



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DO
PETRÓLEO**

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DE PETRÓLEO UTILIZANDO
MICROORGANISMOS ISOLADOS DO ESTUÁRIO DO RIO POTENGI (RN)**

Cíntia de Castro Costa

Natal/RN

Agosto de 2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DO
PETRÓLEO**

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DE PETRÓLEO UTILIZANDO
MICRORGANISMOS ISOLADOS DO ESTUÁRIO DO RIO POTENGI (RN)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia do Petróleo da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como parte dos requisitos necessários à conclusão do curso de mestrado.

Cíntia de Castro Costa

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Gorete Ribeiro de Macedo.

Divisão de Serviços Técnicos
Catalogação da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Central Zila Mamede

Costa, Cíntia de Castro.

Avaliação da biodegradabilidade de petróleo utilizando microrganismos isolados do estuário do rio Potengi (RN) / Cíntia de Castro Costa. – Natal, RN, 2010.
99 f. : il.

Orientador: Gorete Ribeiro de Macedo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia do Petróleo.

1. Petróleo – Biodegradação – Dissertação. 2. Ecologia dos manguezais – Rio Grande do Norte – Dissertação. 3. Biorremediação – Dissertação. I. Macedo, Gorete Ribeiro de. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BCZM

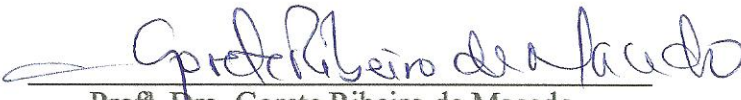
CDU 665.654(043.2)


Cíntia de Castro Costa


**AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DE PETRÓLEO UTILIZANDO
MICROORGANISMOS ISOLADOS DO ESTUÁRIO DO RIO POTENGI (RN)**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Engenharia do Petróleo
da Universidade Federal do Rio
Grande do Norte como parte dos
requisitos necessários à conclusão
do curso de mestrado.

Aprovada em 16 de agosto de 2010.


Prof.^a. Dra. Gorete Ribeiro de Macedo
Orientador – UFRN


Prof.^o. Dr. Everaldo Silvino dos Santos
Membro Interno – UFRN


Dr. Laerte de Medeiros Barros Junior
Membro Externo - Petrobrás

COSTA, Cintia de Castro – Avaliação da biodegradabilidade de petróleo, utilizando microrganismos isolados do estuário do rio Potengi (RN). Dissertação de Mestrado, UFRN, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia do Petróleo. Linha de pesquisa: Meio Ambiente na Indústria de Petróleo e Gás Natural (MAP), Natal/RN, Brasil.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Gorete Ribeiro de Macedo

Co-Orientador: Prof^º. Dr. Josemar Gurgel da Costa

RESUMO: A atividade petrolífera do RN constitui uma ameaça permanente aos ecossistemas costeiros, principalmente os manguezais, com a possibilidade de derramamentos de óleo. Neste contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial de resistência do ambiente de manguezal a um possível derramamento. Foram selecionados e isolados microrganismos degradadores de petróleo pela técnica de enriquecimento de culturas e formação de um consórcio bacteriano. O estudo cinético do consórcio foi realizado em incubador rotativo sob agitação de 150 rpm e temperatura de 30°C. As amostras foram retiradas em intervalos de 4h para análise da concentração celular e tensão superficial. A biodegradação foi monitorada através de dois métodos de respirometria: manométrico (OxiTop-C®) e condutivimetria, nos quais a biodegradabilidade de petróleo foi estimada indiretamente pelo consumo de oxigênio e produção de CO₂, respectivamente. Além disso, nos ensaios de condutivimetria foi realizado um planejamento fatorial completo 2² com triplicata no ponto central. Pela técnica de enriquecimento de culturas foram obtidas treze linhagens bacterianas. No estudo cinético do consórcio, pode-se observar ausência da fase lag atingindo-se uma concentração celular máxima de 2,55 g/L em 16 h de cultivo e queda da tensão superficial. Quando adotou-se a metodologia do OxiTop-C foi detectado uma faixa que indica biodegradabilidade (1% de petróleo v/v), no entanto quando utilizou-se a metodologia de condutivimetria não foi observado nenhuma faixa que indicasse biodegradabilidade efetiva. Ao monitorar um processo de biodegradabilidade é necessário avaliar qual a metodologia será adotada para avaliar o processo de biodegradação, pois para as mesmas condições adotadas diferentes metodologias podem apresentar resultados divergentes. Os degradadores de petróleo isolados do solo de mangue do estuário do Rio Potengi/RN podem vir a ser utilizados em estratégias de biorremediação desses lugares, no caso de um eventual derramamento de óleo, ou ainda, podem ser empregados no tratamento de resíduos petrolíferos gerados em ambientes salinos, desde que sejam otimizadas as condições dos ensaios de modo que as eficiências de biodegradação atinjam o patamar mínimo sugerido pelas normas.

Palavras-chaves: Biodegradabilidade de petróleo, Mangue, Consórcio bacteriano, Biorremediação, Método OxiTop-C, Condutivimetria, Respirometria, Rio Potengi.

BANCA EXAMINADORA:

Presidente:

Prof^ª. Dr^ª. Gorete Ribeiro de Macedo (DEQ/UFRN)

Membros:

Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos (DEQ/UFRN)

Dr. Laerte de Medeiros Barros Junior (Engenheiro de Processamento/Petrobrás)

DATA DA DEFESA: 16.08.2010

Abstract

The oil activity in the Rio Grande do Norte State (RN) is a permanent threat to coastal ecosystems, particularly mangroves, with the possibility of oil spills. In this context, the objective of this study was to evaluate the potential resistance of the mangrove environment of a possible spill. Were selected and isolated microorganisms degrading oil by the technique of enrichment cultures and formation of a bacterial consortium. The kinetic study of the consortium was held in rotary incubator shaken at 150 rpm and 30° C. Samples were taken at intervals of 4 hours for analysis of cell concentration and surface tension. The biodegradation was monitored using two methods of respirometry: manometric (OxiTop-C ®) and conductivimetry, where the biodegradation of oil was estimated indirectly by oxygen consumption and CO₂ production, respectively. Furthermore, it was used a full 2² factorial design with triplicate at central point to the runs that used the conductivimetric methodology.. The technique of enrichment cultures allowed to obtain thirteen bacterial strains. Kinetic study of the consortium, we can showed the absence of the lag phase, reaching a maximum cell concentration of 2.55 g / L at 16 h of cultivation and a reduction on surface tension. When we adopted the methodology of OxiTop-C was detected a band indicating biodegradability (1% oil v/v), however when we used the conductivimetry methodology did not observe any band that would indicate effective biodegradation. By monitoring a process of biodegradation is necessary to observe the methodology will be adopted to evaluate the biodegradation process, since for the same conditions adopted different methodologies can produce different results. The oil-degrading isolates from soils of the mangrove estuary Potengi / RN are largely to be used in bioremediation strategies of these places, in the case of a possible oil spill, or it can be used in the treatment of waste oil generated in saline environments, since they are optimized the conditions of the tests so that the efficiency of biodegradation reach the minimum level suggested by the standarts.

Keywords: Biodegradability of petroleum, Mangrove, Bacterial consortium, Bioremediation, Method OxiTop-C, Conductivimetry, Respirometry, River Potengi.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder o dom da vida, saúde e perseverança a fim de concluir este trabalho;

Aos meus pais, Florêncio e Salete, que me proporcionaram o bem maior que é a educação, fazendo muitas vezes sacrifícios para atender e incentivar meus estudos, meu muito obrigada!;

A todos os meus familiares, por acreditar em meu potencial e por compreender minhas tantas ausências;

A minha orientadora Gorete Ribeiro de Macedo que me acolheu de braços abertos e abriu todos os caminhos para que esse trabalho se realizasse. Agradeço pelas palavras de incentivo, pelos conhecimentos adquiridos, amizade e estímulo durante o desenvolvimento da minha carreira acadêmica;

Ao meu co-orientador Josemar Gurgel, que mesmo distante deu sua parcela de contribuição para realização desse trabalho;

A Olivia Maria pela ajuda nas análises de Gram;

Ao Prof. Dinarte Aéda por me direcionar nas análises de solo;

Ao Prof. Yuri Costa por autorizar as análises do solo no Laboratório de Mecânica dos solos;

Aos professores Djalma Ribeiro e Guilherme Fulgêncio por possibilitar algumas coletas em campo;

Ao Prof. Everaldo Silvino pela orientação das análises estatísticas;

A todos os meus colegas do laboratório que não cabe aqui citar todos os nomes, porém não posso deixar de citar os companheiros da biodegradabilidade: Andrea Karla e Sérgio Oliveira, que me ajudaram na realização desse trabalho;

Em especial a minha amiga Michelle Vaz que ficou sempre do meu lado me ensinando, aconselhando, incentivando e me contagiando com seu bom humor e determinação;

Aos funcionários da UFRN de diversos setores pelo apoio, me socorrendo sempre que precisei;

Aos meus amigos queridos por terem conseguido tirar um sorriso do meu rosto nos momentos difíceis;

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico,
pela concessão da bolsa de mestrado;

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse
trabalho.

Sumário

<i>Lista de figuras</i>	<i>x</i>
<i>Lista de tabelas</i>	<i>xi</i>
<i>Nomenclatura</i>	<i>xii</i>
CAPÍTULO 1	14
INTRODUÇÃO GERAL	14
1. Introdução	14
CAPÍTULO 2	17
ASPECTOS TEÓRICOS	17
2. Aspectos teóricos	17
2.1. Importância ecológica dos manguezais	17
2.2. Petróleo em ambiente de manguezais	18
2.3. Degradação de petróleo	20
2.4. Cinética microbiana	22
2.5. Respirimetria aeróbia	25
2.5.1. Respirimetria aeróbia - parâmetro avaliado: CO ₂	25
2.5.2. Respirimetria aeróbia: parâmetro avaliado: O ₂	26
2.6. Biorremediação aplicada à áreas de manguezais	27
2.7. Planejamento Experimental	28
CAPÍTULO 3	30
ESTADO DA ARTE	30
3. Estado da arte	30
CAPÍTULO 4	34
METODOLOGIA EXPERIMENTAL	34

4. Metodologia experimental.....	34
4.1. Coleta de amostras de sedimento de mangue do Rio Potengi -- RN.....	34
4.2. Caracterização Físico-química, biológica e granulométrica.....	35
4.2.1. pH.....	35
4.2.2. Umidade.....	35
4.2.3. Capacidade de retenção de água.....	36
4.2.4. Granulometria e densidade.....	36
4.2.5. Carbono orgânico.....	36
4.2.6. Matéria orgânica.....	36
4.2.7. Contagem microbiana.....	37
4.3. Enriquecimento, isolamento e identificação preliminar de microrganismos degradadores de petróleo a partir de amostras de campo.....	37
4.3.1. Análise de Gram.....	38
4.3.2. Análise de KOH.....	39
4.4. Formação de um consórcio bacteriano a partir das linhagens obtidas no enriquecimento de culturas.....	40
4.5. Estudo cinético do crescimento do consórcio bacteriano obtido pelo enriquecimento de culturas.....	40
4.5.1. Microrganismo.....	40
4.5.2. Meio de cultivo.....	40
4.5.3. Condições de cultivo.....	41
4.5.4. Métodos de análise.....	41
4.5.4.1. Determinação da concentração celular (x).....	41
4.5.4.2. Determinação da tensão superficial.....	41
4.5.4.3. Velocidade específica de crescimento.....	42
4.6. Ensaio de biodegradabilidade do petróleo em escala de laboratório.....	43
4.6.1. Ensaio de respirometria utilizando o sistema de medida Oxitop-C.....	43

4.6.2. Ensaio de respirometria utilizando o método da condutivimetria.....	46
CAPÍTULO 5	50
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5. Resultados e Discussão.....	50
5.1. Coleta de Amostras de Sedimento de Mangue do Rio Potengi – RN.....	50
5.2. Enriquecimento e Isolamento de Microrganismos Degradadores de Petróleo a Partir de Amostras de Campo.....	51
5.3. Estudo cinético do desenvolvimento do consórcio obtido pelo enriquecimento de culturas.....	54
5.3.1. Determinação da concentração celular (X).....	54
5.3.2. Determinação da tensão superficial.....	55
5.3.3. Velocidade específica de crescimento.....	56
5.4. Ensaio de respirometria utilizando o método manométrico (sistema de medida Oxitop-C).....	58
5.5. Ensaio de respirometria utilizando o método da condutivimetria (respirômetro de Bartha).....	65
CAPÍTULO 6.....	84
CONCLUSÃO.....	8
6. Conclusões.....	84
CAPÍTULO 7.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
7. Referências bibliográficas.....	86

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação das variações de concentrações em um processo fermentativo.....	22
Figura 2 - Fases da curva de crescimento microbiano.....	24
Figura 3- A) Mapa da América do Sul-Brasil-RN indicando o estuário do Rio Potengi/RN B) Coleta de sedimento de mangue no estuário do Rio Potengi, município de Natal, RN C e D) Manguezal.....	34
Figura 4- Tensiômetro modelo K100MK2.....	42
Figura 5- Sistema OxiTop-C.....	44
Figura 6- Ensaio de respirometria utilizando o método condutimétrico.....	47
Figura 7- Linhagens de bactérias obtidas após enriquecimento de culturas do estuários do Rio Potengi/RN.....	51
Figura 8- Transformação de petróleo por microrganismos do solo de mangue, durante a fase de enriquecimento de culturas.....	52
Figura 9- Curva de crescimento do consórcio bacteriano em meio mineral mínimo.....	55
Figura 10- Curvas de produção de biomassa e variação da tensão superficial.....	56
Figura.11- Velocidade específica de crescimento em função do tempo do cultivo do consórcio microbiano.....	57
Figura. 12- Figura $\ln X$ pelo tempo para definição da velocidade específica máxima de crescimento.....	58
Figura 13- Consumo de O_2 ao longo de 28 dias de degradação de petróleo, utilizando o sistema OxiTop-C.....	59
Figura. 14. Consumo de O_2 ao longo de 28 dias de degradação de petróleo, utilizando o sistema OxiTop – C.....	61
Figura. 15. Eficiência da biodegradação de petróleo no decorrer de 28 dias de degradação.....	62
Figura. 16. Eficiência da biodegradação de petróleo no decorrer 28 dias de degradação.....	63
Figura. 17. Eficiência da biodegradação de petróleo no decorrer de 28 dias de degradação.....	64

Figura 18- Eficiência da biodegradação de petróleo com 28 dias de degradação.....	65
Figura 19- Produção de CO ₂ no decorrer de 60 dias de degradação de petróleo.....	66
Figura 20- Eficiência de biodegradação ao longo de 60 dias de degradação de petróleo.....	68
Figura. 21 Eficiência de degradação ao longo de 60 dias de degradação de petróleo.....	68
Figura. 22. Produção de CO ₂ ao longo de 60 dias de degradação de petróleo.....	71
Figura. 23. Eficiência de biodegradação de petróleo nos ensaios do planejamento experimental 2 ² com triplicata no ponto central.....	72
Figura. 24. Diagrama de Pareto a eficiência de degradação de petróleo dos ensaios delimitados pelo planejamento fatorial 2 ² , ao longo de 60 dias de degradação.....	73
Figura. 25. Influência da concentração de petróleo na eficiência de biodegradação de petróleo.....	74
Figura 26. Influência da concentração de inóculo na eficiência de biodegradação de petróleo.....	75
Figura. 27. Influência da concentração de petróleo e inóculo na eficiência de biodegradação de petróleo.....	76
Figura. 28. Influência da concentração de petróleo e inóculo na eficiência de biodegradação de petróleo.....	77
Figura. 29. Superfície de resposta.....	78
Figura.30. Petróleo utilizado nos ensaios de biodegradação de petróleo.....	79

Lista de tabelas

Tabela 1- Matriz do Planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central.....	49
Tabela 2. Pontos de coleta no Estuário do Rio Potengi/RN.....	50
Tabela 3. Análises físico-química e granulométrica do solo.....	50
Tabela 4. Bactérias degradadoras de petróleo, selecionadas pela técnica de enriquecimento de culturas, a partir e sedimento de mangue do estuário do Rio Potengi, município de Natal, RN.....	53
Tabela 5. Matriz do Planejamento Fatorial Completo 2^2 com triplicata no ponto central e os respectivos percentuais de biodegradação PB.....	70

Nomenclaturas

ABNT= Associação Brasileira de Normas Técnicas

NBR=Normas Brasileiras Registradas

UFC/g = Unidade formadora de colônia por grama.

dP/dt = Velocidade de formação de produto (g/L.h)

dS/dt = Velocidade de consumo de substrato (g/L.h)

dX/dt = Velocidade de variação de biomassa (g/L.h)

μ_{max} = Velocidade específica de crescimento de microrganismo máxima (h^{-1})

PT= Estuário do Rio Potengi/RN

DO= Densidade ótica

pH= Potencial hidrogeniônico

rpm= rotações por minuto

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os manguezais ocorrem em todo o território brasileiro ao longo da costa, começando pelo Amapá e findando em Santa Catarina. Ecologicamente os manguezais são estabilizadores da linha da costa: o firme entrelaçamento de suas raízes controla a erosão, além de atuarem como “filtro biológico” de sedimentos, nutrientes e mesmo poluentes. Os mangues funcionam como abrigo para a fauna, particularmente em estágios juvenis. Por essa última função, têm sido considerados como “berçário” para moluscos, peixes e crustáceos tanto de água doce como de água do mar servindo de base para diversas cadeias alimentares (Corson, 1996).

Apesar de sua importância esse ecossistema tem sofrido um intenso processo de degradação e de substituição. Estima-se que mais de um milhão de hectares de manguezais são perdidos anualmente em todo o mundo (Moscatelli, 1999). Dentre as atividades impactantes podemos citar a indústria petroquímica, a exploração petrolífera e o transporte de petróleo e seus derivados que, quando acometem os manguezais, geram impactos consideráveis (Duke & Burns, 1999).

O Estado do Rio Grande do Norte é o terceiro maior produtor de petróleo do Brasil e segundo maior produtor em terra, perdendo atualmente para Amazônia. A produção total é cerca de 60 mil barris por dia (Petrobrás, 2010). Todas essas atividades constituem uma ameaça permanente aos ecossistemas costeiros (principalmente manguezais) com a possibilidade de derramamentos de petróleo.

A contaminação de manguezais devido ao derramamento do petróleo é freqüente (Mckew *et al.*, 2007), ficando a flora e a fauna desse ecossistema vulnerável ao poluente, devido principalmente à facilidade de sua acumulação no solo (Scherer & Mille, 1989) e toxicidade de seus compostos (Franco *et al.*, 2004). Os hidrocarbonetos de petróleo acumulam-se com facilidade nos solos de mangue, podendo persistir por mais de 20 anos (Michel, 2008), devido a características, tais como, alta concentração de matéria orgânica, condições anóxicas, lenta ciclagem de nutrientes (Scherrer & Mille, 1989) e pelo fato do petróleo conter compostos de difícil degradação. Esses fatores, em longo prazo, podem alterar a estrutura das comunidades microbianas e causar desequilíbrios ecológicos que podem levar à extinção de espécies importantes para a manutenção do ecossistema (Cury, 2004; Rosato, 1997).

Embora os ecossistemas de mangue tenham sido extensivamente estudados, poucos estudos tem se focado na capacidade para a biodegradação de óleo (Brito *et al.*, 2006). Faltam, no Brasil, estudos sobre os efeitos nocivos que o petróleo e seus derivados podem ter sobre a microbiota de mangue, tendo em vista que os manguezais são os ecossistemas costeiros mais sensíveis e vulneráveis ao derramamento de óleo (Burns *et al.*, 1993; Queiroz & Celino, 2010). Devido aos impactos sofridos por esse ecossistema nas últimas décadas, são prementes ações que visem sua conservação e remediação das áreas já impactadas.

A biodegradação de petróleo por populações naturais de microrganismos representa um dos mecanismos primários pelo qual os poluentes são eliminados do meio ambiente (Brito *et al.*, 2006). A biodegradação de petróleo pode ser estimada indiretamente através da respirometria que é uma metodologia bastante adequada à quantificação da atividade biológica aeróbia, a qual determina a velocidade de respiração de uma biomassa ativa. Para avaliar a biodegradação de compostos orgânicos no solo, a respiração da microbiota tem sido utilizada como uma importante ferramenta, a partir de medidas da evolução de CO₂ e/ou absorção de O₂, pois indica a atividade biológica em seu perfil. Portanto, medidas respirométricas como, consumo de oxigênio e produção de gás carbônico têm sido utilizadas como evidências da biodegradação.

Neste contexto, o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar o potencial de resistência do ambiente a um possível derramamento de petróleo. Para alcançar o objetivo geral foram delineados como objetivos específicos: selecionar e isolar microrganismos do estuário do Rio Potengi/RN; formar um consórcio bacteriano; avaliar o comportamento da biodegradabilidade de petróleo utilizando duas metodologias distintas, e por fim, levantar indicativos de potencial desse consórcio em processos de biorremediação.

No processo de seleção e isolamento dos microrganismos foi utilizada a técnica do enriquecimento de culturas e os microrganismos isolados foram utilizados para formação de um consórcio bacteriano. Foi realizado um estudo cinético do consórcio bacteriano com objetivo de avaliar a cinética do desenvolvimento desse consórcio. A biodegradação foi monitorada através de duas metodologias distintas de respirometria: manométrico (OxiTop-C®) e condutivimetria. Foram utilizados o sistema de respirometria manométrico representado pelo sistema OxiTop-C, no qual a eficiência de degradação foi estimada

indiretamente pelo consumo de oxigênio e o sistema de respirometria condutimétrico, onde a eficiência de degradação foi estimada indiretamente pela produção de CO₂. Os ensaios foram realizados com solo de mangue do Estuário do Rio Potengi/RN, com níveis crescentes tanto de inóculo, como de petróleo.

Há, portanto, a necessidade de se estudar e desenvolver tecnologias limpas que visem a biorremediação de ecossistemas costeiros, principalmente os manguezais, em caso de derramamento de petróleo, visto que a intensa atividade petrolífera no Estado do Rio Grande do Norte nos coloca fortemente neste contexto.

CAPÍTULO 2

ASPECTOS TEÓRICOS

2. ASPECTOS TEÓRICOS

2.1. Importância ecológica dos manguezais

Manguezal é um ecossistema marinho intertidal típico da costa, sujeito ao regime das marés e presente principalmente nas desembocaduras de rios em regiões tropicais e subtropicais. Ele constitui um importante viveiro para peixes, crustáceos e pássaros (Brito *et al.*, 2006). Ocorre em todo o território brasileiro ao longo da costa, começando pelo Amapá e findando em Santa Catarina. As variações espaciais de características como temperatura e salinidade da água, do solo e de cursos de água nos manguezais são grandes (Cury, 2004). A salinidade da água dos manguezais pode variar de 0,5% a 30% (Odum *et al.*, 1982; Yañez-Arancibia, 1986). Na superfície do solo a salinidade em geral diminui com a distância dos rios e canais, exceto nos casos de regiões desprovidas de vegetação, as quais sofrem evaporação de água pela insolação e circulação do ar (Mogg, 1963). Os teores de oxigênio dissolvido nas águas dos canais responsáveis pela inundação geralmente recebem um padrão decrescente desde a área próxima a baía até a parte superior do manguezal (Tundisi *et al.*, 1978).

As espécies que habitam este ecossistema aprenderam a viver e se multiplicar em condições específicas: água salobra, solo lodoso, alagado, com difícil fixação para as raízes e baixo teor de oxigênio. Estas condições são bastante adversas para a maioria das espécies vegetais. Por isso no mangue preponderam poucas espécies, as que conseguiram se adaptar. Essas plantas apresentam adaptações típicas, como raízes escora, que facilitam a fixação nesse tipo de solo e raízes aéreas (pneumatóforos), que permitem a troca de oxigênio. Já a fauna encontrada nos manguezais é bastante diversa e rica: a grande quantidade de material orgânico presente nos mangues forma um vasto banco de alimentação para muitas espécies, desde os organismos marinhos jovens até as espécies visitantes, tanto marinhas como de água doce (Governo de São Paulo, 1999).

Ecologicamente os manguezais são estabilizadores da linha da costa: o firme entrelaçamento de suas raízes controla a erosão, além de atuarem como “filtro biológico” de sedimentos, nutrientes e mesmo poluentes. Os mangues funcionam como abrigo para a

fauna, particularmente em estágios juvenis. Por essa última função, têm sido considerados como “berçário” para moluscos, peixes e crustáceos tanto de água doce como de água do mar servindo de base para diversas cadeias alimentares. Principalmente pelo solo lodoso e por suas águas escuras, o senso comum tende a considerar o mangue uma área “pouco atraente”, no entanto, a sua importância ecológica e econômica é inquestionável (Corson, 1996).

