

BIODEGRADAÇÃO DE EFLUENTE DE TERMINAIS TERRESTRES DE DISTRIBUIÇÃO COMBUSTÍVEIS

ELIZÂNGELA MAIA E SÁ¹, VICELMA LUIZ CARDOSO²

RESUMO: Neste estudo foram utilizadas uma cultura mista (C_1) e três culturas puras: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* PATC. A cultura C_1 foi obtida de um lago com histórico de contaminação de petróleo. O experimento foi incubado durante 42 dias a temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e agitação de 150 rpm. A cada 48 horas, em câmara asséptica, foi realizada aeração do meio com agitação manual. Para cada condição estudada foram utilizados reatores em triplicata. Os resultados mostraram que todas as culturas foram capazes de crescer e degradar os contaminantes, mas as culturas que apresentaram melhores resultados ao final do processo foram as culturas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e a cultura mista C_1 , com os seguintes valores de concentração celular e remoção de hidrocarbonetos de petróleo (TPH), nesta ordem: 3,6 (g/L) e 77,8% e 4,06 (g/L) e 80,4%, respectivamente. O modelo não estruturado utilizado para o crescimento foi o descrito por Verhulst e Pearl. A degradação dos combustíveis foi descrita pela equação proposta por Ledeking Piret. Os valores obtidos para as velocidades específicas máximas de crescimento mostraram-se muito próximas com 0,901, 0,903, 0,900 e 1,088 d^{-1} para as culturas *Pseudomonas aeruginosa* PATC, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e cultura mista C_1 e os valores de rendimento ($Y_{x/s}$) são 0,425, 0,407, 0,471 e 0,505, respectivamente.

Palavras chave: óleo diesel, gasolina, biodegradação, modelo cinético

(1) Bolsista, (2) Orientadora

ABSTRACT: In this study were used pure and mixed cultures, being they: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* PATC and mixed named C₁. The culture C₁ was obtained from lake with a history of petroleum contamination. The experiments carried out during 42 days the temperature of $30 \pm 1^\circ\text{C}$ and agitation of 150 rpm. At every 48 h was carried aeration under a laminar flow hood with manual agitation. For each condition studied were used reactors in three sets. The results showed that all the cultures were capable to grow and degrade the contaminantes, but the cultures that presented better resulted in the end of the process were the *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 and mixed C₁ cultures, with the following values of cellular concentration and TPH removal, in this order: 3,6 (g/L) and 77,8 % and 4,06 (g/L) and 80,4%, respectively. The model not structuralized used for the growth was described for Verhulst and the Pearl. The degradation of fuels was described for the equation proposal for Ledeking Piret. The values obtained for the maximum specific speeds of growth revealed very next with; 0,901, 0,903, 0,900 and 1,088 d⁻¹ for the *Pseudomonas aeruginosa* PATC, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 and mixed C₁ cultures and the values of the income (Y_{x/s}) were 0,425, 0,407, 0,471 and 0,505, respectively.

Keywords: oil diesel, gasoline, biodegradation, kinetic model.

1-INTRODUÇÃO

O petróleo no estado líquido é uma substância oleosa, inflamável, menos densa que a água, com cheiro característico e cor variando entre o negro e o castanho-claro (TRIGGIA, *et al.*, 2001).

Embora objeto de muitas discussões no passado, hoje tem-se como certa a sua origem orgânica, sendo uma combinação de moléculas de carbono e hidrogênio.

Admite-se que esta origem esteja ligada à decomposição dos seres que compõem o plâncton - organismos em suspensão nas águas doces ou salgadas tais como protozoários, celenterados e outros - causada pela pouca oxigenação e pela ação de bactérias.

Estes seres decompostos foram, ao longo de milhões de anos, se acumulando no fundo dos mares e dos lagos, sendo pressionados pelos movimentos da crosta terrestre e transformaram-se na substância oleosa que é o petróleo. Ao contrário do que se pensa o petróleo não permanece na rocha que foi gerado - a rocha matriz - mas desloca-se até encontrar um terreno apropriado para se concentrar.

Estes terrenos são denominados bacias sedimentares, formadas por camadas ou lençóis porosos de areia, arenitos ou calcários. O petróleo aloja-se ali, ocupando os poros rochosos como forma "lagos". Ele acumula-se, formando jazidas. Ali são encontrados o gás natural, na parte mais alta, e petróleo e água nas mais baixas (CEPETRO, 2007).

O petróleo ainda é na sua maioria, aproximadamente 90%, utilizado como fonte de energia e combustível. O petróleo é a principal fonte energética do mundo, e assim continuará até que tenham exaurido as reservas mundiais (PETROBRÁS, 2002).

A contaminação do ambiente com substâncias tóxicas e perigosas é um dos maiores problemas enfrentados pelo mundo de hoje.

Pelo fato dos campos petrolíferos não serem localizados, necessariamente, próximos dos terminais e refinarias de óleo e gás, é necessário o transporte da produção através de embarcações, caminhões, vagões, ou tubulações (oleodutos e gasodutos) (CEPETRO, 2007).

Vazamentos e derrames acidentais são ocorrências freqüentes durante a exploração, produção, refinamento, transporte e estocagem de petróleo e seus derivados. E a composição destes no meio ambiente geram carga de poluição muitas vezes de difícil degradação. À parte de contaminação acidental de ecossistemas, a vasta

quantidade de lodos de óleo gerado em refinarias de sistemas de separação água e óleo e o acúmulo de sobra de materiais oleosos da parte inferior dos tanques de estocagem de óleo cru é também causa de muitos problemas de contaminação, pelo fato dos processos de tratamento padrões usados para descontaminar o solo e a água subterrânea serem limitados e muitas vezes não são aplicados a estes casos ou por apresentarem efetividade de descontaminação parcial (FERRARI *et al.*, 1996; NICHOLAS, 1997; VASUDEVAN e ROJOVAM, 2001).

As estratégias de tratamento biológico a serem implementadas no tratamento de efluentes líquidos contaminados por gasolina e óleo diesel devem levar em conta a quantidade de contaminante, a capacidades de biodegradação da cultura a ser utilizada e o tipo de tratamento biológico aeróbio ou anaeróbio. A seleção da tecnologia mais adequada a ser empregada será feita em função da melhor relação custo/eficiência e tempo de tratamento (CUNHA *et al.*, 2002).

No Brasil a infra-estrutura para distribuição de petróleo, gasolina, óleo diesel e álcool etílico é composto por: 22 terminais terrestres, dos quais um destes se encontra na cidade de Uberlândia, 30 terminais aquaviários, 6 centros coletores de álcool, 13 refinarias e presença de oleodutos pelo território brasileiro (ANP, 2004).

Em um derramamento de gasolina e ou óleo diesel, uma das principais preocupações é a contaminação de aquíferos que possam ser usados como fonte de abastecimento de água para consumo humano. Por serem pouco solúveis em água, esses hidrocarbonetos derramados, contendo mais de uma centena de componentes, inicialmente estarão presente no subsolo como líquido de fase não aquosa (NAPL). Em contato com a água subterrânea esses hidrocarbonetos se dissolvem parcialmente. Os hidrocarbonetos monoaromáticos: benzeno, tolueno, etilbenzeno e os três xilenos orto, meta e para, chamados compostos BTEX, são os contaminantes que primeiro irão atingir o lençol freático (CORSEUL, 2000). Estes contaminantes são considerados substâncias perigosas por atuarem no sistema nervoso central e por causarem leucemia em exposições crônicas. Dentre os BTEX, o benzeno é considerado o mais tóxico com padrão de potabilidade de 10 µg/L, segundo as normas do Ministério da Saúde.

