranteno foram quantificados em amostras de meio e fundo, exceto o último no tratamento de atenuação natural na amostra de fundo.

Os compostos benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno e indeno(1,2,3-c,d)pireno apresentaram comportamentos semelhantes, com processos de disponibilização mais tardia e significativas reduções do T62 para o T111, com valores menores ou igual, no caso do benzo(k)fluoranteno, para o tratamento de atenuação natural em relação a atenuação natural incentivada.

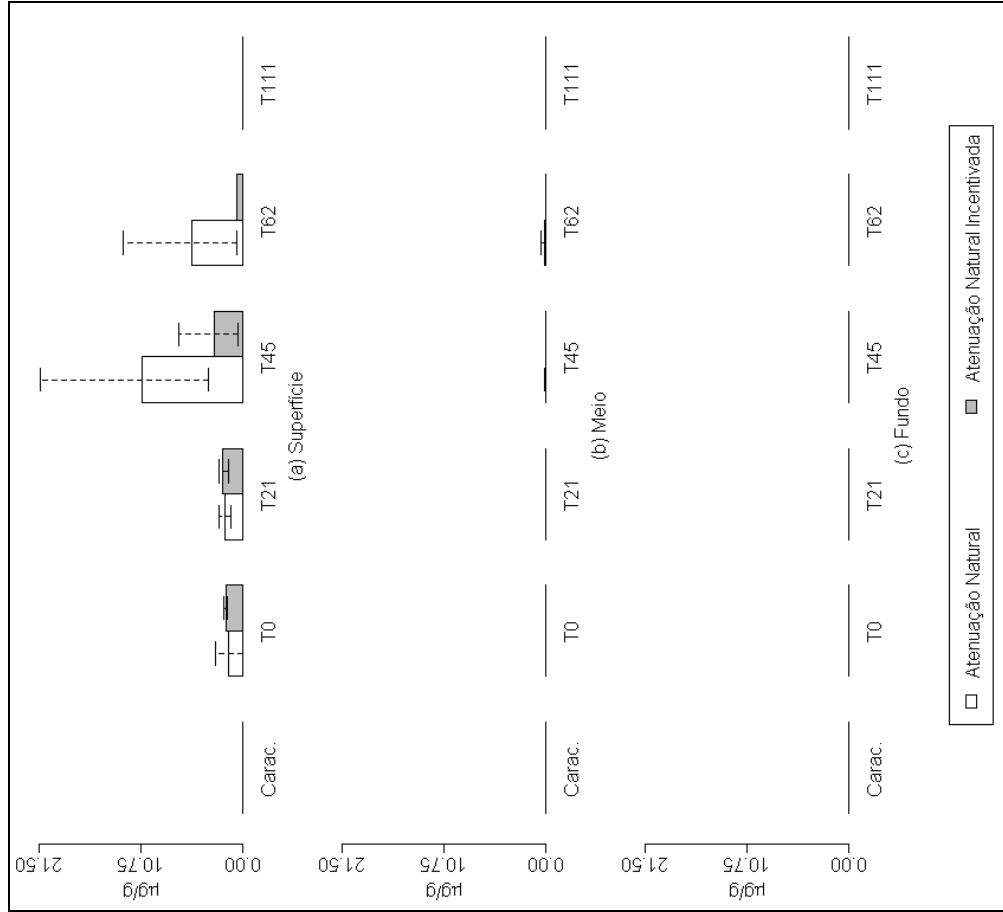
A quantificação dos HPAs nas amostras de caracterização do sedimento confirmou que a área de coleta era livre de contaminação, como pode ser constatado nas Figuras de 14 a 29, exceto pela quantificação do benzo(g,h,i)perileno, 0,06 µg/g na superfície, 0,05 µg/g no meio e 0,30 µg/g no fundo; e do indeno(1,2,3-c,d)pireno, 0,06 µg/g na superfície e 0,18 µg/g no fundo. Tanto o benzo(g,h,i)perileno e quanto o indeno(1,2,3-c,d)pireno possuem um grande número de anéis aromáticos, 6 e 5 respectivamente, e baixas solubilidades, conseqüentemente uma alta capacidade de acumulação e baixa biodegradabilidade.



**Figura 14. Monitoramento do naftaleno nos tratamentos estudados nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111).** NOTA: As colunas referem-se ao valor médio das réplicas de tratamento, com indicações dos valores de máximo e de mínimo obtidos.

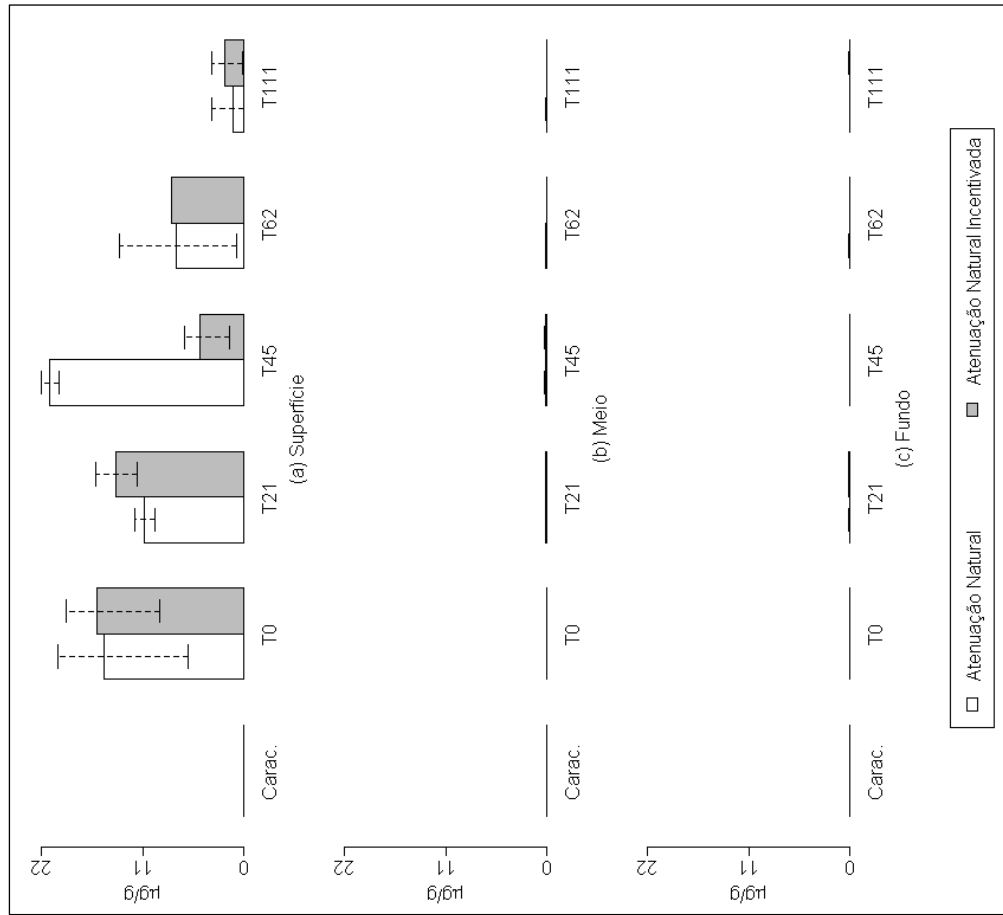


**Figura 15. Monitoramento do acenafeno nos tratamentos estudados nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111).** NOTA: As colunas referem-se ao valor médio das réplicas de tratamento, com indicações dos valores de máximo e de mínimo obtidos.



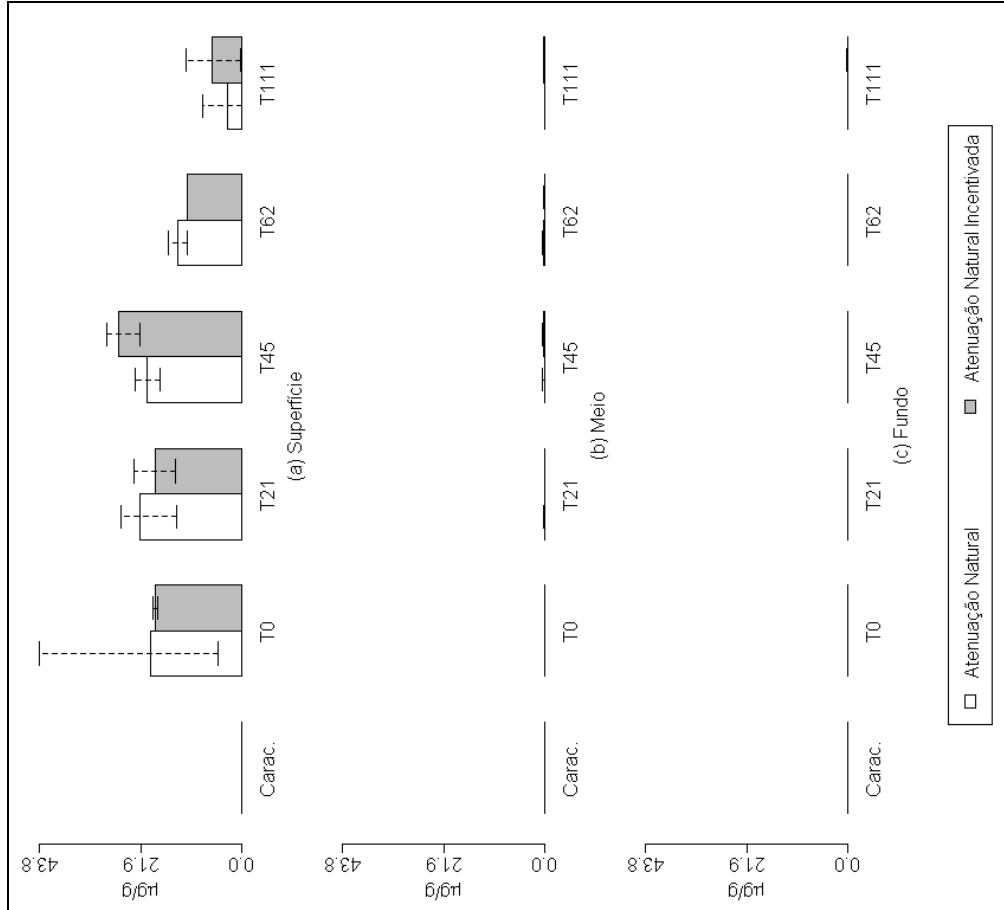
**Figura 16. Monitoramento do acenafileno nos tratamentos estudados nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111).**

NOTA: As colunas referem-se ao valor médio das réplicas de tratamento, com indicações dos valores de máximo e de mínimo obtidos.



