

Universidade de Passo Fundo
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e
Ambiental

Danúbia Paula Cadore Favaretto

BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTE DE POSTO DE
COMBUSTÍVEL COM MICRORGANISMOS
ENCAPSULADOS

Passo Fundo
2015

Danúbia Paula Cadore Favaretto

BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTE DE POSTO DE
COMBUSTÍVEL COM MICRORGANISMOS
ENCAPSULADOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental da Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Luciane Maria Colla e coorientação do Prof. Dr. Vandré Barbosa Brião.

Passo Fundo
2015

DANÚBIA PAULA CADORE FAVARETTO

**BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTE DE POSTO DE COMBUSTÍVEL COM
MICRORGANISMOS ENCAPSULADOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental da Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Luciane Maria Colla e coorientação do Prof. Dr. Vandrê Barbosa Brião.

Data de aprovação: Passo Fundo, 14 de Janeiro de 2015.

Os membros componentes da Banca Examinadora abaixo aprovam a Dissertação.

Prof^a. Dr^a. Luciane Maria Colla

Orientadora

Prof. Dr. Vandrê Barbosa Brião

Coorientador

Prof. Dr. Antônio Thomé

Universidade de Passo Fundo (UPF)

Prof. Dr. Marcelo Hemkemeier

Universidade Passo Fundo (UPF)

Prof^a. Dr^a. Helen Treichel

Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

RESUMO

Os postos de combustíveis realizam atividades com elevado potencial poluidor. Os setores de abastecimento, de troca de óleo e de lavagem de veículos, geram efluentes contaminados com resíduos oleosos derivados de petróleo. O sistema de tratamento convencional utilizado é uma caixa separadora de água e óleo, sendo este tratamento insuficiente quando se trata de remoção de contaminantes oleosos devido à emulsificação e capacidade de detergência de produtos usados. Técnicas complementares a esse tratamento podem reduzir os significativos danos causados ao meio ambiente. Uma alternativa aos tratamentos físicos é a biorremediação, que consiste na utilização do metabolismo microbiano para a remoção de compostos tóxicos do meio ambiente. Apesar de consistir numa alternativa por vezes lenta, apresenta vantagens como a mineralização completa dos compostos tóxicos em compostos mais simples e não ocasiona a geração de resíduos tóxicos com mais contaminação ao meio ambiente. Objetivou-se se utilizar a biorremediação como alternativa para o tratamento de efluentes lançados por postos de combustíveis. Para tanto, realizou-se a coleta e a caracterização do efluente, isolou-se microrganismos em meios de cultivo PCA (Plate Count Agar) e PDA (Plate Dextrose Agar) e selecionou-se os com capacidade de produção de biossurfactantes, redução da tensão superficial do meio, produção de biomassa e remoção de óleos e graxas, comprovando-se a eficiência dessa remoção pela análise cromatográfica. Os microrganismos selecionados foram encapsulados em gel de alginato de sódio e utilizados em ensaios de biorremediação. Como resultado, obteve-se o isolamento de 14 microrganismos, entre eles, fungos e bactérias, os quais apresentaram respostas para os testes realizados, possibilitando a seleção de 4 microrganismos para a encapsulação em consórcios e utilização em ensaio de biorremediação de efluente de posto de combustíveis, que resultou na remoção de óleos e graxas (remoções em torno de 70%), que era o principal contaminante do efluente e na redução de outros parâmetros de controle, como Demanda química de oxigênio (remoções em torno de 78%) e Cor (em torno de 75%).

Palavras-chave: consórcios microbianos, contaminação, água residuária, bioaugmentação.