Nos terminais de distribuição terrestre são abastecidos diariamente inúmeros caminhões de transporte de gasolina e óleo diesel para outras regiões do país. Durante o procedimento de carregamento destes combustíveis muitas vezes ocorre o derrame destes no pátio de abastecimento. Em alguns casos as águas de lavagens dos pátios e da

parte externa dos caminhões, passam por canaletas e são lançadas em lagoas situadas na parte do fundo destes terminais como efluente gerado.

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

2-OBJETIVOS

Os objetivos desse estudo são: construir um reator batelada em escala ampliada para realização dos demais experimentos; realizar a montagem do sistema experimental e realizar testes iniciais com a unidade visando verificar se o funcionamento da mesma encontra-se adequado e se existe algum vazamento; ampliar o volume de microrganismos para atender o reator em escala ampliada.

3-REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1-O Petróleo

O petróleo é considerado uma fonte de energia não renovável, de origem fóssil e é matéria prima da indústria petrolífera e petroquímica. O petróleo bruto possui em sua composição uma cadeia de hidrocarbonetos, cujas frações leves formam os gases e as frações pesadas o óleo cru. A distribuição destes percentuais de hidrocarbonetos é que define os diversos tipos de petróleo existentes no mundo (AMBIENTE BRASIL, 2005). O petróleo bruto extraído pode apresentar a seguinte composição mostrada pela Tabela 3.1:

Tabela 3.1 – Composição do Petróleo Bruto

Compostos	Porcentagens (%)
Carbono	81 a 88%
Hidrogênio	10 a 14%
Oxigênio	0,01 a 1,2%
Nitrogênio	0,002 a 1,7%
Enxofre	0,01 a 5,0%

Fonte: Petrobrás – Petróleo e suas Origens, 2005.

O parque brasileiro de refino é constituído por 14 refinarias, 12 pertencentes à Petrobrás e duas privadas, Refinaria de Petróleo de Manguinhos e Refinaria de Petróleo Ipiranga. As refinarias estão concentradas na região Sudeste, sendo quatro localizadas em São Paulo, duas no Rio de Janeiro e uma em Minas Gerais. Na Região Sul, estão localizadas mais quatro refinarias e no Norte e Nordeste localizam-se outras três. A capacidade de refino está mais concentrada na proximidade dos centros consumidores. As refinarias brasileiras, ao longo dos últimos anos, aumentaram o volume de petróleo nacional processado em suas unidades, alcançando 75% em 2001.

Nas refinarias, o petróleo é submetido a diversos processos pelos quais se obtém grande diversidade de derivados: gás liquefeito de petróleo (GLP) ou gás de cozinha, gasolina, naftas, óleo diesel, gasóleos, querosenes de aviação e de iluminação, óleo combustível, asfalto, lubrificantes, solventes, parafinas, coque de petróleo e resíduos. As parcelas dos derivados produzidos em determinada refinaria variam de acordo com o tipo de petróleo processado. Assim, petróleos mais leves proporcionam maior quantidade de gasolina, GLP e naftas, que são produtos leves. Já os petróleos pesados resultam em maiores volumes de óleos combustíveis e asfaltos. No meio da cadeia estão os derivados médios, como o óleo diesel e querosene (PETROBRÁS, 2005).

O processamento do petróleo começa pela destilação, que permite a separação de diversas correntes, como GLP, nafta, querosenes, óleo diesel, gasóleos e óleo combustível. Algumas dessas correntes sofrem um processamento secundário para conversão em outros produtos. Outras passam por um tratamento para melhoria de suas características e atendimento das necessidades do mercado consumidor (PETROBRÁS, 2005)

3.2-Gasolina

Até 1910, a gasolina era obtida pela destilação do petróleo bruto, processo que fornecia baixa octanagem. Nessa época começaram a ser desenvolvidos os processos de craqueamento, capazes de produzir gasolinas com maiores índices de octanas e maior economia de óleo cru. Esse desenvolvimento técnico foi estimulado pela expansão da frota mundial de automóveis. Assim, somente por volta da metade da década de 1910 o querosene para iluminação foi ultrapassado pela gasolina nas vendas das companhias de petróleo.

As propriedades das gasolinas comerciais são influenciadas pelos processos de refinação utilizados e também pela natureza dos petróleos que as originam. A gasolina automotiva não é uma substância de composição simples, é formada por uma mistura complexa de hidrocarbonetos que pode variar desde que atenda uma especificação determinada. Essa especificação pode variar de um país para o outro. Logo, quando se fala em gasolina deve-se ter em mente uma mistura e não uma única substância como, por exemplo, o álcool que consiste basicamente de etanol como pequena porcentagem de água. A gasolina é um combustível constituído basicamente por hidrocarbonetos (compostos orgânicos que contêm átomos de carbono e hidrogênio) e, em menor quantidade, por substâncias cuja fórmula química contêm átomos de enxofre, nitrogênio, metais, oxigênio, etc.

Os hidrocarbonetos componentes da gasolina são membros das séries parafínica, olefínica, naftênica e aromática, e suas proporções relativas dependem dos petróleos e processos de produção utilizados. Atualmente, as gasolinas que saem das refinarias dotadas de vários processos de refinação, são constituídas de misturas criteriosamente balanceadas desses hidrocarbonetos, visando atender aos requisitos de desempenho nos motores. Uma gasolina para consumo é constituída pela mistura de dois, três ou mais componentes obtidos nesses diferentes processos de refinação, podendo ainda receber a adição de outros compostos como o tolueno ou xilenos, álcoois como o metanol ou etanol anidros, além de outros aditivos especiais com finalidades específicas, entre os quais podemos citar antioxidantes, antidetonantes, detergentes, anticongelantes, desativadores de metal, corantes, etc (PONTES, 2002).

Em relação a composição da gasolina os compostos aromáticos (BTX – benzeno, tolueno e xileno e outros alquilbenzenos) perfazem cerca de 10 a 59% da gasolina (massa/massa), enquanto que os hidrocarbonetos alifáticos compreendem 41 a

62%. Os hidrocarbonetos aromáticos são geralmente mais tóxicos que os compostos alifáticos com o mesmo número de carbonos e possuem maior mobilidade em água, em função da sua solubilidade em água ser da ordem de 3 a 5 vezes maior, como mostra a Tabela 3.2 (TIBURTIUS, *et al.*, 2004).

Tabela 3.2 – Parâmetros físico-químicos de importância para a mobilidade de hidrocarbonetos.

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

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

As especificações das gasolinas são definidas pela Agência Nacional de Petróleo através da Portaria ANP n.º 309 de 27/12/2001 e Regulamento Técnico ANP n.º 05/2001. O percentual de álcool atualmente adicionado à gasolina é definido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Portaria MAPA n.º 266 de 21/06/2002.

3.3-Óleo Diesel

O óleo diesel é um combustível de composição complexa, constituído basicamente por hidrocarbonetos parafínicos, olefínicos e aromáticos e, em menor quantidade, por substâncias cuja fórmula química contém átomos de enxofre, nitrogênio, metais, oxigênio, etc. Estes hidrocarbonetos são formados por moléculas constituídas de 8 a 40 átomos de carbono, normalmente, sendo, portanto mais pesados do que aqueles que compõe a gasolina. O óleo diesel é formulado através da mistura de diversas correntes como gasóleos, nafta pesada, diesel leve e diesel pesado, provenientes das diversas etapas de processamento do petróleo bruto (REFAP, 2005).

É um produto inflamável, medianamente tóxico, volátil, límpido, isento de material em suspensão e com odor forte e característico (PETROBRÁS, 2005).