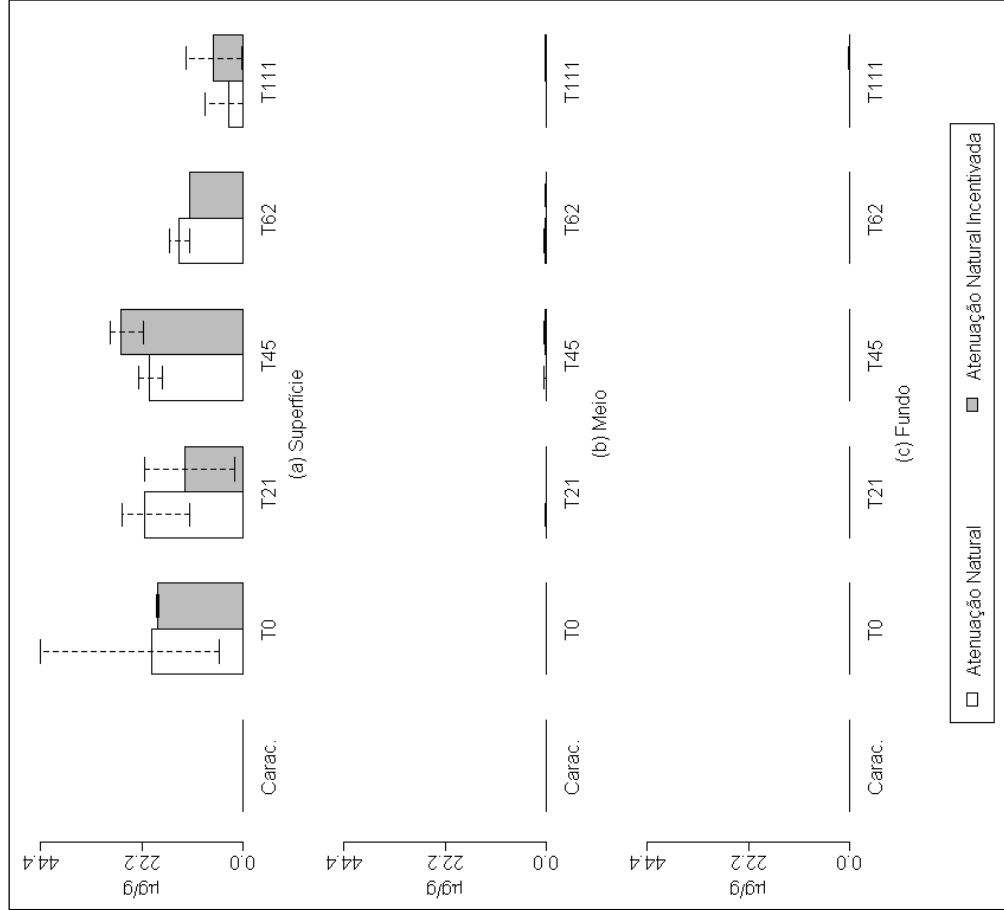
**Figura 17. Monitoramento do fluoreno nos tratamentos estudados nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111).**

NOTA: As colunas referem-se ao valor médio das réplicas de tratamento, com indicações dos valores de máximo e de mínimo obtidos.



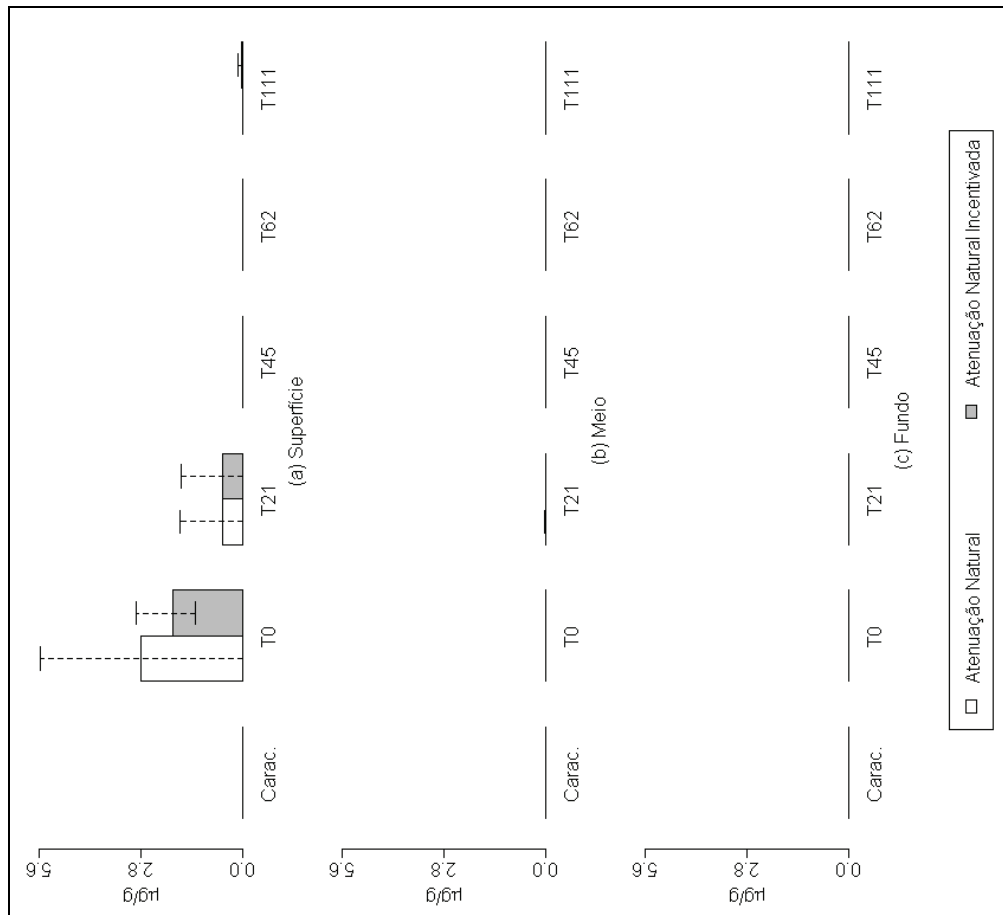
**Figura 18. Monitoramento do fenantreno nos tratamentos estudados nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111).**

NOTA: As colunas referem-se ao valor médio das réplicas de tratamento, com indicações dos valores de máximo e de mínimo obtidos.



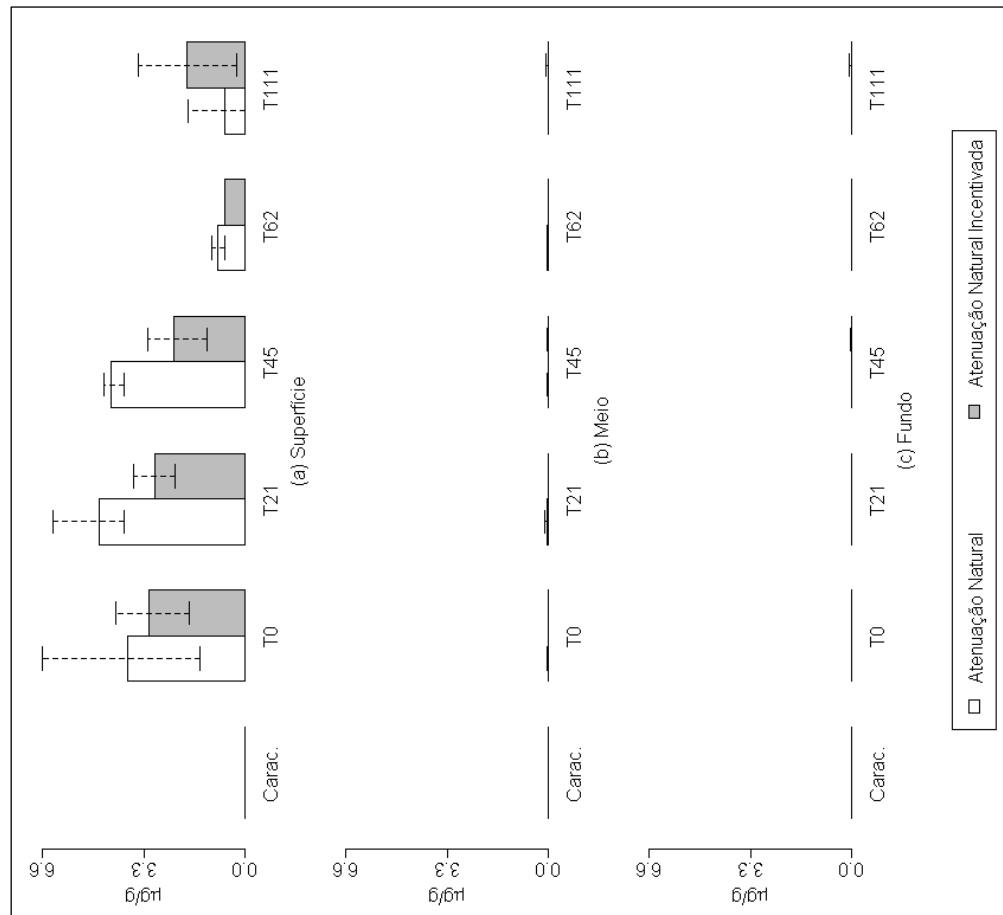
**Figura 19. Monitoramento do antraceno nos tratamentos estudados nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111).**

NOTA: As colunas referem-se ao valor médio das réplicas de tratamento, com indicações dos valores de máximo e de mínimo obtidos.



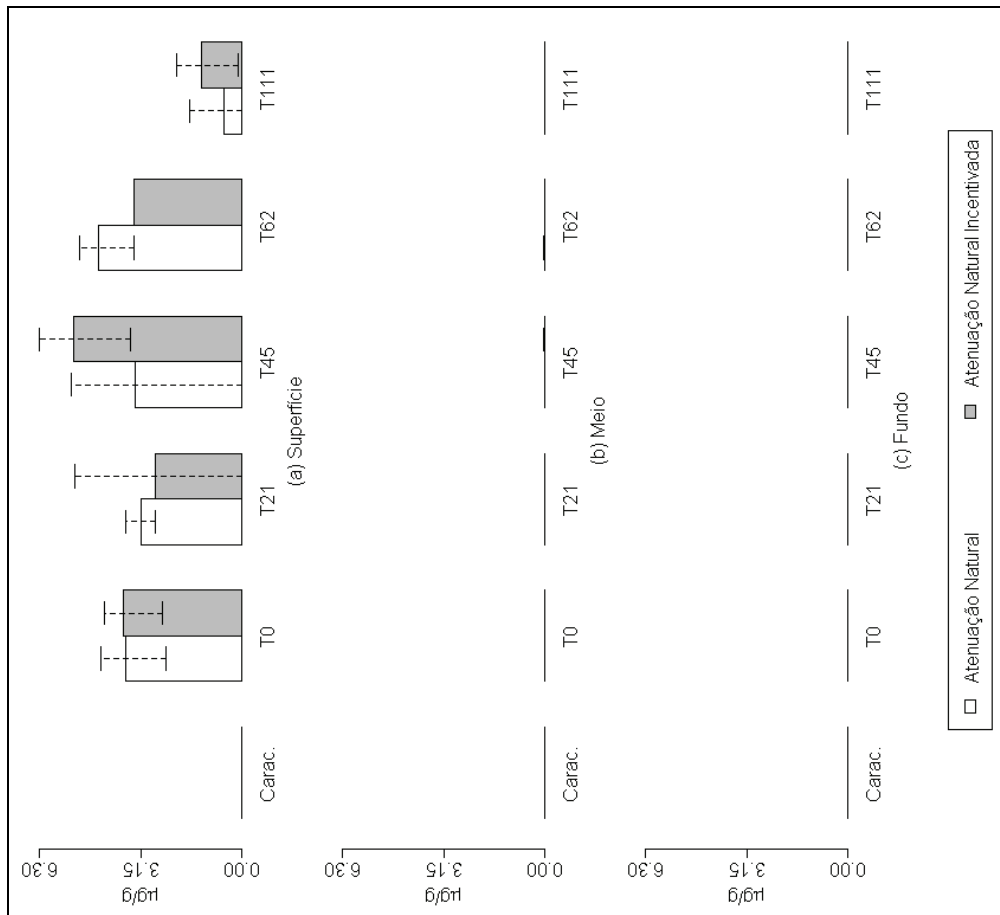
**Figura 20. Monitoramento do fluoranteno nos tratamentos estudados nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111).**

NOTA: As colunas referem-se ao valor médio das réplicas de tratamento, com indicações dos valores de máximo e de mínimo obtidos.