ABSTRACT

The gas stations have high pollution potential. The supply, oil replace and wash of vehicles, generate effluents contaminated with oily waste oil products. The usual treatment system is a sandtrap coupled with a natural flotation tank. This treatment is not enough to remove oily contaminants due to emulsification and detergents in the wastewater. Complementary techniques can reduce the environmental damage caused by oily wastes. An alternative to physical treatments is bioremediation, which consists in using the microbial metabolism to the remove toxic constituents from the environment. Although the bioremediation can be a slow process, it has advantages as the complete mineralization of toxic compounds into simpler compounds, and does not cause the generation of toxic waste to further contamination of the environment. The aim of the work was use bioremediation as an alternative for the treatment of effluents from gas stations. Samples of effluent were collected and it was and characterized. Native microorganisms were isolated from effluent in culture in PCA (Plate Count Agar) and PDA (Dextrose Agar Plate). In a first step, microorganisms which the biosurfactants production capacity, reduction of tension surface and biomass growth and removal of oil and grease were selected potential use in bioremediation. This potential in bioremediation was confirmed by chromatographic analysis. The selected microorganisms were encapsulated in a sodium alginate gel and used for bioremediation tests. As a result, there was obtained the isolation of 14 microorganisms (fungi and bacteria), which showed good responses to the tests. Four strains of microorganisms were encapsulated in consortia and use in bioremediation of the effluent from gas station, which resulted in the removal of oil and grease (removal around 70%). Besides, the bioremediation with encapsulated microorganisms removed Chemical Oxygen Demand (the best result was approximately 78%) and Color (around 75%).

Keywords: microbial consortia, contamination, wastewater, bioaugmentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Atividades de postos de combustíveis que geram resíduos líquidos.....	19
Figura 2: Gêneros microbianos degradadores de hidrocarbonetos.....	22
Figura 3: Relação entre a forma de respiração microbiana, aceptores de elétrons e potencial redox.....	24
Figura 4: Formação do gel de alginato de cálcio por engaiolamento.....	31
Figura 5: Fluxograma geral dos materiais e métodos.....	32
Figura 6: Microscopia mostrando a morfologia de fungo filamentosos (a) e de bactéria (cocos) gram-positivo (b), isolados do efluente de posto de combustíveis, aumentado 1000 vezes.....	41
Figura 7: Análise cromatográfica para quantificação das cadeias carbônicas dos hidrocarbonetos presentes no efluente de posto de combustíveis.....	53
Figura 8: Cromatograma do efluente de uma refinaria de petróleo.....	54
Figura 9: Análise cromatográfica do efluente de posto de combustíveis tratado por biorremediação com o microrganismo X1.....	54
Figura 10: Análise cromatográfica para quantificação das cadeias carbônicas dos hidrocarbonetos presentes no efluente de posto de combustíveis.....	60
Figura 11: Análise cromatográfica do efluente de posto de combustíveis tratado pelo consórcio microbiano encapsulado X4/X12.....	61
Figura12: Curva de crescimento do microrganismo 1.....	71
Figura13: Curva de crescimento do microrganismo 2.....	71
Figura14: Curva de crescimento do microrganismo 4.....	71
Figura15: Curva de crescimento do microrganismo 5.....	72
Figura16: Curva de crescimento do microrganismo 9.....	72
Figura17: Curva de crescimento do microrganismo 12.....	72
Figura18: Curva de crescimento do microrganismo 14.....	73
Figura19: Curva padrão do microrganismo 4.....	74
Figura20: Curva padrão do microrganismo 12.....	74
Figura 21: Curva padrão do microrganismo 14.....	74
Figura 22: Picos de cadeias carbônicas do efluente antes do tratamento.....	75
Figura 23: Picos de cadeias carbônicas do efluente tratado pelo microrganismo 1.....	75
Figura 24: Picos de cadeias carbônicas do efluente tratado pelo microrganismo 2.....	75
Figura 25: Picos de cadeias carbônicas do efluente tratado pelo microrganismo 4.....	76
Figura 26: Picos de cadeias carbônicas do efluente tratado pelo microrganismo 5.....	76
Figura 27: Picos de cadeias carbônicas do efluente tratado pelo microrganismo 9.....	76
Figura 28: Picos de cadeias carbônicas do efluente tratado pelo microrganismo 12.....	77
Figura 29: Picos de cadeias carbônicas do efluente tratado pelo microrganismo 14.....	77
Figura 30: Picos de cadeias carbônicas do efluente antes do tratamento.....	78
Figura 31: Picos de cadeias carbônicas do efluente tratado por atenuação natural.....	78
Figura 32: Picos de cadeias carbônicas do efluente tratado com cápsulas de alginato sem microrganismo.....	78
Figura 33: Picos de cadeias carbônicas do efluente tratado pelo consórcio de microrganismos X4/X12.....	79
Figura 34: Picos de cadeias carbônicas do efluente tratado pelo consórcio de microrganismos X4/X12/X14.....	79
Figura 35: Picos de cadeias carbônicas do efluente tratado pelo consórcio de microrganismos X4/X14.....	79
Figura 36: Picos de cadeias carbônicas do efluente tratado pelo consórcio de microrganismos X12/X14.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Meios de cultivos para crescimento dos microrganismos.....	34
Tabela 2: Valores encontrados para os parâmetros analisados do efluente coletado, comparado com a legislação vigente.....	39
Tabela 3: Produção de biomassa obtida ao longo do tempo com os microrganismos crescidos em Meio 1 e Meio 2.....	42
Tabela 4: Atividades emulsificantes de cada microrganismo cultivados no Meio 1 utilizando óleo diesel como fase orgânica da emulsão.....	43
Tabela 5: Atividades emulsificantes de cada microrganismo cultivados no Meio 1 utilizando biodiesel como fase orgânica da emulsão.....	43
Tabela 6: Atividades emulsificantes de cada microrganismo cultivados no Meio 1 utilizando gasolina diesel como fase orgânica da emulsão.....	43
Tabela 7: Atividades emulsificantes de cada microrganismo cultivados no Meio 2 utilizando óleo diesel como fase orgânica da emulsão.....	45
Tabela 8: Atividades emulsificantes de cada microrganismo cultivados no Meio 2 utilizando biodiesel como fase orgânica da emulsão.....	46
Tabela 9: Atividades emulsificantes de cada microrganismo cultivados no Meio 2 utilizando gasolina como fase orgânica da emulsão.....	46
Tabela 10: Valores obtidos para tensão superficial nos tempos inicial e final de crescimento dos microrganismos nos meios de cultivo 1 e 2.....	48
Tabela 11: Atividades emulsificantes água em óleo (A/O) dos extratos obtidos a partir dos cultivos com microrganismos em meio de cultivo com 70% de efluente de posto de combustível, utilizando óleo diesel, biodiesel e gasolina como fase orgânica da emulsão.....	50
Tabela 12: Atividades emulsificantes óleo em água (O/A) dos extratos obtidos a partir dos cultivos com microrganismos em meio de cultivo com 70% de efluente de posto de combustível, utilizando óleo diesel, biodiesel e gasolina como fase orgânica da emulsão.....	51
Tabela 13: Remoção de óleos e graxas nos ensaios de biorremediação com meio misto contendo 70% efluente e 30% meio PC inoculados com sete microrganismos pré-selecionados.....	52
Tabela 14: Percentual de degradação das cadeias carbônicas presentes no efluente em relação ao tempo inicial do cultivo, realizada pelos microrganismos.....	55
Tabela 15: Caracterização inicial do efluente e após o tratamento por biorremediação com microrganismos encapsulados individualmente.....	56
Tabela 16: Caracterização inicial do efluente e após o tratamento por biorremediação com microrganismos encapsulados em consórcios.....	57
Tabela 17: Contagem em placas dos microrganismos encapsulados individualmente para verificação da sobrevivência dos mesmos após 7 dias e após 14 dias do ensaio de biorremediação.....	59
Tabela 18: Contagem em placas dos microrganismos encapsulados em consórcios para verificação da sobrevivência dos mesmos após 7 dias e após 14 dias do ensaio de biorremediação.....	59
Tabela 19: Remoção de óleos e graxas realizada pelos 4 consórcios de microrganismos encapsulados, após 14 dias do ensaio de biorremediação.....	60
Tabela 20: Degradação das cadeias carbônicas presentes no efluente após 14 dias de tratamento por biorremediação.....	61