A partir do refino do petróleo obtém-se, pelo processo inicial de destilação atmosférica, entre outras, as frações de óleo diesel leve e pesado, que são básicas para a

produção de óleo diesel. A elas podem ser agregadas outras frações como a nafta, o querosene e o gasóleo leve de vácuo resultando no produto conhecido como óleo diesel. A incorporação destas frações e de outras obtidas por outros processos de refinação, dependerá da demanda global de derivados de petróleo pelo mercado consumidor (PETROBRÁS, 2005).

O número de cetano de um óleo combustível corresponde ao percentual volumétrico de cetano e alifametilnaftaleno contido neste óleo. Quando maior for o número de cetano, menor será o retardo de ignição e por conseguinte melhor será sua capacidade de incendiar-se. Um óleo diesel comumente empregado em motores térmicos tem o número de cetano compreendido entre 40 e 60. Os melhores óleos diesel são encontrados nas frações perto do querosene. Dependendo da constituição do óleo combustível, pode-se elevar até 13 pontos o “NC” (número de cetano). Na Tabela 3.4 são apresentadas as características de um óleo combustível leve e pesado (DEMEC, 2005).

Tabela 3.4 – Características de um óleo combustível leve e pesado.

Características	Leve	Pesado
Número de cetano	50 – 60	30-45
Água	Zero	0 – 0,50
Ponto de anilina °C	65	54
Ponto de congelamento °C	-34	-18
Viscosidade centistoke a 37,7 °C	1,8	4,2
Ponto de inflamabilidade	57,5	85
Ponto de ebulição	174	198
Grau <i>api</i>	42	28

Fonte: (DEMEC, 2005)

3.4-Crescimento de Microrganismos

O crescimento em uma cultura microbiana normalmente significa um crescimento no número total de células devido à reprodução dos organismos individuais na cultura. Dois fenômenos ocorrem (LIVRONLINE, 2006): (1) o crescimento, ou reprodução das células individualmente; (2) crescimento ou aumento na população de uma cultura microbiana.

3.4.1-A Curva de Crescimento Microbiano

Após a inoculação do meio de cultura, devidamente favorável ao desenvolvimento do microrganismo em estudo, sob condições operacionais controladas e adequadas de temperatura e agitação, observa-se um comportamento nos valores da concentração celular, conforme indica a Tabela 3.5 (SCHIMIDELL *et al.*, 2001).

Tabela 3.5 – Fases no crescimento microbiano

Fase de crescimento	Taxa de crescimento	Características
Lag	Zero	Nenhum aumento no número de células, aumento de tamanho, são sintetizadas novas enzimas para as células se adaptarem ao novo meio.
Exponencial ou log	Máxima ou constante	Condições de crescimento balanceado; as células são uniformes em termos de composição química e atividades metabólicas e fisiológicas. Pico da atividade e eficiência fisiológica.
Estacionária	Zero	Acúmulo de produtos metabólicos tóxicos e/ou exaustão de nutrientes. Algumas células morrem, outras crescem e se dividem. O número de células viáveis diminui.
Morte	Negativa	Acúmulo adicional de produtos metabólicos inibitórios. A taxa de morte é acelerada; o número de células diminui de modo exponencial. Tipicamente todas as células morrem em dias ou meses.

3.5-Microrganismos Envolvidos no Processo de Biodegradação

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos. Apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 5% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos. É importante ressaltar que grande parte dos avanços da biotecnologia moderna e da agricultura, é derivada de descobertas recentes nas áreas de genética, fisiologia e metabolismo de microrganismos. A diversidade genética e metabólica dos microrganismos tem sido explorada há muitos anos visando à obtenção de produtos biotecnológicos, tais como a produção de antibióticos (estreptomicina, penicilina, etc.), de alimentos (cogumelos, etc.), processamento de alimentos (queijo, iogurte, vinagre,

etc.), bebidas alcoólicas (vinho, cerveja, etc.), ácidos orgânicos (cítrico e fumárico), álcoois (etanol), alimentos fermentados (molho de soja), tratamento e/ou remediação de resíduos, e, na agricultura, na fertilização de solos (fixação biológica de nitrogênio) e controle biológico de pragas e doenças (controle de lagarta da soja, da cigarrinha da cana de açúcar, de fitopatógenos como *Rhizoctonia* e outros) (COUTINHO *et al.*, 1998).

A capacidade microbiana de degradar alguns compostos orgânicos também ocorre em locais contaminados, mesmo que os componentes sejam completamente xenobióticos e nenhuma rota metabólica de degradação natural exista.

3.5.1-Produção de Biosurfactantes

Os microrganismos como bactérias e fungos quando estimulados são capazes de produzir certas substâncias que agem como detergentes naturais (biosurfactantes). Entre estes microrganismos estão bactérias dos gêneros *Cândida*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e outros. Os biosurfactantes possibilitam a mistura (emulsão) de compostos como água e óleo, o que normalmente não acontece devido à alta tensão de superfície da água. O termo surfactante foi criado a partir de partes da expressão inglesa *surface active agents* – agentes ativos na superfície.

4-MATERIAIS E MÉTODOS

4.1-Matéria-Prima: Efluente Contaminado

Utilizou-se como única fonte de carbono e energia o efluente contaminado gerado em terminais terrestres de distribuição de óleo diesel e gasolina. O efluente era coletado periodicamente em uma lagoa que situava nos fundos do terminal, conforme mostra a Figura 4.1, e armazenado em galões de 50 litros, sob refrigeração a 4°C. Durante todo o desenvolvimento do trabalho foi utilizada a mesma amostra para cada etapa do estudo visando evitar qualquer variação de composição e concentração da matéria-prima.



Figura 4.1 – Foto da lagoa mostrando a canaleta e o bocal de descarga do efluente na mesma.

4.2-Fonte dos Microrganismos Empregados

Foram utilizadas quatro culturas sendo uma cultura mista (C_1) e três culturas puras de linhagens conhecidas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Pseudomonas aeruginosa* PATC, as duas primeiras culturas foram obtidas de um banco de cultura da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ) e mantido em gelose nutriente (DIFCO 0003) inclinado sob refrigeração a 4°C, para diminuir o metabolismo da bactéria, até futura necessidade de uso.

A cultura mista C_1 foi isolada do solo contaminado de uma lagoa que recebe água de lavagem do pátio do terminal onde há derrames rotineiros de gasolina e óleo diesel. A cultura *Pseudomonas aeruginosa* PATC foi isolada do mesmo solo da lagoa que forneceu a cultura mista C_1 .

4.3-Meio de Cultura

Os meios de cultura empregados neste trabalho são descritos a seguir:

4.3.1-Meio de Cultura para a Manutenção das Culturas Puras

As bactérias foram conservadas através de repiques mensais, em tubos de ensaio contendo gelose nutriente inclinada. Após incubação por 48 horas em estufa a 30°C, as culturas foram mantidas sob refrigeração a 4°C, para diminuir o metabolismo celular, até futura necessidade de uso.

4.3.2-Manutenção das Culturas Mistas

As culturas mistas foram mantidas a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ no meio sintético, após crescimento a temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas, conforme descrito por Vieira *et al.* (2006).

4.3.3-Meio de Cultura Utilizado no Isolamento

Para o isolamento das culturas bacterianas foram utilizados o meio M₂ proposto por Cunha e Leite (2000), cuja composição está apresentada na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Meio de cultivo utilizado no isolamento dos microrganismos.

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

4.3.4-Meio de Cultura para o Crescimento dos Microrganismos – Meio Sintético para Prévia Adaptação

Os microrganismos foram cultivados em meio inorgânico adicionado da concentração da mistura óleo diesel e gasolina de 4% de combustíveis, sendo 2% de gasolina e 2% de óleo diesel em volume/volume (constituindo um efluente sintético), cuja composição está relacionada na Tabela 4.2.