Apesar de sua importância esse ecossistema tem sofrido um intenso processo de degradação e de substituição. Estima-se que mais de um milhão de hectares de manguezais são perdidos anualmente em todo o mundo (Moscatelli, 1999). Sua exploração econômica tem se dado secularmente por meio do extrativismo: madeira para lenha e construção; cascas das árvores para extração de tanino, que é usado para o curtume do couro e proteção das redes de pesca. A pesca predatória, a poluição e a urbanização da orla marítima, juntamente com os aterros que se fazem para construção de casas e empreendimentos, têm sido as maiores causas de sua destruição (Governo do Estado de São Paulo, 1999). Além disso, o desenvolvimento de atividades industriais, portuárias, pesqueiras, de exploração mineral, turísticas, entre outras, sem planejamento adequado, vem colocando em risco os atributos básicos dos estuários e ecossistemas frágeis associados, como os manguezais. Dentre essas atividades pode-se citar a indústria petroquímica e o transporte de petróleo e seus derivados que quando acometem os manguezais geram impactos consideráveis (Duke & Burns, 1999).

2.2. Petróleo em ambiente de manguezais

A contaminação principalmente de manguezais devido ao derramamento do petróleo é freqüente (McKew *et al.*, 2007), ficando a flora e a fauna desse ecossistema vulnerável ao poluente, devido principalmente à facilidade de sua acumulação no solo (Scherer & Mille, 1989). Os hidrocarbonetos de petróleo acumulam-se com facilidade nos solos de mangue, devido a características, tais como, alta concentração de matéria orgânica e condições anóxicas podendo, em longo prazo, alterar as estruturas das comunidades microbianas e causar desequilíbrios ecológicos que podem levar à extinção de espécies importantes para a manutenção do ecossistema (Venosa *et al.*, 1996).

A contaminação do solo com petróleo cru e seus derivados tem se tornando um problema mundial. O óleo cru é física, química e biologicamente prejudicial ao solo devido ao fato de seus compostos serem altamente tóxicos para a biota (Franco *et al.*, 2004).

Após a entrada no ambiente o petróleo sofre alterações de suas características originais, devido a fatores físicos (evaporação, dissolução, dispersão, oxidação fotoquímica, adsorção as partículas, etc) e, principalmente, biológicos (biodegradação) (Sloan, 1999). As transformações físicas e biológicas são reguladas pelas características específicas do derramamento e do ambiente atingido. Assim, o grau de impacto ambiental e persistência do petróleo no ambiente dependem de fatores como: *habitat* atingido, tipo de quantidade de óleo derramado, espécies de organismos atingidos, época do ano (pode afetar o ciclo de vida das espécies), condições hidrográficas e meteorológicas (pode afetar a dispersão de petróleo), clima, frequência, duração a exposição ao petróleo e práticas utilizadas na tentativa de descontaminação (Sloan, 1999). A entrada de hidrocarbonetos em um ecossistema pode resultar ainda num aumento ou decréscimo seletivo do tamanho da população microbiana ou ainda não surtir nenhum efeito (Rosato, 1997).

Quando os derramamentos ocorrem próximos as regiões costeiras ou estuarinas, como os manguezais, ocorrem reações complexas quando o petróleo entra em contato com o sedimento, que torna os compostos do óleo mais protegidos (Rosato, 1997). As condições de inundação e as características da vegetação com suas raízes abundantes, formando uma malha superficial, dificultam o acesso às regiões contaminadas, impedindo a descontaminação física imediata (Getter *et al.*, 1984).

Assim, o petróleo e seus derivados podem persistir por mais de 20 anos nos manguezais antes que a vegetação se recupere totalmente (Michel, 2008). Essa alta persistência é explicada pela lenta biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo, devido à limitação de oxigenação do meio e lenta ciclagem de nutrientes, essenciais para a atividade microbiana aeróbia (Scherrer & Mille, 1989). A persistência dos hidrocarbonetos depende também da exposição do sítio contaminado aos fluxos de água marinha, influenciados pelas marés. A maior frequência de exposição a estes fluxos pode acelerar a remoção dos hidrocarbonetos contribuindo para recuperação da vegetação (Michel, 2008).

Embora os ecossistemas de mangue tenham sido extensivamente estudados, poucos estudos tem se focado na capacidade para a biodegradação do óleo (Brito *et al.*, 2006).

Faltam ao Brasil, conhecimentos sobre os efeitos nocivos que o petróleo e seus derivados podem ter sobre organismos do solo, cujo desaparecimento causa desequilíbrio na dinâmica populacional dos mesmos prejudicando todo o ecossistema local.

Por isso, tendo em vista os impactos causados nos manguezais nas últimas décadas, são prementes ações que visem sua conservação e remediação das áreas já impactadas.

2.3. Degradadores de petróleo

Nas últimas décadas o aumento de acidentes, envolvendo transporte de petróleo e seus derivados com a conseqüente contaminação do ambiente por esses compostos, resultou em pesquisas que objetivaram isolar e identificar microrganismos, com a capacidade de degradar hidrocarbonetos de petróleo, para uma eventual utilização em processos de recuperação das áreas poluídas, bem como avaliar seus comportamentos em presença de diferentes quantidades de hidrocarbonetos.

Os microrganismos desempenham importante função na ciclagem de nutrientes na natureza. A mineralização de compostos orgânicos é essencial para a manutenção da vida na Terra, pois permite a liberação do carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo e outros elementos no estado inorgânico no ambiente. O conceito de que os microrganismos podem utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia é difundindo há muito tempo. Em 1895, um estudo mostrou a degradação da parafina por fungo *Botrytis cinerea*. Desde então, o metabolismo de hidrocarbonetos tem sido extensivamente estudado (Higgins & Burns, 1975).

Tanto em áreas poluídas como em áreas que não tiveram contato prévio com petróleo podem ser encontrados microrganismos com habilidade em utilizar hidrocarbonetos de petróleo, como substrato para exercer suas atividades metabólicas. A quantidade de microrganismos, porém, que apresentam essa habilidade geralmente é maior no local que foi impactado. Além disso, nas áreas expostas a esses poluentes, a condição de estresse ocasionada pode selecionar melhores linhagens com habilidade em degradar tais compostos. Os microrganismos presentes em solo poluído por hidrocarbonetos de petróleo provavelmente estão adaptados a esse ambiente e podem utilizar este poluente como fonte de carbono e energia (Riser-Roberts, 1998).

Biodegradação é a transformação de compostos orgânicos pela atividade metabólica dos organismos, especialmente microrganismos. Por ser o petróleo composto principalmente de hidrocarbonetos, a sua degradação completa resulta na produção de CO₂ e água, fenômeno denominado de mineralização (Silva, 2004). A habilidade em degradar hidrocarbonetos não é restrita a apenas alguns gêneros de microrganismos, pois, vários grupos de bactérias, fungos e actinomicetos têm mostrado possuir essa capacidade (Morais & Tauk-Tornisielo, 2009). Bactérias, fungos e leveduras são os principais agentes biotransformadores devido à habilidade em degradar uma ampla variedade de substâncias xenobióticas, normalmente encontradas em resíduos de indústrias de óleo (Uruahy *et al.*, 1998).

O uso de culturas mistas de microrganismos pode ser mais eficiente na biodegradação do petróleo, por ser este uma mistura complexa de compostos (Balba *et al.*, 1998). Muitos trabalhos que avaliaram a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo demonstraram o uso de consórcio de microrganismos (Lazar *et al.*, 1999; Jørgensen *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Mishra *et al.*, 2001; Vasudevan & Rajaram, 2001), pois, a capacidade biodegradativa deste é maior quantitativamente e qualitativamente quando comparado com a cultura pura. A comunidade mista pode também apresentar maior resistência frente às substâncias tóxicas, pois é maior a probabilidade de que um organismo que tenha a capacidade de detoxificá-las esteja presente. Assim, o produto metabólico pode ser degradado por outra espécie e o ataque de outros microrganismos pode levar a uma completa degradação do produto, mesmo que dentro da comunidade não exista um microrganismo capaz de degradá-lo totalmente. Finalmente, a utilização de culturas mistas permite uma sucessão de ataques aos mesmos, proporcionando no final uma completa degradação do poluente (Morais & Tauk-Tornisielo, 2009).

Alguns microrganismos degradadores de hidrocarbonetos produzem biosurfactantes que aumentam a interação superficial água/óleo, aceleram a degradação de vários óleos por microrganismos e promovem a biorremediação de águas e solos. Os biosurfactantes podem ser usados diretamente para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo. Alternativamente, podem ser utilizados microrganismos produtores ou a adição de fatores de crescimento de microrganismos selvagens capazes de produzir estes compostos (Lobato, 2003; Bezerra, 2006).

Os consórcios microbianos podem ser utilizados como inóculos em tratamentos biológicos, visando reduzir o tempo de degradação de resíduos (Costa *et al.*, 2007).

2.4. Cinética microbiana

Para realizar-se um estudo cinético, inicialmente devem-se definir quais as substâncias consumidas e produzidas que tomar-se-á como referência da cinética. Uma vez escolhidas estas substâncias, é necessário escolher métodos analíticos seguros que permitam medir, com elevado grau de confiança, as variações de suas concentrações com o tempo.

Dispondo de métodos seguros de medida de concentrações de nutrientes, de produtos e de microrganismos durante um cultivo, inocula-se o meio nutriente convenientemente preparado em condições favoráveis à atividade das células microbianas. Periodicamente retira-se uma amostra do cultivo para se determinar às concentrações de uma substância que está sendo consumida (S), de um produto (P) e do microrganismo (X). As variações dessas concentrações com o tempo fornecem curvas do tipo representado na Figura 1.

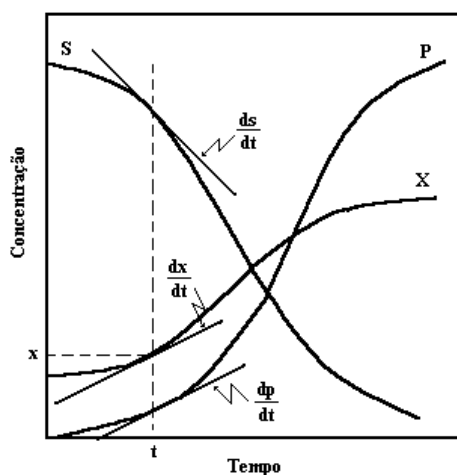


Figura 1. Representação das variações de concentrações em um processo fermentativo.
P, concentração do produto; S, substrato; X, microrganismo
(Aquarone; Borzani; Lima, 1975, p. 176)

A partir dessas curvas é possível determinar em cada instante, as velocidades de consumo de substrato ($-dS/dt$), de formação de produto (dP/dt) e de crescimento do

microrganismo (dX/dt). Levando em consideração que a concentração de microrganismo pode ter sofrido uma considerável variação do instante t_1 a t_2 , define-se então estas velocidades em termos de velocidade específica, na forma:

- *Velocidade específica de crescimento de microrganismo*

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

- *Velocidade específica de formação do produto*

$$\mu_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (2)$$

- *Velocidade específica de consumo do substrato*

$$\mu_s = -\frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (3)$$

Neste estudo será avaliada apenas a velocidade específica de crescimento de um consórcio bacteriano. Visto que o material a ser transformado pelo microrganismo (petróleo) é insolúvel no meio aquoso e fica inviável a avaliação dos outros parâmetros pelos métodos tradicionais (Schmidell *et al*, 2001).

No estudo cinético do crescimento microbiano, as condições não permanecem ideais por muito tempo, logo a quantidade de nutrientes começa a diminuir e os produtos do metabolismo microbiano vão se acumulando. Estas modificações têm uma considerável influência sobre o crescimento dos microrganismos, o que pode ser acompanhado através da análise da Figura 2, em uma cultura descontínua em meio líquido.

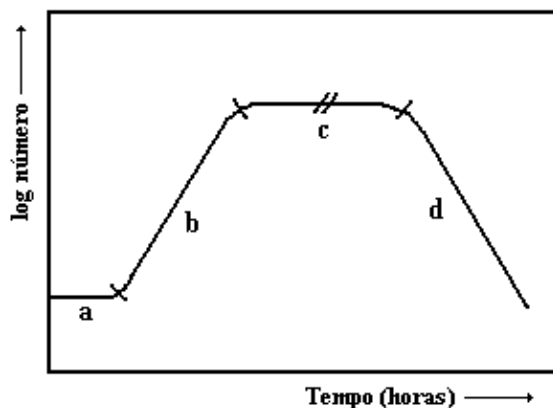


Figura 2. Fases da curva de crescimento microbiano.
a, fase de lag; *b*, fase exponencial; *c*, fase estacionária; *d*, fase de declínio
(Aquarone; Borzani; Lima, 1975, p.12).

- ◆ **Fase de “lag” ou fase de latência:** É a fase de adaptação do microrganismo ao meio, em cujo decorrer a célula sintetiza particularmente as enzimas que são necessárias para metabolizar o substrato presente. Não há reprodução celular, $X = X_0 = \text{cte}$.
- ◆ **Fase de crescimento exponencial:** Os microrganismos se encontram na plenitude de suas capacidades, num meio cujo suprimento de nutrientes é superior às suas necessidades. A velocidade de crescimento dX/dt é uma função da massa X e a velocidade específica μ_X é constante. Esta é a fase mais importante do crescimento microbiano, pois fornece dados fundamentais para o estudo de fisiologia e de cinética, para os quais a velocidade específica é um parâmetro de máxima importância. Nesta fase é possível estudar a influência de uma série de fatores, analisando as modificações introduzidas na curva de crescimento e na composição do meio de cultura, consumo de substrato, aparecimento de produtos do metabolismo, etc.
- ◆ **Fase estacionária:** Após certo tempo, variável com a natureza do microrganismo e condições de cultura, a velocidade de crescimento vai diminuindo até atingir a fase em que a taxa de microrganismos novos é igual a taxa de microrganismos que morrem. As causas dessa parada de crescimento podem ser devido ao acúmulo de metabólitos tóxicos, ao esgotamento de nutrientes e/ou ao esgotamento de oxigênio em cultivos de microrganismos aeróbios ou facultativos.

- ◆ **Fase de declínio:** Depois de certo tempo a taxa de microrganismos que morrem torna-se progressivamente superior aos que surgem.

2.5. Respirometria Aeróbia

Os métodos respirométricos (consumo de oxigênio e/ou produção de dióxido de carbono) podem ser utilizados como um primeiro teste para se avaliar a pronta ou inerente biodegradabilidade de poluentes em solo ou água (Mariano, 2006).

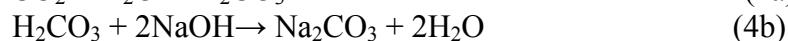
A respirometria é uma metodologia bastante adequada à quantificação da atividade biológica aeróbia, a qual determina a velocidade de respiração de uma biomassa ativa. Para avaliar a biodegradação de compostos orgânicos no solo, a respiração da microbiota tem sido utilizada como uma importante ferramenta, a partir de medidas da evolução de CO₂ e/ou absorção de O₂, pois indica a atividade biológica em seu perfil. Portanto medidas respirométricas como consumo de oxigênio e produção de gás carbônico têm sido utilizadas como evidências da biodegradação (Pedroti, 2007).

2.5.1. Respirometria aeróbia - parâmetro avaliado - CO₂

O sistema de respirometria por condutivimetria, proposto pela Embrapa (Silva, 2007), pode ser utilizado para determinar a atividade microbiológica pela geração de gás carbônico e, indiretamente, a biodegradação de contaminantes orgânicos no solo.

O CO₂ liberado na respirometria é capturado pela solução de NaOH e determinado por condutivimetria. O método da condutivimetria usa a relação direta entre as produções de CO₂ e as mudanças de condutividade da solução básica receptora para análise de biodegradabilidade. Junto com os íons de uma solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH), o CO₂ gerado produz carbonato de sódio (Na₂CO₃). O carbonato é menos dissociável que a base, e mostra uma menor condutividade. A relação linear entre a quantidade de CO₂ liberada e as mudanças na condutividade pode ser usada para determinar a formação de CO₂ com bastante precisão.

As principais reações de avaliações no sistema de respirometria aeróbia são:



Os métodos utilizados para a determinação da eficiência de biodegradação baseiam-se na medição de CO₂ gerado no processo de biodegradação e construção de uma curva da massa acumulada desse CO₂ em função do tempo, que deverão apresentar fases distintas, tais como: início da curva com baixíssima inclinação, que deverá corresponder à fase de adaptação dos microrganismos, seguida de um elevado crescimento exponencial, uma vez que nesta fase estará ocorrendo elevada atividade microbiana e, por fim, a formação de um patamar, onde a eficiência da biodegradação é drasticamente reduzida (Pedroti, 2007).

2.5.2. Respirimetria aeróbia: parâmetro avaliado - O₂

A medida manométrica do consumo de oxigênio é o procedimento que vem sendo empregado desde a década de 1920 para a caracterização de processos respiratórios. Respirômetros manométricos avaliam a diferença de pressão em um sistema com volume constante, enquanto o oxigênio é consumido (Jenkins, 1960; Montgomery, 1967; Tebbut & Berkun, 1976; Huang & Cheng, 1984; Andreottola *et al.*, 2005; Vähöja *et al.*, 2005; Taok *et al.*, 2007). O princípio da determinação manométrica de oxigênio se baseia no oxigênio consumido por organismos ao mesmo tempo em que é formado dióxido de carbono. Este último gás é retido por um agente absorvente e, portanto, não aparece na forma de gás livre. Conseqüentemente, a mudança da pressão é atribuída apenas ao consumo de oxigênio.

A taxa de consumo de oxigênio dá informações sobre a cinética do processo (Bernardes & Klapwijk, 1996). Dessa forma, a taxa de consumo de oxigênio ou a taxa de respiração é fator primordial na caracterização de processo de remoção e degradação de matéria biodegradável.

Para que o consumo de oxigênio seja medido manometricamente, devem-se atender as seguintes condições (Platen & Wirtz, 1999):

- A amostra (biologicamente ativa) deve estar contida em recipiente impermeável a gases.
- Deve haver um espaço de tamanho adequado preenchido com ar acima da amostra para fornecer oxigênio ilimitado para os processos de decomposição biológica.
- O recipiente de medida deve abrigar um agente para a absorção de dióxido de carbono sem que a amostra entre em contato com o mesmo.

- Um dispositivo de medida de pressão adequado deve ser acoplado ao recipiente de reação.
- O recipiente de reação deve ser mantido em local de temperatura constante e no escuro durante a medida. Mudanças de temperatura causam variações de pressão que tornam impossível a medida do consumo de oxigênio. Os raios de luz causam um rápido aumento da pressão, especialmente quando o recipiente de medida contém solo úmido. Isso provém do fato de que o solo escuro absorve a luz muito bem e, assim, esquenta.

A medida de DBO é baseada na habilidade dos microrganismos degradar substâncias orgânicas. Microrganismos degradadores consomem certa quantidade de oxigênio e produzem CO₂ como resultado. A diminuição da pressão é causada pelo consumo de oxigênio. Simultaneamente, o CO₂ formado é captado pelo agente absorvente hidróxido de sódio (NaOH, 1M). O método respirométrico mede mudanças de pressão em garrafas de DBO vedadas. A DBO é calculada automaticamente pelo sistema, através de sensores acoplados nas cabeças de medição.

É de grande importância que pesquisas sobre a biodegradação de produtos petroquímicos avancem porque reduzir e controlar a poluição têm sido um desafio para as indústrias petroquímicas, especialmente porque os impactos ambientais e os acidentes ecológicos são dois fatores ainda não totalmente dominados (Mello, 2007).

2.6. Biorremediação aplicada à área de manguezais

A biorremediação, ou seja, o emprego de recursos microbianos para a biodegradação de poluentes ambientais vem se destacando como uma tecnologia promissora e factível para a descontaminação de áreas poluídas e o tratamento de resíduos tóxicos (Baker & Herson, 1994; King *et al.*, 1998; Riser-Roberts, 1998; Alexander, 1999; Van Stempvoort & Biggar, 2008; Karhu *et al.*, 2009). Além disso, é pouco pesquisado ainda o uso de microrganismos na recuperação de áreas contaminadas por petróleo e seus derivados (biorremediação). Esta pode ser uma alternativa econômica e ecológica de extrema importância, visto que para os manguezais a melhor opção é a limpeza natural, pois deve-se evitar, totalmente, o pisoteio nas áreas de manguezal contaminadas (Cantagallo *et al.*, 2007).

A técnica de biorremediação é ainda pouco estudada com relação a manguezais impactados por óleo, apresentando algumas limitações. É, todavia, uma técnica em potencial para tratamentos de longo prazo. Como a biorremediação é feita com a adição de fertilizantes (bioestimulação) e a adição de microrganismos (bioadição), não é recomendada para manguezais eutrofizados, pois, na maioria das vezes os nutrientes não são limitantes (Michel, 2000).

Há, portanto, a necessidade de se estudar e desenvolver tecnologias limpas que visem a biorremediação de ecossistemas costeiros, principalmente os manguezais, em caso de derramamento de petróleo, visto que a intensa atividade petrolífera no Estado do Rio Grande do Norte nos coloca fortemente neste contexto.

2.7. Planejamento experimental

Profissionais de diferentes formações buscam técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos devido a necessidade crescente da otimização de produtos e processos, minimizando custos e tempo, maximizando rendimento, produtividade e qualidade de produtos.

A metodologia do planejamento fatorial, associada à análise de superfície de resposta, é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro. Embora essa metodologia tenha sido proposta por Box na década de 50, somente a partir da década de 80 com a evolução dos microcomputadores e softwares estatísticos, ela tem sido mais intensamente utilizada (Rodrigues & Iemma, 2005).

O planejamento consciente dos experimentos que devem ser realizados para determinar, e mesmo quantificar, a influência das variáveis sobre as respostas desejadas é indispensável para que resultados confiáveis sejam obtidos e para que análises estatísticas consistentes possam ser realizadas. Nesse contexto, considera-se que desenvolver processos através de tentativa e erro, conforme registros do início do século passado, foram, de fato, importantes naquele momento. No entanto, a difusão da tecnologia, bem como a competência e a responsabilidade dos pesquisadores atuais inviabiliza tais procedimentos (Rodrigues & Iemma, 2005).

Duas das vantagens de se utilizar um planejamento experimental são a redução do número de experiências ou repetições e a melhora na qualidade da informação obtida através dos resultados. Isso significa uma sensível diminuição do trabalho e, conseqüentemente, do tempo e do custo final. Naturalmente, caberá ao pesquisador investir algum tempo no planejamento do processo e no estudo das variáveis envolvidas, coletando informações na literatura, para que a definição da estratégia de realização dos ensaios possa agregar melhor qualidade aos resultados obtidos.

Em um planejamento, inicialmente, deve-se definir quais os fatores e as respostas de interesse. Os fatores, em geral, são as variáveis que se têm condições de controlar. As respostas são as variáveis de saída do sistema, nas quais se está interessado, e que serão, ou não, afetadas por modificações provocadas nos fatores. Tendo identificado todos os fatores e respostas, define-se o objetivo que se pretende alcançar com os experimentos para que se possa escolher o planejamento mais apropriado (Rodrigues & Iemma, 2005; Barros Neto *et al.*, 2003).

CAPÍTULO 3

ESTADO DA ARTE

3. Estado da Arte

Há algumas décadas, têm-se realizado estudos relacionados aos degradadores de petróleo, nos quais diversos autores em todo o mundo buscam formas de isolar, selecionar e cultivar microrganismos competentes na degradação de diversos compostos de petróleo, principalmente os recalcitrantes.

Os trabalhos pioneiros em seleção e isolamento de bactérias salinas foram realizados por Zobell (Zobell, 1946a; Morita, 1989). Em uma extensa revisão sobre a ação dos microrganismos nos hidrocarbonetos, Zobell (1946b), descreveu que muitas espécies têm a habilidade de utilizar hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia e que estes microrganismos estão amplamente distribuídos na natureza. Observou também que mais de 100 espécies de 30 gêneros microbianos foram capazes de utilizar hidrocarbonetos.

Na literatura vários autores como Gray & Thornton, 1928; Austin *et al.*, 1977; Kadri *et al.*, 1986; Shamsboom *et al.*, 1990; Al-Hadhrami *et al.*, 1995; Ururahy *et al.* 1998; Chaîneau, *et al.* 1999; Li *et al.* 2000; Barathi & Vasudevan, 2001, e Souza *et al.*, 2005 citam os seguintes gêneros de bactérias que degradam hidrocarbonetos como os mais importantes: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Bacterium*, *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium sp.*, *Hyphomicrobium*, *Klebsiella cepacia*, *Klebsiella aerogenes*, *Mycobacterium*, *Micrococcus luteus*, *Moraxella phenylpiruvica*, *Nocardia sp.*, *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas picketti*, *Proteus mirabilis*, *Vibrio sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Spirillum*, *Streptomyces sp.*, *Sphaerotilus natans*, *Sphingomonas*, *Vibrio fisheri* e *Xanthomonas maltophilia*.

Através do enriquecimento de culturas Venkateswaram & Harayama (1995) isolaram uma população bacteriana capaz de degradar petróleo bruto, verificando que 28-51% da fração saturada e 0-18% da fração aromática presentes foram biodegradadas por uma cultura mista. Contudo, quando as culturas foram colocadas puras, nenhuma delas apresentou melhor degradação do que quando estavam consorciadas. As espécies isoladas

foram *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas vesicularis*, *Pseudomonas diminuta*, *Moraxella sp.*, *Sphingobacterium sp.* e *Ochrobactrum sp.*

Souza *et al* (2005) trabalharam com seleção e isolamento de microrganismos visando utilizá-los em processo de biorremediação. As amostras poluídas por petroderivados foram coletadas na lagoa da Barra (Suape-PE), localizada próxima ao porto de Suape, em Pernambuco-Brasil, de onde foram isolados 86 microrganismos, compreendendo 40 bactérias (23 Gram-negativas e 17 Gram-positivas), 23 leveduras e 23 fungos filamentosos, os quais foram testadas quanto à potencialidade de degradar os derivados de petróleo.