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Postos de combustíveis	13
2.1.1. Tipos de combustíveis utilizados	13
2.1.1.1. Gasolina	14
2.1.1.2. Álcool combustível (álcool etílico ou etanol)	14
2.1.1.3. Óleo diesel.....	14
2.1.1.4. Biodiesel.....	14
2.1.1.5. Gás natural veicular	14
2.1.1.6. Lubrificantes.....	15
2.1.1.7. Óleo lubrificante	15
2.1.1.8. Graxa.....	15
2.1.2. Lavagem de veículos	15
2.1.2.1. Desengraxante de chassis	16
2.1.2.2. Desengraxante de motores	16
2.1.2.3. Xampu automotivo	16
2.1.2.4. Renovador de pneus.....	16
2.1.2.5. Cera automotiva.....	17
2.2. Legislação ambiental.....	17
2.3. Geração de resíduos em postos de combustíveis	18
2.4. Biorremediação	20
2.4.1. Biorremediação de resíduos oleosos em efluentes.....	20
2.4.2. Microrganismos utilizados no processo de biorremediação	21
2.4.3. Biodegradação dos hidrocarbonetos.....	23
2.4.4. Fatores que influenciam a biodegradação	23
2.4.4.1. Aceptores de elétrons.....	24
2.4.4.2. Umidade	25
2.4.4.3. Temperatura.....	25
2.4.4.4. pH	25
2.4.4.5. Nutrientes	26
2.4.5. Biossurfactantes	26
2.5. Técnicas de biorremediação.....	27
2.5.1. Atenuação natural.....	28
2.5.2. Bioestimulação	28
2.5.3. Bioaugmentação.....	29
2.6. Uso de microrganismos encapsulados em processos de biorremediação	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. Coleta e caracterização do efluente	33
3.2. Isolamento, identificação e manutenção dos microrganismos	33
3.3. Seleção de microrganismos capazes de biorremediar resíduos oleosos a partir de meios sintéticos.....	33
3.4. Seleção de microrganismos capazes de biorremediar resíduos oleosos a partir de meios contendo efluente	36
3.5. Encapsulação dos microrganismos selecionados.....	36
3.6. Biorremediação de efluentes com microrganismos encapsulados	37
3.7. Tratamento de dados.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1. Caracterização do efluente.....	39