O pH do meio foi ajustado na faixa 7-7,2 com solução de NaOH e HCL a 0,1N e posteriormente esterilizado a 121°C durante 20 min, antes da adição da mistura óleo diesel e gasolina.

Tabela 4.2 – Composição do meio inorgânico para adaptação prévia.

Componentes	g/L
K ₂ HPO ₄	0,5
KHPO ₄	1,4
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02
MnSO ₄ .H ₂ O	0,03
Extrato de levedo	2,0
NH ₄ NO ₃	1,0

4.4-Adaptação das Culturas ao Efluente Sintético

Após a obtenção da cultura mista C₁ em meio líquido, 10 mL da respectiva cultura crescida (inóculo) foi adicionada a erlenmeyers de 500 mL, contendo 100 mL de meio sintético. A densidade microbiana foi aumentada, devido a repiques sucessivos realizados a cada 48 horas durante 12 dias a 30 ± 1°C e 150 rpm. Os inóculos das culturas puras foram obtidos através de três alçadas da cultura estoque cultivadas em 100 mL de meio sintético (o mesmo meio utilizado para cultura mista) nas mesmas condições operacionais e adotando-se o mesmo procedimento experimental citado anteriormente.

4.5-Characterização do Efluente

As seguintes análises foram realizadas para a caracterização do efluente: hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH); óleos ou graxas totais pelo método

gravimétrico modificado (Macedo, 2003); demanda química de oxigênio (DQO) foi realizada segundo a metodologia de refluxo fechado pelo método titulométrico descrita no Standard Methods (APHA, 1999); demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (STANDARD METHODS, 1998); nitrogênio total pelo método *kjeldahl* e fósforo total pelo método colorimétrico por redução com ácido ascórbico. Caracterização em relação ao carbono orgânico total foi realizada através da técnica de combustão catalítica a alta temperatura.

4.6-Adaptação das Culturas ao Efluente

Ao efluente contaminado foram adicionadas as culturas puras e mista e as seguintes substâncias em g/L: 1,2 fertilizante nitrato de amônio; 4,8 superfosfato simples e 2 de extrato de levedo. O pH foi ajustado para 7,0 e a densidade microbiana foi aumentada através de repiques sucessivos a cada 96 horas durante 24 dias. Nesta etapa, foi acompanhado o resultado de crescimento celular para as culturas estudadas.

Os principais microrganismos presentes na cultura C₁ depois de adaptada ao efluente foram devidamente isolados e identificados.

4.7-Estudo da Cinética de Biodegradação de Efluente Contaminado Empregado Culturas Puras e Mista

Os experimentos foram desenvolvidos utilizando-se efluente de terminal de combustível com concentração de TPH inicial de 8960 mg/L.

Os experimentos foram realizados em erlenmeyer de 500 mL, tampados com rolha de borracha, para evitar a perda dos hidrocarbonetos mais leves. Aos reatores contendo 100 mL de efluente foi adicionado fertilizantes e o extrato de levedo e foram inoculados com uma concentração de inóculo em peso úmido correspondente a aproximadamente 0,3 g/L de massa seca das respectivas culturas crescidas a temperatura ambiente por 96 horas sob agitação de 150 rpm.

O sistema foi incubado durante 56 dias a temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e agitação de 150 rpm. Com intervalo de 48 horas em fluxo laminar foi realizada aeração do meio através da retirada da tampa de borracha e ligeira agitação manual por 3 minutos.

Para determinar o potencial de biodegradação dos contaminantes foram realizadas análises de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) e crescimento celular.

As amostras dos reatores foram retiradas diariamente até o 7^o dia e a pos este tempo a cada 7 dias de processo para as respectivas análises. Para cada condição estudada foram utilizados reatores em triplicata e a cada dia de operação um reator era sacrificado para realização das análises de TPH e crescimento celular. Para todos os ensaios foram realizados testes de controle (sem adição de microrganismos) visando determinar as perdas abióticas.

4.7.1-Modelagem Matemática

Balanços de massa para o crescimento celular e consumo de substrato foram realizados nos reatores bateladas para estabelecer a formulação matemática. A formulação utilizada para a cinética do crescimento celular foi o modelo logístico não estruturado descrito por Verhulst-Pearl apud Bailey (1986), (Eq. 4.1) e para degradação dos combustíveis dos combustíveis a equação proposta por Luedeking Piret (1959), (Eq. 4.2)

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} \quad (4.1)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} X \left(1 - \frac{X}{X^*} \right) \quad (4.2)$$

Sendo:

μ_{\max} - Taxa máxima específica de crescimento [T^{-1}];

X^* - Parâmetro de crescimento celular estacionário [ML^{-3}];

S – Concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo – TPH - [ML^{-3}];

X - Concentração de crescimento celular [ML^{-3}];

$Y_{x/s}$ - Rendimento do crescimento celular em relação a degradação de TPH [$M X.MS^{-1}$].

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

4.8-Estudo da Substituição da Adição de Extrato de Levedo por Levedura Autolizada Cervejeira Empregando as Culturas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e Mista C₁.

Após a etapa do estudo da cinética de biodegradação, obteve-se melhores resultados de crescimento e biodegradação do efluente quando empregada às culturas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e a mista C₁. Por este motivo, nesta etapa foi realizado o estudo da substituição da adição de extrato de levedo por levedura cervejeira autolizada.

Os experimentos foram desenvolvidos utilizando-se efluente de terminal de combustível após a adição dos fertilizantes na mesma concentração utilizada no estudo da cinética de redução de TPH e levedura cervejeira residual nas seguintes concentrações: 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0g/L.

Os experimentos foram realizados em erlenmeyer de 500 mL, tampados com rolha de borracha. Os reatores contendo 100 mL de meio foram inoculados com 0,3 g/L das respectivas culturas crescidas em efluente a temperatura ambiente por 24 horas.

O sistema foi incubado durante 14 dias sob agitação a 150 rpm. Com intervalo de 48 horas em câmara asséptica foi realizado aeração do meio através da retirada da tampa de borracha e ligeira agitação manual (3 minutos).

Para determinar a melhor concentração de levedura de cervejeira, que proporciona-se uma remoção de TPH próxima à encontrada quando se utilizou o extrato de levedo foram coletadas amostras nos reatores para a realização das análises de TPH e crescimento celular.

Para as análises de TPH foram retiradas amostras em 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 14 dias de processo. Para cada dia de amostragem um reator foi sacrificado, ou seja, durante os 14 dias foram sacrificados 9 reatores e suas réplicas. Em relação ao crescimento celular, foi realizada a técnica de massa seca no início e no final do processo. Neste caso, os reatores dos quais se retiraram às amostras também foram sacrificados.

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

4.9-Análises Quantitativas

4.9.1-Demanda Química de Oxigênio – DQO

A análise de Demanda Química de Oxigênio (DQO) foi realizada através do método de oxidação por dicromato de potássio em meio ácido, empregando o procedimento descrito no STANDARD METHODS, 5210 D1995.

4.9.2-Demanda Bioquímica de Oxigênio – DBO

Para determinação da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) foi utilizado o Método de incubação (20°C, cinco dias) – (SANDARD METHODS, 1998).

4.9.3-Determinação de Fósforo Total

O fósforo foi determinado pelo Método colorimétrico por redução com ácido ascórbico, que cobre a determinação de formas específicas de compostos fosforados, em águas e águas de despejos. O método é usado numa faixa de 0,01 mg/L a 0,5 mg/L de fósforo. Esta faixa aplica-se a medidas fotométricas efetuadas a 880 nm em células de 20 mm a 25 mm. Altas concentrações também podem ser determinadas por diluição da amostra ou pela medição da cor em 625 nm a 650 nm.