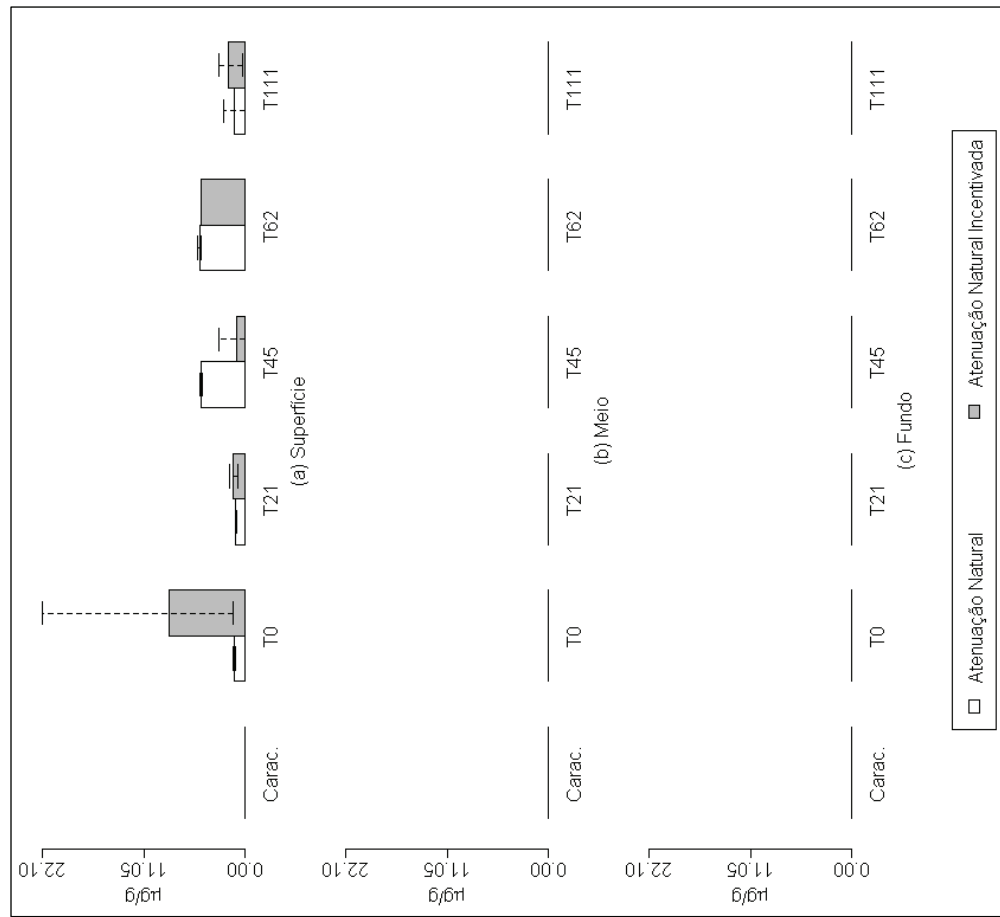


**Figura 21. Monitoramento do pireno nos tratamentos estudados nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111).**

NOTA: As colunas referem-se ao valor médio das réplicas de tratamento, com indicações dos valores de máximo e de mínimo obtidos.

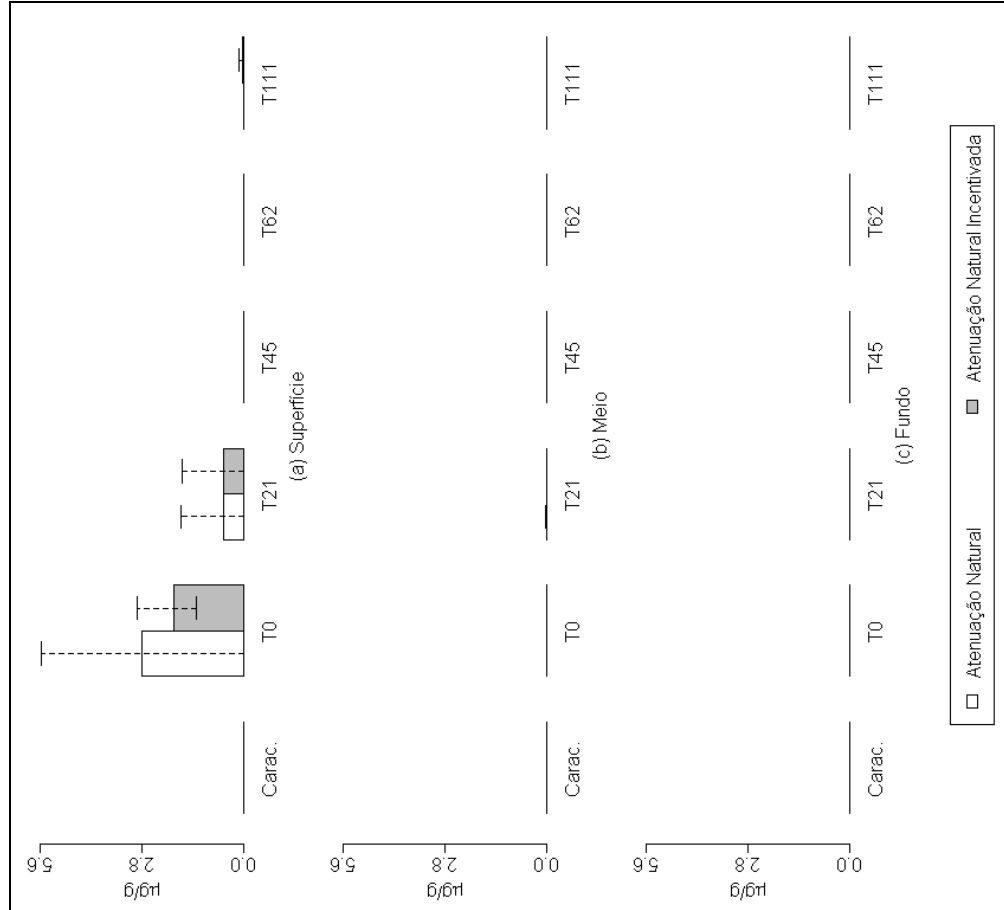


**Figura 22. Monitoramento do benzo(a)antraceno nos tratamentos estudados nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111).**  
NOTA: As colunas referem-se ao valor médio das réplicas de tratamento, com indicações dos valores de máximo e de mínimo obtidos.

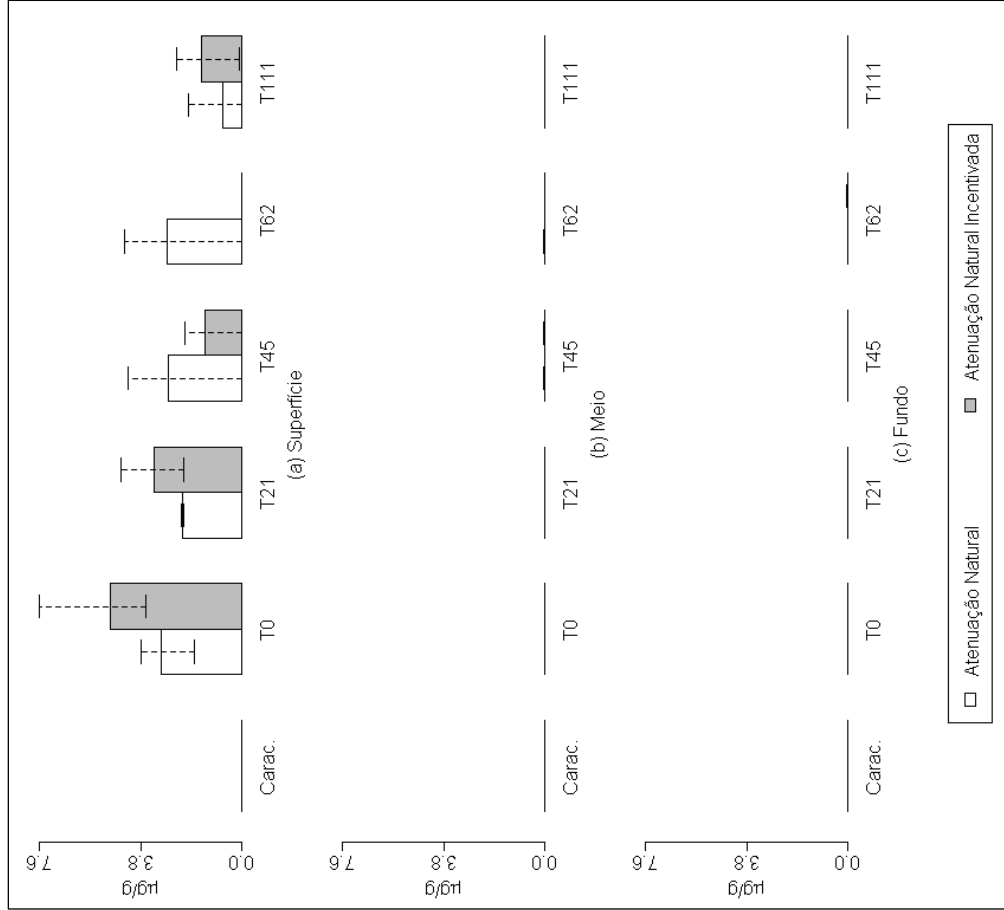


**Figura 23. Monitoramento do benzo(a)antraceno nos tratamentos estudados nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111).**  
NOTA: As colunas referem-se ao valor médio das réplicas de tratamento, com indicações dos valores de máximo e de mínimo obtidos.