4.2. Isolamento e identificação dos microrganismos	40
4.3. Seleção de microrganismos capazes de biorremediar resíduos oleosos a partir de meios sintéticos	41
4.3.1. Produção de biomassa	41
4.3.2. Produção de biossurfactante	42
4.3.3. Tensão superficial	47
4.4. Seleção de microrganismos cultivados em meios contendo efluente de postos de combustíveis	50
4.4.1. Produção de biossurfactantes	50
4.4.2. Remoção de óleos e graxas	52
4.5. Biorremediação de efluente com microrganismos encapsulados.....	56
5. CONCLUSÃO.....	63

1. INTRODUÇÃO

Os postos de combustíveis geram resíduos líquidos com alto potencial poluidor, por utilizarem em seus serviços, produtos derivados de petróleo. Os resíduos líquidos gerados podem causar graves danos ao meio ambiente, contaminando solos e águas por vazamentos nos tanques de combustíveis e aumento na geração de efluentes. Estes vazamentos ou residuais produzidos podem causar graves problemas de saúde e segurança pública, visto que a maioria destes postos se localizam em áreas urbanas.

O mercado de comercialização de combustíveis é um importante setor para a economia, com cerca de 90 mil agentes por todo o território nacional, e por isso demanda um grande esforço de regulação e fiscalização (ANP, 2013).

No Brasil, no ano de 2014 foram produzidos 2.180 barris por dia de petróleo (PETROBRAS, 2014), e segundo dados disponibilizados pelo Denatran (2014), até o mês de outubro de 2014, o Brasil emplacou 85.766.231 novos veículos, sendo 17.190.755 veículos só na Região Sul.

Os principais resíduos gerados pelos postos de combustíveis consistem em vapores de combustíveis, embalagens de lubrificantes, flanelas e estopas contaminadas, efluentes líquidos, como águas oleosas, filtros usados, óleo queimado e lodo tóxico das caixas separadoras de água e óleo (LORENZETT; ROSSATO, 2010).

Em um posto de abastecimento há várias fontes geradoras de efluentes líquidos provenientes das atividades comuns do empreendimento, como os sanitários e os vestiários, que devem ter como destino o esgoto sanitário comum. Já locais como a cabine de lavagem, a pista de abastecimento e a cabine de lubrificação, que são áreas sujeitas a vazamentos acidentais de combustíveis ou óleos, devem estar ligados a um sistema de tratamento de efluente, adequado e eficiente, antes de seu lançamento ao meio ambiente.

Os estabelecimentos de lavagem de carros apresentam significativo consumo de água em suas atividades, resultando na geração de efluentes que apresentam como características alta demanda química de oxigênio (DQO), sólidos, óleos e graxas. Os sistemas de tratamento destes efluentes de modo geral são compostos somente por tratamento preliminar e não removem a carga poluidora em termos de DQO. A emissão destes efluentes sem o tratamento adequado gera uma demanda sobre a disponibilidade do oxigênio dissolvido na água, causando a degradação dos cursos hídricos (GOETTEMS, 2011).