Ururahy *et al.* (1998) estudaram a viabilidade técnica do tratamento biológico de borra oleosa em escala de bancada. A partir de estímulo de microrganismos nativos presentes no resíduo oleoso, concluíram que os mesmos foram capazes de crescer em meio contendo borra de óleo como única fonte de carbono e energia. Verificaram também que a eficiência da biodegradação (76,9 %) no meio contendo 5% (v/v) de resíduo foi maior do que a eficiência da biodegradação no meio contendo 10% (v/v) do mesmo. O fato é que em altas quantidades, as populações microbianas podem sofrer inibição pelo efeito tóxico do resíduo.

Ururahy (1998) estudou a biodegradação de resíduos oleosos de petróleo em meio líquido e verificou que a eficiência de biodegradação no meio contendo 5% (v/v) de resíduo foi maior que a eficiência de biodegradação no meio contendo 10% (v/v) do mesmo. O fato é que em altas quantidades, as populações microbianas podem sofrer inibição pelo efeito tóxico do resíduo.

Gallego *et al.* (2007) confirmaram experimentalmente que a biodegradação pelo consórcio de microrganismos obtidos a partir do petróleo em solo contaminado com petróleo foi mais eficiente que utilizando os microrganismos isolados. O consórcio possuía capacidade de emulsificação e degradou 100% dos alcanos, 85% de cicloalcanos, 44% de alcanos ramificados e 31-55% de compostos de enxofre e aromáticos.

Alguns autores investigaram a degradação de petróleo, por meio da respirometria, em meio sólido, outros em meio líquido, utilizando culturas puras ou mistas, com presença ou ausência de oxigênio, em temperaturas variadas, e utilizando nutrientes e/ou inóculo.

Com respeito a relação entre remoção do substrato e utilização biológica de oxigênio (respiração), importantes parâmetros como demanda biológica de oxigênio (DBO), atividade de remoção de substrato por diversos tipos de microrganismos e os parâmetros relacionados, podem ser determinados por respirometria, de acordo com o apresentado por Bernardes & Klapwijk, 1996; Chudoba *et al.*, 1989; Fleps, 1975; Huang & Cheng, 1984; Tebbutt & Berkun, 1976; Therien *et al.*, 1984 e Vernimmen *et al.* 1967.

Kataoka (2001), utilizando o respirômetro de Bartha & Pramer, avaliou a biodegradação de borra oleosa, um resíduo proveniente de refinaria de petróleo, em solo de *landfarming*. Esta mesma metodologia foi utilizada em Siviero (1999); Souza (2000); Siviero *et al.* (2000); Inazaki *et al.* (2004), Crivelaro (2005), Hencklein, (2005); Guerra & Angelis (2005); Mariano *et al.* (2005, 2006), Coneglian *et al.* (2006); Muthuswamy, *et al.* (2008) e Morais & Tauk-Tornisielo, (2009).

Vähäoja *et al.* (2005a); Vähäoja *et al.* (2005b); Sadaka *et al.* (2006); Taok *et al.* (2007) e Kaakinen *et al.* (2007) monitoram a biodegradação utilizando o método respirométrico BOD OxiTop® e provaram ser preciso e confiável para determinação da biodegradação dos diferentes tipos de óleos.

Vähäoja *et al.* (2005a) avaliaram a biodegradação de diferentes tipos de óleos em águas subterrâneas de acordo com as condições da norma 301F que possui as diretrizes para degradação de produtos químicos em um sistema de respirometria manométrico. As eficiências de degradação obtidas durante 28 dias de biodegradação foram: 13,4% para *Tall Oil* e 14,8% para *Linseed oil* e o *Creosote Oil* não foi degradado. No entanto, ao otimizar as condições dos ensaios adicionando nutrientes e microrganismos, houve um incremento nas eficiências de degradação 54,3% para *Tall Oil* e 72,9% para *Linseed oil*. O *Creosote Oil* indicou lenta degradação de 24,9%.

Vähäoja *et al.* (2005b) avaliaram a biodegradação de diferentes tipos de óleos no solo de acordo com as condições da norma 301F. As eficiências de degradação obtidas durante 28 dias de biodegradação foram: 24,9% para *Creosote Oil*, 27,8% para *Tall Oil* e 42,9% para *Linseed oil*.

Rambeloarisoa *et al.*, (1984) que estudou a degradação de óleo cru por uma população mista de bactérias isoladas da espuma da superfície do mar contaminada com hidrocarbonetos e verificou que o aumento na concentração de óleo cru decresce o

percentual de degradação para mesma quantidade de biomassa. A degradação do óleo cru foi inversamente proporcional a concentração de óleo.

McGill *et al.* (1981) relatam o incremento da atividade respiratória após adição de óleo ao solo. Neste mesmo experimento, notaram subsequente declínio na respiração após alguns dias de incubação, devido a completa decomposição de frações mais lábeis ou à disponibilidade limitada de nutrientes.

Coneglian *et al.* (2006) avaliaram a eficiência de biodegradação no solo de resíduos gerados em refinaria de petróleo. A eficiência de 36% de biodegradação foi alcançada com 4% de borra oleosa. Nos ensaios com 4, 8 e 12% de lodo biológico nos respirômetros verificou-se que não houve biodegradação nas taxas aplicadas no período de 90 dias.

Kaakinen *et al.* (2007) estudaram a biodegradabilidade de biocombustíveis, em solo de floresta, utilizando sistema OxiTop®. Foi testado a possibilidade de se aumentar a biodegradação de petróleo adicionando minerais e ajustando o pH do solo. O efeito dessas duas variáveis aumentou significativamente a biodegradação. Quando minerais foram adicionado ao solo e o pH foi ajustado de 6,1 para 8,0 houve um incremento na eficiência de biodegradação de 45,1% para 75,8%.

Muthuswamy *et al.* (2008) estudaram a biodegradação de óleo cru por linhagens de bactérias puras e consorciadas isoladas de áreas contaminadas por hidrocarbonetos. As melhores porcentagens de biodegradação foram obtidas quando utilizou-se um consórcio: 76% de degradação a 1% de óleo cru, seguidos por 72% a 3%, 63% a 6%, 52% a 9%, e 41% a 12%. Observou-se também um decréscimo na eficiência de degradação de óleo cru a mediada que concentração de petróleo aumentou.

Morais & Tauk-Tornisielo (2009) estudaram a biodegradação de resíduos oleosos utilizando consórcio de bactérias e fungos. As eficiências de biodegradação obtidas indiretamente pela evolução do CO₂, utilizando o respirômetro de Bartha & Pramer foram 26,04% no solo com 5% de resíduo, 26,56% no solo+5% resíduo + inóculo ($9,6 \times 10^7$ UFC/g de bactérias e 4×10^5 UFC/g fungo), 27,61% no solo+resíduo+inóculo+fertilizante (C:N na proporção de 30:1). A adição de inóculo e nutrientes não contribuíram para aumentar a biodegradação do resíduo oleoso estudado.

CAPÍTULO 4

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4. Metodologia experimental

O trabalho foi realizado com amostras de solos coletadas em horizontes superficiais do manguezal do Estuário do Rio Potengi (RN).

4.1. Coleta de amostras de sedimento de mangue do Rio Potengi – RN

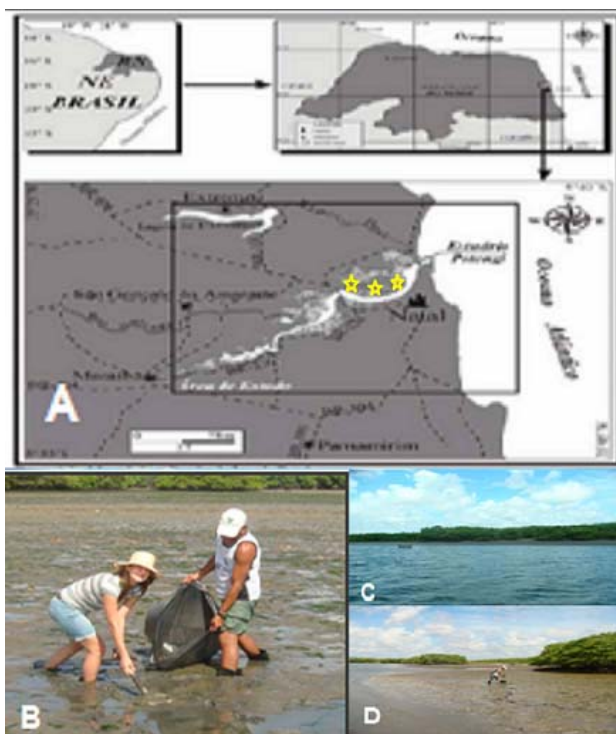


Figura3. A) Mapa da América do Sul-Brasil-RN indicando o estuário do Rio Potengi/RN B) Coleta de sedimento de mangue no estuário do Rio Potengi, município de Natal, RN C e D) Manguezal.

A região escolhida para coleta de sedimento possui intensa atuação antrópica, sendo causa de sérios danos ambientais, pondo em risco a sustentabilidade do seu potencial ecológico e social (Sindern, 2007), conforme Figura 3. O estuário do Rio Potengi abriga a zona portuária de Natal e um terminal petrolífero, concentrando, desta forma, operações importantes de transporte de petróleo (Frazão, 2003). Portanto, este importante ecossistema marinho está susceptível a contaminação por petróleo ocasionado por um possível derramamento acidental (Costa, 2007).

Foram coletadas 5 subamostras dos sedimentos superficiais de três pontos de coleta (região aeróbia), as quais foram misturadas e homogeneizadas no próprio local, de onde foi retirada uma única amostra final de aproximadamente 5 kg (Da Costa, 2004). Esta amostra foi mantida sob refrigeração e transportada até o laboratório de Engenharia Bioquímica da UFRN para seleção e isolamento de microrganismos degradadores de petróleo, ensaios de respirometria e determinação do carbono orgânico total.

4.2. Caracterização Físico-química, biológica e granulométrica do solo

Os parâmetros determinados na caracterização físico-química, microbiológica e granulométrica do solo foram avaliados para determinar se processo de biodegradação ocorreu sob condições favoráveis.

4.2.1. pH

Para determinação do pH do solo, colocaram-se em béquer de 100 mL, 5 g de solo pesado em balança analítica e com auxílio de proveta de capacidade 100 mL, adicionaram-se 100 mL de água. Agitou-se a amostra com bastão de vidro e deixou-se em repouso por uma hora (Silva *et al.*, 1998). Decorrido este intervalo de tempo, agitou-se a amostra com bastão de vidro e mergulhou-se o eletrodo na suspensão homogeneizada procedendo-se a leitura do pH por meio de potenciômetro digital (marca WTW).

4.2.2. Umidade

Na determinação do teor de umidade do solo utilizou-se a metodologia descrita no Manual de Métodos de Análise de Solo (Silva *et al.*, 1998). O teor de umidade foi obtido pela Equação (5):

$$\text{Umidade Total (\%)} = \left(\frac{m_{\text{soloúmido}} - m_{\text{soloseco}}}{m_{\text{soloúmido}}} \right) \times 100 \quad (5)$$

4.2.3. Capacidade de retenção de água

Para determinação da capacidade de retenção de água, o solo previamente seco ao ar livre foi colocado em coluna de 15cm de diâmetro e completamente umedecido. Sua superfície foi coberta com um plástico para evitar evaporação. Após 24h calculou-se a umidade do solo presente no 1/3 médio da coluna (Bernardo *et al.*, 2008).

4.2.4. Granulometria e densidade

A granulometria do solo foi determinada com a finalidade de identificar o tipo de solo, se argiloso ou arenoso. A distribuição granulométrica do solo, assim como a densidade foram determinados no Laboratório de Mecânica dos solos do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. A classificação do solo foi feita seguindo-se a norma ABNT NBR 7181.

4.2.5. Carbono orgânico

Os conteúdos de carbono foram obtidos através de análises de COT (carbono orgânico total) por combustão a alta temperatura com detector infravermelho não dispersivo (NDIR), utilizando o sistema TOC-VCPH da marca Shimadzu (Columbia, MD, USA).

A determinação do COT foi realizada em duplicata, em 200 mg de sedimento de mangue, por oxidação a 900°C (Segnini *et al.*, 2008). Para os cálculos foi feita uma curva padrão dextrose PA. As medidas foram realizadas no analisador COT citado acima, acoplado a uma unidade de combustão para amostras sólidas (modelo SSM-5000A, Shimadzu).

4.2.6. Matéria orgânica

O percentual de matéria orgânica foi calculado multiplicando-se o resultado do carbono orgânico por 1,724. Este fator é utilizado em virtude de se admitir que na composição média do húmus, o Carbono orgânico participa com 58% (Silva *et al.*, 1998).

4.2.7. Contagem microbiana

A contagem microbiana foi realizada a fim de avaliar a presença e a densidade de bactérias heterotróficas que ocorrem naturalmente no solo de mangue do Potengi/RN.

A avaliação da densidade total de bactérias heterotróficas totais foi feita pela técnica “pour plate”. Uma amostra inicial de solo foi adicionada a 100 mL de uma solução salina (0,85% NaCl) e colocada sob agitação em *shaker* a 150 rpm e 30°C por 30 minutos para a extração das bactérias presentes. Em seguida, com o sobrenadante foram preparadas diluições em solução salina (0,85% NaCl) variando de 10^{-1} a 10^{-7} e, a partir de cada diluição, alíquotas de 1 mL foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura *marine agar*. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 30°C durante 48 horas e após este período, as colônias foram contadas e os resultados expressos em UFC (unidade formadora de colônia)/g de solo (Standard Methods, 1999).

4.3. Enriquecimento, isolamento e identificação preliminar de microrganismos degradadores de petróleo a partir de amostras de campo

Os microrganismos foram isolados em meio mineral mínimo contendo (g/L): K_2HPO_4 , 1,6; KH_2PO_4 , 0,2; $(NH_4)_2SO_4$, 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01; NaCl, 19,5 (modificado de 0,1 para 19,5 por ser o mesmo valor utilizado no meio de cultivo *marine agar*); $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,02 e preparado conforme descrito por Pellizari (1995) e posteriormente, modificado por Pellizari (2000), isto é, os reagentes foram adicionados a 1 litro de água destilada, homogeneizados e autoclavados a 121°C por 15 minutos. Antes da autoclavagem, o pH final foi ajustado para os valores dos locais de coleta. Após a autoclavagem do meio mineral, o petróleo (livre de microrganismos) foi adicionado como única fonte de carbono e energia, no percentual de 5% (v/v) (Ururahy *et al.*, 1998). A técnica de enriquecimento de culturas, muito difundida na literatura científica (Costa, 2003a, 2003b; Alexander, 1999; Pellizari, 1995), foi empregada nesse trabalho, para a seleção e isolamento de microrganismos. O protocolo experimental de isolamento de microrganismos foi como segue: 10 gramas de material coletado em campo foram

colocados em Erlenmeyer de 500 mL e diluídos em solução salina (NaCl 0,85%) completando 100mL de solução. Após cerca de meia hora de agitação branda, intercalada com intervalos de repouso (5 minutos), 10 mL do sobrenadante desta solução foram adicionados a 90 mL do meio mineral descrito acima. O Erlenmeyer foi mantido em plataforma de agitação (150 rpm, 30°C) até atingir bom crescimento microbiano. Após este período, 10 mL foram transferidos para um meio novo, a cada sete dias, três vezes consecutivas (Costa, 2007). O próximo passo foi a preparação de diluições seriadas e subsequente plaqueamento, ou seja, alíquotas de 100 µL de cada diluição foram espalhadas com alça de Drigalsky na superfície de placas de Petri, contendo o meio de cultivo *marine agar* (20 g/ L). As placas foram incubadas a 30°C e, após 24h de cultivo, foram isoladas as colônias. O isolados foram purificados em estrias em placas de Petri contendo o meio sólido *marine agar* enriquecido com 1% de petróleo incubados a 30°C. Passado o período de incubação as colônias foram transferidas para tubos de ensaios contendo os referidos meios sólidos. Para a identificação preliminar foi realizada uma coloração de Gram e checagem da pureza das colônias ao microscópio óptico. Os isolados foram preservados sob congelamento, com crioprotetor glicerol (caldo nutriente + glicerol 10%, v/v + 0,5% petróleo (Costa, 2005).

4.3.1. Análise de Gram

Os métodos de coloração são muito importantes em bacteriologia, pois facilitam a visualização das bactérias ao microscópio óptico. A diferenciação das bactérias neste método decorre da capacidade da bactéria de resistir a remoção do complexo corante iodopararosanilina por uma solução de descorante orgânico (solução de álcool etílico). O complexo corante iodopararosanilina é formado a partir da reação do corante cristal violeta com o iodo da solução de lugol utilizada como mordente do método. As bactérias que retêm o complexo corante (reação positiva) se apresentam coradas em roxo (cor do complexo corante cristal violeta-iodo) são chamadas de “Gram positivas”. As que não conseguem reter o complexo corante, reação negativa, se apresentam coradas em rosa (cor do Contra-Corante = fucsina de Ziehl-Neelsen) são denominadas de “Gram negativas” (Martins *et al.*2001).

Para realização do método é necessário fazer um esfregaço bacteriano para posterior coloração. Na preparação do esfregaço colocou-se 2 a 3 gotas de água destilada estéril em uma lâmina de vidro de microscopia, homogeneizou a colônia com auxílio de uma alça níquel-cromo estéril na água com movimentos elípticos e deixou-se o esfregaço secar a temperatura ambiente. Após secagem fixou-se o esfregaço à lâmina passando o verso desta por 3-5 vezes sobre a chama do bico de Bunsen. Para coloração cobriu-se o esfregaço com a Solução de Cristal Violeta por 1 minuto, Solução de Lugol (iodo + iodeto de potássio) por 1 minuto, solução Descolorante (álcool absoluto) por alguns segundos e por fim cobriu-se o esfregaço com a Solução de Contra-Corante (fucsina) por 30 segundos. Sempre lavando o esfregaço entre uma solução e outra. Após secagem da lâmina observou-se ao microscópio óptico com objetiva de imersão 100x (Martins *et al.*, 2001).

4.3.2. Análise de KOH

Como existem muitos fatores que influenciam o resultado do método de Gram (tempo e adequação das condições culturais da cultura bacteriana; a habilidade e experiência de quem o executa) sempre que possível deverá ser feito um teste complementar que é o teste do KOH. Neste teste é preparada uma suspensão da bactéria em uma solução de KOH a 3% que, em muitas situações, possui a capacidade de romper os envoltórios celulares de bactérias Gram negativas, não atuando sobre bactérias Gram positivas. A ruptura dos envoltórios celulares libera o DNA bacteriano que altera a viscosidade e outras características da suspensão bacteriana.

O teste de KOH foi realizado para auxiliar na confirmação do teste de Gram (Buck, 1982). Para a realização desse teste colocou-se 3 a 4 gotas de solução de KOH a 3% em uma lâmina de vidro de microscopia. Homogeneizou a colônia com auxílio de uma alça níquel-cromo estéril na solução de KOH da lâmina e esperou-se por cerca de 30 segundos. Após esse período tocou-se a suspensão com a alça de níquel-cromo e ergueu-se a alça lentamente até 2 a 3 cm da lâmina.

Ao observar a formação de “fios viscosos” entre a alça e a lâmina indica que o teste foi positivo, ou seja indica a possibilidade da bactéria ser Gram negativa.

4.4. Formação de um consórcio bacteriano a partir das linhagens obtidas no enriquecimento de culturas

Das treze linhagens obtidas pelo enriquecimento de culturas, dez apresentaram bom crescimento em placas de Petri e foram selecionadas para formação do consórcio bacteriano. Tais isolados foram diluídos em tampão fosfato salino (pH 7,6) e centrifugadas a 16000xg por 15 minutos (Centrífuga Eppendorf 5415D). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado com a mesma solução tampão e padronizado a densidade óptica (DO) 1 à 615nm no espectrofotômetro (Genesys 10uv, Thermo Scientific) (Jacques *et al.*, 2008). Foi retirado 1mL de cada cepa e adicionado em um erlenmeyer com 89 mL de meio mineral mínimo e 1mL de petróleo (totalizando 10 mL, ou seja, 10% de inóculo). O Erlenmeyer foi mantido em plataforma de agitação (150 rpm, 30°C) por 48h e, em seguida, foi semeado em placas de Petri e incubados em estufa 30°C. Este consórcio foi utilizado como inóculo em ensaios de biodegradação.

4.5. Estudo cinético do crescimento do consórcio bacteriano obtido pelo enriquecimento de culturas

4.5.1. Microrganismo

Neste estudo cinético utilizou-se o consórcio bacteriano isolado do estuário do Rio Potengi/RN conforme descrito por Jacques *et al.*, (2008) e citado nos itens 4.3 e 4.4.

4.5.2. Meio de cultivo utilizado no ensaio em incubador rotativo

O meio de cultivo utilizado foi o conforme descrito no item 4.3.

4.5.3. Condições de cultivo

Frascos Erlenmeyer com capacidade para 250 mL, contendo 89 mL de meio mineral mínimo e 1 mL de petróleo foram lacrados com rodilhões de algodão e gases e esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 min. Após a esterilização os frascos Erlenmeyer foram levados à câmara de fluxo laminar, onde 10 mL de inóculo padronizado a densidade óptica (DO) 1 à 615nm foram transferidos assepticamente para os frascos contendo o meio de cultura. Os frascos foram colocados em *shaker*, submetidos a uma agitação de 150 rpm a 30°C. Amostras foram retiradas em intervalos de 4h para análise. As análises realizadas foram o acompanhamento do crescimento celular e da tensão superficial até completar 52 h.

4.5.4. Métodos de análise

4.5.4.1. Determinação da concentração celular (X)

Para determinação da concentração celular adotou-se o método de massa seca (Shim *et al.*, 2005). Para massa seca 2 mL de amostra, em duplicata, foram centrifugados (Centrífuga Eppendorf 5415D) 16.100g por 15min. As células foram colocadas em estufa Nova ética (Modelo MPS 11) a 80°C por 24h e posteriormente pesadas. Avaliou-se também a evolução da densidade ótica onde as amostras do *shaker* foram submetidas à densidade óptica (DO) 1 à 615nm, utilizando o espectrofotômetro (Genesys 10uv, Thermo Scientific).

4.5.4.2. Determinação da tensão superficial

A medida da tensão superficial é uma ferramenta comum e um método indireto para monitorar a produção de biossurfactantes. À medida que o microrganismo cresce, ele sintetiza o biossurfactante e este metabólito é lançado ao caldo, reduzindo a tensão superficial.

A medição da tensão superficial foi realizada no Núcleo de Pesquisa em Petróleo e Gás (NUPEG/UFRN) utilizando o tensiômetro modelo K100MK2, pelo método da placa,

conforme Figura 4. As análises foram realizadas com o sobrenadante obtido após a centrifugação da amostra bruta, a uma temperatura de aproximadamente 25°C.



Figura 4. Tensiômetro modelo K100MK2.

4.5.4.3. Velocidade específica de crescimento

Para uma boa avaliação de um processo de cultivo é necessário determinar a velocidade específica de crescimento que exprime a velocidade de crescimento da unidade por massa celular (X) conforme se definem na Equação (6):

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (6)$$

A determinação do valor de μ_x , requer a determinação dos valores da derivada dx/dt , em função do tempo, sendo o cálculo da velocidade específica de crescimento do consórcio bacteriano realizado pelo método proposto por LE DUY; ZAJIC (Schmidell *et al.*, 2001).

A detecção da fase de crescimento exponencial foi realizada traçando-se um gráfico ($\ln X$) vs. (t) para diferentes limites iniciais e finais de tempo, determinando-se, através do melhor coeficiente de correlação, o início e a duração da fase exponencial de crescimento; o coeficiente angular da melhor correlação forneceu o valor de velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$).

4.6. Ensaios de biodegradabilidade do petróleo em escala de laboratório

Para estimar a biodegradabilidade de petróleo em solo de mangue foram realizadas duas cinéticas de degradação:

- A primeira cinética de degradação foi realizada utilizando o sistema Oxitop-C com duração de 28 dias, de acordo com a norma OECD 301f. A biodegradabilidade foi estimada a partir do consumo de oxigênio medido pelo sistema.
- A segunda cinética de degradação foi realizada pelo método da condutivimetria com duração de 60 dias, de acordo com a norma CETESB (1990). A biodegradabilidade foi estimada a partir da produção de CO₂ medido pelo sistema.

4.6.1. Ensaios de respirometria utilizando o sistema de medida Oxitop-C

A análise da biodegradabilidade do petróleo de forma qualitativa em solo pode ser facilmente realizada utilizando o sistema OxiTop®-C (WTW, Weilheim, Germany) que é um sistema semi-automatizado que permite avaliar a evolução de produção de CO₂ e/ou o consumo de O₂ durante o processo de biodegradação. Este sistema possui sensores que detectam variação (diminuição) de pressão em garrafas hermeticamente fechadas mantidas à temperatura constante, permitindo medições precisas e simultâneas de CO₂ e/ou O₂ em tempo real (Kaakinen *et al.*, 2007)

O sistema de respirometria Oxitop-C fornece medidas de consumo de oxigênio a cada 112 minutos, totalizando 360 valores no decorrer de 28 dias de degradação. A Figura. 5 representa a foto do sistema: são 6 garrafas e 6 cabeças de medição que ficam numa bandeja que possui agitação magnética. O sistema é limitado porque não se pode fazer muitos ensaios de uma só vez. Uma garrafa foi utilizada para o branco, outra para o controle e as restantes para fazer duplicata de 2 variáveis.