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

4.9.4-Determinação de Nitrogênio KJELDAHL TOTAL

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

A amostra é aquecida em presença de ácido sulfúrico concentrado, sulfato de potássio e sulfato de cobre, evaporada até o aparecimento de fumaças de SO_3 e total decomposição da matéria orgânica. O resíduo era alcalinizado e passava pela destilação da amônia presente e posterior titulação.

4.9.5-Carbono Orgânico Total

A metodologia e as condições operacionais empregadas na análise de carbono orgânico total (TOC) estão de acordo com a STANDARD METHODS (1998), gentilmente realizada pela empresa CARGIL AGRÍCOLA S/A Uberlândia-MG.

4.9.6-Determinação de Hidrocarboneto Total de Petróleo (TPH)

A dosagem de TPH foi feita utilizando-se o solvente S-316 (fluorocarbono) para extrair a mistura de combustíveis da amostra e um espectrofotômetro de infravermelho (equipamento OCMA – 350) da marca Horiba, no qual é realizada a leitura da amostra. O S-316 é um solvente de propriedade da Horiba usado para a extração de hidrocarbonetos de petróleo em amostras de solo e líquido.

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

Durante a análise, absorvâncias associadas com as configurações CH, CH_2 e CH_3 são medidas em um comprimento de onda próximo de $3,4 \mu\text{m}$. O equipamento opera numa faixa de comprimento de onda de $3,8$ a $3,5 \mu\text{m}$, sendo capaz de medir as configurações CH ($3,8 \mu\text{m}$), CH_2 ($3,42 \mu\text{m}$) e CH_3 ($3,50 \mu\text{m}$) e possui o software para converter as medições em teor total de hidrocarboneto (U. S. EPA, 2001).

Para as análises foram utilizados 10 mL de amostra de efluente e adicionado ácido clorídrico para levar o pH para valor igual ou inferior a 2,0. Posteriormente, os hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) foram extraídos utilizando o solvente S-316. A leitura foi feita no equipamento OCMA-350 da Horiba devidamente calibrado com a solução span – solução preparada a partir de um concentração conhecida do óleo de

calibração (óleo padrão tipo B, fornecido pelo fabricante do instrumento) dissolvida no solvente do teste (S-316).

4.9.7-Quantificação do Crescimento Celular

O crescimento celular das culturas estudadas ao longo do processo foi avaliado pela massa seca. Uma amostra do meio foi centrifugada, as células precipitadas foram lavadas e secadas em estufa a 90°C até peso constante.

5-RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1-Characterização do Efluente

5.1.1-Characterização Físico-Química do Efluente

Os resultados de caracterização do efluente antes e após a correção de nutrientes (nitrogênio e fósforo) estão apresentados na Tabela 5.1, onde se observa que o efluente apresenta valores relativamente elevados de demanda química de oxigênio (DQO) e hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH), indicando a elevada carga orgânica apresentada pelo efluente. Pode se constatar, as baixas concentrações de nitrogênio e fósforo no efluente *in natura*, sendo necessária a adição de nutrientes para possibilitar o processo de biodegradação.

Tabela 5.1 – Caracterização do efluente antes e após a correção nas concentrações de nutrientes (adicionado de fertilizante e extrato de levedo).

Variáveis Medidas	Resultados Antes da Correção de Nutrientes (valor mín – valor máx)	Resultados Após de Nutrientes (valor mín – valor máx)
TPH (mg/L)	7050 – 8960	7050 – 8960
DBO _{solúvel} (mg/L)	1200 – 1500	1300 – 1750
Óleos ou Graxas (mg/L)	7400 – 11196	7400 – 11196
DQO _{solúvel} (mg/L)	7100 – 9500	7900 – 10400
Nitrogênio total (mg/L)	50 – 70	600
Nitrogênio amoniacal (mg/L)	10 – 15	260
Fósforo total (mg/L)	20	400
pH	6,5 – 6,8	6,7 – 6,8

5.2 - Caracterização microbiológica das amostras de solo contaminada

Na Tabela 5.2 são mostrados os resultados da caracterização microbiológica das amostras coletadas no solo da lagoa, que recebe efluente contaminado com óleo diesel e gasolina. As culturas mistas obtidas destes locais foram adaptadas ao efluente sintético contendo óleo diesel e gasolina. O critério de escolha das fontes destas culturas teve como objetivo verificar o desempenho das culturas mistas de ambiente contaminado com derivados de petróleo (solo da lagoa contaminada). Foram coletadas amostras na superfície do solo (C₁) e a aproximadamente 30 cm de profundidade no solo (C₂) da lagoa contaminada.

Tabela 5.2 - Quantificação microbiológica dos solos utilizados como fontes das culturas mistas utilizadas na biodegradação dos poluentes presentes no efluente.

Amostras	Bactérias Aeróbias (UFC/g de solo)	Fungos (UFC/g de solo)	Bactérias Anaeróbias (NMP/g de solo)	BRS (NMP/g de solo)
C ₁	$3,8 \pm 0,1 \times 10^7$	$2,4 \pm 0,05 \times 10^5$	$2,4 \pm 0,1 \times 10^4$	$1,1 \pm 0,2 \times 10^3$
C ₂	$5,2 \pm 0,08 \times 10^5$	$1,3 \pm 0,15 \times 10^4$	$7,7 \pm 0,3 \times 10^{10}$	$2,7 \pm 0,07 \times 10^7$

Pela análise microbiológica verifica-se que a concentração de bactérias aeróbias e de fungos coletadas no solo da superfície da lagoa (culturas C₁) foram superiores às coletadas em profundidade. Como o processo a ser estudado será realizado com aeração intermitente optou por trabalhar com essa cultura.

MORGAN e WATKINSON (1989) encontraram a uma profundidade de 0-8 cm da superfície, quantidades de bactérias aeróbias de $2,8 \times 10^7$ UFC/ g de solo e de fungos de $2,4 \times 10^5$ UFC/g de solo, em solos que não sofreram contaminação com hidrocarbonetos. RIBEIRO (2003) coletou o solo virgem, próximo da lagoa contaminada com óleo diesel e gasolina (culturas C₁ e C₂) e obteve uma relevante população de bactérias aeróbias, $1,10 \times 10^6$ células/g solo. Este resultado foi superior ao encontrado em outros solos, tais como: $4,0 \times 10^4$ células /g solo para o solo arenoso (OLIVEIRA, 2001) e de $2,7 \times 10^5$ ufc/g solo para o solo argilo arenoso (TRINDADE, 2002). A concentração de fungos nestes solos foi de $7,2 \times 10^3$ ufc/g solo, o que foi considerada elevada.

5.3-Adaptação de Culturas Puras e Mista ao Efluente

As culturas puras (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Pseudomonas aeruginosa* isolada PATC) e mista C₁ utilizada neste trabalho foram inicialmente adaptadas, conforme descrito na seção 4.4. Este procedimento visava adaptar as culturas mencionadas ao efluente contaminado por óleo diesel e gasolina (com correção nas concentrações de nitrogênio e fósforo e suplementado com extrato de levedo), para assim selecionar os microrganismos capacitados e com maior potencial metabólico em biodegradar as frações de hidrocarbonetos constituintes da mistura óleo diesel e gasolina.

A Figura 5.1 o crescimento das culturas microbianas em efluente natural com correção nas concentrações de nitrogênio e fósforo. O crescimento foi observado pela quantificação microbiológica empregando a técnica de peso seco, ao final de cada cultivo sucessivo.