As caixas de separação não são eficientes para remoção de todos os contaminantes, ela não separa, por exemplo, óleo emulsionado por detergente. O tempo de residência também é

muito baixo e permite que uma pequena parcela de sólidos suspensos seja arrastada. Há, portanto, a necessidade de readequação com o uso de tratamentos complementares.

Técnicas complementares se fazem necessárias para tratar esse tipo de efluente, que em determinados casos são lançados em rede pública municipal de tratamento de esgoto ou ainda em arroios próximos ao local de instalação dos postos de combustíveis.

Tratamentos físico-químicos, como processos eletrolíticos, podem complementar os processos convencionais para tratamento de águas residuárias de postos de combustíveis, mas tornam-se inviáveis por terem alto custo e adicionarem produtos químicos ao meio, além de exigirem operação e cuidados. Já os processos oxidativos removem cor, controlam gosto e odor, reduzem compostos orgânicos, precipitam metais, destroem microrganismos e removem DQO, porém aumentam muito o parâmetro cor e necessitam de um controle rígido das condições de reação para que atinjam boas eficiências de remoção sendo que ambos tornam-se de difícil aplicação para postos de combustíveis (GALLEGO et al., 2007).

Uma alternativa aos tratamentos físico-químicos é a biorremediação, que consiste na utilização do metabolismo microbiano para a remoção de compostos tóxicos do meio ambiente. A biorremediação tem apresentado um crescimento de aplicação envolvendo problemas ambientais contendo petróleo e seus derivados (GARGHOURI et al., 2011).

A biorremediação é o processo pelo qual organismos vivos, tais como, bactérias, fungos, plantas, algas verdes ou suas enzimas são utilizados para reduzir ou remover - remediar - contaminações no ambiente. A biorremediação consiste na utilização do metabolismo microbiano para a remoção de compostos tóxicos do meio ambiente (CASTILLO et al., 2012). Engloba uma série de tecnologias e técnicas distintas para tratamento não só de solos, mas também de águas contaminadas e outros resíduos. Utilizando processos biodegradáveis, este processo é capaz de regenerar o equilíbrio do ecossistema original. Especificamente, a biorremediação atua através da introdução de processos biológicos adicionais para a decomposição dos resíduos que favorecem e incrementam a velocidade do processo natural de degradação (SCHMITZ, 2013). A biorremediação, apesar de consistir em uma alternativa por vezes lenta, apresenta vantagens como a mineralização completa dos compostos tóxicos em compostos mais simples, não ocasiona a geração de resíduos tóxicos com mais contaminação ao meio ambiente e é mais aceita. As vantagens da biorremediação residem em baixos custos, pouca geração de subprodutos, reutilização da biota, diversidade de aplicações, além de poder ser aplicada em condições *in situ* e *ex situ* (DAS; DASH, 2014).

A biorremediação é capaz de tratar contaminantes diluídos e com grandes áreas de dispersão, requer investimentos baixos, tem uma ação rápida e pode ser aplicada em simultâneo com outros tratamentos químicos e físicos (BOOPATHY, 2000). A vantagem mais atrativa desta técnica consiste na sua aplicação *in-situ*, causando uma perturbação mínima do sistema e a capacidade extensiva de degradação de compostos sintéticos por parte dos microrganismos, o que permite a aplicação desta técnica em locais contaminados por vários poluentes (IWAMOTO et al., 2001).

Contudo, há a desvantagem de poder causar efeitos desconhecidos no ecossistema, uma vez que são introduzidas grandes quantidades de bactérias no meio, porém a técnica de encapsulação de microrganismos poderia evitar esse problema, pois consiste em imobilizar o microrganismo em uma capsula de gel, que pode ser controlada.