Figura 5 .Sistema Oxitop®-C.

Foram realizados ensaios no sentido de otimizar a biodegradação, utilizando microrganismos do consórcio bacteriano. Os degradadores de petróleo selecionados pela técnica de enriquecimento de culturas foram utilizados como inóculo, no microcosmo contaminado com 5% de petróleo, para se avaliar o efeito do consórcio na biodegradação de petróleo nessa condição. A padronização do inóculo foi avaliada por densidade óptica, a 615nm, com DO=1 e o inóculo final correspondeu a 10% da massa total de sedimento do microcosmo (Pellizari, 1995).

A eficiência da biodegradação foi avaliada de acordo com as condições da OECD 301F. O aparato utilizado para medir a biodegradabilidade do óleo cru foi o sistema OxiTop® Control (WTW). Esse ensaio da biodegradação é baseado em um sistema respirométrico automático que possui medições de pressão em garrafas fechadas, sob temperatura constante ($30 \pm 0,2$ ° C). A medição de DBO é baseada na habilidade dos microrganismos degradarem substâncias orgânicas. Microrganismos degradadores consomem certa quantidade de oxigênio, produzindo CO₂ como resultado. A diminuição da pressão é causada pelo consumo de oxigênio. Simultaneamente o dióxido de carbono é formado e ligado a um agente de absorção NaOH 1M (50mL). O método respirométrico mede mudanças na pressão em um recipiente fechado. O valor de DBO é calculado automaticamente pelo sistema OxiTop® Control (WTW) aplicando a Equação(7):

$$DBO \text{ [mgL}^{-1}\text{]} = \frac{M(O_2)}{RT_m} \cdot \left[\frac{V_{\text{tot}} - V_1}{V_1} + \frac{\alpha T_m}{T_0} \right] \cdot \Delta p(O_2) \quad (7)$$

Onde R é a constante do gás ($83.1441 \text{ hpa mol}^{-1} \text{ k}^{-1}$), T_m é a temperatura de medição, T_0 é $273, 5 \text{ K}$, V_{tot} é o volume da garrafa, M é a molaridade o oxigênio, V_l é o volume da fase líquida, α é o coeficiente de absorção Busen ($0,03103$), e $\Delta p (\text{O}_2)$ é a mudança na pressão parcial de oxigênio (Kuokkanem *et al.* 2001; Vähöja *et al.* 2005a, b).

As medições foram realizadas conforme descrito nas instruções do WTW (Platen & Wirtz, 1999), bem como os estudos de (Vähöja *et al.* 2005b; Kaakinem *et al.* 2007, Taok, 2007). Os solos foram homogeneizados e apresentavam estrutura uniforme, sem pedras, folhas ou raízes.

Os testes de biodegradação foram realizados em duplicata com garrafas de 1000 mL contendo 50g de sedimento de mangue homogeneizado não contaminado (Taok, 2007), e outras contendo solo artificialmente contaminado com petróleo em concentrações crescentes de 1%, 3%, 5%, 10% e 15%, onde o peso da amostra final foi de 50g para todos os ensaios. A fim de absorver a quantidade de CO_2 liberada foi colocado um béquer com 50 mL de NaOH 1M. As garrafas foram fechadas e colocadas num gabinete de incubação a uma temperatura constante ($30^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$) por 28 dias. Um branco contendo apenas solo foi utilizado para se obter a respiração do solo.

A eficiência de biodegradação do óleo foi calculada utilizando a equação descrita em trabalhos anteriores (Kuokkanem *et al.* 2001; Vähöja *et al.* 2005). O volume de gás livre foi calculado pela Equação (8):

$$V_{\text{gl}} = V_{\text{Garrafa}} - V_{\text{Béquer}} - V_{\text{NaOH}} - V_{\text{Solo}} \quad (8)$$

Onde V_{garrafa} é o volume da garrafa (1L), $V_{\text{béquer}}$ é o volume do béquer (0,05L), V_{NaOH} é o volume da solução de NaOH (0,05L) e V_{solo} é o volume do solo usado (0,05L).

A DBO[gg^{-1}] do óleo pode ser calculada usando a Equação (9):

$$\text{DBO} [\text{gg}^{-1}] = \frac{\Delta m - \Delta m_{\text{solo}}}{m_{\text{amostra}}} \quad (9)$$

Onde Δm é a quantidade de oxigênio consumido (g), Δm_{solo} é a quantidade de respiração dos microrganismos do solo e m_{amostra} é a massa de óleo aplicada (g).

A eficiência de degradação do óleo, em porcentagem foi calculada pela Equação (10):

$$\text{Grau de biodegradação} = \frac{\text{DBO}}{\text{COT}} \cdot 100\% \quad (10)$$

Onde COT é calculado pelo conteúdo de carbono do óleo (gg^{-1})

Os conteúdos de carbono foram obtidos através de análises de COT (carbono orgânico total) por combustão a alta temperatura com detector infravermelho não dispersivo (NDIR), utilizando o sistema TOC-VCPH da marca Shimadzu (Columbia, MD, USA).

A determinação do COT foi realizada em duplicata, em 200 mg de sedimento de mangue, por oxidação a 900°C (Segnini *et al.*, 2008). Para os cálculos foi feita uma curva padrão de dextrose PA. As medidas foram realizadas no analisador COT citado acima, acoplado a uma unidade de combustão para amostras sólidas (modelo SSM-5000A, Shimadzu).

4.6.2. Ensaios de respirometria utilizando o método da condutivimetria

A análise de biodegradabilidade de petróleo também foi avaliada utilizando o método condutimétrico, desenvolvido por Rodella & Saboya, (1995). Nesse método a biodegradabilidade de petróleo foi estimada indiretamente pela produção de CO_2 liberado do solo. O método se baseia no decréscimo da condutividade elétrica de uma solução alcalina a medida que o CO_2 é absorvido, já que o íon OH^- reage com o CO_2 para produzir CO_3^{-2} . O fenômeno ocorre porque a mobilidade do íon hidróxido é bem mais elevada do que a da maioria dos ânions, inclusive do íon carbonato (Rodella & Saboya, 1995).

Para avaliação de CO₂ produzido pela atividade microbológica 100g de solo + petróleo e/ou inóculo em diferentes concentrações foram colocado em potes de vidro com capacidade de 2,5L. Também foram colocados béqueres com 50 mL de solução NaOH de concentração exatamente conhecida 1M, para absorver o CO₂ do solo pelo processo de retenção passiva.

A Figura 6 ilustra o aparato usado para os ensaios de respirometria utilizando o método condutimétrico.



Figura. 6. Aparato para os ensaios de respirometria utilizando o método condutimétrico.

O CO₂ liberado foi estimado a partir de uma curva de calibração. Neste método a calibração foi efetuada preparando-se soluções padrões de NaOH e Na₂CO₃ obtendo-se concentrações equivalentes em cargas de ânions. Cada solução pode ser relacionada à uma hipotética quantidade de CO₂ que, se efetivamente absorvida, resultaria nas mesmas concentrações de CO₃⁻².

As medidas de condutividade elétrica foram efetuadas em condutivímetro marca WTW, modelo TetraCon® 325.

A quantidade em miligramas de CO₂ absorvido (mg) foi calculada pela Equação (11):

$$M = \frac{V \times M \times 22 \times (CE_1 - CE_x)}{(CE_1 - CE_2)} \quad (11)$$

Onde V e M são respectivamente o volume de solução de NaOH empregada na absorção de CO₂ e sua concentração em mol L⁻¹; CE_x é a condutividade elétrica da amostra; CE₁ é a medida da condutividade elétrica da solução padrão de NaOH; e CE₂ é a medida da condutividade elétrica da solução padrão de Na₂CO₃.

A produção de gás carbônico foi utilizada para estimar a quantidade total de hidrocarbonetos mineralizados. Assumindo que 50 % do carbono biodegradado é convertido à CO₂ e a outra metade é adicionada ao solo como húmus e biomassa (CETESB, 1990), a quantidade de carbono biodegradado pode ser expresso usando-se a Equação (12):

$$\text{Quantidade total de carbono biodegradado } (\mu\text{mol}) = 2 \cdot \text{CO}_2 \text{ produzido } (\mu\text{mol}) \quad (12)$$

Nos ensaios foi utilizado um controle (solo *in natura*). Para se obter a curva representativa da degradação apenas do petróleo foi necessário subtrair o CO₂ produzido dos ensaios com petróleo e/ou inóculo pelo controle (Minhoni *et al.*, 1990).

Assim, a eficiência de biodegradação (EB) foi calculada pela Equação (13):

$$\text{EB\%} = \frac{\text{Quantidade total de carbono biodegradado } (\mu\text{mol}) \cdot 100}{\text{Quantidade de carbono orgânico inicial no solo } (\mu\text{mol})} \quad (13)$$

Os conteúdos de carbono foram obtidos através de análises de COT conforme descrito no Item 4.2.5.

No presente trabalho, utilizando essa metodologia, foram realizados ensaios com concentrações crescentes de petróleo (1%, 3%, 6,5%, 10% e 12%), a fim de avaliar a eficiência da flora bacteriana autóctone do solo na degradação de petróleo.

Também foram realizados ensaios para avaliar a influência de concentrações crescentes de inóculo e petróleo, na eficiência da biodegradação. A avaliação foi realizada através de experimento respirométrico delineado a partir de um planejamento fatorial 2² com triplicata no ponto central onde os fatores estudados foram concentração de petróleo e quantidade de inóculo. A resposta é a eficiência de biodegradação de petróleo.

A adição de ponto central permite avaliar a variância do erro experimental quando experimentos não replicados nos pontos fatoriais forem realizados. Ensaios no ponto central podem fornecer informações muito úteis sobre o comportamento das respostas entre os

níveis inicialmente atribuídos aos fatores, além de evidenciar a qualidade da repetibilidade do processo. A situação ideal é aquela na qual podemos repetir ensaios nos pontos fatoriais e, além disso, realizar alguns ensaios no ponto central. No entanto, isto em geral não é possível em ensaios com alto custo e grande demanda de equipamentos e/ou tempo (Rodrigues & Iemma, 2005).

Esse planejamento resultou em sete condições experimentais conforme Tabela 1.

Tabela 1. Matriz do Planejamento fatorial 2² com triplicata no ponto central.

Ensaio	Petróleo (%)	Inóculo(%)
1 (--)	1	5
2 (+ -)	12	5
3 (- +)	1	20
4 (++)	12	20
5 (00)	6,5	12,5
6 (00)	6,5	12,5
7 (00)	6,5	12,5

No planejamento experimental foi testado a possibilidade de otimizar o processo de biodegradação com adição de diferentes concentrações de inóculo e petróleo. Os degradadores de petróleo selecionados pela técnica de enriquecimento de culturas foram utilizados, para se avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de microrganismos na degradação de petróleo em concentrações crescentes de petróleo (1%, 6,5% e 12%). A padronização do inóculo foi feita por densidade ótica, a 615nm, com DO=1 e o inóculo final correspondeu a 10% da massa total de sedimento do microcosmo (Pellizari, 1995).

CAPÍTULO 5
RESULTADOS
E DISCUSSÃO

5. Resultados e Discussão

5.1. Coleta de Amostras de Sedimento de Mangue do Rio Potengi – RN.

No estuário do Rio Potengi os três pontos de coleta selecionados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Pontos de coleta no Estuário do Rio Potengi/RN

PONTO	LOCAL	LATITUDE	LONGITUDE
1	Jusante do canal do baldo	254.915	9.360.258
2	Em frente ao dique da Base Naval	253.757	9.359.787
3	Bairro das Quintas	252.729	9.359.935

Os solos coletados desses pontos foram homogeneizados formando uma única amostra final representativa do estuário. Os parâmetros determinados na caracterização física, química e microbiológica do solo foram pH, umidade, capacidade de retenção de água, granulometria, carbono orgânico, matéria orgânica, e quantidade de bactérias heterotróficas. Estes parâmetros foram avaliados para determinar se o processo de biodegradação ocorreu sob condições favoráveis. Os resultados obtidos na caracterização física, química e microbiológica do solo são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Análises físico-química e granulométrica do solo.

Parâmetro	Resultado	Unidade
Silte	83,53	%
Argila	11	%
Areia	2,47	%
Capacidade de campo	50	%
Umidade	52	%
pH	7,57	-
Densidade	2,615	g/cm ³

O solo de mangue do estuário do Rio Potengi/RN é argiloso-siltoso, ligeiramente básico e possui umidade e capacidade de campo que estão dentro de uma faixa efetiva para que o processo de biodegradação ocorra de forma favorável (EPA, 1994).

5.2. Enriquecimento e Isolamento de Microrganismos Degradores de Petróleo a Partir de Amostras de Campo

No processo de enriquecimento de culturas, apenas linhagens de bactérias foram selecionadas conforme apresentada na Figura 7.



Figura7. Linhagens de bactérias obtidas após enriquecimento de culturas do estuários do Rio Potengi/RN

Nesta etapa de isolamento de microrganismos na presença de petróleo como fonte de carbono e energia, a biodegradação de óleo foi observada através do aumento de formação de biomassa, emulsificação e solubilização do petróleo (Figura 8). Após o enriquecimento de culturas obteve-se uma população de $6,1 \times 10^6$ UFC/g, ou seja, houve

um incremento de uma ordem de grandeza em relação à população inicial que era de $1,8 \times 10^5$ UFC/g.

Nos controles empregados não houve crescimento bacteriano, portanto não foram observados os efeitos descritos acima.

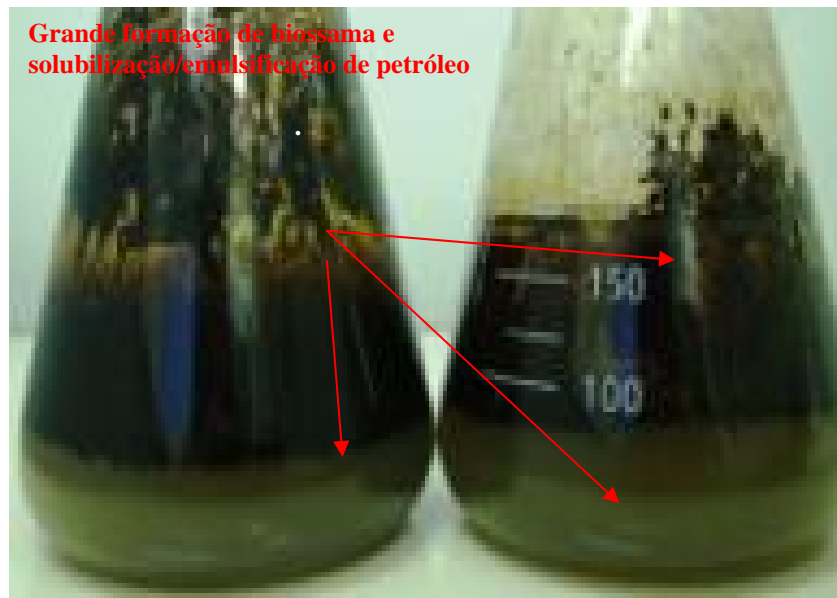


Figura 8. Transformação de petróleo por microrganismos do solo de mangue, durante a fase de enriquecimento de culturas.

Quanto à seleção de degradadores, foram isoladas 13 linhagens de bactérias do estuário do Rio Potengi através da técnica de enriquecimento de cultura. Apesar do estuário do Rio Potengi ser um ambiente impactado pela ação antrópica (Sidern, 2007), ele não possui histórico de contaminação por petróleo descrito na literatura.

Essas linhagens foram testadas em ensaios de biodegradação para averiguar a competência em degradar compostos de petróleo.

A Tabela 4 mostra a relação das linhagens obtidas com suas respectivas características morfológicas, tintoriais (Gram) e teste do KOH. As treze linhagens isoladas possuem características diversificadas em relação à cor, tamanho e forma. Em relação ao teste de Gram foram observadas tanto cocos como bacilos, sendo 7 linhagens Gram

positivas e 6 Gram negativas. O teste de KOH complementou efetivamente o Teste de Gram, confirmando os resultados obtidos.

Tabela 4. Bactérias degradadoras de petróleo, selecionadas pela técnica de enriquecimento de culturas, a partir de sedimento de mangue do estuário do Rio Potengi, município de Natal, RN.

	GRAM	KOH	CARACTERIZAÇÃO COLONIAL	MORFOLOGIA MICROSCÓPICA
PT*1	+	-	Colônias médias, amarelo gema, regulares, esféricas, brilhosas e com relevo.	Cocos muito pequenos, delgados, isolados e sem arranjo característico.
PT2	+	-	Colônias médias, rosa, regulares, esféricas, brilhosas e com relevo.	Cocos pequenos, isolados ou unidos, formando diplococos.
PT3	+	-	Colônias médias, bege, regulares, esféricas, brilhosa e com relevo.	Bastonetes e Cocos bem pequenos, sem arranjo característico.
PT4	-	+	Colônias médias, cinza, regulares, esféricas, opacas e com relevo.	Bastonetes pequenos.
PT5	-	+	Colônias pequenas, brancas, regulares, esféricas, opacas e com relevo.	Coco-bacilos.
PT6	+	-	Colônias médias, bege, irregulares, brilhosas e com relevo.	Coco-bacilos.
PT7	-	+	Colônias médias, bege, com borda transparentes, regulares, esféricas, brilhosas e com relevo.	Cocos.
PT8	+	-	Colônias pequenas, bege, regulares, esféricas, brilhosas e com relevo.	Coco-bacilos
PT9	-	+	Colônias grandes, marrom, , irregulares, opacas e com relevo.	Cocos pequenos.
PT10	-	+	Colônias médias, areia, regulares, esféricas, brilhosas e com relevo.	Cocos pequenos.
PT11	-	+	Colônias médias, bege, regulares, esféricas, brilhosas e com relevo.	Cocos isolados e com arranjo em fileiras.
PT12	+	-	Colônias médias, bege, enrugadas, irregulares, opacas e com relevo.	Cocos.
PT13	+	-	Colônias médias, amarelo claro, irregular, brilhosa e com relevo.	Bastonetes delgados.

*PT= Potengi/RN.

Similarmente a esse estudo Souza *et al* (2005) também trabalharam com seleção e isolamento de microrganismos visando utilizá-los em processo de biorremediação (Capítulo do Estado da Arte – Página 32).

5.3. Estudo cinético do desenvolvimento do consórcio obtido pelo enriquecimento de culturas

As linhagens isoladas pelo enriquecimento de culturas foram utilizadas para formação de um consórcio bacteriano com objetivo de utilizá-las nos ensaios de biodegradação. Há na literatura, diversos estudos que comprovam que a utilização de consórcio de microrganismos é mais eficiente que utilizar culturas puras. Muitos trabalhos quanto a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo demonstraram o uso de consórcio de microrganismos (Sugiura, 1997; Balba, *et al.*, 1998, Lazar *et al.*, 1999; Jørgensen *et al.*; 2000; Li *et al.*, 2000; Mishra *et al.*, 2001; Vasudevan & Rajaram, 2001; Kataoka, 2001; Gallego *et al.*, 2007; Muthuswamy, 2008), pois a capacidade biodegradativa deste é maior quantitativamente e qualitativamente quando comparado com a cultura pura. Finalmente, sendo o petróleo e seus resíduos compostos tóxicos poluentes que possuem moléculas de difícil degradação, a utilização de culturas mistas permite uma sucessão de ataques aos mesmos, proporcionando no final uma completa degradação do poluente. Diante disso foram selecionados e isolados microrganismos para formação do consórcio bacteriano e utilização destes nos ensaios de biodegradação.

O estudo cinético do consórcio bacteriano isolado do solo de mangue, do estuário do Rio Potengi foi realizado com objetivo de avaliar a cinética do desenvolvimento desse consórcio. Para realizar a cinética realizou-se um ensaio, em *shaker* (150 rpm e 30°C), com Erlenmeyer 250 mL contendo (meio mineral mínimo + 1% de petróleo + 10% de inóculo) onde o petróleo foi à única fonte de carbono e energia.

5.3.1. Determinação da concentração celular (X)

A determinação da concentração celular avaliou o comportamento da curva de crescimento e o fim de sua fase exponencial.

A Figura 9 mostra a evolução da concentração celular do consórcio bacteriano durante o cultivo de 32 h, bem como as medidas da densidade óptica a cada 4 h de cultivo. Nota-se que o comportamento da densidade óptica foi consistente com o comportamento da

concentração celular. É interessante notar também a ausência da fase lag, sugerindo uma boa aclimação do consórcio em meio mineral mínimo com petróleo 1% v/v. O consórcio atingiu a maior concentração celular de aproximadamente ($X_{máx}$) 2,55 g/L, em 16 h de cultivo.

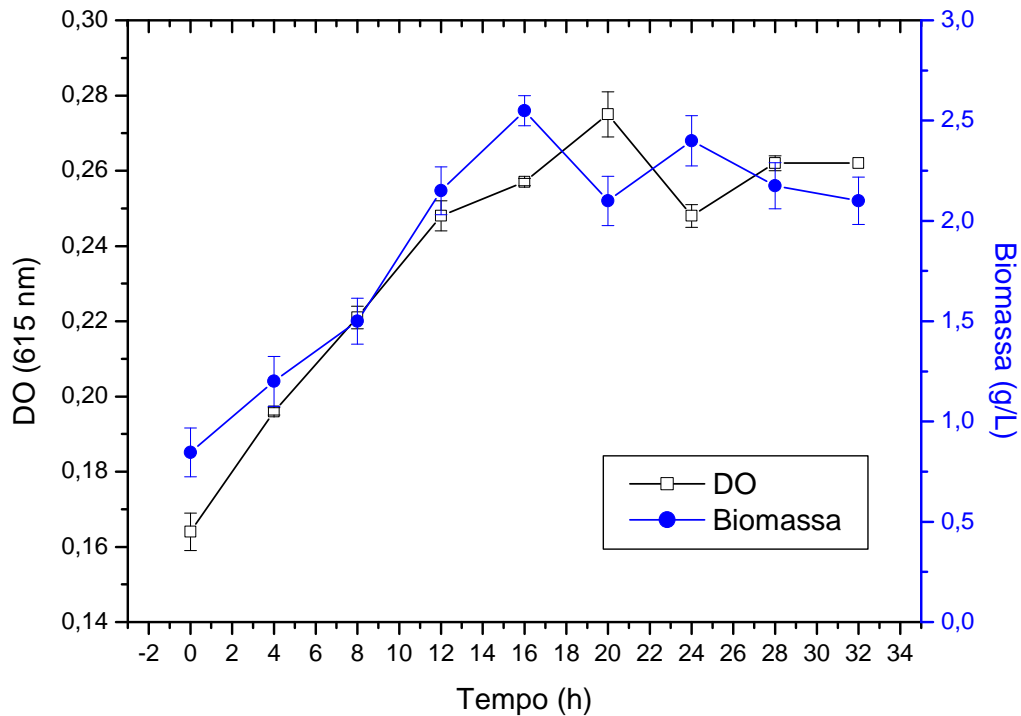


Figura 9. Curva de crescimento do consórcio bacteriano em meio mineral mínimo.

5.3.2. Determinação da tensão superficial

Alguns microrganismos degradadores de hidrocarbonetos produzem biossurfactantes que aumentam a interação superficial água/óleo, aceleram a degradação de vários óleos por microrganismos e promovem a biorremediação de águas e solos e em especial caso ocorra um derramamento de óleo (Nitschke & Pastore, 2002).

Os resultados de tensão superficial estão apresentados na Figura 10 onde se observa que a tensão superficial, uma medida indireta para a produção de biossurfactante, diminuiu à medida que a concentração celular aumentou. Essa redução de aproximadamente 12% ocorreu tanto na fase exponencial, como na estacionária. Desta forma, há indícios que o

consórcio bacteriano isolado do Rio Potengi tem potencial para produzir biossurfactantes. Isso é de grande importância, pois esse consórcio poderá ser utilizado como inóculo em ensaios de biodegradação, como objetivo de otimizar a eficiência de degradação de petróleo.