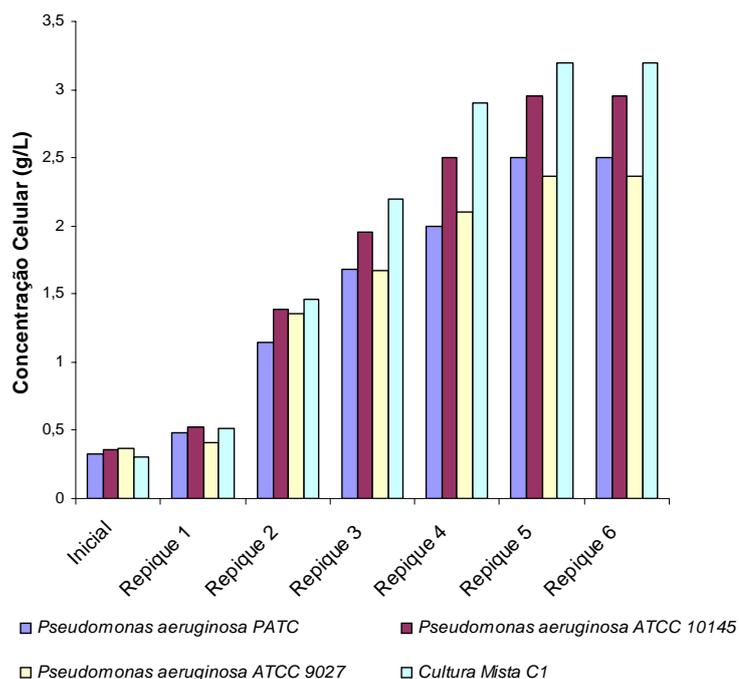


Figura 5.1 – Adaptação das culturas em efluente

Por meio da Figura 5.1, observa-se que todos os microrganismos estudados apresentaram crescimento significativo entre cada repique sucessivo, mostrando que os repiques das culturas foram importantes para adaptá-las ao meio em questão.

Comparando o desempenho entre as culturas estudadas, a cultura C₁ foi a que apresentou maior crescimento entre cada repique. O que provavelmente, está relacionado ao fato da cultura esta ser advinda de local com historio de contaminação por derivados de petróleo, onde provavelmente sofreu uma pré-adaptação.

5.4-Identificação da Cultura Mista C₁

Na identificação da cultura C₁, foram isolados 6 membros pertencentes a esta cultura dos seis membros isolados 4 foram identificados, sendo eles: *Pseudomonas sp.*, *Serratia sp.*, *Klebsiella sp* e *Bacillus sp.*

Nota-se que os principais gêneros de microrganismos que compõem a cultura mista C₁ são facultativos, sugerindo que a pequena aeração (3 minutos) em intervalos de 48 h favoreceu o crescimento de microrganismos com

metabolismo facultativo. Por outro lado, os gêneros *Pseudomonas*, *Serratia* e *Bacillus* são produtores de biosurfactantes e segundo relatado por PRUTHI e CAMEOTRA (1997), a boa performance destas culturas na biodegradação de hidrocarbonetos está relacionada, em muitos casos, à produção de biosurfactantes (moléculas anfipáticas que reduzem a tensão superficial do meio), facilitando a biodisponibilidade dos compostos às bactérias.

5.5-Cinética de Biodegradação

Os dados obtidos de concentração de TPH e suas remoções estão apresentados nos gráficos das Figuras 5.2 e 5.3 e na Tabela 4.4 ao longo dos 56 dias de processo.

Observando os gráficos das Figuras 5.2 e 5.3 constata-se que os microrganismos estudados *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e cultura mista C₁, foram eficazes na degradação dos contaminantes presentes no efluente, promovendo remoções com valores superiores a 70% decorridos 7 dias de processo. No gráfico da Figura 5.2 observa-se, que houve um decréscimo contínuo do TPH neste período, mantendo-se inalterado até os períodos de 35 dias para a cultura *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e 42 dias para a cultura *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e mista.

Ao final do processo os maiores valores de remoção de TPH encontrados foram de 81,9% para a cultura *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e de 85,6% para a cultura mista C₁.

Pode-se destacar também, que em um pequeno período de tempo de operação (7 dias) a biodegradação foi alta (76,8% para a cultura *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e de 79,3% para a cultura C₁).

5.6-Modelagem da Cinética de Crescimento e Biodegradação

Nos sistemas testados envolvendo o uso das 4 culturas, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e mista C₁, os resultados do crescimento celular foram bem ajustados pelo modelo não estruturado descrito pela Equação (4.1),

enquanto a Equação (4.2) foi utilizada para verificar o comportamento da biodegradação (consumo) da mistura de óleo diesel e gasolina.

As linhas sólidas nas Figuras 5.2 e 5.3 são os resultados dos ajustes do modelo para as condições estudadas e a Tabela 5.3 mostra os parâmetros ajustados para o crescimento (μ_{\max} e X^*) e degradação dos contaminantes da mistura de óleo diesel e gasolina ($Y_{X/S}$).

Na Tabela 5.3 pode-se verificar, que a cultura C_1 apresentou maior valor de μ_{\max} 1,088 d^{-1} e as demais culturas, apresentaram valores de μ_{\max} estatisticamente iguais de 0,900 d^{-1} .

Em relação à degradação dos contaminantes verifica-se pela Tabela 5.3 que o valor $Y_{X/S}$ também foi maior para a cultura mista e para a cultura *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. Estes resultados comprovam a discussão anterior em relação ao maior desempenho da biodegradação dos contaminantes e aumento do crescimento observados em relação às culturas C_1 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145.

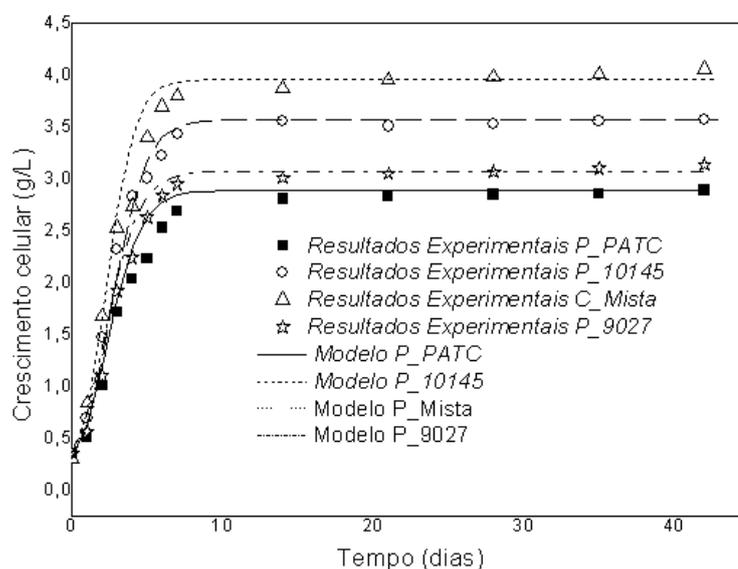


Figura 5.2 - Crescimento celular em 42 dias de processo

Tabela 5.3- Valores dos parâmetros ajustados.