Uma das estratégias de biorremediação para se melhorar a biodegradação de ambientes contaminados é a bioaugmentação. Esta consiste em selecionar microrganismos com potencial de degradação de determinado contaminante e reinseri-los no meio de maneira isolada ou na forma de consórcios (MEYER et al, 2014, DI MARTINO et al, 2012). Este método tem sido muito utilizado na remediação de solos contaminados com derivados de petróleo (ZAWIERUCHA et al, 2011; ALESSANDRA et al, 2012, BENTO et al, 2005; COVINO et al, 2015, GARCIA et al, 2015), com plasticizantes da indústria química (FERREIRA; MORITA, 2012) e de lodos contaminados com petróleo (CAMEOTRA; SINGH, 2008; GALLEGO et al, 2007; GOJGIC-CVIJOVIC et al, 2012; VERMA et al, 2006). Há também estudos envolvendo a bioaugmentação de contaminantes específicos em águas e efluentes, como compostos organoclorados (QUAN et al, 2011; MA et al, 2011; QU et al, 2011; PUYOL et al, 2011) e alguns poluentes industriais, tais como nitrobenzênicos (XU et al, 2011) e fenóis em meio alcalino (QU et al, 2011). Contudo, há um interesse especial na bioaugmentação em efluentes contendo derivados de petróleo, pois a técnica poderia ser aplicada a postos de combustíveis assim como melhorar os sistemas de tratamento existentes de refinarias de petróleo e de indústrias petroquímicas. Essa técnica utiliza microrganismos autóctones, podendo ser utilizada para o tratamento de efluentes gerados em postos de combustíveis, porque estes microrganismos adaptam-se ao contaminante. Entretanto os microrganismos bioaugmentados podem constituir-se como uma fonte de poluição ambiental, o que pode ser resolvido utilizando-se a técnica de encapsulação dos microrganismos.

Três critérios são essenciais para sucesso na biorremediação: capacidade de degradar o contaminante mesmo na presença de inibidores; devem ser persistentes na competição com

outras cepas de microrganismos; compatíveis com os microrganismos nativos ao meio sujeito à biorremediação (HERRERO; STUCKEY, 2014). Contudo, os efluentes e meios são complexos, apresentam diferentes contaminantes e necessitam da degradação de diversos compostos. Nesses casos é interessante a utilização de consórcios microbianos. Há relatos de consórcios com diferentes microrganismos para aplicação em biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos (SZULC et al, 2014, CHAGAS et al, 2012, CERQUEIRA et al, 2011, SASIDHARAN et al, 2014) e mesmo para biorremediação de esgoto doméstico (GUO et al, 2010).

Para meios líquidos, torna-se interessante utilizar os consórcios microbianos de maneira imobilizada. As técnicas de imobilização podem ser a solução para gerar uma barreira protetiva ao redor dos microrganismos e ainda aumentar a atividade metabólica (HERRERO; STUCKEY, 2014). Além disso, a encapsulação protege os microrganismos do predadorismo por protozoários e evita o arraste da biomassa e facilita a separação e sedimentação da biomassa (HERRERO; STUCKEY, 2014).

O Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil e Ambiental, em sua linha de pesquisa Infraestrutura sustentável, tem desenvolvido vários trabalhos envolvendo biorremediação de solos contaminados com derivados de petróleo. Esta dissertação trabalha com a biorremediação de efluentes contaminados com combustíveis, expandindo o foco das pesquisas em biorremediação do Programa. O objetivo geral foi utilizar a biorremediação como alternativa para o tratamento de efluentes lançados por postos de combustíveis. Os objetivos específicos foram: a) Coletar e caracterizar efluentes de caixa de separação água e óleo de um posto de combustível; b) Realizar o isolamento de microrganismos com potencial de degradação de resíduos oleosos; c) Selecionar os microrganismos com potencial de produção de biossurfactantes, produção de biomassa, redução da tensão superficial do meio e redução de óleos e graxas; d) Propor consórcios microbianos com potencial de degradação de resíduos oleosos em efluentes líquidos; e) Encapsular os consórcios microbianos; f) Simular em laboratório um processo de biorremediação de efluentes líquidos de um posto de combustíveis por bioaugmentação, utilizando os consórcios microbianos encapsulados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Postos de combustíveis

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), em sua Resolução nº 273/2000 denomina e classifica estes empreendimentos da seguinte forma (BRASIL, 2000):

a) **Posto Revendedor:** Instalação onde se exerça a atividade de revenda varejista de combustíveis líquidos derivados de petróleo, álcool combustível e outros combustíveis automotivos, dispo de equipamentos e sistemas para armazenamento de combustíveis automotivos e equipamentos medidores;

b) **Posto de Abastecimento:** Instalação que possua equipamentos e sistemas para o armazenamento de combustível automotivo, com registrador de volume apropriado para o abastecimento de equipamentos móveis, veículos automotores terrestres, aeronaves, embarcações ou locomotivas; e cujos produtos sejam destinados exclusivamente ao uso do detentor das instalações ou de grupos fechados de pessoas físicas ou jurídicas, previamente identificadas e associadas em formas de empresas, cooperativas, condomínios, clubes ou assemelhados;

c) **Instalação de Sistema Retalhista:** Instalação com sistema de tanques para o armazenamento de óleo diesel, óleo combustível, querosene de iluminação, destinada a exercício da atividade de Transportador Revendedor Retalhista;

d) **Posto Flutuante:** Toda embarcação sem propulsão empregada para o armazenamento, distribuição e comércio de combustíveis que opera em local fixo e determinado.