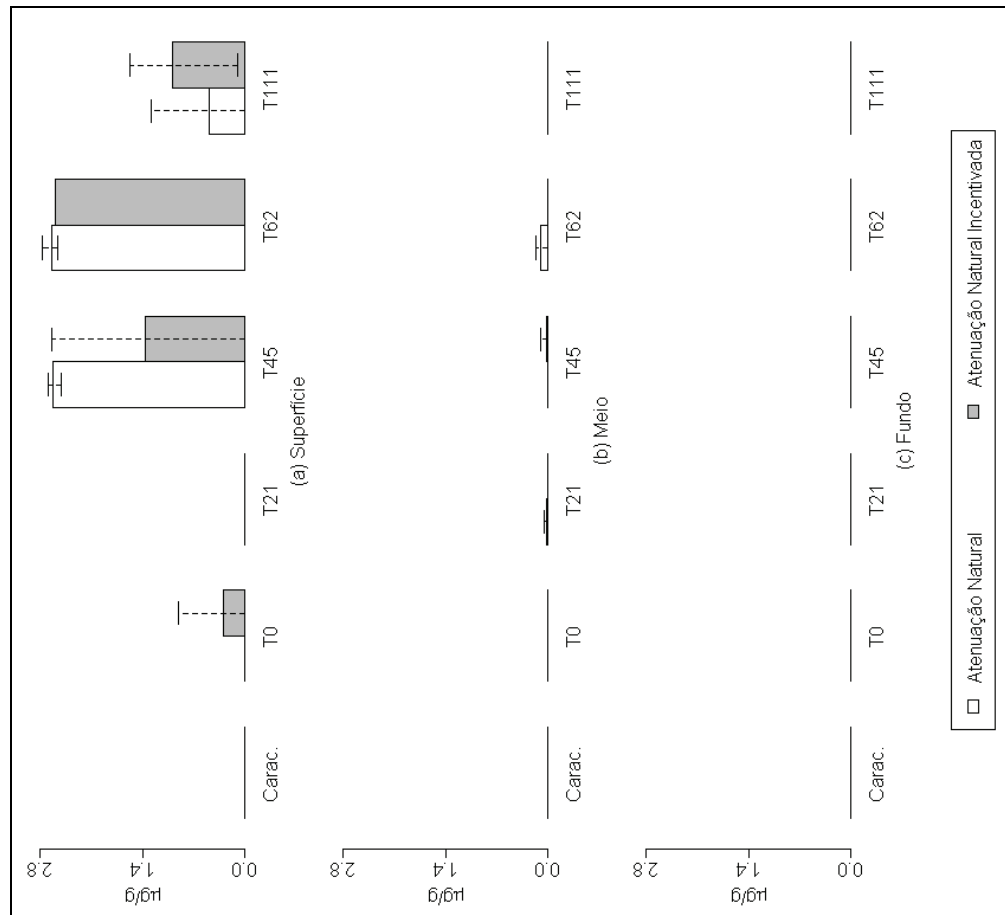




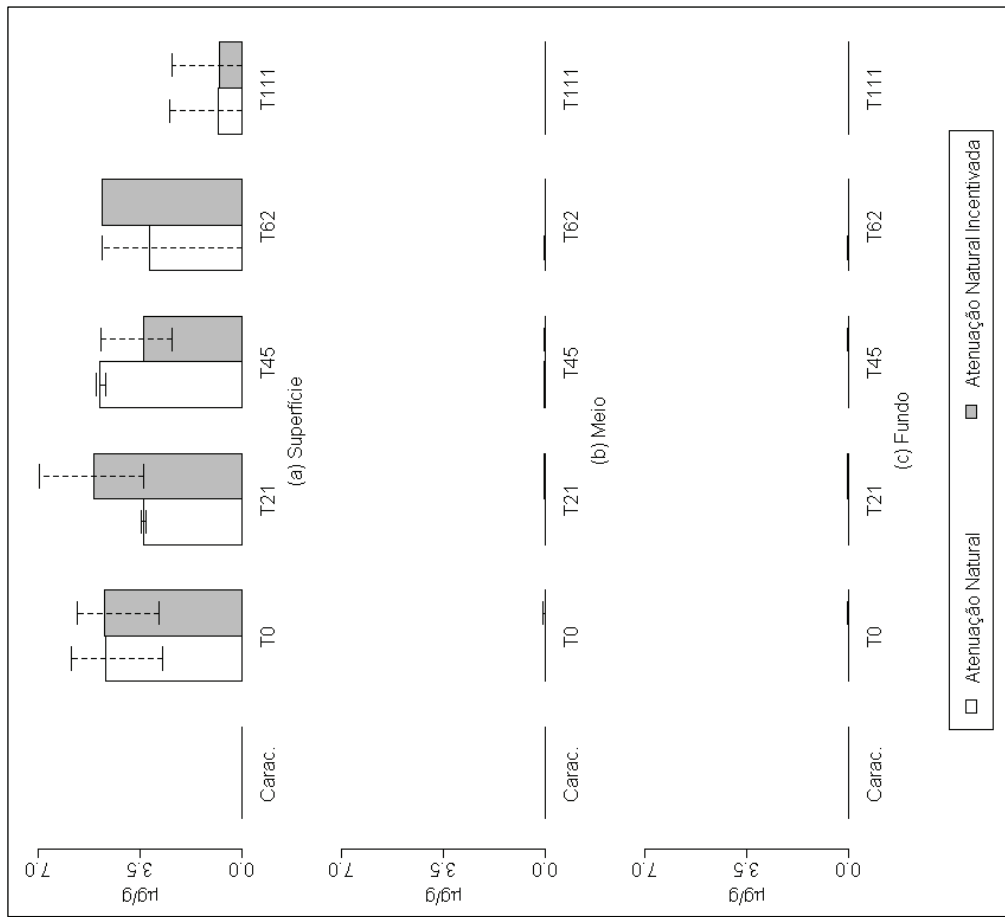
**Figura 24. Monitoramento do benzo(b)fluoranteno nos tratamentos estudados nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111).** NOTA: As colunas referem-se ao valor médio das réplicas de tratamento, com indicações dos valores de máximo e de mínimo obtidos.



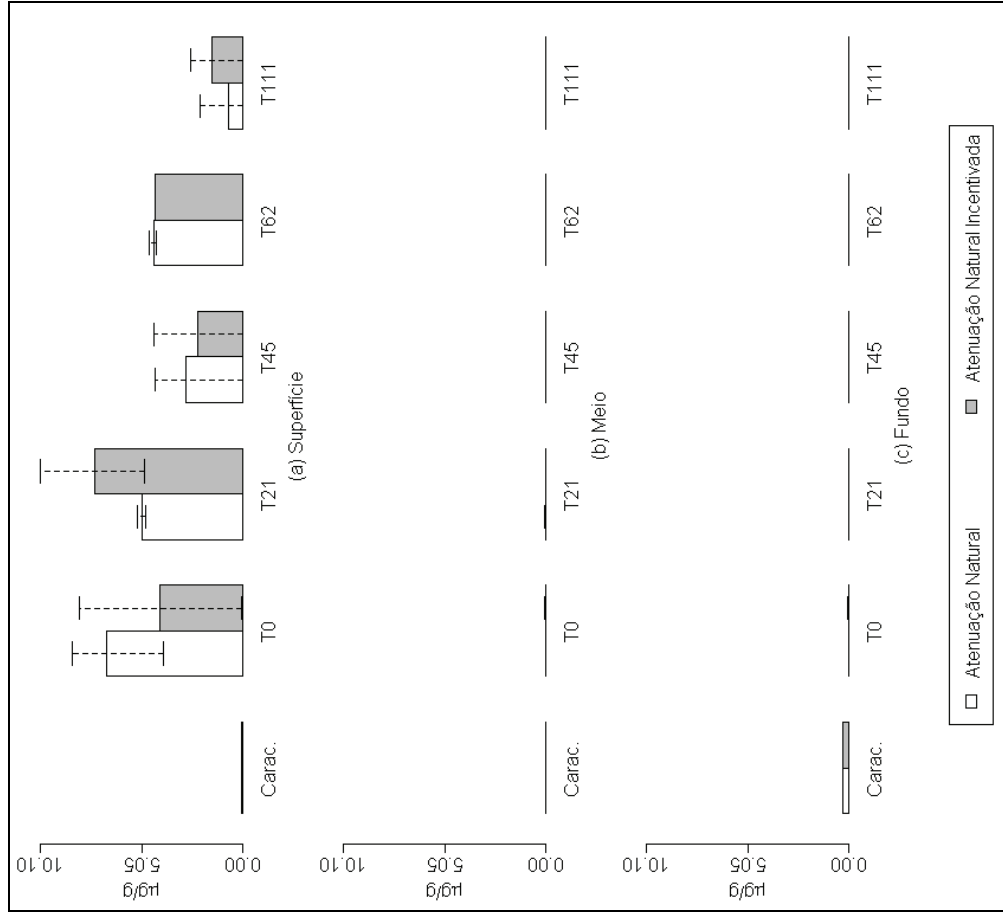
**Figura 25. Monitoramento do benzo(k)fluoranteno nos tratamentos estudados nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111).** NOTA: As colunas referem-se ao valor médio das réplicas de tratamento, com indicações dos valores de máximo e de mínimo obtidos.



**Figura 26. Monitoramento do benzo(a)pireno nos tratamentos estudados nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111).** NOTA: As colunas referem-se ao valor médio das réplicas de tratamento, com indicações dos valores de máximo e de mínimo obtidos.

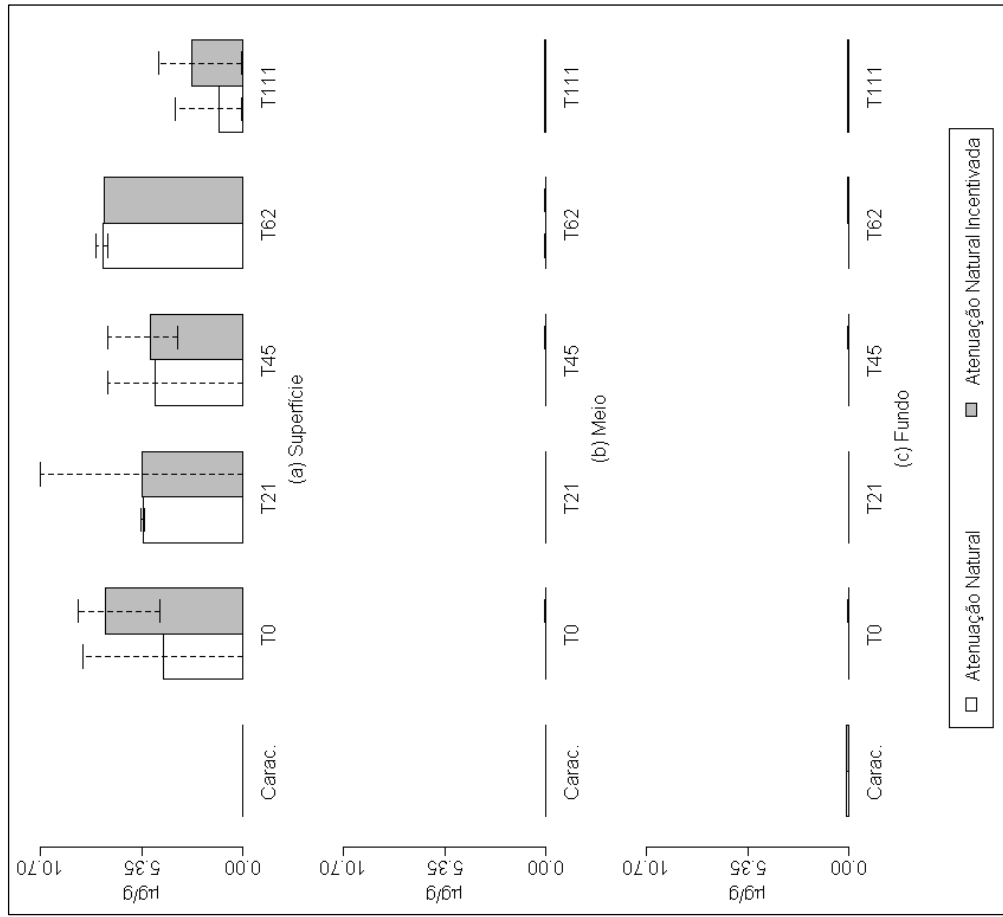


**Figura 27. Monitoramento do dibenzo(a,h)antraceno nos tratamentos estudados nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111).** NOTA: As colunas referem-se ao valor médio das réplicas de tratamento, com indicações dos valores de máximo e de mínimo obtidos.



**Figura 28. Monitoramento do benzo(g,h,i)perireno nos tratamentos estudados nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111).**

NOTA: As colunas referem-se ao valor médio das réplicas de tratamento, com indicações dos valores de máximo e de mínimo obtidos.



**Figura 29. Monitoramento do indeno(1,2,3-c,d)pireno nos tratamentos estudados nos tratamentos estudados ao longo do tempo (T0, T21, T45, T62 e T111).**

NOTA: As colunas referem-se ao valor médio das réplicas de tratamento, com indicações dos valores de máximo e de mínimo obtidos.

Para que o processo de biodegradação inicie é necessário um considerável período de adaptação da microbiota, conforme visto no ítem 0.

O sistema estudado é dinâmico, ao mesmo tempo em que o óleo diesel percorre a coluna ele está sendo degradado, como visto anteriormente. Dessa maneira, considerando a coluna como um sistema único, as Figuras 30 e 31 mostram a relação entre o número de bactérias heterotróficas totais e o somatório dos 16 HPAs quantificados.

De acordo com o observado, o somatório dos 16 HPAs, tanto no tratamento de atenuação natural quanto no de atenuação natural incentivada teve redução em sua concentração após o T62, nas amostras de superfície, período esse com um crescimento no número de bactérias heterotróficas no sistema.

Coates et al. (1997) obtiveram significativas degradações em 37 dias do naftaleno, do fluoreno, do fenantreno e do fluoranteno em um sedimento de uma Estação Naval, sendo que esse já se encontrava adaptado a contaminação por hidrocarbonetos, uma vez que faziam 60 anos que sofria impactos por esse tipo de contaminante. Os autores verificaram que a degradação do naftaleno era inibida quando ocorria a retirada do sulfato do sedimento. Bedessem et al. (1997) obtiveram a degradação anaeróbia de 66% do naftaleno, por sulfato redução, em 13 dias, porém o sedimento já havia sido exposto a contaminação por hidrocarbonetos.