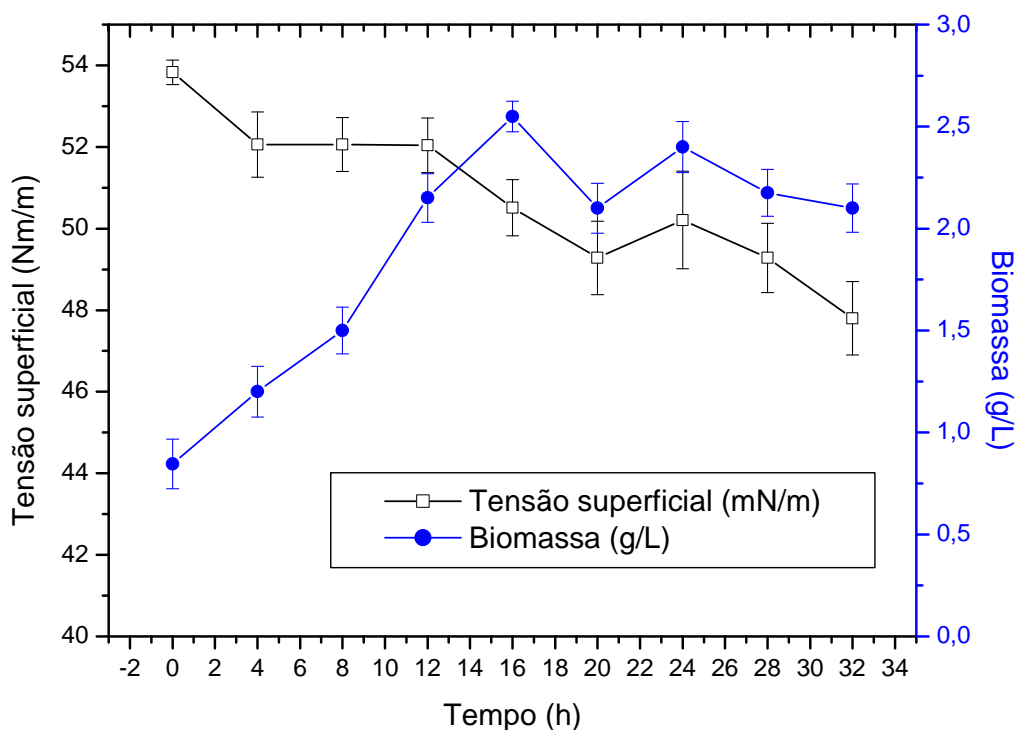


Figura10. Curvas de produção de biomassa e variação da tensão superficial

5.3.3. Velocidade específica de crescimento

A velocidade específica de crescimento (μ_x) foi calculada para avaliar o comportamento cinético do consórcio está representada pela Figura 11.

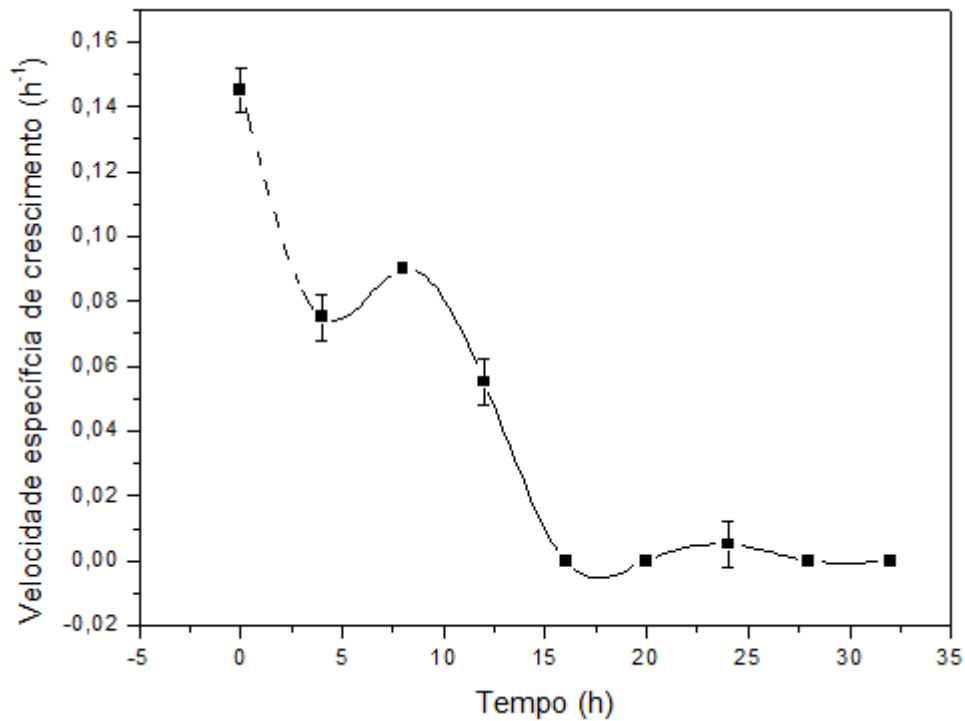


Figura11. Velocidade específica de crescimento em função do tempo do cultivo do consórcio microbiano em meio mineral mínimo +1% petróleo a 150rpm, 30°C.

Pode-se observar uma queda acentuada na velocidade específica de crescimento após 12 horas de cultivo, o que indica fim da fase exponencial de crescimento.

Para determinar a fase exponencial de crescimento foram realizados ajustes lineares nos intervalos de tempo onde a concentração celular estava crescendo, conforme se observa Figura 12. Desta forma, o intervalo que forneceu o melhor coeficiente de correlação foi de 0,9961, indicando a fase exponencial de crescimento que teve duração de 12h. Neste período, o coeficiente angular da melhor correlação forneceu o valor máximo e constante da velocidade específica de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) $0,075 \text{ h}^{-1}$.

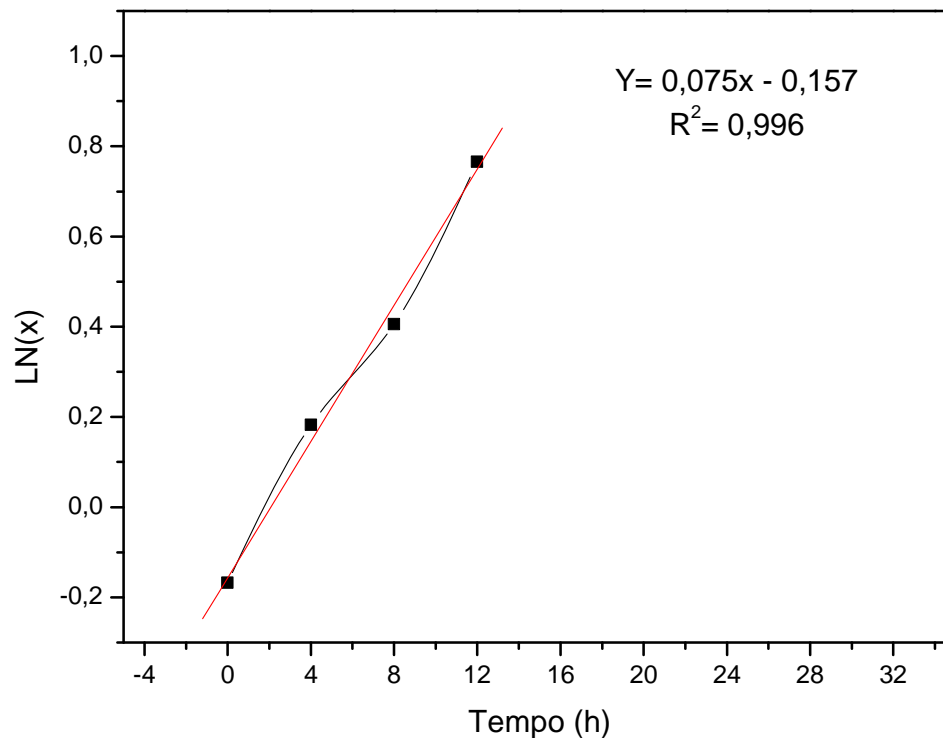


Figura 12. Perfil de lnX em função do tempo para definição da velocidade específica máxima de crescimento em meio mineral mínimo +1% petróleo a 150rpm, 30°C.

5.4. Ensaio de respirometria utilizando o método manométrico (sistema de medida Oxitop-C)

O método de respirometria manométrico Oxitop-C foi utilizado para monitorar a biodegradação de petróleo em solo de mangue. Em todos os ensaios foram empregados um branco e um controle. O branco foi representado pelo solo de mangue com azida de sódio 1%. Ele representa a degradação abiótica, pois teoricamente a azida de sódio mata todos os microrganismos. Sua DBO máxima foi de 48,3 mg/L. O controle abiótico representou respiração insignificante similarmente ao controle abiótico apresentado por Taok *et al.* (2007). O ensaio controle foi representado pelo solo de mangue *in natura* neste caso, a DBO máxima foi de 290 mg/L. Os resultados de respirometria quando utilizou-se o solo sem contaminantes foi baixa em comparação aos resultados quando utilizou-se solos

contaminados com petróleo. Os valores de DBO dos ensaios contaminados com petróleo foram subtraídos dos valores de DBO do branco e controle com objetivo de se obter a degradação apenas do petróleo.

Os parâmetros analisados no processo de biodegradação foram níveis crescentes de contaminação de petróleo (1, 5 e 15% v/v) com solo *in natura* e a presença de 10% (v/v) de inóculo no ensaio com 5% de petróleo. O inóculo utilizado foi o consórcio bacteriano isolado do manguezal do Rio Potengi. O objetivo da utilização de inóculo foi avaliar se ele provoca um incremento na eficiência de biodegradação em relação ao ensaio com 5% de petróleo, sem inóculo.

A Figura 13 apresenta o consumo de O₂ ao longo de 28 dias de degradação de petróleo, utilizando o sistema OxiTop – C. Neste ensaio foi analisado solo de mangue com níveis crescentes de petróleo (1, 5 e 15%).

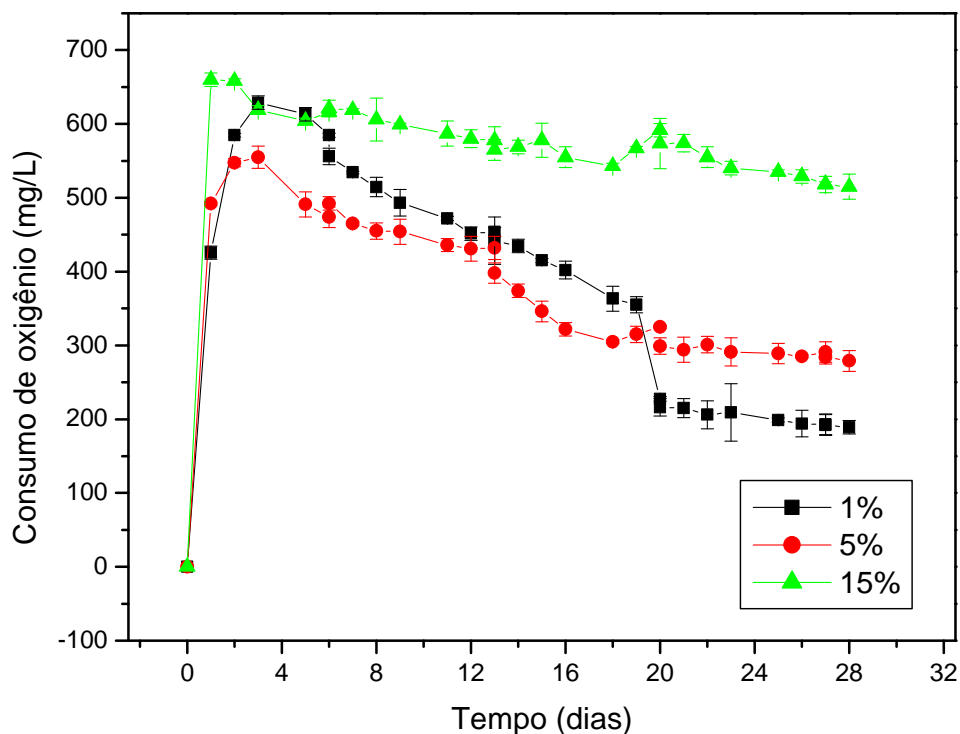


Figura 13. Consumo de O₂ ao longo de 28 dias de degradação de petróleo, utilizando o sistema OxiTop – C.

Observa-se que o ensaio com 1% de petróleo, realizado em duplicata, atingiu DBO máxima de 628 mg/L, quando adotou-se 5% atingiu DBO máxima de 555 mg/L e quando adotou-se 15% atingiu DBO máxima de 653 mg/L. Nota-se também que ocorre um incremento na atividade respiratória de 290 para 628 mg/L, 555 mg/L e 653 mg/L, nos ensaios contaminados com 1, 5 e 15% de petróleo, respectivamente. É interessante notar a ausência da fase lag, e que ocorre um consumo acentuado de oxigênio nos primeiros dias atingindo o máximo no 3º dia de incubação para todos os ensaios, onde utilizou-se concentrações crescentes de petróleo (1, 5 e 15%). Após esse período ocorre um decréscimo no consumo de oxigênio em todos os ensaios (Figura 13). Esses resultados demonstram que esse declínio na respiração após alguns dias de incubação é devido a completa decomposição das frações mais lábeis ou à disponibilidade limitada de nutrientes. Esses resultados corroboram com os resultados de McGill *et al.* (1981) descritos no Estado da Arte (Página 33).

A Figura 14 apresenta o consumo de O₂ ao longo de 28 dias de degradação de petróleo, utilizando o sistema OxiTop - C. Neste ensaio foi avaliado o efeito do inóculo no processo de biodegradação de petróleo.

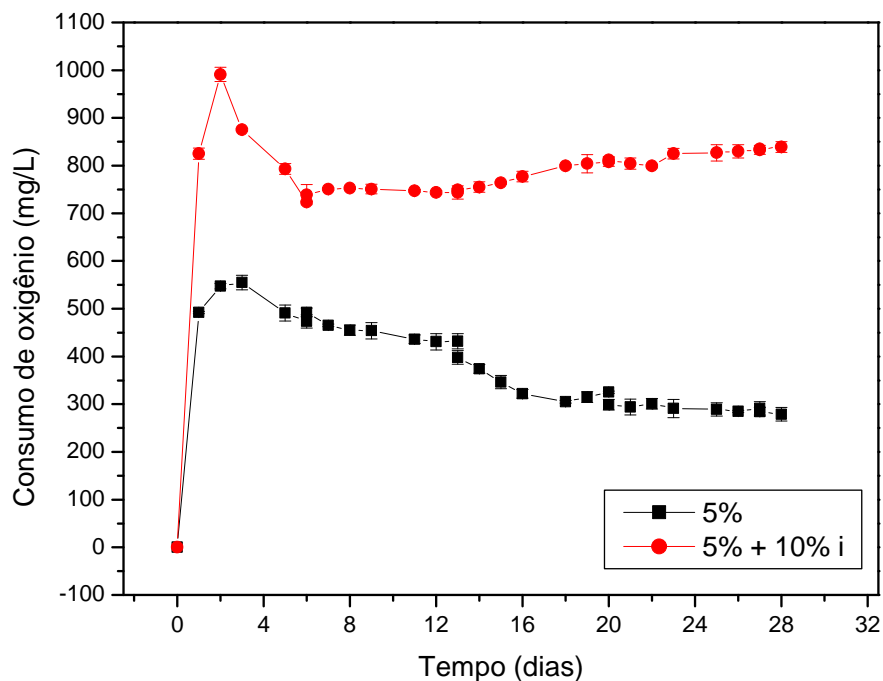


Figura 14. Consumo de O₂ ao longo de 28 dias de degradação de petróleo, utilizando o sistema OxiTop – C, nos ensaios com solo de mangue + 5% de petróleo e solo de mangue + 5% de petróleo + 10% de inóculo.

Observa-se que o ensaio com 5% (v/v) de petróleo +10% (v/v) inóculo atingiu DBO máxima de 991 mg/L. Houve um incremento de 44%, no consumo de oxigênio, se comparado com o ensaio com 5% de petróleo (555 mg/L). Nota-se também ausência da fase lag, nas duas condições estudadas, sugerindo uma boa aclimatação do consórcio no ensaio com solo de mangue + 5% de petróleo (v/v). É interessante notar que ocorre um consumo de oxigênio acentuado no 2º e 3º dia de cultivo, refletindo degradação dos compostos mais leves do petróleo. Após esse período ocorre uma queda no consumo de oxigênio do ensaio sem inóculo e no ensaio com inóculo o consumo de oxigênio permanece constante.

A partir do consumo de oxigênio fornecido pelo sistema OxiTop-C foi estimada a eficiência de degradação. O método DBO OxiTop-C tem sido intensivamente usado em estudos de biodegradabilidade de óleos (Vähäoja et al., 2005 a,b; Kaakinen et al.2007; Karhu, 2009).

As Figuras 15 e 16 apresentam a eficiência da biodegradação de petróleo no decorrer de 28 dias de degradação, utilizando o sistema OxiTop-C. Nesses ensaios foram utilizadas concentrações crescentes de petróleo (1, 5 e 15%), sem inóculo.

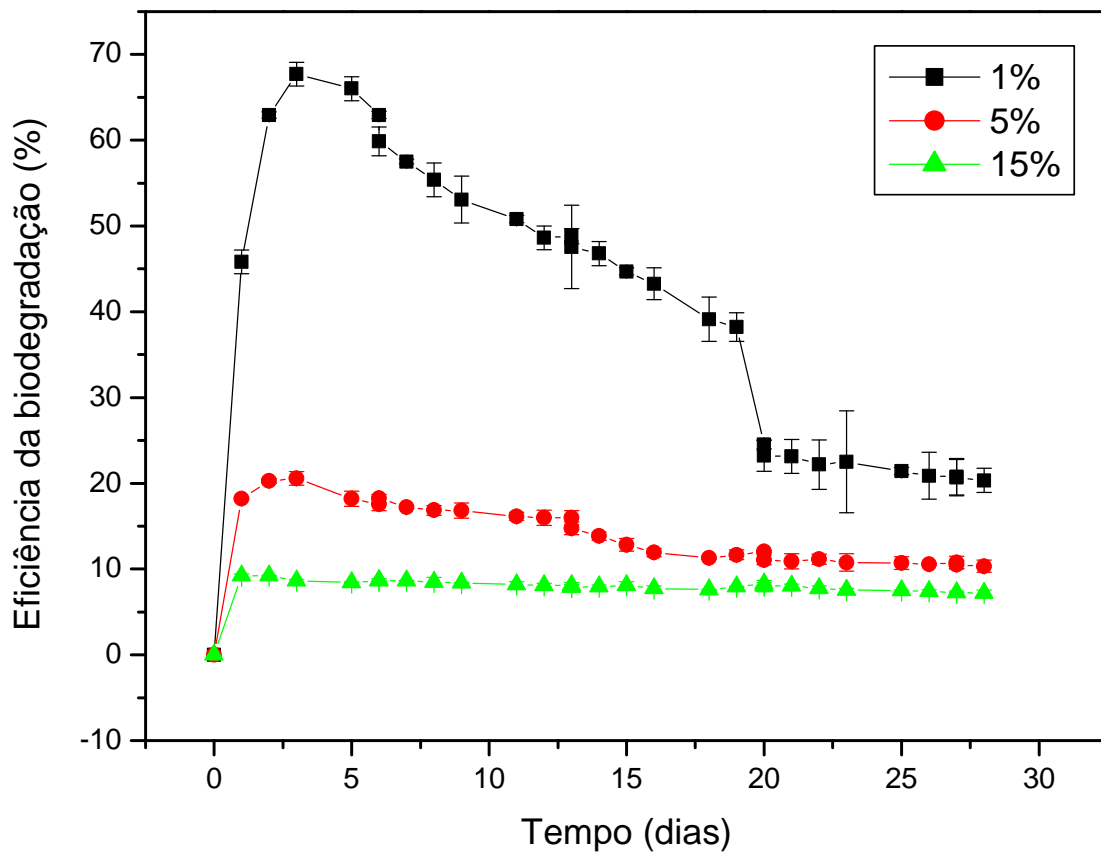


Figura 15. Eficiência da biodegradação de petróleo no decorrer de 28 dias de degradação nos ensaios com solo de mangue e concentrações crescentes de petróleo (1, 5 e 15%).

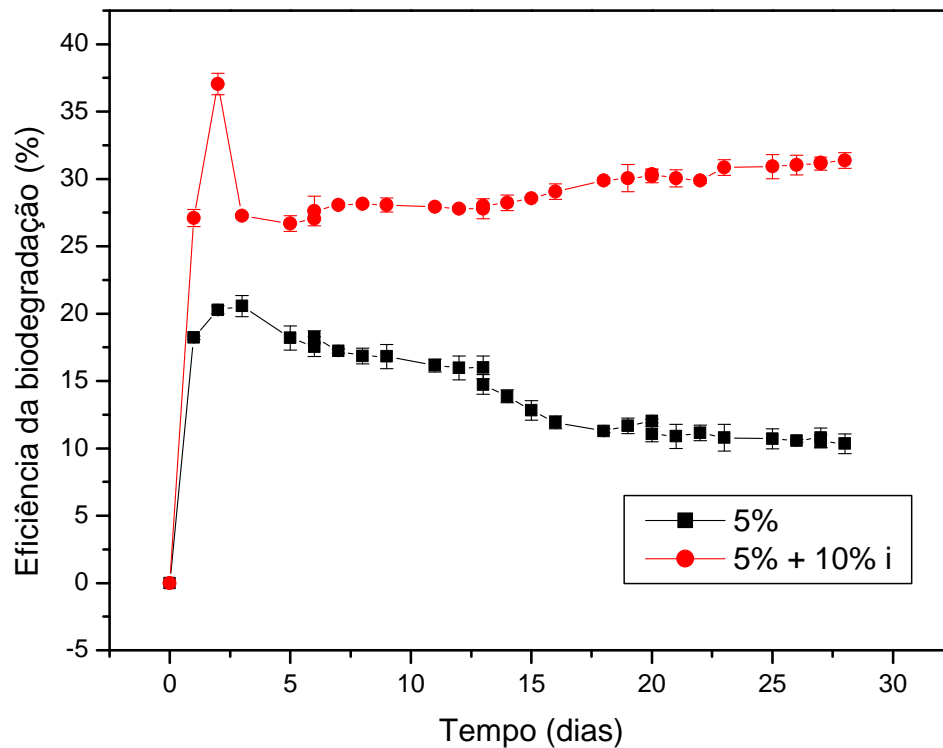


Figura 16. Eficiência da biodegradação de petróleo no decorrer 28 dias de degradação, nos ensaios com solo de mangue + 5% de petróleo e solo de mangue + 5% de petróleo + 10% de inóculo.

Observa-se, pelas Figuras 15 e 16 que a medida que aumenta a concentração de petróleo, ocorre um decréscimo na eficiência da biodegradação para a mesma quantidade de biomassa.

Resultados similares ao encontrados nesse estudo foram relatados nos trabalhos de Rambeloarisoa *et al.*, (1984) e Muthuswamy *et al.*, (2008) conforme descritos no Estado da Arte (Página 34)

As Figuras 16 e 18 apresentam a eficiência da biodegradação de petróleo no decorrer de 28 dias de degradação. Nesses ensaios utilizou-se solo de mangue com 5% de petróleo, sem inóculo e com inóculo do consórcio bacteriano isolado do manguezal do Rio Potengi. Observa-se redução significativa na eficiência de biodegradação passando de 67%

quando utilizou-se 1% de petróleo para 20,5% e 9,21% quando utilizou-se 5% e 15%, respectivamente.

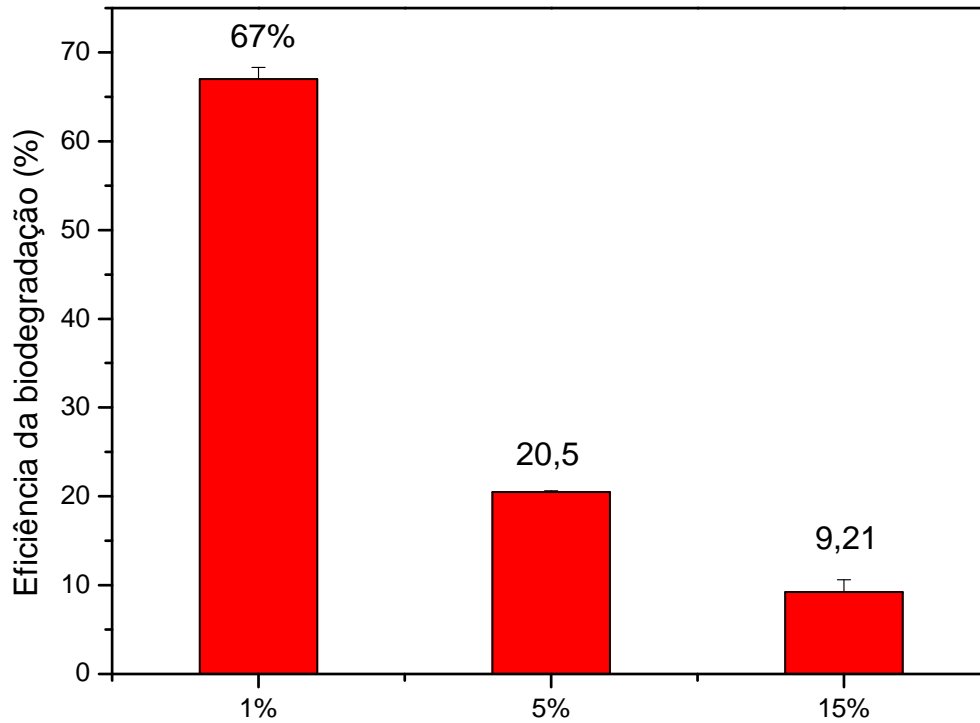


Figura 17. Eficiência da biodegradação de petróleo no decorrer de 28 dias de degradação.