2.1.1. Tipos de combustíveis utilizados

Estão listados a seguir os principais tipos de combustíveis comercializados em postos de combustíveis e suas principais características (NEVES, 2010).

2.1.1.1. Gasolina

A gasolina é líquida, volátil, inflamável e constituída quimicamente por uma mistura complexa de mais de 400 hidrocarbonetos. É obtida da mistura de hidrocarbonetos contidos no petróleo bruto, por intermédio de destilação e também por craqueamento, ou seja, é composta de numerosos constituintes e a maior parte desses é classificada como *alifáticos* ou como *aromáticos*.

2.1.1.2. Álcool combustível (álcool etílico ou etanol)

Os álcoois são compostos orgânicos caracterizados por hidrocarbonetos saturados ou insaturados, mediante ocorrência de um ou mais átomos de carbono com uma ou mais hidroxilas (OH). São classificados em monovalentes, bivalentes, etc., dependendo da quantidade de hidroxilas.

2.1.1.3. Óleo diesel

O óleo diesel é composto principalmente por hidrocarbonetos alifáticos, formado principalmente por átomos de carbono, hidrogênio e baixas concentrações de enxofre, nitrogênio e oxigênio.

2.1.1.4. Biodiesel

É um biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil.

2.1.1.5. Gás natural veicular

É todo hidrocarboneto que permaneça em estado gasoso nas condições atmosféricas normais, extraído diretamente a partir de reservatórios petrolíferos ou gaseíferos, incluindo gases úmidos, secos, residuais e gases raros. É uma mistura de hidrocarbonetos leves que, à temperatura ambiente e pressão atmosférica, permanece no estado gasoso. É constituído predominantemente por metano com teor mínimo de 87%.

2.1.1.6. Lubrificantes

Lubrificantes, sintéticos ou não, apresentam cerca de 2,5% de derivados de petróleo. São empregados em fins automotivos ou industriais, e após o período de uso recomendado pelos fabricantes dos equipamentos, deterioram-se parcialmente formando compostos como ácidos orgânicos, aromáticos polinucleares, potencialmente carcinogênicos. Contém elevados níveis de hidrocarbonetos e metais pesados, sendo os mais representativos: Chumbo (Pb), Zinco (Zn), Cobre (Cu), Níquel (Ni), Cádmio (Cd).

2.1.1.7. Óleo lubrificante

É um produto formulado a partir de óleos lubrificantes básicos e aditivos. Pode ser de origem mineral (derivado de petróleo) ou sintética (derivado de vegetal ou de síntese química). Uma das principais diferenças entre um óleo novo e um óleo usado, e que confere o seu caráter de resíduo perigoso, é a presença de metais pesados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). O óleo usado contém normalmente grandes quantidades de Pb, Zn, Ca, Ba, e quantidades menores de Fe, Na, Cu, Al, Cr, K, Ni, Sn, B e Mo. O popular “óleo queimado” é mundialmente considerado como produto maléfico ao meio ambiente e à saúde pública.

2.1.1.8. Graxa

É um lubrificante fluido espessado por adição de outros agentes, formando uma consistência “gel”. Tem a mesma função do óleo lubrificante, mas com consistência semissólida para reduzir a tendência do lubrificante a fluir ou vaziar.

2.1.2. Lavagem de veículos

Muitos postos de combustíveis realizam atividade de lavagem de veículos e utilizam produtos químicos. Tais produtos podem causar corrosão dos automóveis, bem como danos graves à saúde humana e também ao meio ambiente. De acordo com informações obtidas através da indústria química, os principais produtos utilizados podem ser visualizados a seguir.

2.1.2.1. Desengraxante de chassis

O desengraxante de chassis é um composto químico de alto poder de limpeza, formulado para fazer com eficácia a limpeza de graxas, óleo e fuligem armazenada em chassis e carrocerias de automóveis, ônibus e caminhões. Pode ser aplicado também em motores e suspensões de veículos automotivos, inclusive motos. Seu pH pode variar de 0,5 a 1,5. Composição química: Tensoativo, aniônico, ácido fluorídrico, ácido muriático, corante e solvente. Componente ativo: Ácido dodecil benzeno sulfônico.