Johnson e Ghosh (1998) verificaram degradação anaeróbia dos HPAs em biorreatores, testando a adição de nitrato ou sulfato como aceptores de elétrons. Após 50 dias de tratamento, bons resultados de degradação foram obtidos com a adição do sulfato. Esse experimento resultou em significativas reduções na concentração do acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoreno, pireno, benzo(a)antraceno e criseno, sendo que o nafataleno, o benzo(b)fluoreno, o benzo(k)fluoreno, o benzo(a)pireno, o benzo(g,h,i)perileno e o indeno(1,2,3-c,d)pireno também foram degradados, mas em menores proporções.

Dou et al. (2009) utilizaram bactérias mistas de um solo, sendo que essas eram adaptadas a contaminação com hidrocarbonetos, para degradar o naftaleno. Esses obtiveram bons resultados de degradação, por nitrato redução, em 25 dias de incubação.

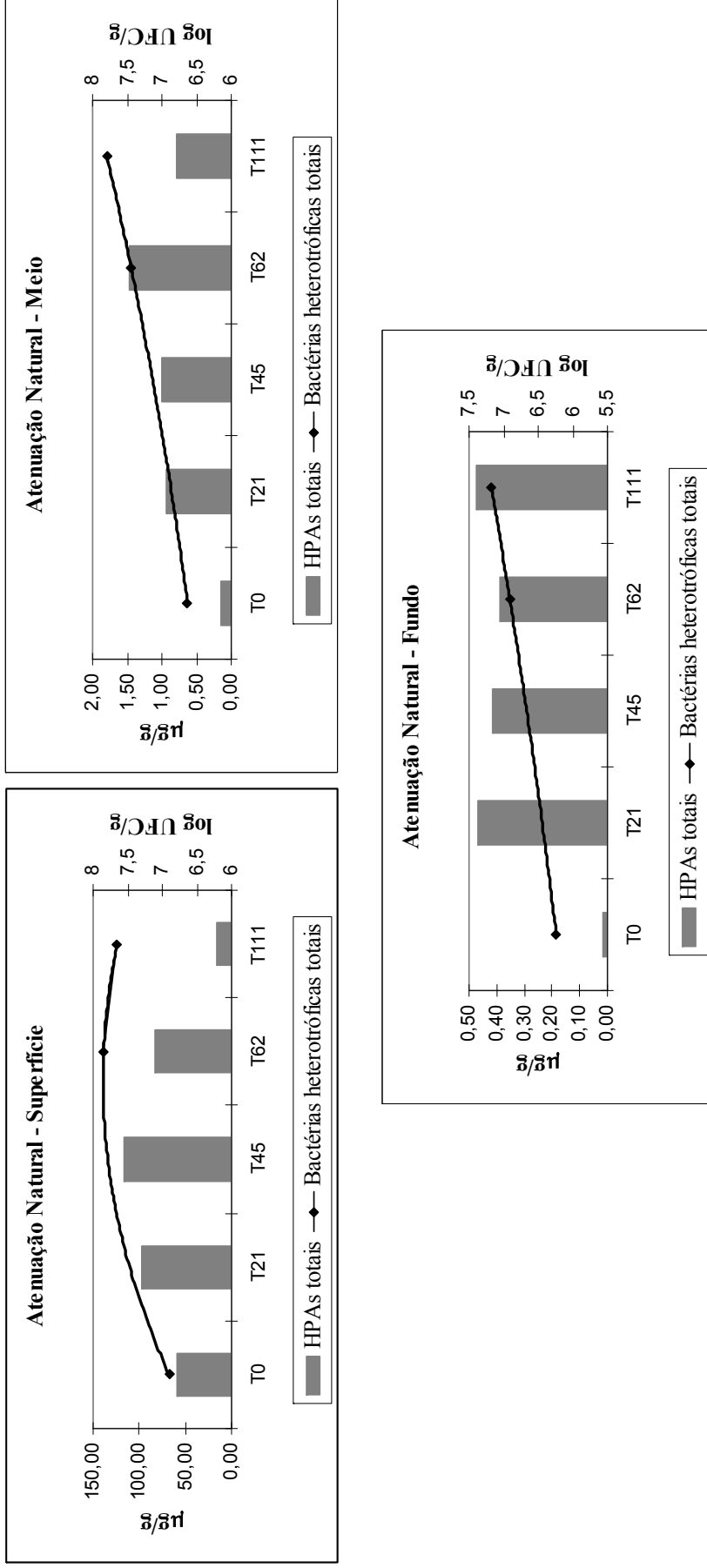


Figura 30. Relação entre o somatório dos 16 HPAs e o número de bactérias heterotróficas totais no tratamento de atenuação natural

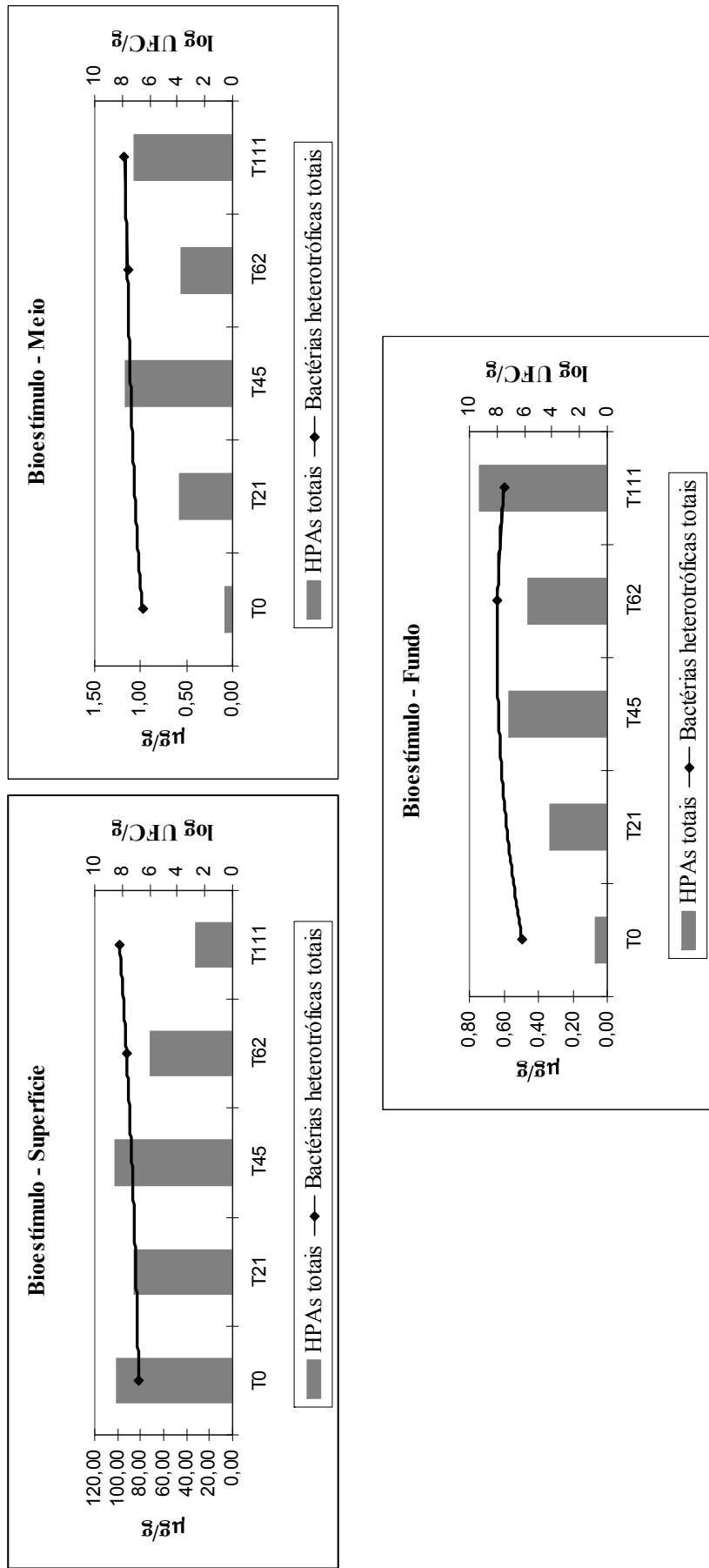


Figura 31. Relação entre o somatório dos 16 HPAs e o número de bactérias heterotróficas totais no tratamento de atenuação natural incentivada

## 4.2 Água

Os parâmetros físico-químicos da água do mar como temperatura, pH, potencial redox, condutividade elétrica e salinidade foram monitorados semanalmente. Estes resultados não são apresentados, pois serviram apenas para verificar as condições operacionais do sistema.

A Tabela 8 apresenta os valores médios dos parâmetros físico-químicos da água do mar coletada simultaneamente com o sedimento.

Parâmetros como temperatura, pH e oxigênio dissolvido sofreram poucas variações ao longo dos 111 dias de tratamento. A água apresentou baixos valores de nitrogênio total, nitrito e fósforo não indicando lixiviação desses compostos do sedimento.

Nos tempos T45, T62 e T111 foram verificadas reduções no potencial redox. Essas reduções foram devido a troca da água de abastecimento do sistema, mas há indicativos, como vistos nos resultados apresentados nos itens acima, de que isso não interferiu no processo de biorremediação.

Como pode ser observado, a água do mar possui altas concentrações de sulfato, que de acordo com o discutido anteriormente, é para muitos pesquisadores o principal acceptor final de elétrons na degradação de hidrocarbonetos em sedimentos marinhos.

As concentrações de óleos e graxas detectadas na água tiveram significativo aumento no T111, o que indica a percolação do óleo diesel pela coluna. A presença desse óleo pode ser atribuída a frações mais leves presentes no óleo diesel, uma vez que não foi verificada infiltração significativa dos 16 HPAs monitorados ao longo do perfil de sedimento.

Tabela 8. Resultado da avaliação dos parâmetros físico-químicos da água do mar

	Unidade	Tratamento	T0 16/06/09	T21 07/07/09	T45 31/07/09	T62 17/08/09	T111 05/10/09
Temperatura	°C	AN	25,8	25,1	25,0	24,5	26,2
		BS	25,7	24,9	25,1	24,3	26,1
pH	-	AN	8,2	8,3	8,7	8,1	9,3
		BS	8,3	8,3	8,8	8,3	9,3
Eh	mV	AN	107,7	123,7	39,7	24,7	69,3
		BS	114,7	102,7	75,3	37,3	57,7
Condutividade	mg/L	AN	41,6	40,8	39,6	39,8	38,6
		BS	41,7	40,8	39,7	40,0	38,8
Salinidade	mg/L	AN	30,2	29,4	25,2	25,4	27,7
		BS	30,1	29,5	25,3	25,6	27,9
Oxigênio Dissolvido	mg/L	AN	8,3	7,7	6,5	6,9	7,4
		BS	7,7	8,1	7,0	7,5	7,6
Tensão Superficial	mV/m	AN	66,24	72,33	72,02	72,27	72,10
		BS	65,57	72,13	72,49	71,84	71,94
Nitrogênio Total (NTK)	mg/L	AN	0,54	0,38	0,24	n.d.	0,76
		BS	0,91	0,67	0,59	n.d.	0,81
Nitrito	mg/L	AN	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
		BS	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Fósforo Total	mg/L	AN	0,28	n.d.	0,06	0,54	2,01
		BS	0,08	0,39	0,35	0,36	3,16
Sulfato	mg/L	AN	1207,79	2130,10	1207,79	1207,79	879,23
		BS	1200,14	1337,91	1200,14	1200,14	877,78
Óleos e Graxas	mg/L	AN	12,67	15,87	13,53	4,60	77,67
		BS	12,80	15,13	6,93	24,00	73,87

NOTA: n.d.: não detectável



## 5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram testados dois tratamentos de biorremediação, atenuação natural e atenuação natural incentivada, de sedimento estuarino contaminado por óleo diesel. Como forma de incentivo foi utilizado um biossurfatante, a fim de promover uma maior disponibilidade dos compostos hidrofóbicos, como os HPAs, para que ocorra uma maior biodegradação.