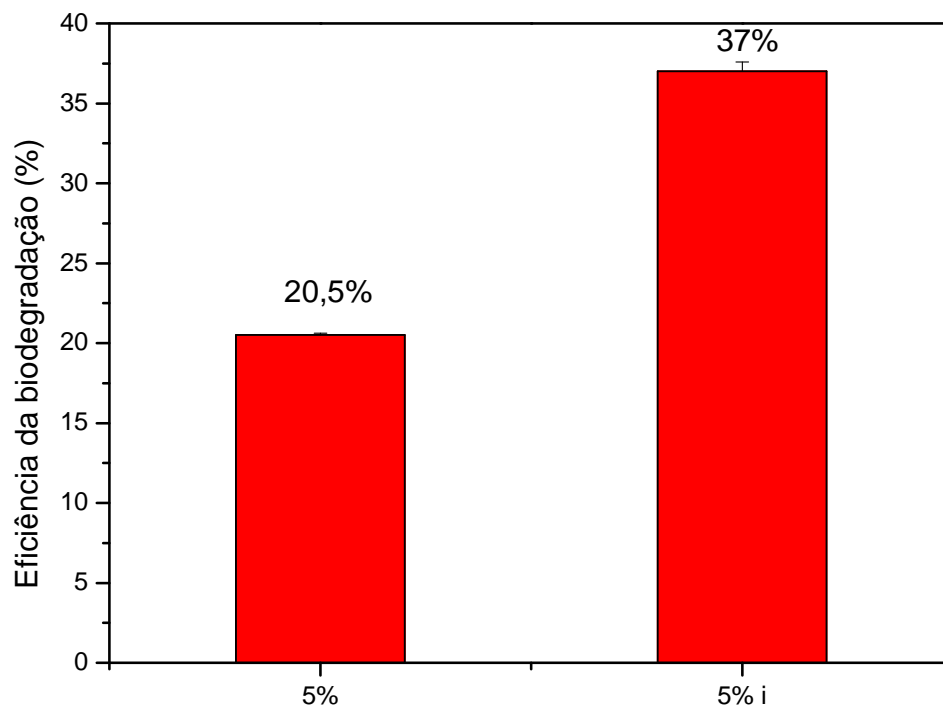


Figura 18. Eficiência da biodegradação de petróleo com 28 dias de degradação.

Observa-se pelas Figuras 16 e 18 um incremento na eficiência de degradação de 44,6% a medida que adiciona-se 10 % (v/v) de inóculo, no ensaio com 5% de petróleo, em 28 dias de degradação. A presença de inóculo bacteriano agiu de forma positiva na degradação de óleo cru.

5.5. Ensaio de respirometria utilizando o método da condutivimetria (respirômetro de Bartha)

O sistema de respirometria por condutivimetria foi utilizado para monitorar o processo de biodegradabilidade em solo de mangue.

Os ensaios foram realizados nas seguintes condições: solo de mangue com níveis crescentes de petróleo (1, 3, 6,5, 10, e 12%), sem inóculo. Foram realizados também ensaios com solo de mangue variando as concentrações de petróleo e inóculo, onde foi

delineado um planejamento fatorial com triplicata no ponto central. Para esse planejamento as concentrações de utilizadas petróleo foram (1, 6,5 e 12%) e de inóculo foram (5, 12,5 e 20%).

A Figura 19 apresenta a produção de CO₂ em 60 dias de degradação de petróleo nos quais, os ensaios foram realizados nas seguintes condições: solo de mangue com níveis crescentes de petróleo (1%, 3%, 6,5%, 10% e 12%), exceto no ensaio controle onde o solo de mangue foi avaliado *in natura*.

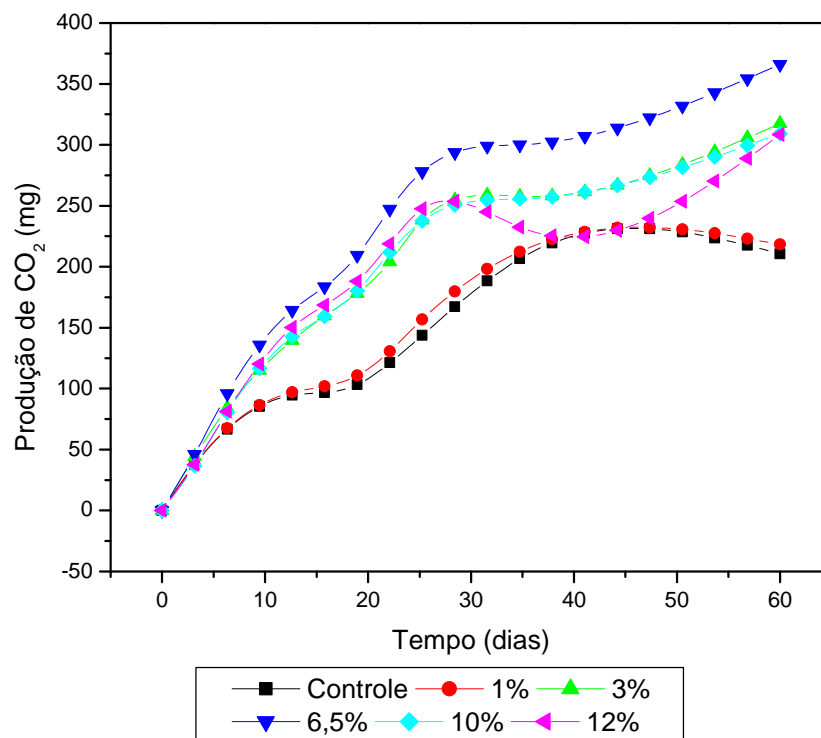


Figura 19. Produção de CO₂ no decorrer de 60 dias de degradação de petróleo pelo sistema de condutivimetria (Solo de mangue com concentrações crescentes de petróleo: 1%, 3%, 6,5%, 10% e 12%) .

Observa-se que até 60 dias de degradação, nos ensaios em que o solo foi contaminado com 1%; 3%; 6,5%; 10% e 12% (v/v) de petróleo houve um incremento em relação ao solo controle (sem contaminação por petróleo) de 3,55%; 33,7%, 42,48%; 31,89% e 31,73%, respectivamente, na produção de CO₂ conforme mostra a Figura 19. Esse incremento na taxa de respiração também foi observado por Watts *et al.* (1982) que trabalharam com aplicação de resíduos oleosos no solo, medindo a atividade microbiana

pela evolução do CO₂ e encontraram índices de respiração maior em sítios que tiveram a aplicação de resíduo oleoso em comparação com aqueles sem aplicação.

O ensaio que apresentou maior produção de CO₂ foi o contaminado com 6,5% de petróleo. A medida que aumentou-se a concentração de petróleo para 10 e 12% a produção de CO₂ diminuiu. Bartha & Bossert (1984) observaram que em muitos casos, níveis altos de hidrocarbonetos maiores que 10 % são associados com vários efeitos inibitórios sobre os micróbios do solo.

Nota-se também ausência da fase lag, em todos os ensaios. Observa-se que nos primeiros 30 dias a produção de CO₂ foi mais acentuada. Neste período, outra vez, os microrganismos consumiram mais rapidamente aqueles compostos que são facilmente biodegradáveis, restando, portanto os que são mais resistentes a degradação (recalcitrantes), que provavelmente foram consumidos posteriormente de forma mais lenta. Similarmente a esse estudo (Moraes, 2005), avaliando a biodegradação de resíduos oleosos provenientes de refinaria de petróleo através do sistema de biopilhas detectou que nos primeiros 45 dias de sua análise, foram produzidos mais de 50% do total de CO₂ acumulado em todos os respirômetros.

A partir da produção de CO₂ liberado do solo foi estimada a eficiência de biodegradação que estão representadas pelas Figuras 20 e 21. Os ensaios foram realizados com níveis crescentes de petróleo (1%, 3%, 6,5%, 10% e 12%), sem inóculo, ao longo de 60 dias de degradação. Pode-se observar que o ensaio contaminado com 1% (v/v) de petróleo foi o que apresentou melhor eficiência na degradação, atingindo 16,15%.

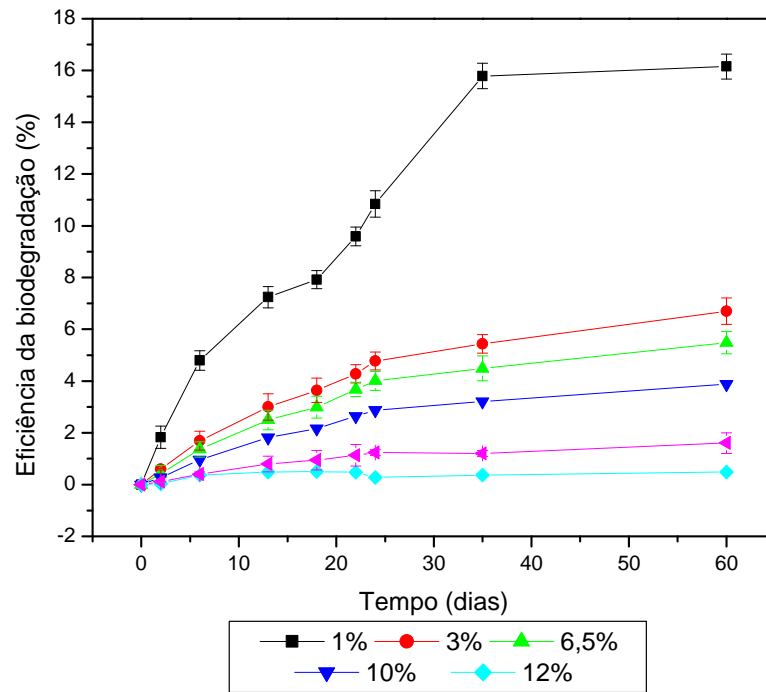


Figura 20 Eficiência de biodegradação ao longo de 60 dias de degradação de petróleo

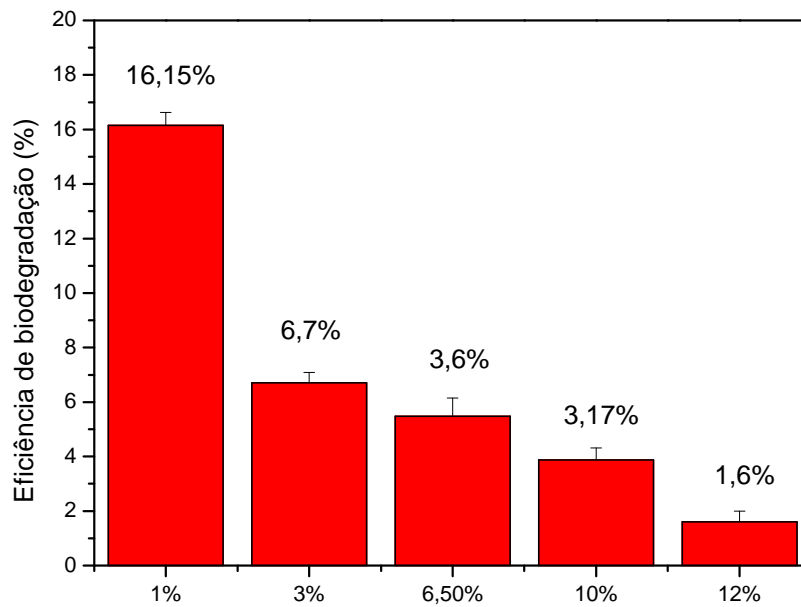


Figura 21 Eficiência de degradação ao longo de 60 dias de degradação de petróleo.

Resultados similares ao encontrados nesse estudo utilizando a metodologia da condutividade foram encontrados quando se utilizou a metodologia OxiTop-C e também foram relatados na literatura (Rambeloarisoa *et al.*, 1984; Muthuswamy *et al.*, 2008), ou seja, a medida em que a concentração de petróleo aumentou a eficiência de degradação diminuiu. Em contrapartida as eficiências de degradações obtidas nesses ensaios, utilizando o sistema de respirometria por condutivimetria, apresentaram resultados inferiores comparados ao da literatura: 16,15% de degradação a 1% de óleo cru, seguidos por 6,7% a 3%, 3,6% a 6,5%, 3,17% a 10%, e 1,6% a 12% (Figuras 20 e 21). Porém não se pode fazer uma análise comparativa, pois os tipos de óleos e solos utilizados nos ensaios são diferentes.

Esse efeito de inibição também foram observados por Ururahy *et al.* (1998) também observaram esse efeito de inibição pelo efeito tóxico do resíduo (Estado da Arte, página 32).

A baixa eficiência de degradação, estimada pela produção de CO₂ pode ser atribuída ao solo de mangue utilizado nos ensaios. A quantidade e o tipo de argila podem afetar grandemente o local onde há carbono orgânico estabilizado. Isso ocorre porque, na fração argila, o C orgânico é estabilizado principalmente pela sua íntima associação com os minerais do solo, que o protege contra a degradação biológica. Isso faz com que solos siltico-argilosos, geralmente apresentem maior teor de C orgânico. Diante disso, as argilas podem reduzir a perda de carbono na forma de CO₂, aumentando a eficiência da utilização desse elemento pelos microrganismos e ainda formando complexos com produtos de decomposição e com substâncias húmicas (Tauf, 1990). Isso pode ser uma justificativa para baixa eficiência de degradação obtida por esse método.

Também foram realizados ensaios com a presença de petróleo e inóculo utilizando um planejamento experimental com a finalidade de avaliar a relação entre a concentração de petróleo e inóculo mais favorável para o processo de biodegradação de petróleo. Fez-se necessária, a análise da matriz do planejamento fatorial completo com triplicata no ponto central 2². A Tabela 5 apresenta os sete ensaios analisados e os resultados mostram diferentes percentuais de biodegradação que variaram de 1,6 a 23,7%, em 60 dias de degradação.

Tabela 5. Matriz do Planejamento Fatorial Completo 2² com triplicata no ponto central e os respectivos percentuais de biodegradação PB.

Ensaio	Petróleo (%)	Inóculo (%)	EB (%)
1 (- -)	1	5	19,2
2 (+ -)	12	5	1,7
3 (- +)	1	20	23,7
4 (++)	12	20	1,6
5 (00)	6,5	12,5	2,2
6 (00)	6,5	12,5	3,2
7 (00)	6,5	12,5	2,6

Nesses ensaios a produção de CO₂ foi utilizada como indicador do processo de biodegradabilidade, sendo obtida indiretamente pela condutividade. A Figura 22 apresenta a produção de CO₂ em 60 dias, de degradação de petróleo. Não foi observada fase lag em nenhum dos ensaios, similarmente aos ensaios anteriores. Observa-se também a produção de CO₂ mais acentuada nos primeiros 30 dias de incubação refletindo a degradação dos compostos mais leves. Após esse período a produção de CO₂ torna-se lenta podendo ser atribuído a degradação lenta dos compostos recalcitrantes do petróleo.

Comportamento similar também foi observado por Ghaemghami *et al.* (1998) que trabalharam com solos contaminados com solventes e notaram que as taxas de mineralização são mais elevadas nas primeiras semanas de incubação, sugerindo a existência de uma comunidade adaptada a biodegradação e também a existência de compostos mais facilmente degradados.

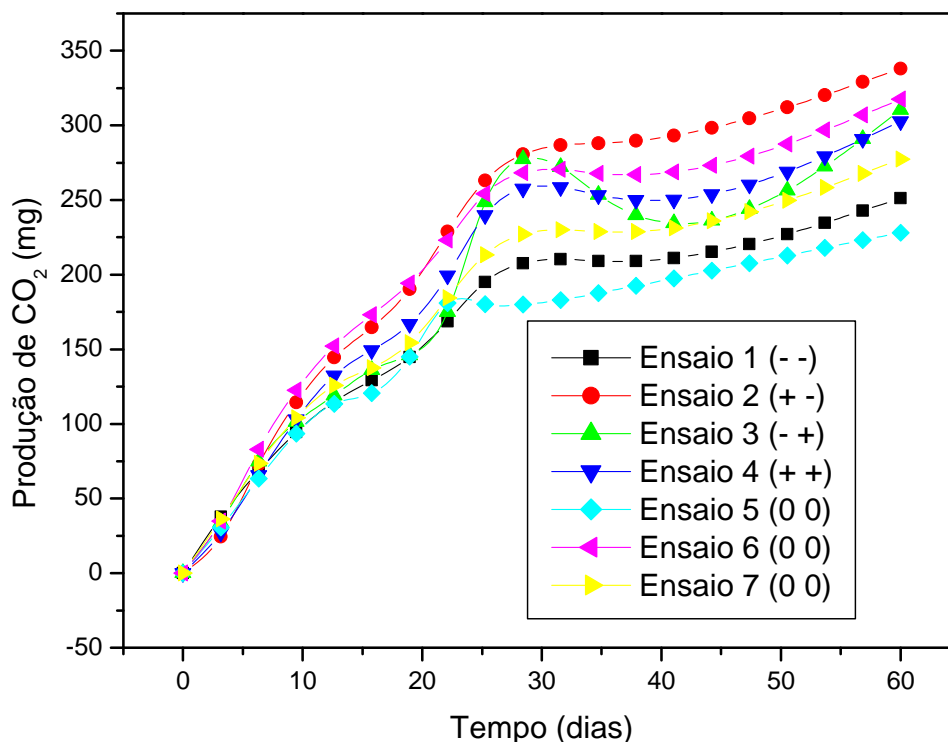


Figura 22. Produção de CO₂ ao longo de 60 dias de degradação de petróleo.

A Figura 23 apresenta a eficiência de biodegradação de petróleo nos ensaios realizados a partir do planejamento experimental 2² com triplicata no ponto central. Os ensaios 1 e 3 são representados pelo solo de mangue com 1% de petróleo, variando a concentração de inóculo de 5% para 20%, respectivamente. Nesses ensaios observou-se que a presença de inóculo bacteriano agiu de forma positiva incrementando 15,8% e 31,8%, respectivamente nos ensaios, em relação ao ensaio anterior, onde foi utilizado apenas solo de mangue com 1% de petróleo, sem inóculo.

Nesses ensaios além da presença de inóculo, foi avaliado também o efeito da quantidade de inóculo no processo de biodegradação. O aumento na quantidade de inóculo bacteriano também agiu de forma positiva incrementando a eficiência de biodegradação de 19,2% para 23,7%, ou seja, houve um incremento de 19% na eficiência de biodegradação

de petróleo no ensaio 3 em relação ao 1, ou seja, quando a quantidade de inóculo utilizada aumentou de 5% para 20% no solo com 1% de petróleo.

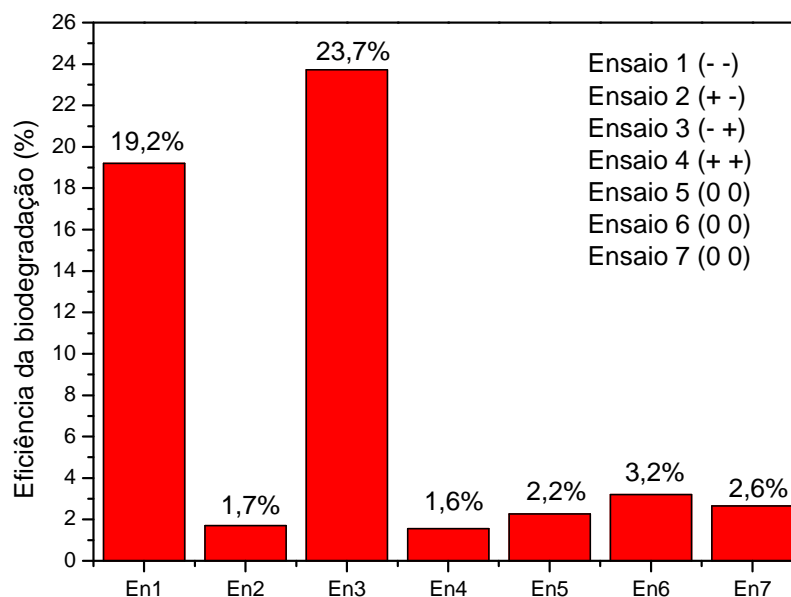


Figura 23. Eficiência de biodegradação de petróleo nos ensaios do planejamento experimental 2² com triplicata no ponto central.

Os ensaios 2 e 4 são representados pelo solo de mangue com 12% de petróleo, variando a concentração de inóculo de 5% para 20%, respectivamente. Observa-se que tanto a presença, como a quantidade de inóculo não surtiram efeito no processo de biodegradação se comparado com o ensaio anterior (solo de mangue +12% de petróleo, sem inóculo), pois a eficiência de biodegradação foi praticamente a mesma.

Os ensaios 5, 6 e 7 são representados pela triplicata no ponto central do planejamento fatorial 2² (solo de mangue com 6,5% de petróleo e 12,5% de inóculo). Observa-se que a presença de inóculo também não surtiu efeito no processo de biodegradação se comparado com o ensaio anterior (solo de mangue + 6,5% de petróleo, sem inóculo), pois a eficiência de biodegradação foi praticamente a mesma, tanto para o solo inoculado, como para o solo não inoculado.

Dessa forma, similarmente aos ensaios anteriores a medida que a concentração de petróleo aumentou a eficiência de biodegradação diminuiu. O ensaio que melhor apresentou

eficiência de biodegradação foi o ensaio 3 (mangue com 1% de petróleo e 20% de inóculo) com 23,7%.

A Figura 24 apresenta o diagrama de Pareto com a eficiência de degradação de petróleo dos ensaios delineados pelo planejamento fatorial 2^2 , ao longo de 60 dias de degradação. A partir dele é possível identificar quais os fatores que surtiram o melhor efeito no processo de biodegradação de petróleo.

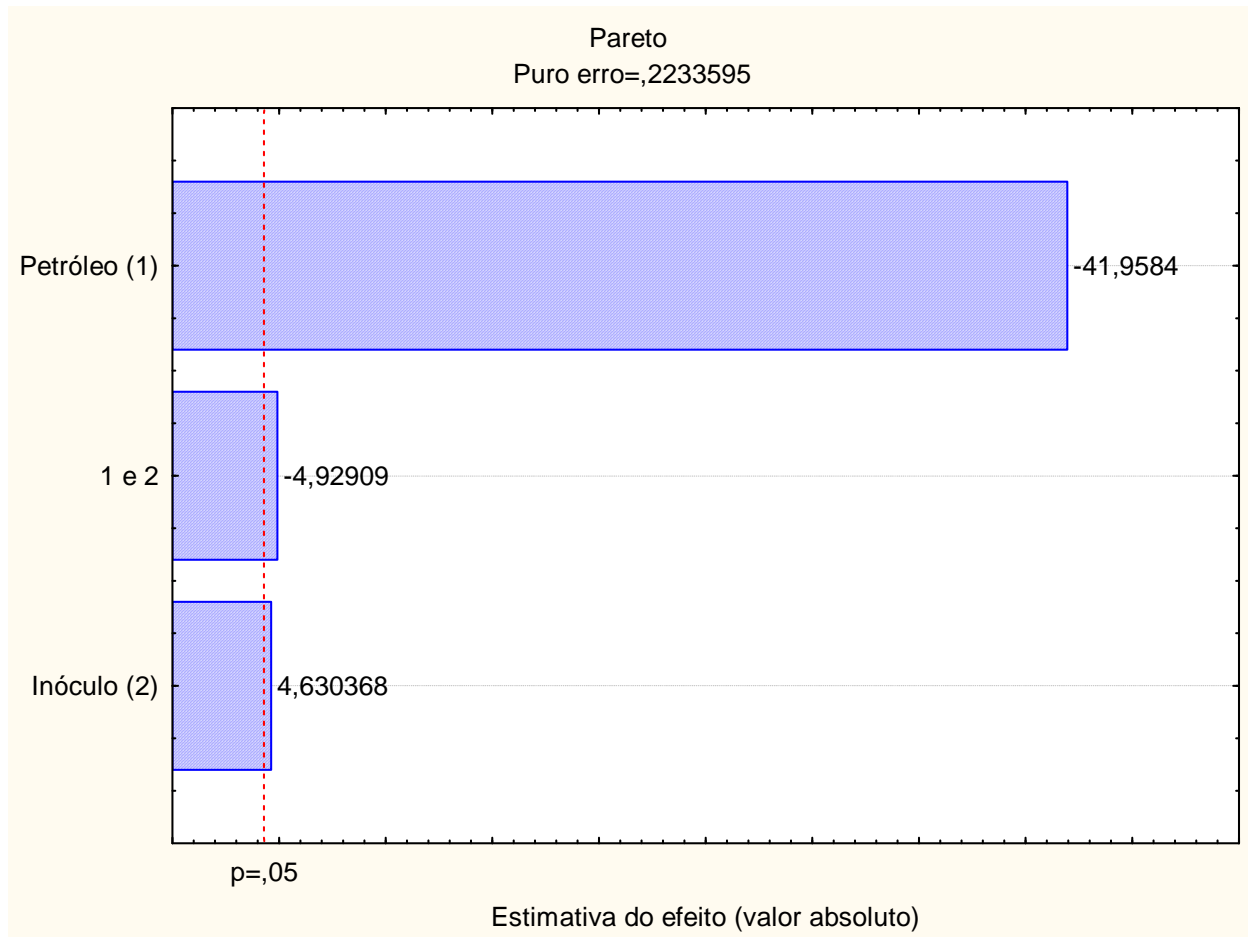


Figura 24. Diagrama de Pareto a eficiência de degradação de petróleo dos ensaios delineados pelo planejamento fatorial 2^2 , ao longo de 60 dias de degradação.