Culturas	Parâmetros Ajustados		
	$\mu_{\max} \pm \text{desvio}$ (d ⁻¹)	$X^* \pm \text{desvio}$ (g/L)	$Y_{X/S} \pm \text{desvio}$ (gX/gS)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PATC	0,901 ± 0,03	2,890 ± 0,08	0,425 ± 0,08
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	0,900 ± 0,05	3,570 ± 0,16	0,472 ± 0,11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0,903 ± 0,03	3,074 ± 0,08	0,408 ± 0,08
Cultura Mista C ₁	1,088 ± 0,06	3,960 ± 0,17	0,505 ± 0,10

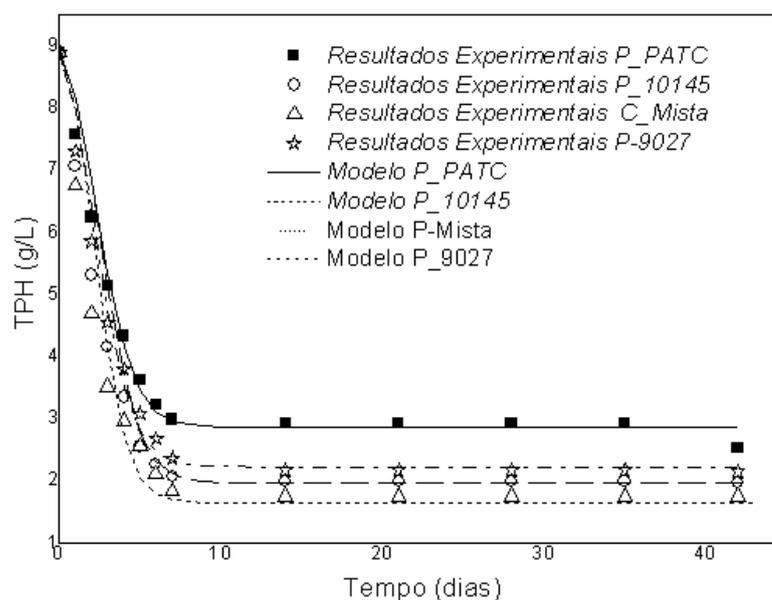


Figura 5.3 - Concentração de TPH durante 42 dias de processo

5.7- Estudo da substituição de extrato de levedo o meio por resíduo de levedura cervejeira autolizada

A justificativa deste trabalho para utilização de extrato de levedo como suplemento esta relacionada aos bons resultados que diversos autores obtiveram ao empregá-lo em estudos no qual se visava aumentar o poder de culturas mistas na degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) em solos. Além destes pesquisadores outros têm também mostrado que a presença de co-substratos (extrato de levedo) aumenta a degradação de PAHs.

Desta maneira, com a escolha das duas melhores culturas (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e cultura mista C₁) obtidas na etapa da cinética de biodegradação realizou-se, este estudo na tentativa de substituir o suplemento extrato de levedo adicionado ao efluente por levedura cervejeira autolizada (LCA), para escolha da concentração que proporcionasse maiores remoções de TPH, portanto maior biodegradação dos contaminantes.

Um parâmetro de comparação adotado para seleção da concentração de LCA foi utilizar os resultados obtidos de crescimento celular e remoção de TPH empregando o extrato de levedo a 2 g/L, no mesmo período de tempo adotado. As concentrações adotadas neste estudo foram realizadas com base em concentrações superiores e inferiores ao valor utilizado de extrato de levedo (2 g/L).

O critério de seleção do tempo de operação (14 dias) foi realizado com base nos resultados obtidos na etapa da cinética de biodegradação. Foi observado que ao final dos 56 dias de operação, ocorreu um pequeno aumento nas remoções de TPH de 4,4% e 5,2% para as culturas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e mista respectivamente, após o 14º dia de operação. Por isso, não haveria necessidade de prolongar o tempo de processo (além dos 14 dias) para obter um pequeno aumento nos valores de remoção.

5.7.1-Crescimento Celular

A Tabela 5.4 mostra os resultados de crescimento celular das culturas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e mista C₁ em 14 dias de processo nas várias concentrações de resíduo de levedura cervejeira.

Para facilitar a comparação entre o crescimento dos microrganismos na presença de concentrações de levedura cervejeira autolizada (LCA) e extrato de levedo, estas tabelas apresentam os resultados de ambos os casos.

De acordo com a Tabela 5.4, pode-se observar que houve crescimento celular de todas as culturas estudadas nas várias concentrações de LCA indicando, que não houve inibição do crescimento em nenhuma das condições estudadas. Porém, observa-se que a concentração celular variou com a concentração de levedura de cervejeira empregada.

A presença de levedura autolizada cervejeira utilizada como suplemento ao meio pode ter contribuído para o crescimento dos micrororganismos ao longo do processo.

Verifica-se ainda pela Tabela 5.4, que a substituição do extrato de levedura por LCA na concentração de 2 g/L, proporcionou uma concentração de biomassa próxima a obtida utilizando extrato de levedo (2g/L). Portanto, em relação à quantidade de biomassa presente no meio ao final do processo, o melhor resultado obtido para a concentração de LCA foi utilizando 2 g/L.

Tabela 5.4-Crescimento Celular para as culturas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e mista C₁.

Culturas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145		Cultura Mista C ₁	
	Concentração Celular (g/L)		Concentração Celular (g/L)	
Concentração de Levedura de Cervejaria (g/L)	0 dias	14 dias	0 dias	14 dias
0,5	0,356	2,32	0,325	2,71
1,0	0,327	2,64	0,304	3,02
2,0	0,318	3,21	0,288	3,61
3,0	0,298	3,01	0,331	3,43
4,0	0,642	2,87	0,363	3,17
Extrato de Levedo (2 g/L)	0,301	3,52	0,294	3,87

5.7.2-Biodegradação

A Tabela 5.5 e as Figuras 5.4 e 5.5 apresentam as porcentagens de remoção de TPH de cada experimento nas várias concentrações de LCA estudadas.

Foi observado que a variação das concentrações de LCA resultou em cerca de 54 a 81,5% de remoção de TPH empregando culturas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e mista C₁. Comparando os resultados verifica-se que o aumento na concentração de LCA de 0,5 para 4,0 g/L ocasionou um aumento na remoção de TPH até concentração de 2g/L e a partir desta ocorreu uma ligeira queda na remoção ao longo do processo. Isto sugere que para concentrações superiores a 2 g/L o aumento na concentração de LCA não proporcionou um aumento na remoção de TPH fato este que pode ser verificado

através dos perfis de remoção obtidos nos gráficos das Figuras 5.2 e 5.3. Portanto, em relação às concentrações de LCA estudadas o melhor resultado obtido de remoção foi utilizando concentrações de LCA de 2g/L para ambas as culturas (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e mista C₁). Além disto, esta mesma concentração proporcionou resultados bem próximos ao obtido quando empregado o extrato de levedo (2g/L). Com o emprego do extrato de levedo as remoções de TPH obtidas no 14º dia para as culturas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e mista C₁ foram: 77,5 e 80,4%, respectivamente.

Tabela 5.5-Resultados de remoção de TPH aos 14 dias de processo para as culturas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e mista C₁.

Levedura Autolizada (g/L)		Dias								
		0	1	2	3	4	5	6	7	14
0,5	P. 10145	0	14,5±2	27,8±2	37,9±2	46,0±2	50,0±2	52,7±2	53,7±2	54,0±2
	C ₁	0	19,5±1	30,0±2	41,7±2	48,3±2	53,1±2	54,8±2	55,7±2	60,0±2
1,0	P. 10145	0	17,2±3	32,9±3	46,5±3	55,4±3	61,3±3	65,4±3	66,7±3	67,2±4
	C ₁	0	21,5±1	36,9±2	49,5±4	58,4±4	62,8±4	68,5±4	69,0±4	70,8±4
2,0	P. 10145	0	20,7±2	39,7±3	54,2±3	65,7±3	71,4±3	75,3±3	76,7±3	77,2±3
	C ₁	0	28,7±3	49,3±3	59,6±3	68,9±3	73,9±3	76,5±3	78,9±3	81,5±3
3,0	P. 10145	0	18,7±1	37,7±2	51,5±2	62,4±2	67,8±2	72,5±2	75,7±2	73,3±2
	C ₁	0	24,7±1	41,7±2	54,8±2	64,0±2	69,8±2	70,8±2	73,0±2	75,5±2
4,0	P. 10145	0	16,5±1	33,0±1	49,3±2	57,4±2	67,8±2	67,8±2	72,3±2	72,7±2
	C ₁	0	22,5±1	38,0±2	50,4±2	59,5±2	68,8±2	69,8±2	71,8±2	74,1±2

Entre as duas culturas estudadas na melhor concentração obtida (2 g/L) a cultura mista C₁ foi capaz de proporcionar maiores remoções de TPH portanto maior potencial em biodegradar os contaminantes presentes no efluente durante todo o processo. Assim para o estudo da otimização das condições operacionais empregando planejamento experimental foi utilizada a cultura mista C₁.