O sedimento de manguezal utilizado no experimento foi coletado em uma região estuarina próxima ao Porto de Suape, onde se instalará uma refinaria para processamento de óleo cru proveniente do Brasil e da Venezuela. Esse sedimento foi caracterizado, com relação à textura, como um silte-arenoso para as amostras de superfície, meio e fundo. Devido a alta concentração de silte nas amostras ocorreu pouca infiltração dos contaminantes analisados ao longo da coluna, como era esperado, devido ao tamanho diminuto dos poros. O sedimento foi considerado livre de contaminação por petróleo ou seus derivados.

Foram realizados 5 coletas, nos tempos 0, 21, 45, 62 e 111 dias após o início do incentivo com biossurfatante, com monitoramento de parâmetros físico-químicos na água e no sedimento. No período de 111 dias estudado, as condições de temperatura e pH mantiveram-se praticamente constantes, com temperatura média de 26°C e pH neutro. O potencial redox, que determina o tipo de processo de degradação, caracterizou-se por apresentar valores abaixo de -110 mV em todo o experimento, ou seja, um ambiente redutor. De acordo com os valores observados existem indicativos de que processos metanogênicos e, principalmente, de sulfato redução tenham ocorrido..

Em ambos os tratamentos, nas amostras de superfície, de meio e de fundo, foi observado, pela quantificação do número de bactérias heterotróficas totais, um período de adaptação da microbiota ao contaminante.

Dentre os 16 HPAs quantificados, o naftaleno apresentou uma maior percolação na coluna, uma vez que a contaminação foi realizada no topo da mesma. Isso pode ser atribuído a sua maior solubilidade em água, 31 mg/L. Os HPAs de menor peso molecular apresentaram uma maior oscilação de concentração nos primeiros 45 dias de tratamento, enquanto que os de maior peso molecular apresentaram comportamentos semelhantes, com processos de disponibilização mais tardia e significativas reduções do T62 para o T111, com valores

menores ou igual, no caso do benzo(k)fluoranteno, para o tratamento de atenuação natural em relação a atenuação natural incentivada.

A dinâmica do sistema e do processo de degradação dificultou a obtenção de eficiências de remoção, uma vez que a biodisponibilidade do contaminante é controlada por processos de aprisionamento e liberação do contaminante do solo para a água. No entanto, foi possível observar indícios de remoção de 82% do composto pireno no tratamento de atenuação natural nos 111 dias estudados. No tratamento de atenuação natural incentivada observou-se uma redução gradual até o T62, porém no T111 ocorre uma nova disponibilização do contaminante, no entanto do T0 até o T111 ocorre uma remoção de 36% do pireno.

De uma maneira geral, o somatório dos 16 HPAs, para ambos os tratamentos nas amostras de superfície, teve redução em sua concentração após o T62, período esse com um significativo crescimento no número de bactérias heterotróficas.

Bons indícios de degradação anaeróbia foram observados nos tratamentos adotados, porém não foram verificadas diferenças entre os tratamentos, ou seja, o biossurfatante não solubilizou os HPAs a níveis significativos à biodegradação, como o esperado. No entanto, isso pode ser atribuído a baixa concentração de biossurfatante utilizada, 0,12 % em relação ao óleo diesel, sendo necessário testar novas proporções, uma vez que a biodisponibilidade do contaminante é um fator limitante a biodegradação.

## 6 SUGESTÕES

- Testar novas concentrações de biossurfatantes como forma de incentivo a degradação, assim como técnicas de purificação desse biossurfatante;
- Monitorar o consumo do biossurfatante;
- Monitorar parâmetros como sulfato e sulfeto no sedimento e produção de dióxido de carbono e metano, a fim de identificar os processos degradativos;
- Identificar e monitorar o surgimento de hidrocarbonetos intermediários do processo de degradação;
- Quantificar os microrganismos degradativos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AELION, C.M.; SWINDOLL, C.M.; PFAENDER, F.K.. Adaptation to and biodegradation of xenobiotic compounds by microbial communities from a pristine aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 9, p. 2212-2217. 1987.

ALVES, B.J.R.; BAÊTA, A.M.; ALVES, J.V. Protocolo da Embrapa Agrobiologia para Análise de Nitrogênio em Adubos Orgânicos, Solo e Tecidos. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**, 1999. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 100). 17p.

ARVIN, E.; JENSEN, B.K. e GUNDERSEN, A.T.. Substrate interactions during aerobic biodegradation of benzene. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n.12, p. 3221-3225. 1989.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10004**: Resíduos sólidos: classificação. Rio de Janeiro. 2004.

AISLABIE, J.; SAUL, D.J.; FOGHT, J.M..Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. **Extremophiles**. v.10, p.171–179. 2006

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

BALBA, M.T.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R.. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, p. 155-164. 1998.

BANAT, I.M.. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource Technology**. v.51, p. 1-12. 1995.

BARAHONA, L.M.; VÁZQUEZ, R.R.; VELASCO, M.H.; JARQUIN, C.V.; PÉREZ, O.P.; CANTÚ, A.M.; ALBORES, A.. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. **Applied Soil Ecology**. v. 27, p. 165-175. 2004.

BARDI, L.; MATTEI, A.; STEFFAN, S.; MARZONA, M.. Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with  $\beta$ -cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 27, p. 709-713. 2000.

BARNSLEY, E.A.. Bacterial oxidation of naphthalene and phenanthrene. **Journal of Bacteriology**, v. 153, n.2, p. 1069-1071. 1983.

BARNSLEY, E.A.. Metabolism of 2,6-dimethylnaphthalene by *flavobacteria*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.2, p.428-422. 1988.

BARTHA, R.. Biotechnology of petroleum pollution biodegradation. **Microbial Ecology**. v. 12, p. 155-172. 1986.

BAUER, J.E.; CAPONE, D.G.. Degradation and mineralization of the polycyclic aromatic hydrocarbons anthracene and naphthalene in intertidal marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.50, n.1, p. 81-90. 1985.

BEAM, H.W.; PERRY, J.J.. Microbial degradation of cycloparaffinic hydrocarbons via co-metabolism and commensalism. **Journal of General Microbiology**, v.82, p.163-169. 1974.

BEDESSEM, M.E.; SWOBODA-COLBERG, N.G.; COLBERG, P. J. S.. Naphthalene mineralization coupled to sulfate reduction in aquifer-derived enrichments. **FEMS Microbiology Letters**. v.152, n.2, p. 213-218. 1997.

BENTO, D.M.. **Análise química da degradação dos hidrocarbonetos de óleo diesel no estuário da Lagoa dos Patos – Rio Grande/RS**. 2005.112f. Dissertação (Mestre em

Oceanografia Física, Química e Geológica) - Fundação Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 2005.

BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.C. e FRANKENBERGER, W.T..Comparative bioremediation of soil contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v.96, p.1049-1055. 2005.

BERRY, D. F.; FRANCIS, A. J.; BOLLAGI, J.-M..Microbial metabolism of homocyclic and heterocyclic aromatic compounds under anaerobic conditions. **Microbiological Reviews**, v. 51, n.1, p. 43-59.1987.

BOETHLING, S. e ALEXANDER,M.. Effect of concentration of organic chemicals on their biodegradation by natural microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, n.6, p. 1211-1216. 1979.

BRÄNDLI, R.;KUPPER, T. BUCHELI, T.; MAYER, J.; STADELMANN, F.X.; TARRADELLAS, J.. **Occurrence and relevance of organic pollutants in compost, digestate and organic residues**: literature review. EPF Lausanne – ENAC – ISTE – CECOTOX/Agroscope FAL Reckenholz. 2004.

BRASIL. Lei n. 11.097 de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nos 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 jan. 2005. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=8&data=14/01/2005>>. Acesso em: 03 set. 2009.

CANTAGALLO, C; MILANELLI, J.C.; DIAS-BRITO, D.. Limpeza de ambientes costeiros brasileiros contaminados por petróleo: uma revisão. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v.2, n.1, p. 1-12, 2007.

CHAGAS-SPINELLI, A.C.O.. **Biorremediação de solo argiloso contaminado por hidrocarbonetos poliaromáticos provenientes de derrame de óleo diesel**. 2007. 158f. Tese (Doutor em Geociências) - Universidade Federal Pernambuco, Recife, 2007.

COATES, J.D.; ANDERSON, R.T.; WOODWARD, J.C.; PHILLIPS, E.J.P.; LOVLEY, D.R... Anaerobic Hydrocarbon Degradation in Petroleum-Contaminated Harbor Sediments Under Sulfate-Reducing and Artificially Imposed Iron-Reducing Conditions. **Environmental Science and Technology**, v.30, p. 2784-2789. 1996a.

COATES, J.D.; ANDERSON, R.T.; LOVLEY, D.R.. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing conditions. **Applied and Environmental Microbiology**. v.62, p.1099-1101. 1996b.

COATES, J.D.; WOODWARD, J.; ALLEN, J.; PHILIP, P.; LOVLEY, D.R.. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. **Applied and Environmental Microbiology**. v.63, n.9, p. 3589-3593. 1997.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). **Solo: propriedades**. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/solo/propriedades.asp>> . Acesso em: 14 de abril de 2010.

COOPER, D.G.; GOLDENBERGER, B.G.. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 53, n. 2, p. 224-229. 1987.

CORDAZZO, J., MALISKA, C.R. e CORSEUIL, H.X.. Solução numérica do problema de derramamento de gasolina acrescida de álcool no solo. **In anais...II Congresso de Engenharia de Processos do MERCOSUL**. Florianópolis, 1999.

CORSEUIL, H.X.. Limitações da biomassa autóctone na degradação de compostos tóxicos no subsolo. **Revista BIO**, v. III, n. 2, p. 46-56, 1994.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M.. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 61, n.1, p. 47-64. 1997.

DIAS, J.A.. **A análise sedimentar e o conhecimentos dos sistemas marinhos**: versão preliminar. 2004. Disponível em: <[http://w3.ualg.pt/~jdias/JAD/ebooks/Sedim/SedimA\\_AT.pdf](http://w3.ualg.pt/~jdias/JAD/ebooks/Sedim/SedimA_AT.pdf)>. Acesso em: 21 jan. 2010.

DIBBLE, J.T.; BARTHA, R.. Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludget. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 729-739. 1979.

DOU, J.; LIUB, X. DINGA, A.. Anaerobic degradation of naphthalene by the mixed bacteria under nitrate reducing conditions. **Journal of Hazardous Materials**. v. 165 , p. 325–331. 2009.

DUBOIS, M. ; GILLES, K.A. ; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F.. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Chemistry**. v. 28, n. 3, p. 350-356. 1956.

EVANS, P.J.; MANG, D.T.; YOUNG, L.Y.. Degradation of toluene and m-xylene and transformation of o-xylene by denitrifying enrichment cultures. **Applied and Environmental Microbiology**. v.57, n.2, p. 450-454. 1991a.

EVANS, P.J.; MANG, D.T.; KIM, K.S.; YOUNG, L.Y.. Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**. v.57, n.4, p. 1139-1145. 1991b.

FALL, R.R.; BROWN, J.L.; SCHAEFFER, T.L.. Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbons by *Pseudomonas citronellolis*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.38, n.4, 715-722. 1979.

FERNANDES, M., CORSEUIL, H.X. Contaminação de águas subterrâneas por derramamento de gasolina: efeito cossolvência, **In anais...3º Simpósio Ítalo-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental (SIBESA)**, Gramado, 1996.