De acordo com o diagrama de pareto, observou-se que os dois fatores (concentração de petróleo e inóculo) são significativos, com 95% de confiança, bem como a combinação entre eles. Entretanto a variável concentração de petróleo apresenta maior efeito em relação a concentração de inóculo na eficiência de biodegradação.

Observa-se que ao se aumentar a concentração de petróleo há um decréscimo na eficiência de degradação, por outro lado, ao se aumentar a concentração de inóculo há um incremento na eficiência de degradação. Destaca-se que o efeito de interação entre os fatores tende a reduzir a eficiência de biodegradação. Esses resultados confirmam o que foi observado e comentado anteriormente.

As Figuras 25 e 26 apresentam a influência da concentração de petróleo e inóculo na eficiência de degradação de petróleo.

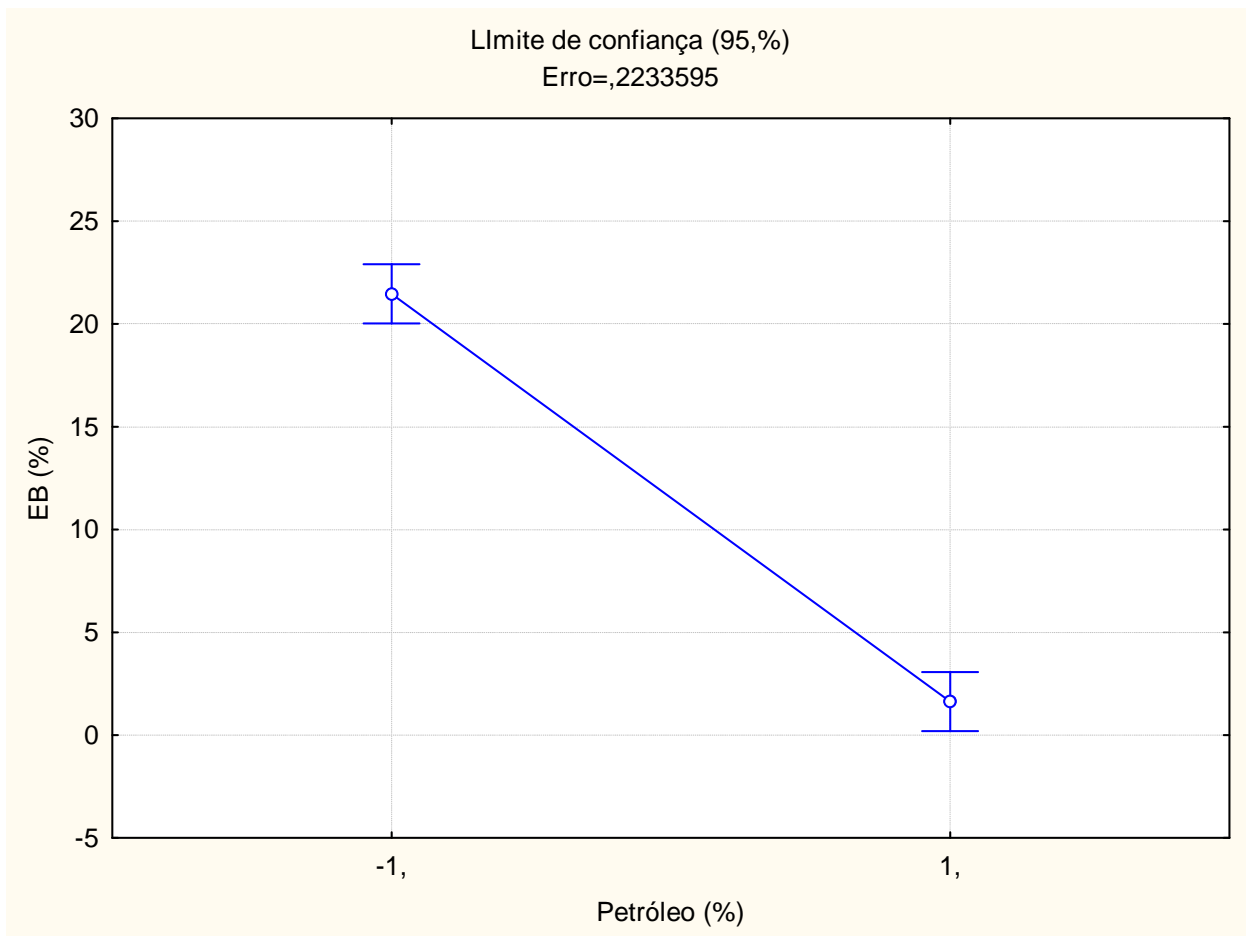


Figura 25. Influência da concentração de petróleo na eficiência de biodegradação de petróleo.

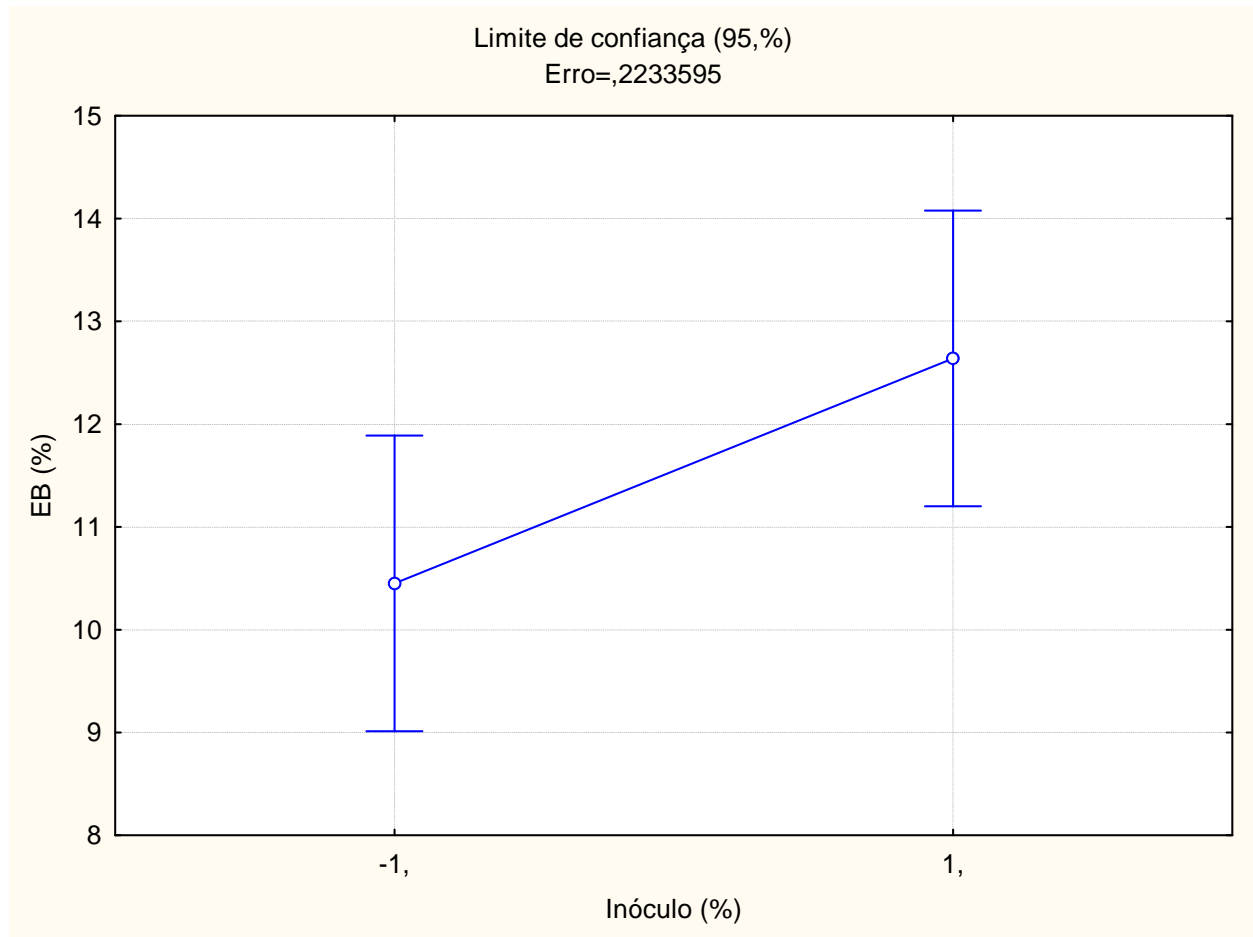


Figura 26. Influência da concentração de inóculo na eficiência de biodegradação de petróleo.

Observando a Figura 25 observa-se que a medida que aumenta-se a concentração de petróleo, a eficiência de biodegradação diminui. Em contrapartida, analisando a Figura 26, observa-se que a medida que aumenta-se a concentração de inóculo, há um incremento na eficiência de biodegradação. Estes efeitos observados foram gerados pelo programa STATÍSTICA versão 7.0 e estão de acordo com o que foi observado e discutido anteriormente.

A Figura 27 apresenta a influência da concentração de petróleo e inóculo na eficiência de biodegradação de petróleo.

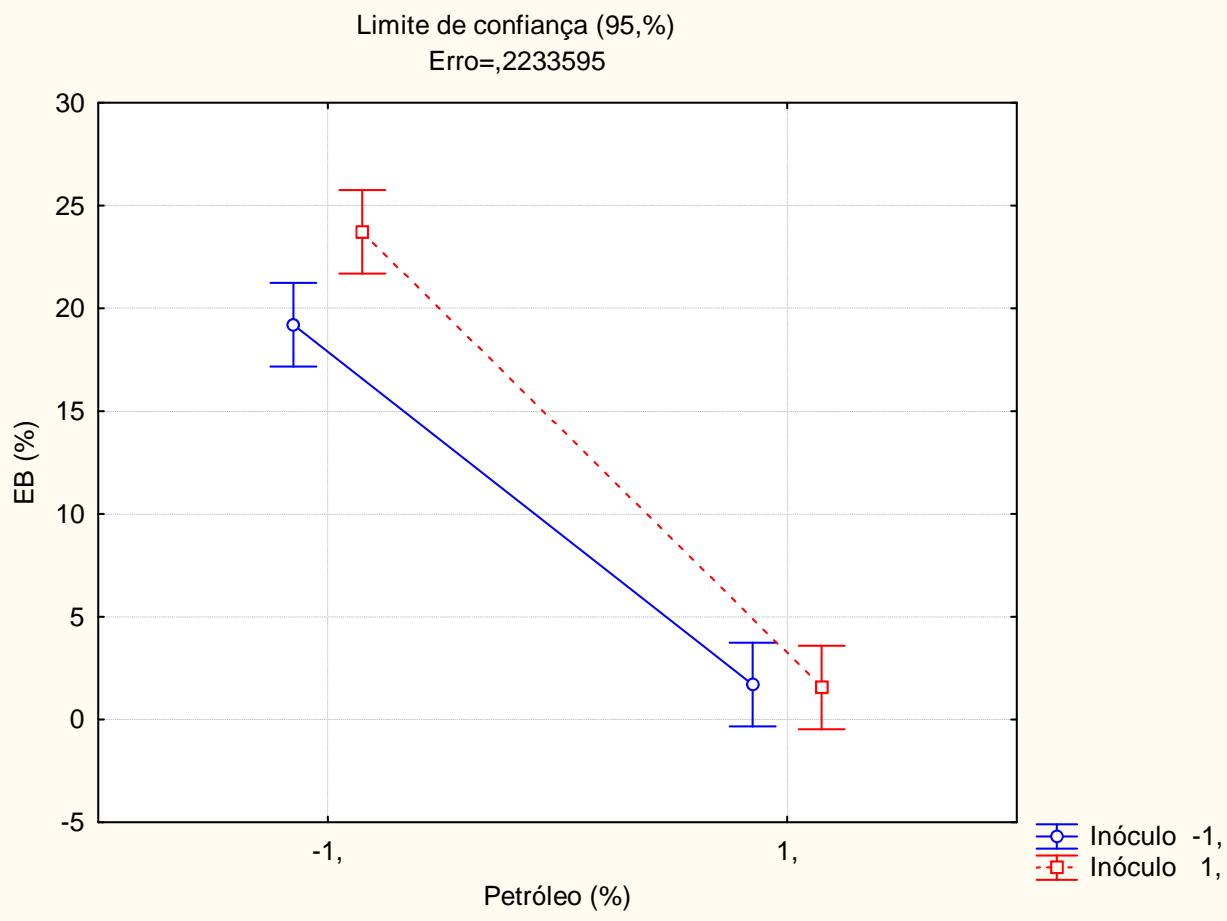


Figura 27. Influência da concentração de petróleo e inóculo na eficiência de biodegradação de petróleo.

Analisando os resultados apresentados na Figura 27 observa-se que a medida que aumenta-se a concentração de petróleo, nas condições máxima (20%) e mínima (5%) de inóculo, diminui a eficiência de biodegradação. A concentração de inóculo tem um efeito significativo maior na concentração mínima de petróleo, em contrapartida, quanto a concentração de petróleo é máxima o inóculo não tem efeito significativo na variável resposta. De fato esse efeito foi verificado e discutido anteriormente.

A Figura. 28 apresenta o efeito da concentração de inóculo na eficiência de biodegradação.

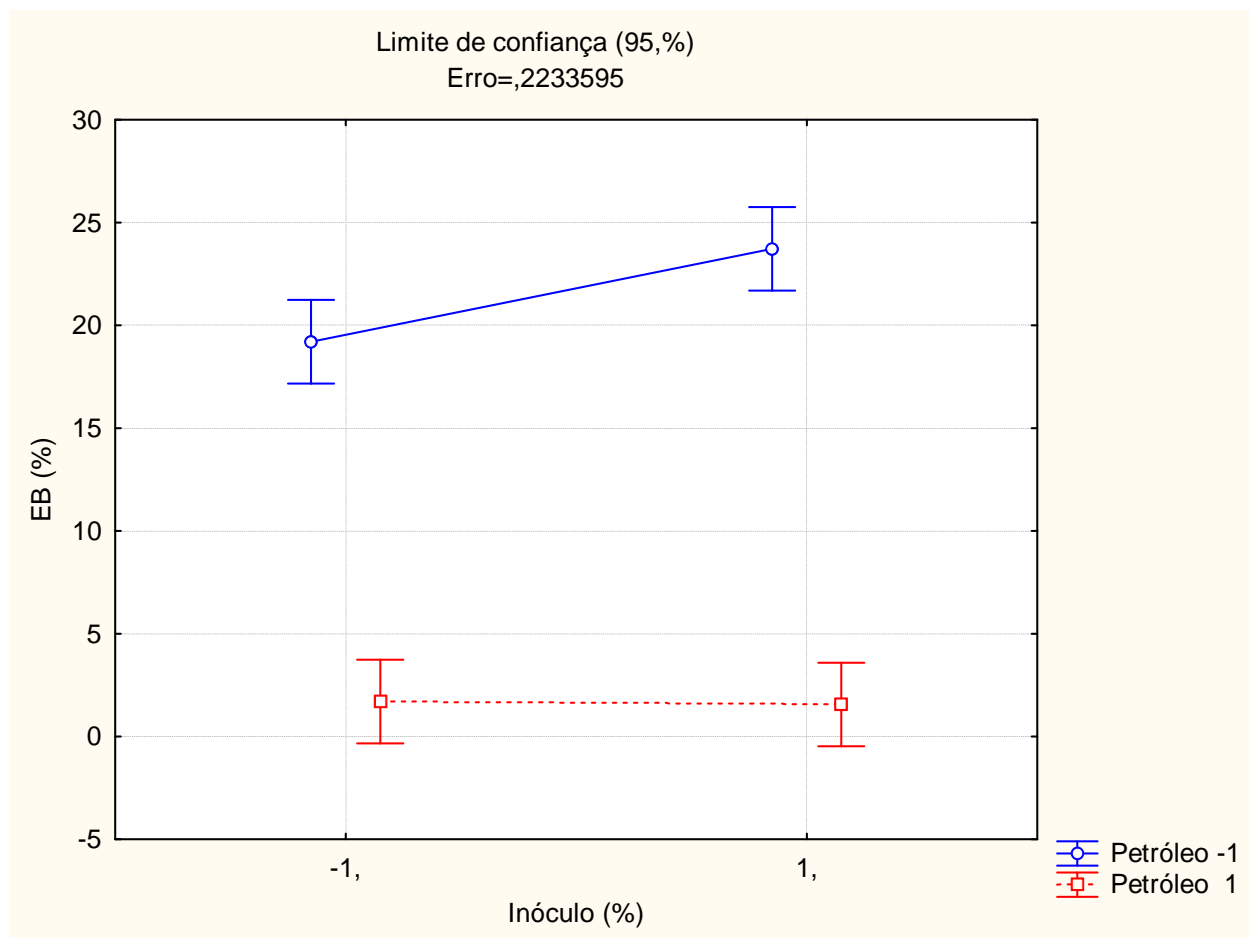


Figura 28. Influência da concentração de inóculo na eficiência de biodegradação de petróleo.

De acordo com a Figura 28 observa-se que a medida que aumenta a concentração de inóculo na condição de concentração de petróleo máxima (12%) não há variância significativa na eficiência de biodegradação. Entretanto, na medida em que a aumenta-se a concentração de inóculo na concentração mínima de petróleo testada (1%) a eficiência de biodegradação melhora significativamente.

A finalização da interpretação dos efeitos das variáveis petróleo e inóculo na eficiência de biodegradação foi avaliada através da superfície de resposta (Figura 29).

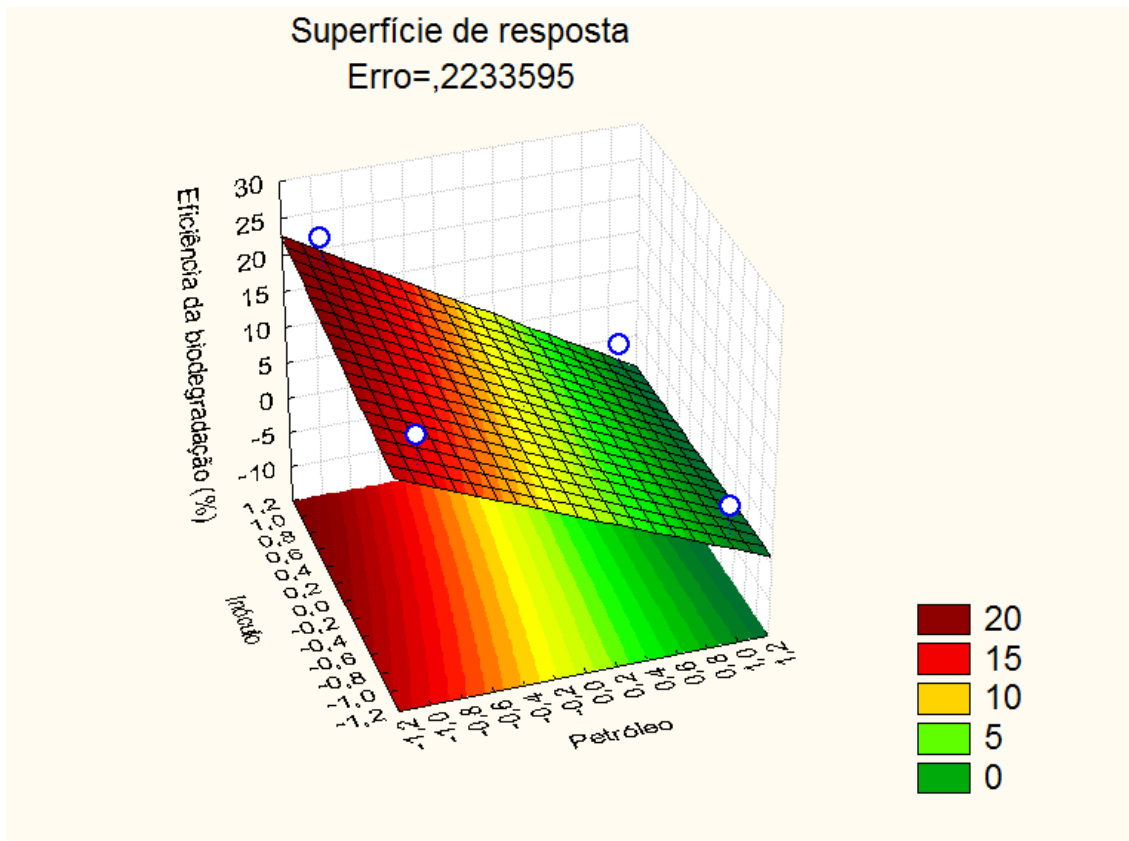


Figura 29. Superfície de resposta

Analisando a Figura 29 há uma confirmação dos efeitos observados anteriormente e conclui-se que tanto as concentrações de petróleo como de inóculo têm efeito significativo sobre a eficiência de biodegradação.

Apesar de ocorrer um incremento das eficiências de degradação com adição de inóculo, os ensaios teriam que obter uma eficiência de biodegradação de 30% dentro de um específico período de tempo para que os poluentes fossem biodegradados pelos microrganismos, sob condições apropriadas (CETESB, 1990).

Outro fator que pode justificar a baixa eficiência de degradação observada nas duas metodologias utilizadas neste trabalho foi o petróleo utilizado nos ensaios (Figura 30).



Figura30. Petróleo utilizado nos ensaios de biodegradação de petróleo.

O petróleo é pesado e estava estocado a mais de dois anos em temperatura de aproximadamente 30°C, no escuro, e apresentava um aspecto degradado (presença de água no óleo que é um produto final do processo de degradação) e viscoso. Provavelmente os compostos voláteis e de fácil degradação já tinham sido degradados e os compostos restantes presentes no petróleo utilizado nos ensaios seriam recalcitrantes. Isso é de grande relevância, já que a degradação das frações recalcitrantes é um fator de interesse mundial.

As duas técnicas de respirometria monitoradas neste estudo apresentaram resultados distintos, quando utilizado ensaios em condições similares. Ou seja, no ensaio monitorado pelo sistema OxiTop-C em que foi adicionado 1% de petróleo no solo de mangue *in natura* apresentou biodegradabilidade efetiva. Em contrapartida, este mesmo ensaio não apresentou biodegradação, quando monitorado pelo sistema de condutivimetria.

No caso de um derrame acidental de petróleo, em que a quantidade de óleo cru adicionada no ambiente fosse 1% (v/v), o que corresponderia cerca de 20.000L de óleo cru por hectare, a degradação ocorreria efetivamente, levando em consideração os resultados obtidos pela metodologia OxiTop-C (Franco *et al.*, 2004).

No entanto se o derrame acidental for considerado de média escala em diante, ou seja, contaminações de óleo cru acima de 4% (v/v), seria necessário utilizar estratégias de biorremediação *in situ*.

CAPÍTULO 6
CONCLUSÕES

4. Conclusões

1. No processo de seleção e isolamento de microrganismos degradadores de petróleo, no estuário do Rio Potengi/RN foram obtidas 13 linhagens de bactérias capazes de utilizar petróleo como única fonte de carbono e energia.
2. O consórcio bacteriano isolado do estuário do Rio Potengi/RN apresentou uma boa aclimatação em meio mineral mínimo com petróleo 1% v/v e ainda reduziu a tensão superficial do meio. A utilização desse consórcio como inóculo nos ensaios de biodegradação melhorou a eficiência de degradação de petróleo, mas não a ponto de tornar a degradação efetiva.
3. Quando adotou-se a metodologia do OxiTop-C foi detectado uma faixa que indica biodegradabilidade (1% de petróleo v/v). Concentrações de petróleo acima dessa faixa não atingiram a eficiência mínima recomendada pela OECD 301F que é 60%.
4. Quando adotou-se a metodologia de condutivimetria não foi observado nenhuma faixa que indicasse biodegradabilidade efetiva.
5. Ao monitorar um processo de biodegradabilidade é necessário atentar qual a metodologia será adotada para avaliar o processo de biodegradabilidade, pois para as mesmas condições adotadas diferentes metodologias podem apresentar resultados divergentes.
6. No caso de um derramamento acidental de petróleo, em pequena escala, o ambiente possui potencial de degradar o petróleo, pela atenuação natural, segundo monitoramento realizado pela metodologia OxiTop-C.

7. Os degradadores de petróleo isolados do solo de mangue do estuário do Rio Potengi/RN podem vir a ser utilizados em estratégias de biorremediação desses lugares, no caso de um eventual derramamento de óleo, ou ainda, podem ser empregados no tratamento de resíduos petrolíferos gerados em ambientes salinos, desde que sejam otimizadas as condições dos ensaios de modo que as eficiências de biodegradação atinjam o patamar mínimo sugerido pelas normas.

8. Os resultados deste trabalho mostram a necessidade de se otimizar os ensaios visando melhorar a tendência natural dos microrganismos do solo em decompor hidrocarbonetos do óleo cru acelerando a degradação de hidrocarbonetos de petróleo.

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

Referências bibliográficas

ABNT, NBR 7181-84, Solo: Análise Granulométrica, (1984).

ALEXANDER, M. *Biodegradation and Biorremediation*. 2ed. San Diego: Academic Press, p.453, 1999.

AL-HADHRAMI, M. N.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; FISHER, P. J. Bacterial survival and nalkane degradation within Omani crude oil and a mousse. *Marine Pollution Bull.*, v.30, n.6, p. 403-408, 1995.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20. ed. Washington: American Public Health Association; AWWA; WPCF, 1999, 1569 p.