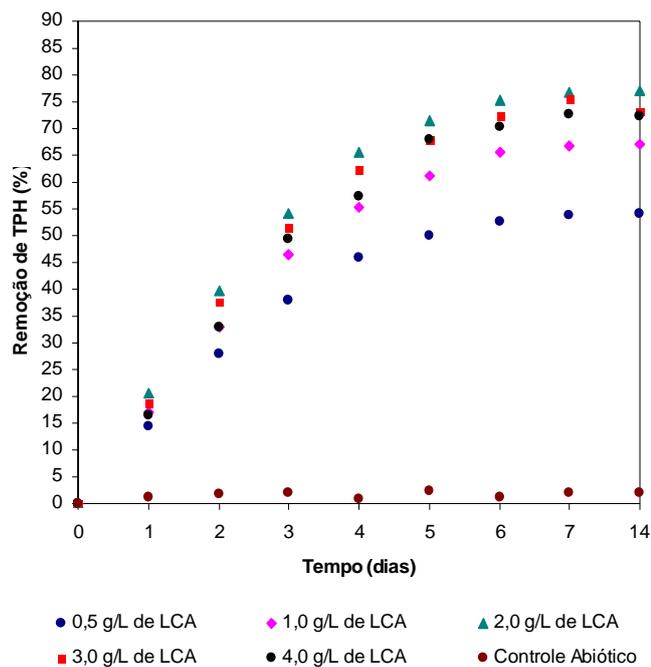


Figura 5.4 - Perfil de remoção de TPH para cultura *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145.

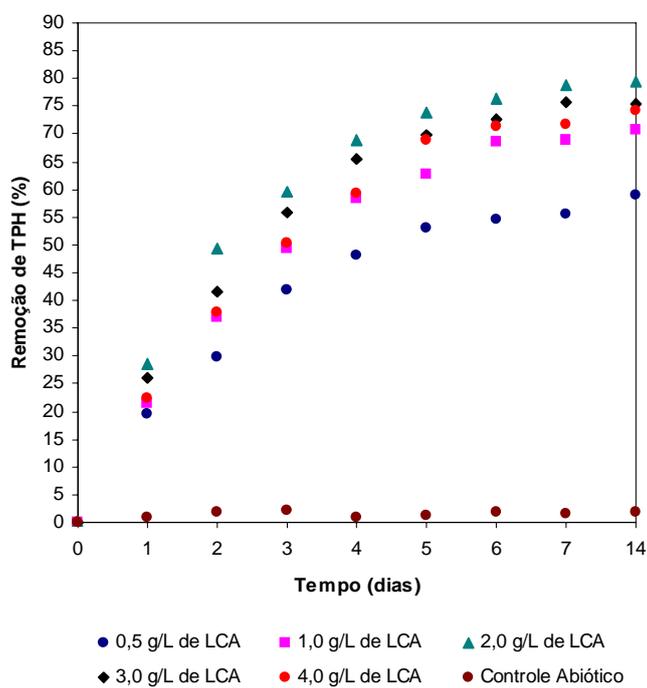


Figura 5.5 (na tese 4.8) Perfil de remoção de TPH para cultura C₁.

6-CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo, podem-se enunciar as seguintes conclusões:

- Na etapa de adaptação das culturas puras (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* PATC) e mista (C₁) em efluente de terminais de combustíveis, todas as culturas mostraram capacidade de crescer em meio contaminado por hidrocarbonetos;
- A cultura mista coletada na superfície do solo da lagoa contaminada por óleo diesel e gasolina foi selecionada para o estudo por apresentar maior concentração de bactérias aeróbias;
- Foi possível a identificação dos principais membros pertencentes à cultura mista após a adaptação no efluente. Foram identificados gêneros pertencentes aos gêneros das *Pseudomonas sp*, *Serratia sp*, *Klebsiella sp*, e *Bacillus sp*.
- Dentre as concentrações de levedura cervejeira autolizada estudada, a concentração de 2g/L foi a que promoveu remoções de TPH próximo ao obtido quando se utilizou o extrato de levedo, para ambas as culturas estudadas.

7-AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro concedido pelo CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico .

8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M (1994). Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, 302 p.

ANP, Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo e do Gás Natural, Fonte, Internet: [http: www.agnp.gov.br](http://www.agnp.gov.br), 2004.

ATLAS, R.M. (1998). Microbiology – Fundamental and applications. 2nd ed. New York – USA, Mcmillan Publishing Co.

- BIELECKA, K., KACZOREK, E., OLSZANOWSKI, A., VOELKEL, A. (2002). Examination of biodegradation of hydrocarbons in emulsified systems. Publish J. Environ Stud. V. 11 pp. 11-16.
- BOOPATHY, R (2000). Factors limiting bioremediation technologies. Biores. Techn., v. 74, pp 63-67.
- CUNHA, C.D; LEITE, S.G.F. (2000). Gasoline biodegradation in different soil microcosms, Brazil. J. Microbiol. v. 31. pp. 45-49.
- DORN, P.B., SALANITRO, I.P. (2000). Temporal Biological Assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. Chemosp., v. 40 pp. 419-426.
- GOGOI, B.K., DUTTA, N.N., GOSWAMI, P., KRISHNA MOHAN, T.R. (2003). A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. Adv. Environ. Res. v. 7. pp. 767-782.
- KALUARCHCHI, J.J., CVETKOVIC, V., BERGLUND, S (2000). Stochastic analysis of oxygen and nitrate-based biodegradation of hydrocarbons in aquifers, J. Cont. Hydrol. 41. pp. 335-365.
- MEHLMAN, M.A. (1992). Dangerous properties of petroleum – refining products carcinogenicity of motor fuels (gasoline). Teratogenesis, carcinogenesis, mutagenesis, v. 15, pp. 399-408.
- MOERI, E., COELHO, R., MARKEI, A. (2004). Remediação e Revitalização de Áreas Contaminadas. Aspectos Técnicos legais e Financeiros. Editora Signus. 219p.
- SCHIMIDEL, W., BORZANI, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E. (2001). Biotecnologia industrial. Editora Edgard Blucher. 1ª edição. 541p.
- STANDARD METHODS (1998), For the Examination of water and wastewater. 20th Edition.
- TIBURTIUS, E.R.L., ZAMORA, P.P., LEAL, E.S. (2004). Contamination of waters by BTXs and processes used in the remediation of contaminated sites, Quim. Nova. v.27. pp. 1-16.
- VIEIRA, P. A. VIEIRA, R. B, DE FRANÇA, F. P., CARDOSO, V. L. (2006). Biodegradation of Effluent Contaminated with Diesel Fuel and Gasoline. Journ. Hazard. Mat. Article In Press, Xxx-xxx.
- http://www.cepetro.unicamp.br/petroleo/index_petroleo.html