FERNANDES, P.A.V; ARRUDA, I.R.; SANTOS, A.F.A.B.; ARAÚJO, A.A.; SOUTO-MAIOR, A.M.; XIMENES, E.A.. Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* r14 against multidrug-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.38, p. 704-709. 2007.

FRONZA, L.. **Capacidade de liberação de hidrocarbonetos dos sedimentos de áreas contaminadas do estuário da Lagoa dos Patos – RS**. 2006.126f. Dissertação (Mestre em Oceanografia Física, Química e Geológica) - Fundação Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 2006.

GRASSHOFF, K.; KREMLING, K; EHRHARDT, M.. **Methods of seawater analysis**. - 3., completely rev. and extended ed. - Weinheim; New York; Chichester; Brisbane; Singapore; Toronto: Wiley - VCH. ISBN 3-527-2958-5. 1999.

HEALY, J.B.; YOUNG, L.Y.. Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. **Applied and Environmental Microbiology**. v.38, n.1, p.84-89. 1979.

HEIDER, J.; FUCHS, G.. Anaerobic metabolism of aromatic compounds. **European Journal of Biochemistry**. v. 243, p. 577-596.1997.

HORVATH, R.S.. Microbial Co-Metabolism and the Degradation of Organic Compounds in Nature. **Bacteriological Reviews**, v. 36, n. 2, p. 146-155. 1972.

HUANG, X.D; EL-ALAWI, Y.; PENROSE, M.D; GLICK, B.R.; GREENBERG, B.M.. A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. **Environmental Pollution**. v.130, p. 465-476. 2004.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC. Agents reviewed by the IARC monographs. V 1-100A. 2009. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>>. Acesso em: 06 de janeiro de 2010.

JORGENSEN, K.S.; PUUSTINEN, J.; SUORTTI, A.M.. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. **Environmental Pollution**. v. 107, p. 245-254. 2000.

JOHNSON, K.; GHOSH, S.. Feasibility of anaerobic biodegradation of PAHs in dredged river sediments. **Water Science and Technology**. v. 38.n. 7. p. 41-48. 1998.

KARTHIKEYAN, R.; BHANDARI, A.. Anaerobic biotransformation of aromatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in soil microcosms: a review. **Journal of Hazardous Substance Research**. v. 3, n. 19 p. 1-18. 2001.

KORDA, A.; SANTAS, P.; TENENTE, A.; SANTAS, R. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. **Applied Microbiology Biotechnology**. v.48, p. 677-686. 1997.

LÉO, L.F.R.. **Avaliação do comportamento de um reator UASB com separador de fases simplificado no tratamento de efluentes de curtume**. 137f. Dissertação (Mestre em Engenharia Civil) - Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, UNESP. 2002.

LORING, D.H.; RATALA, R.T.T.. Manual for the Geochemical Analyses of Marine Sediments and Suspended Particulate Matter. **Earth-Science Reviews**, v. 32, p. 235-283. 1992.

LOVLEY, D.R.; PHILLIPS, E.J.P.. Competitive mechanisms for inhibition of sulfate reduction and methane production in the zone of ferric iron reduction in sediments. **Applied and Environmental Microbiology**. v.53, p. 2636-2641. 1987.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F.. Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpine soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2660-2664. 1997.

MAZZUCO, L.M.. **Atenuação natural de hidrocarbonetos aromáticos em aquíferos contaminados com óleo diesel**. 2006.86f. Dissertação (Mestre em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

MCNALLY, D.L.; MIHELICIC, J.R.; LUEKING, D.R.. Biodegradation of three- and four-ring polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and denitrifying conditions. **Environmental Science & Technology**. v. 32, n. 17, p. 2633-2639. 1998.

MECKENSTOCK, R.U.; ANNWEILER, E.; MICHAELIS, W.; RICHNOW, H.H.; SCHINK, B.. Anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture. **Applied and Environmental Microbiology**. v.66, n.7, p.2743-2747. 2000.

MIHELICIC, J.R.; LUTHY, R.G.. Degradation of polycyclic aromatic compounds under various redox conditions in soil-water systems. **Applied and Environmental Microbiolog.** v.54, n.5, p.1182-1187. 1988a.

MIHELICIC, J.R.; LUTHY, R.G.. Microbial degradation of acenaphthene and naphthalene under denitrification conditions in soil-water systems. **Applied and Environmental Microbiolog.** v.54, n.5, p. 1188-1198. 1988b.

MILLIOLI, V.S.. Avaliação da potencialidade da utilização de surfactantes na biorremediação de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo. 2009. 200f. Tese (Doutor em Ciências) - Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

MIRANDA, L.B.; CASTRO, B.M.; KJERFVE, B.. **Princípios de oceanografia física de estuários**. Editora: UdUSP. 2002. Disponível em:< [http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=cpM71FEOS1sC&oi=fnd&pg=PA11&dq=estu%C3%A1rio&ots=LpSC8LT-UT&sig=onQxckxk0o3Ym0vSb\\_gucEVOC-k#v=onepage&q=estu%C3%A1rio&f=false](http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=cpM71FEOS1sC&oi=fnd&pg=PA11&dq=estu%C3%A1rio&ots=LpSC8LT-UT&sig=onQxckxk0o3Ym0vSb_gucEVOC-k#v=onepage&q=estu%C3%A1rio&f=false)> Acesso em: 23 jan. 2010.

PERRY, J. J.. Microbial cooxidations involving hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v.43, n.1, p. 59-72. 1979.

PROTAZIO, L; NEIVA TANAKA, S.M.C & CAVALCANTE, P.R.S. Avaliação de procedimentos de extração sequencial de fósforo em sedimento. *Revista Analytica.*, n. 8. 2004. 7p.

QUEIROZ, A.F.S.; CELINO, J.J.. Manguezais e ecossistemas estuarinos da Baía de Todos os Santos. In. QUEIROZ, A.F.S.; CELINO, J.J.(Org.). **Avaliação de ambientes na Baía de Todos os Santos: aspectos geoquímicos, geofísicos e biológicos**. Salvador: UFBA, 2008. cap. 1, p. 39-58.

RISER-ROBERTS, E.. **Remediation of petroleum –contaminated soil: biological, physical, and chemical processes**. Lewis Publishers. Boca Raton, FL. 542p. Disponível em:< [http://books.google.com.br/books?id=NegqBYA7G6oC&pg=PA6&lpg=PA6&dq=Remediation+of+petroleum+%E2%80%93contaminated+soil:+biological,+physical,+and+chemical+processes&source=bl&ots=xdAOKbxk1m&sig=JfDF7XrghHloTz-Kr6SviJmiSqU&hl=pt-BR&ei=47tqS7m7KJ-ltgfE2qyYBg&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=6&ved=0CC8Q6AEwBQ#v=onepage&q=&f=false](http://books.google.com.br/books?id=NegqBYA7G6oC&pg=PA6&lpg=PA6&dq=Remediation+of+petroleum+%E2%80%93contaminated+soil:+biological,+physical,+and+chemical+processes&source=bl&ots=xdAOKbxk1m&sig=JfDF7XrghHloTz-Kr6SviJmiSqU&hl=pt-BR&ei=47tqS7m7KJ-ltgfE2qyYBg&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=6&ved=0CC8Q6AEwBQ#v=onepage&q=&f=false)>. Acesso em: 20 de janeiro de 2010.

ROCKNE, K.J.; STRAND, S.E.. biodegradation of bicyclic and polycyclic aromatic hydrocarbons in anaerobic enrichments. **Environmental Science and Technology**. v.32, p. 3962-3967.1998.

ROCKNE, K.J., CHEE-SANFORD, J.C.; SANFORD, R.A; HELUND, B.P.; STALEY, J.T.; STRAND, S.E.. Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. **Applied and Environmental Microbiolog.** v.66, n.4, p.1595-1601. 2000.

ROSA, A.; TRIGUIS, J.A.. Bioremediation process on Brazil shoreline. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 14, n.7, p. 470-476, 2007.

SEABRA, P.N.C.. **Uso de tensoativos na mobilização e biodegradação de óleo diesel em solos impactados**. 1997. 128f. Dissertação ( Mestre em Ciências em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1997.

SILVA, D.M.C.; ARAÚJO, J.A.; GAVAZZA, S.; SOUTO-MAIOR, A.M.; CHAGAS-SPINELLI, A.C.O.. Avaliação da eficiência de produção de ramnolipídeos a partir de diferentes fontes de nitrogênio por *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de poço de petróleo. In: XVII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS. **Anais...**Natal. 2009.

SIM, L., OP Ward, O.P.; Li, Z-Y.. Production and characterisation of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1 **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v.19, p. 232–238. 1997.

SPAIN, L. C.; PRITCHARD, P.H.; BOURQUIN, A.W.. Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment/water cores from estuarine and freshwater environments. **Applied Environmental Microbiology**. v. 40, p.726-134. 1980.

**Standard methods for examination of water and wastewater**, 20th, APHA-AWWA-WEF, Washington. 1999.

SYKES, P. **A guidebook to mechanism in organic chemistry**. New York: Longman Scientific & Technical, 1985.

TARVIN, D.; BUSWELL, A. M..The methane fermentation of organic acids and carbohydrates. **Journal of the American Chemical Society**. v. 56, p.1751-1755. 1934.

TAYLOR, F.B.; CAMPBELL, W.L.; CHINOY, I..Anaerobic degradation of the benzene nucleus by a facultatively anaerobic microorganism. **Journal of Bacteriology**. v.102, n.2, p.430-437. 1970.

THE INTERNATIONAL TANKER OWNERS POLLUTION FEDERATION LIMITED - ITOPF. **Case Histories**. 2009a. Disponível em: <<http://www.itopf.com/information-services/data-and-statistics/case-histories/indexold.html>>. Acesso em: 27 de agosto de 2009.

\_\_\_\_\_. **Handbook 2009/10**. London, 2009b. Disponível em: <[www.itopf.com](http://www.itopf.com)>. Acesso em: 27 de agosto de 2009.

\_\_\_\_\_. **Statistics**.2009c. Disponível em: <<http://www.itopf.com/information-services/data-and-statistics/statistics/>>. Acesso em: 27 de agosto de 2009.

TORREIRO, A. G. A. G.. **Toxicidade e biorremediação em sedimento contaminado, utilizando o copépo do harpacticóide *Tisbe biminiensis***. 2010. XXf.. Dissertação (Mestre em Oceanografia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2010.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L.. **Microbiologia**. Tradução: Roberta Marchiori Martins. 8 ed.. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894 p.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - U.S.EPA. **Provisional guidance for quantitative risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons**, Washington, 1993. Disponível em: <<http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?deid=49732>>. Acesso em: 08 de setembro de 2009.

\_\_\_\_\_. **Seminars bioremediation of hazardous waste sites: practical approaches to implementation**. EPA/625/K-96/001. Washington, DC. 1996. Disponível em: <<http://www.epa.gov/nrmrl/pubs/625k96001/625k96001.pdf>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2010.

\_\_\_\_\_. **Priority Pollutants**. 2009. Disponível em: <<http://www.epa.gov/waterscience/methods/pollutants.htm>> Acesso em: 06 de janeiro de 2010.

WARD, D.M; BROCK, T.D.. Environmental factors influencing the rate of hydrocarbon oxidation in temperate lakes. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 3, n.5, p. 764-772.1976.

ZHANG, X.; YOUNG, L.Y..Carboxylation as an initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia. **Applied and Environmental Microbiolog.** v.63, n.12, p. 4759-4764. 1997.

ZOBELL, C.E.. Action of microorganisms on hydrocarbons. **Bacteriological Reviews**, v.10, p. 1-49. 1946.