ANDREOTTOLA, G.; DE OLIVEIRA, E.L; FOLADORI, P.; DALLAGO, L.; PETERLINI, R.; CADONNA, M. Método respirométrico para o monitoramento de processos biológicos. *Eng. Sanitária. Ambiental*. Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 14-23, 2005.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. A. *Tópicos de microbiologia industrial*. São Paulo: Edgard Blücher, v. 2, 1975.

AUSTIN, B.; CALOMIRIS, J. J.; WALKER, J. D.; COLWELL, R. R. Numerical taxonomy and ecology of petroleum-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.34, n.1, p.60-68, 1977.

BAKER, K. H.; HERSON, D.S. *Biorremediation*. New York: McGraw-Hill, 375p, 1994.

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

BARATHI, S.; VASUDEVAN, V. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environ. Int.*, Elmsford, v.26, p.413-416, 2001.

BARROS NETO, B.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. Como fazer experimentos – Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 2 ed. Editora UNICAMP, Campinas, p.401, 2003.

BARTHA, R., BOSSERT, I. The treatment and disposal of petroleum wastes. p. 553 – 578. In: *Petroleum Microbiology* (Atlas, R.M., ed.) New York, Macmillan, 1984.

BERNARDES, R.S.; KLAPWIJK, A. Biological Nutrient Removal in a Sequencing Batch Reactor Treating Domestic Wastewater. *Wat. Sci. Tech.* v.33, n.9, p. 29-38, 1996.

BERNARDO, S.; SOARES, A. A.; MANTOVANI, E. C. *Manual de irrigação*. 8. ed. Viçosa: UFV, 2008. 596 p.

BEZERRA, M. S. *Levantamento e avaliação de critérios para a ampliação de escala da produção de biossurfactantes utilizando melaço como substrato*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN, 101f., 2006.

BRITO, E. C. M; GUYONEAUD, R; GOÑI-URRIZA, M; RANCHOU-PERYRUSE, A; VERBAERE, A; CRAPZ, M. A. C; WASSERMAN, J. C. A; DURAN, R. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay. *Brazil. Research in Microbiology*, v.157, p.752-762, 2006.

BUCK, J. D. (1982), Nonstaining (KOH) Method for Determination of Gram Reactions of Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 44,n. 4, p. 992-993

BURNS, K. A.; GARRITY, S. D.; LEVINGS, S. C. “How many years until mangrove ecosystems recover from catastrophic oil spills?” *Marine Pollution Bulletin*, 26, pp. 249-257, 1993.

BUSHNELL, L. D.; HAAS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *J. Bacteriol.*, v. 41, p. 653-673, 1941.

CANTAGALLO, C; MILANELLI, J. C. C.; BRITO, D. D. Limpeza de ambientes costeiros brasileiros contaminados por petróleo: uma revisão. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, v.2, n.1, p.172, 2007.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/vazamento/impactos/efeitos.asp>> Acessado em maio 2008.

CHAÎNEAU, C. H.; MOREL, J.; DUPONT, J.; BURY, E.; OUDOT, J. Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. *Sci. Total Environ.*, Amsterdam, v.227, n.2-3, p.237-247, 1999.

CHUDOBA, J., ALBOKOVA, J., CECH, J. Determination of kinetic constant of activated sludge microorganisms responsible for degradation of xenobiotics. *Wat. Res.* 23:1431-1438, 1989.

CONEGLIAN, C. M. R.; SILVIERO, A.R.; POLETTI, E. C. C. *et al.* Evaluation of biodegradation in the soil o oil residues from a petroleum refinery. *HOLOS ENVIRONMENT*, v.6. 2006.

CORSON, W. H. *Manual Global de Ecologia: o que você pode fazer a respeito do meio ambiente.* São Paulo: 1996. 413 p.

COSTA, J. G. ; OLIVEIRA, A. M. ; AUGUSTO, F. ; DURRANT, L. R. . Non-Cometabolic PCB Biodegradation: Does It Occur in Nature?. In: In Situ and On-Site Bioremediation (7th International Symposium), 2003, Orlando. In Situ and On-Site Bioremediation, 2003a.

COSTA, J. G.; SERRANO, I. ; DURRANT, L. R. Biodegradação de Ácidos Clorobenzóicos por Bactérias Isoladas de Ambientes Contaminados por PCBs. In: XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2003, Florianópolis. Resumos do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2003b.

COSTA, J. G.; ANDRADE, N. M; GURGEL, Y. K. P; PINHEIRO, F. S. H. T; BARRETO DE OLIVEIRA, M. T; FERNANDES, M. J. B. C; ARAÚJO, M. F. F. A novel solid medium to cultivate petroleum degraders. In: First Brazilian Symposium on Petroleum Biotechnology, 2005, Natal. CD de resumos do First Brazilian Symposium on Petroleum Biotechnology, 2005.

COSTA, A. F. S.; SILVA, J. R. R.; SANTOS, R. C, *et al.* Obtenção de consórcio de microrganismos a partir de amostra de petróleo. Revista Ciências & Tecnologia, v.1. 2007.

CRIVELARO, S. H. R. *Associação de borra oleosa de refinaria de petróleo e vinhaça visando a biodegradação.* Monografia (Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 2005.

CURY, J. C. Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo. Pós graduação em agronomia, Universidade de São Paulo, São Paulo 2004. 95 p.

DA COSTA, J. G. (2004), Degradação de bifenilos policlorados (PCBs) e ácidos clorobenzóicos por bactérias aeróbias isoladas em ambientes contaminados. 106f. *Tese de doutorado*, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

DUKE, N. C. & BURNS., K. A. Fate and effects of oil and dispersed oil on mangrove ecosystems in Australia. Final Report to the Australian Petroleum Production Exploration Association, p.24, 1999.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA (EUA). *How to evaluate alternative cleanup technologies for underground storage tank sites: a guide for corrective action plan reviewers.* (EPA 510-B-94-003 and EPA 510-B-95-007) 1994. Disponível em: < <http://www.epa.gov/swerust1/pubs/tums.htm>>. Acesso em: 10 de julho de 2008.

FLEPS, W. An automatic, continuous flow respirometer, its description and use. *Prog. Wat.Tech.* 7:1-12, 1975.

FRANCO, I. C., M.; BRAGATO,G.; DE NOBILI, M. Microbiological resilience of Soils Contaminated with crude oil. Published by Geoderma, p.14. 2004.

FRAZÃO, E. P. *Caracterização hidrodinâmica e morfo-sedimentar do estuário Potengi e áreas adjacentes: subsídios para controle e recuperação ambiental no caso de derrame de hidrocarboneto.* Dissertação (mestrado). Pós Graduação em Geodinâmica e Geofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN, 2003.

GALLEGO, J. L. *et al* Biodegradation of oil tank bottom sludge using microbial consortium. *Biodegradation.*, v.18, p.269-281. 2007.

GETTER, C. D.; CINTRON, G.; DICKS, B.; LEWIS, R. R.; SENECA, E. D. The recovery and restoration of salt marches and mangrove following an oil spill. In: Cairns, J.; Buikema, A. L.; (ed.). *Restoration of habitats impacted by oils spills.* Boston: Butterworth, p.65-113, 1984.

GHAEMGHAMI, J.; BAKER, R.S.; SIMKINS, S. Outgassing losses of Toluene and M-xylene Evaluated by 14C-based Mass Balances for Laboratory Bioventing Simulations. *Journal of Soil Contamination.* Vol. 7, p.697-708, 1998.

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO. *Conhecer para conservar: as unidades de conservação do Estado de São Paulo*. Secretaria do Estado de Meio Ambiente, São Paulo/SP, 1999.

GRAY, P. H. H & THORNTON, H.G. Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkunde. Abt. II, 73, 74 (1928).

GUERRA, R. C.; ANGELIS, D. F. Classificação e biodegradação de lodo de estações de tratamento de água para descarte em aterro sanitário. Arquivos do Instituto Biológico, v.72, p.87-91, 2005.

HENCKLEIN, F. A. *Estabilização de “landfarming” de refinaria de petróleo e aplicabilidade em solos com baixos teores de carbono*. Trabalho de Conclusão de Curso. Instituto de Biociências, Unesp-Rio Claro, 2005.

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

HUANG, J.Y.C.; CHENG, M.D. Measurements and new applications of oxygen uptake rates in activated sludge processes. *J. Wat. Poll. Cont. Fed.* v.56, p. 259-265, 1984.

INAZAKI, T. H.; PIÃO, A. C. S.; BIDOIA, E. D. Treatment of simulated wastewater containing n-phenyl-nisopropyl-p-phenylenediamine using electrolysis system with Ti/TiRuO₂ electrodes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.47, p.983-994, 2004.

JACQUES, R. J. S.; OKEKE, B. C.; BENTO, F. M. *et al.* Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. *Bioresource Technology* 99, 2637–2643, 2008.

JENKINS, D. *The use of manometric methods in the study of sewage and trade waste waters treatment*. Pergamon Press, New York, USA, 1960.

JØRGENSEN, K. S.; PUUSTINEM, J.; SUORTTI, A. M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environ. Int., Elmsford*, v.107, p.245-254, 2000.

KAAKINEN, J., P. VAHAOJA, KUOKKANEN, T., ROPPOLA, K. Studies on the effects of certain soil properties on the biodegradation of oils determined by the manometric respirometric method. *Journal of Automated Methods & Management in Chemistry*. 2007.

KADRI, M. H., SALEM, A. A., SALMA, M. Oil degrading bacteria in Kuwait Bay. *J. Marine Sci.*, v. 15, p.50-51, 1986.

KARHU, M. K., J; KUOKANEM, T; RÄMÖ, J. Biodegradation of light fuel oils in water and soil as determined by the manometric respirometric method. *Water Air Soil Pollut*, v.197, p.3-14, 2009.

KATAOKA, A. P. A. G.; Biodegradação de resíduos oleosos de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de “landfarming”. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 202f., 2001.

KING, R. B.; LONG, G. M.; SHELDON, J.K. *Practical environmental bioremediation: the field guide*. Boca Raton: Lewis Publishers. p. 179, 1998.

KUOKKANEN, T.; VÄLIMÄKI, I.; PERÄMÄKI, P.*et al.* Biodegradability of forestry hydraulic oils determined by the respirometric BOD_x OxiTop method. *Finnish Chemical Congress*, p. 13-15, 2001.

LAZAR, I.; DOBROTA, S.; VOICU, A.; STEFANESCU, M.; SANDULESCU, L.; PETRISOR, I. G. Microbial degradation of waste hydrocarbons in oily sludge from some Romanian oil fields. *J. Petrol. Sci. Eng.*, Amsterdam, v. 22, n.1-3, p.151-160, 1999.

LI, G.; HUANG, D. N.; LERNER, D. N.; ZHANG, X. Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. *Water Res.*, New York, v.34, n.15, p.3845-3853, 2000.

LI, P. J.; SUN, T. H.; STAGNITTI, F.; ZHANG, C. G.; ZHANG, H. R.; XIONG, X. Z. ALLINSON, G.; MA, X. J.; ALLINSON, M. Field-scale bioremediation of soil contaminated with crude oil. *Environ. Eng. Sci.*, New York, v.19, n.5, p.277-289, 2002.

LOBATO, A. K. C. *Estudo da produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de poços de petróleo*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN, 148f., 2003.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an Alpine glacier skiing area. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.67, n.7, p.3127-3133, 2001.

MARIANO, A. P.; ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M. *Enhancement of Bioremediation Process Applied to Diesel Oil Contaminated Soils*. In: ENPROMER - 2th MERCOSUR CONGRESS ON CHEMICAL ENGINEERING, Mangaratiba - RJ, 2005.

MARIANO, A. P.; CRIVELARO, S. H. R.; ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M. *Use of vinasse, an ethanol distillery waste, as an amendment to bioremediation of diesel oil contaminated soils*. In: XXII INTERAMERICAN CONGRESS OF CHEMICAL ENGINEERING, Buenos Aires, 2006.

MARTINS, C. R. F.; FERREIRA, J. A. P. S.; SIQUEIRA, L. F. G. *et al. Técnica de coloração de Gram*. Ministério da Saúde, Secretaria de saúde, Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS,.67 p. Brasília, 2001.

McGILL, W.B., ROWELL, M.J., WESTLAKE, D.W.S. *Biochemistry, Ecology and Microbiology of Petroleum Components in Soil*. Soil Biochemistry Ed. E.A . Paul and J.N. Ladd, Marcel Dekker, New York,. Vol. 5. 229p., 1981.

MCKEW, B. A.; COULON, F.; OSBORN, A. M.; TIMMIS, K.N.; MCGENITY, T. J. Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK. *Environmental Microbiology*, v.9, n.1, p.165 – 176, 2007.

MELLO, J. M. M. *Biodegradação dos compostos BTEX em um reator com biofilme*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC, Brasil, 2007.

MICHEL, J. Assessment and Recommendations for the Oil Spill Cleanup of Guanabara Bay, Brazil. *Spill Science & Technology Bulletin*, v. 6, n.1, p. 89-96, 2000.

MICHEL, J. *Adverse effects from oil*. Disponível em: http://www.darrp.noaa.gov/library/pdf/IAD_AP-D.PDF. Acesso em: 30 de abril de 2008.

MINHONI, M. T. A.; EIRA, A. F.; CARDOSO, E. J. B. N. Efeitos do N e P sobre a decomposição de diferentes tipos de material orgânico no solo. *Revista brasileira de ciência do solo*. 14: 297-304 p. 1990.

MISHRA, S.; JYOT, J.; KUHAD, R. C.; LAL, B. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.67, n.4, p.1675-1681, 2001.

MOGG, A. O. D. *A preliminary investigation of the significance of salinity in the zonation of species in salt marsh and mangrove swamp associations.* South African Journal Science, v.59, n.3, p. 81-86, 1963.

MONTGOMERY, H.A.C. The determination of biochemical oxygen demand by respirometric methods. *Wat. Res.* v.1, p. 631-662, 1967.

MORAES, L.M. Avaliação da Biodegradabilidade Anaeróbia de Lodos de Esgoto Provenientes de Reatores Anaeróbios Sequenciais. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP Faculdade de Engenharia Agrícola – FEAGRI, 2005.

MORAIS, E. B.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Biodegradation of oil refinery residues using mixed-culture of microorganisms isolated from a landfarming. *Braz. arch. biol. technol.*, Curitiba, v. 52, n. 6, Dec. 2009.

MORITA, R. Y. In Memoriam Dr Claude E. ZoBell. *Mar Ecol. Prog. Ser.* v. 58, p. 1-2, 1989.

MOSCATELLI, M. Salvando o Manguezal. *Eco 21 - Revista Brasileira de Ecologia do século 21.* v. 41, p. 41, 1999.

MUTHUSWAMY, S., B. ARTHUR RAJ, *et al.* Biodegradation of Crude Oil by Individual Bacterial Strains and a Mixed Bacterial Consortium Isolated from Hydrocarbon Contaminated Areas. 36: 92-96 p. 2008.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Revista Química Nova*, v.25, n.5, p.772-776, 2002.

ODUM, W. E.; MC IVOR, C. C.; SMITH, T.J. *The ecology the mangroves of the South Florida: a community profile.* 1982. 144p. OBS Publication, Washington.

PEDROTI, G. I. *Ensaio de biodegradabilidade aeróbia de hidrocarbonetos derivados do petróleo em solos*. Dissertação (mestrado) – Centro Tecnológico, Universidade Federal do Espírito Santo, 119f. 2007.

PELLIZARI, V. H. *Aspectos moleculares e fenotípicos de bactérias isoladas do ambiente e envolvidas na biodegradação de bifenilos policlorados – PCBs*. (Tese de doutorado), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, p.67, 1995.

PELLIZARI, V. H. *Biodegradação de PCBs*. In: Silva, C. M. M. S.; Roque, M. R. A.; Melo, I. S. (Eds.). *Microbiologia ambiental: manual de laboratório*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p.98, 2000.

PETROBRÁS, 2010. *Produção de petróleo no país aumentou em março 2010*. Disponível em: <<http://www.petrobras.com.br/pt/noticias/producao-de-petroleo-no-pais-aumentou-em-marco/>> Acesso em: 22 abril 2010.

PLATEN, H., & WIRTZ, A. *Applications of analysis no.1; Measurement of the respiration activity of soils using the Oxitop® Control measuring system*. Weinheim: WTW. 1999.

QUEIROZ, A.; CELINO, J.. *Impacto Ambiental da Indústria Petrolífera em Manguezais da Região Norte da Baía de todos os Santos (Bahia, Brasil)*. Boletim Paranaense de Geociências, América do Sul, 62 28 01 2010

RAMBELOARISOA, E. RONTANI, J. F. GIUSTI, G., *et al.* Degradation of Crude Oil by a Mixed Population of Bacteria Isolated from Sea Surface Foams. *Mar. Biol.*, v.83, p.69 - 81. 1984.

RISER-ROBERTS, E. *Remediation of petroleum contaminated soils*. Boca Raton: Lewis Publishers. p. 501, 1998.

RICHARD, J.Y.; VOGEL, T.M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. *International Biodeterioration & Biodegradation* 44 (93-100), 1999.

RODELLA, A. A. & SABOYA, L. V. Calibration for conductimetric determination of carbon dioxide. *Soil Biology and Biochemistry*, v.31, n.14, p.2059-2060. 1995.

RODRIGUES, M., I. & IEMMA, A., F. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos. 1ed. Casa do Pão Editora: Campinas/SP. p.326, 2005.

ROSATO, Y. B. *Biodegradação do petróleo*. In: Melo, I. S; Azevedo, J. L. *Microbiologia Ambiental*, 1ed. Hamburg gráfica ed., v1, p.307, 1997.

SADAKA, S. S., T. L. RICHARD, T. D. LOECKE, AND M. LIEBMAN. Determination of compost respiration rates using pressure sensors. *Compost Sci.Util.* 14:124-131, 2006.

SCHERRER, P. & MILLE., G. Biodegradation of crude oil in an experimentally polluted peaty mangrove soil. *Marine Pollution Bulletin*, v.20, p.430-432. 1989.

SHIM, H., B. HWANG, *et al.* Kinetics of BTEX biodegradation by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* under hypoxic conditions. *Biodegradation*, v.16, n.4, p.319-327. 2005.

SCHMIDELL, W. LIMA, U. A.; AQUARONE, E; *et al.* *Biotechnologia Industrial*. São Paulo, v.2. 2001.

SEGNINI, A; SANTOS, L. M.; SILVA, T. L. W. *et al.* Estudo comparativo de métodos para a determinação da concentração de carbono em solos com altos teores de Fe (latossolos). *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 1, 94-97, 2008.

- SHAMSHOOM, S. M.; ZIARA, T. S.; ABDUL-RITHA, A. N.; YACOUN, A. E. Distribution of oil bacteria in the north-west Arabian Gulf. *Mar. Pollut. Bull.*, v. 21, p.38-40,1990.
- SIDERN, S.; LIMA, R. F. S.; SCHWARZBAUER, J.; PETTA, R. A. Anthropogenic heavy metal signatures for the fast growing urban area of Natal (NE-Brazil). *Enviro Geol.* v.52, p. 731-737, 2007.
- SOUZA, C. S.; MIRANDA, R. C. M.; SENA, K. X. F. R.; ARAÚJO, J. M.; CHIAPPETA, A.; SOUSA, M. F. V. Q. *Isolamento e seleção de microrganismos degradadores de derivados de petróleo.* In: 3º CONGRESSO BRASILEIRO DE P&D EM PETRÓLEO E GÁS. Salvador-BA-Brazil, 2005.
- SUGIURA, M. K.; SHIMAUCHI, T.; HARAYAMA, S. Physicochemical Properties and Biodegradability of Crude Oil. *Environ. Sci. Technol.*, v.31, p.45 – 51. 1997.
- TAOK, M., N. COCHET, *et al.* Monitoring of microbial activity in soil using biological oxygen demand measurement and indirect impedancemetry. *European Journal of Soil Biology*, v.43, n.5-6, Nov-Dec, p.335-340. 2007.
- TAUK, S. M. Biodegradação de Resíduos Orgânicos no solo. *Rev. Bras. Geociência*, p.299-301. 1990.
- TEBBUT, T.H.Y.; BERKUN, M. Respirometric determination of BOD. *Wat.Res.* v.10, p. 613-617, 1976.
- THERIEN, N., LE CLAVE, P., JONES, P. A respirometric study of the influence of aliphatic alcohols on activated sludges. *Wat. Res.* 18:905-910, 1984.

TUNDISI, J.; TEIXEIRA, C.; TUNDISI, T. M.; KURNER, M. B.; KINOSHITA, L. Plankton studies in a mangrove environment. IX. Comparatives investigations with coastal oligotrophic waters. *Revista Brasileira de Biologia*, v.38, n.2, p. 301-320, 1978.

URURAHY, A. F. P. Biodegradação de Resíduo Oleoso Proveniente de Refinaria de Petróleo. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 1998.

URURAHY, A. F. P.; MARINS, M. D. M.; VITAL, R. L.; GABARDO, I. T.; PEREIRA, N. Effect of aeration on biodegradation of petroleum waste. *Rev. Microbiology*. . v.29, n.4, 1998.

SINDERN, S. et al. Anthropogenic heavy metal signatures for the fast growing urban area of Natal (NE – Brazil). *Environ. Geol.* v.52. 731-737p, 2007.

SILVA, F. C.; EIRA, P. A.; BARRETO, W. O.; PÉREZ, D. V.; SILVA, C. A. *Manual de métodos de análises químicas para avaliação da fertilidade do solo*. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1998. 56 p.

SILVA, E. P. *Avaliação Preliminar do Potencial de Aplicação da Tecnologia de Biopilhas para a Biorremediação do Solo de Guamaré-RN*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN, 119f. 2004.

SILVA, E. E.; AZEVEDO, P. H. S.; DE-POLLI, H. Determinação da respiração basal (RBS) e quociente metabólico do solo (qCO_2). *Seropédica*, 2007 (Comunicado Técnico 99).

SIVIERO, A. R. *Avaliação da biodegradação em solo de resíduos sólidos de fundição areia fenólica - utilizando o método respirométrico*. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 1999.

SIVIERO, A. R.; CORAUCCI FILHO, B.; ALBUQUERQUE, A. F.; ANGELIS, D. F.; OLIVEIRA, L. F. C.; HONÓRIO, E. F. *O ensaio de respirometria na orientação para aplicação de resíduos industriais no solo*. In: IX SIMPÓSIO LUSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL (SILUBESA), Porto Seguro - BA, 2000.

SLOAN, N.A. *Oil impacts on cold-water Marine Resources: A review relevant to Parks Canada's evolving Marine Mandate*. Parks Canada. National Parks, Occasional paper, n. 11, 1999.

SOUZA, A. M. G. F. *Aplicação de método respirométrico na avaliação do emprego de areia fenólica de fundição, juntamente com solo, na cobertura de aterro sanitário*. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 2000.

SUPRAYOGI, B.; MURRAY, F. A field experiment of the physical and chemical effects of two oils on mangroves. *Environmental and Experimental Botany*. v.42, p.221 – 229, 1999.

VÄHÄOJA, P., T. KUOKKANEN, VALIMAKI, I. VALIMAKI, I VALIMAKI, I. VUOTI, S.; PERÄMÄKI, P. Biodegradabilities of some chain oils in groundwater as determined by the respirometric BOD OxiTop method. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.381, n.2, p.445-450. 2005a.

VÄHÄOJA, P., K. ROPPOLA, VALIMAKI, I.; KUOKKANEN, T. Studies of biodegradability of certain oils in forest soil as determined by the respirometric BOD OxiTop method. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v.85, n.14, Dec, p.1065-1073. 2005b.

VAN STEMPOORT, D. & K. BIGGAR. Potential for bioremediation of petroleum hydrocarbons in groundwater under cold climate conditions: A review. *Cold Regions Science and Technology*, v.53, n.1, p.16-41, 2008.

VASUDEVAN, N.; RAJARAM , P. Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. *Environ. Int.*, Elmsford, v.26, p.409-411, 2001.

VENKATESWARAM, K.; HARAYAMA, S. Sequential enrichment of microbial populations exhibiting enhanced biodegradation of crude oil. *Can. J. Microbiol.*, Vol. 41, pp.767-775, 1995.

VENOSA, A., SUIDAN, M., WRENN, B., STROHMEIER, K., HAINES, J., EBERHART, B., KING, D.H.E. Bioremediation of an experimental oil spill on the shoreline of Delaware Bay. *Environmental Science and Technology* 30, 1764–1775, 1996.

VERNIMMEN, A.P., HENKEN, E.R., LARUB, J.C. A short-term biochemical oxygen demand test. *J. Wat. Poll. Control Fed.* **39**:1006-1020, 1967.

WATTS, J.R.; COREY, J.C.; McLEOD, K.W. Land Application Studies of Industrial Waste Oils. *Environmental Pollution*. v.28, p.165-175, 1982.

WHO – World Health Organization. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 202: Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. Geneva: WHO, 1998.

WTW. *Determination of soil respiration*. Disponível em: <www.wtw.com>. Acesso em: maio de 2008.

YAÑEZ-ARANCIBIA, A. *Ecología de la zona costera: analisis de siete tópicos*. 1986. 189p. A.G.T. Ed. México.

ZOBELL, C. E. A monograph on hydrobacteriology. *Marine microbiology*. Waltham, Mass: Chronica Botanica Company; 1946a.

ZOBELL, C. E. Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriol. Rev.*, v.10, p.1-49, 1946b.

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](#)