## ANEXOS

### Anexo 1: Parecer de caracterização do óleo diesel utilizado no experimento

BOLETIM DE ANÁLISE

N° R001.06.09

ÓLEO DIESEL

Resolução ANP N° 15/2006

Regulamento Técnico ANP N° 02/2006

Resolução ANP N° 18/2008

Resolução ANP N° 41/2008

Resolução ANP N° 43/2008



Razão Social:		Laboratório de Saneamento Ambiental		CNPJ:	24.134.488/0001-08
Endereço:					
Av Acadêmico Hélio Ramos S/N - Cidade Universitária - RECIFE-PE					
Código da amostra:	N° do laçre:	Data da coleta:	Local de coleta:	UF:	
R1095.06.09/ODC-40	-	01/06/2009	Não informado	-	
Classificação do produto:					
Óleo Diesel Comum Metropolitano					
Observações:					
<p>A amostra foi entregue pelo cliente no Laboratório de Combustíveis da UFPE em 15/06/2009 às 11h.                  Local de coleta não informado. Amostra declarada pelo cliente como Óleo Diesel Metropolitano.                  Os ensaios foram realizados no período de 15 à 26/06/2009.                  A classificação do produto constante neste boletim foi declarada pelo cliente.                  Os resultados deste boletim referem-se à amostra conforme recebida, não implicando, portanto, em nenhuma garantia quanto à coleta e procedência do produto que são de total responsabilidade do cliente.</p>					

Característica (*)	Unidade	Resultado	Especificação (*)	Método (*)
Aspecto	-	Turvo	Límpido e isento de impurezas	Visual (2)
Cor ASTM	-	-	máx. 3,0	NBR 14483 ASTM D 1500
Cor	-	-	-	Visual (2)
Teor de Biodiesel (4)	%vol	3,0	3,0	Infravermelho
Enxofre Total	mg/kg	-	máx. 50,0	NBR 14533 ASTM D 4294
Destilação:				
10% Recuperados	°C	232,5	Anotar	NBR 9619 ASTM D 86
50% Recuperados	°C	275,6	245,0 a 310,0	
85% Recuperados	°C	325,0	máx. 360,0	
90% Recuperados	°C	335,9	Anotar	
Massa Específica a 20°C	kg/m <sup>3</sup>	837,5	820,0 a 865,0	NBR 14065 ASTM D 4052
Ponto de Fulgor	°C	71,0	mín. 38,0	NBR 14598/A ASTM D 93/A
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm <sup>2</sup> /s	-	2,000 a 5,000	NBR 10441 ASTM D 445
Ponto de Entupimento de Filtro a Frio	°C	-	(5)	NBR 14747 ASTM D 6371



(Continuação)

Código da Amostra: R1095.06.09/ODC-40	N <sup>o</sup> do Boletim de Análise: R001.06.09
--	---

Característica (*)	Unidade	Resultado	Especificação (*)	Método (*)
Corrosividade ao Cobre (3h a 50° C)	-	-	máx. 1	NBR 14359 ASTM D 130
Cinzas	%massa	-	máx. 0,010	NBR 9842 ASTM D 482
RCR, no Resíduo dos 10% Finais da Destilação	%massa	-	máx. 0,25	NBR 14318 ASTM D 524
Número de Cetano (6)	-	-	mín. 42,0	ASTM D 613
Índice de Cetano	-	53,5	mín. 45,0	ASTM D 4737
Água e Sedimentos	%vol	-	máx. 0,05	NBR 14647 ASTM D 1796

(\*) As observações numeradas devem ser verificadas na Tabela de Especificações da Resolução ANP.

**Conclusão:**

Amostra não conforme por apresentar Aspecto fora das especificações da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP).

Recife-PE, 29/06/2009

Recife-PE, 29/06/2009

Os resultados apresentados neste documento têm significação restrita e se aplicam somente à amostra analisada. Este documento e seus resultados não podem ser usados para fins promocionais. É permitida a reprodução deste documento desde que realizada integralmente.

## Anexo 2: Parecer de caracterização granulométrica do sedimento

**Tabela 9. Distribuição granulométrica das amostras de sedimento de caracterização da superfície (a), do meio (b) e do fundo (c).**

Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %
0.010	0.00	0.105	0.00	1.096	0.22	11.482	1.21	120.226	2.44	1258.925	0.00
0.011	0.00	0.120	0.00	1.259	0.24	13.183	1.50	138.038	1.40	1445.440	0.00
0.013	0.00	0.138	0.00	1.445	0.27	15.136	1.92	158.489	0.60	1659.587	0.00
0.015	0.00	0.158	0.00	1.660	0.30	17.378	2.48	181.970	0.09	1905.461	0.00
0.017	0.00	0.182	0.00	1.905	0.34	19.953	3.19	208.930	0.00	2187.762	0.00
0.020	0.00	0.209	0.00	2.188	0.38	22.909	4.03	239.883	0.00	2511.886	0.00
0.023	0.00	0.240	0.00	2.512	0.41	26.303	4.96	275.423	0.00	2884.032	0.00
0.026	0.00	0.275	0.00	2.884	0.45	30.200	5.89	316.228	0.00	3311.311	0.00
0.030	0.00	0.316	0.00	3.311	0.49	34.674	6.75	363.078	0.05	3801.894	0.00
0.035	0.00	0.363	0.00	3.802	0.53	39.811	7.43	416.869	0.14	4365.158	0.00
0.040	0.00	0.417	0.00	4.365	0.57	45.709	7.85	478.630	0.20	5011.872	0.00
0.046	0.00	0.479	0.09	5.012	0.62	52.481	7.93	549.541	0.23	5754.399	0.00
0.052	0.00	0.550	0.13	5.754	0.66	60.256	7.64	630.957	0.22	6606.934	0.00
0.060	0.00	0.631	0.16	6.607	0.72	69.183	6.99	724.436	0.19	7585.776	0.00
0.069	0.00	0.724	0.18	7.586	0.78	79.433	6.03	831.764	0.14	8709.636	0.00
0.079	0.00	0.832	0.20	8.710	0.87	91.201	4.88	954.993	0.09	10000.000	0.00
0.091	0.00	0.955	0.21	10.000	1.01	104.713	3.63	1096.478	0.04		
0.105	0.00	1.096		11.482		120.226		1258.925			

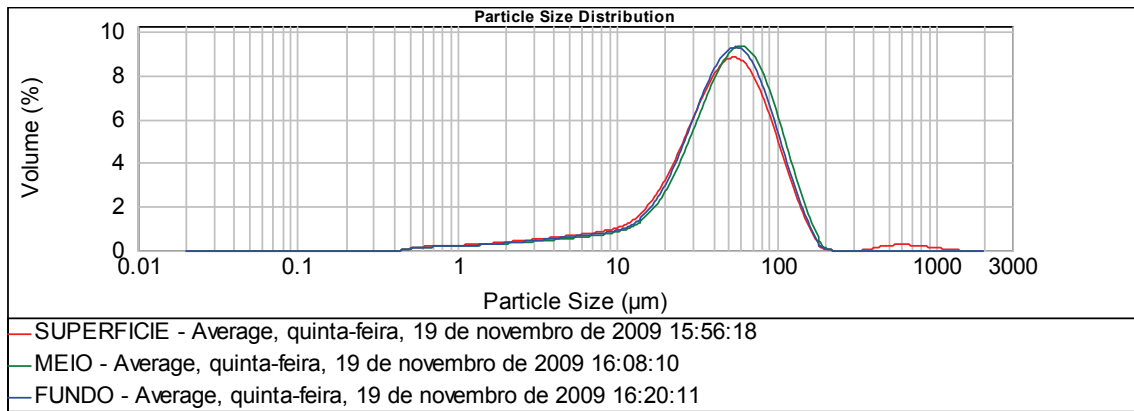
(a)

Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %
0.010	0.00	0.105	0.00	1.096	0.19	11.482	0.97	120.226	3.20	1258.925	0.00
0.011	0.00	0.120	0.00	1.259	0.21	13.183	1.20	138.038	1.95	1445.440	0.00
0.013	0.00	0.138	0.00	1.445	0.23	15.136	1.54	158.489	0.94	1659.587	0.00
0.015	0.00	0.158	0.00	1.660	0.26	17.378	2.03	181.970	0.23	1905.461	0.00
0.017	0.00	0.182	0.00	1.905	0.28	19.953	2.67	208.930	0.00	2187.762	0.00
0.020	0.00	0.209	0.00	2.188	0.31	22.909	3.48	239.883	0.00	2511.886	0.00
0.023	0.00	0.240	0.00	2.512	0.34	26.303	4.41	275.423	0.00	2884.032	0.00
0.026	0.00	0.275	0.00	2.884	0.37	30.200	5.42	316.228	0.00	3311.311	0.00
0.030	0.00	0.316	0.00	3.311	0.40	34.674	6.42	363.078	0.00	3801.894	0.00
0.035	0.00	0.363	0.00	3.802	0.43	39.811	7.32	416.869	0.00	4365.158	0.00
0.040	0.00	0.417	0.00	4.365	0.47	45.709	7.99	478.630	0.00	5011.872	0.00
0.046	0.00	0.479	0.08	5.012	0.51	52.481	8.35	549.541	0.00	5754.399	0.00
0.052	0.00	0.550	0.11	5.754	0.55	60.256	8.33	630.957	0.00	6606.934	0.00
0.060	0.00	0.631	0.14	6.607	0.60	69.183	7.88	724.436	0.00	7585.776	0.00
0.069	0.00	0.724	0.16	7.586	0.65	79.433	7.04	831.764	0.00	8709.636	0.00
0.079	0.00	0.832	0.17	8.710	0.72	91.201	5.90	954.993	0.00	10000.000	0.00
0.091	0.00	0.955	0.18	10.000	0.82	104.713	4.56	1096.478	0.00		
0.105	0.00	1.096		11.482		120.226		1258.925			

(b)

Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %
0.010	0.00	0.105	0.00	1.096	0.20	11.482	1.04	120.226	2.63	1258.925	0.00
0.011	0.00	0.120	0.00	1.259	0.21	13.183	1.31	138.038	1.54	1445.440	0.00
0.013	0.00	0.138	0.00	1.445	0.24	15.136	1.70	158.489	0.63	1659.587	0.00
0.015	0.00	0.158	0.00	1.660	0.27	17.378	2.26	181.970	0.13	1905.461	0.00
0.017	0.00	0.182	0.00	1.905	0.30	19.953	2.98	208.930	0.00	2187.762	0.00
0.020	0.00	0.209	0.00	2.188	0.33	22.909	3.88	239.883	0.00	2511.886	0.00
0.023	0.00	0.240	0.00	2.512	0.37	26.303	4.87	275.423	0.00	2884.032	0.00
0.026	0.00	0.275	0.00	2.884	0.40	30.200	5.91	316.228	0.00	3311.311	0.00
0.030	0.00	0.316	0.00	3.311	0.44	34.674	6.89	363.078	0.00	3801.894	0.00
0.035	0.00	0.363	0.00	3.802	0.48	39.811	7.69	416.869	0.00	4365.158	0.00
0.040	0.00	0.417	0.00	4.365	0.53	45.709	8.20	478.630	0.00	5011.872	0.00
0.046	0.00	0.479	0.07	5.012	0.57	52.481	8.36	549.541	0.00	5754.399	0.00
0.052	0.00	0.550	0.11	5.754	0.61	60.256	7.45	630.957	0.00	6606.934	0.00
0.060	0.00	0.631	0.14	6.607	0.66	69.183	6.46	724.436	0.00	7585.776	0.00
0.069	0.00	0.724	0.16	7.586	0.71	79.433	5.24	831.764	0.00	8709.636	0.00
0.079	0.00	0.832	0.17	8.710	0.78	91.201	3.91	954.993	0.00	10000.000	0.00
0.091	0.00	0.955	0.18	10.000	0.88	104.713		1096.478	0.00		
0.105	0.00	1.096		11.482		120.226		1258.925			

(c)



**Figura 32. Gráfico da distribuição granulométrica das amostras de sedimento de caracterização da superfície, do meio e do fundo.**

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)