2.1.2.2. Desengraxante de motores

É um desengraxante de alto poder de limpeza. Formulado para atuar com eficácia na limpeza de graxas, óleos e fuligens armazenadas em motores de automóveis, caminhões, motocicletas e máquinas industriais em geral. Também costuma ser utilizado nas partes laterais baixas dos veículos, para remover a sujeira pesada. Seu pH é aproximadamente entre 12 e 13. Composição química: Lauril éter sulfônico de sódio, tensoativo aniônico, água, corantes, espessantes, conservantes, silicatos, resina acrílica, hidróxido de sódio.

2.1.2.3. Xampu automotivo

Detergente automotivo concentrado, utilizado para limpar e dar brilho às laterais de automóveis, caminhões, ônibus e motocicletas, sem agredir a pintura. Tem pH próximo de 8. Composição Química: Tensoativo aniônico, alcalinizante, amida, lauril sulfato de sódio, espessante, conservante, resina opalescente, corante e veículo.

2.1.2.4. Renovador de pneus

Produto desenvolvido para aplicação em pneus e tapetes emborrachados. Sua utilização evita o ressecamento renovando a superfície onde é aplicado. Pode ser aplicado em qualquer superfície de borracha, como: pneus, borrachas dos vidros e das portas, laterais dos veículos e tapetes emborrachados. Composição Química: Emulsão de silicone 30%, glicerina bi-destilada, conservante, corante e veículo.

2.1.2.5. Cera automotiva

Indicada para automóveis, motos, carrocerias em geral, eletrodomésticos, barcos, etc. Possui silicone e polímeros que permitem produzir um brilho imediato na pintura e uma camada de proteção resistente e durável. Material inflamável com pH próximo a 9. Por ser parcialmente solúvel, pode permanecer nas águas afetando o ecossistema, sendo tóxico à vida aquática e podendo causar contaminação no solo e lençol freático. Sua decomposição produz gases nocivos como CO, CO₂ e NO_x. Composição Química: Cera Carnaúba, parafina, fluido de silicone, aguarrás, hidrocarbonetos parafínicos, álcool laurílico etoxilado, morfolina, ácido poliacrílico, 1,2 benzo-isotiazolin-3 ona, silicato de alumínio, fragrância, óleo mineral e água.

2.2. Legislação ambiental

Os óleos são uma ameaça constante ao meio ambiente, vista que 85% dos postos possuem troca de óleo e que as embalagens contêm resto de óleo dentro do recipiente e esse óleo é mundialmente considerado como produto maléfico ao meio ambiente e a saúde pública, estando inserido na “Classe II dos Resíduos Perigosos”, por apresentar toxicidade (BRASIL, 1996).

A Resolução do CONAMA, 273 de 29 de novembro de 2000 (BRASIL, 2000) considera:

“Toda a instalação e sistemas de armazenamento de derivados de petróleo e outros combustíveis, configuram-se como empreendimentos potencialmente ou parcialmente poluidores e geradores de acidentes ambientais e que postos de abastecimento de combustíveis são instalação que possuem equipamentos e sistemas para o armazenamento de combustível automotivo, com registrador de volume apropriado para o abastecimento de equipamentos móveis, veículos automotores terrestres, aeronaves, embarcações ou locomotivas; e cujos produtos sejam destinados exclusivamente ao uso do detentor das instalações ou de grupos fechados de pessoas físicas ou jurídicas, previamente identificadas e associadas em forma de empresas, cooperativas, condomínios, clubes ou assemelhados.”

Para a instalação, modificação, ampliação e operação de postos de abastecimento de combustíveis, deverá ter-se prévio licenciamento em órgão ambiental competente, sendo que

os principais impactos deste tipo de atividade são o vazamento de tanques de combustíveis, o risco de explosão e o lançamento de efluentes provenientes da lavagem interna e externa dos veículos e da rampa de abastecimento, sendo considerados com (BRASIL, 2000).

A Resolução do CONAMA nº 237/97, cita a atividade como sendo de potencial poluidor médio, sujeita ao licenciamento ambiental, sendo a Fepam (Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luis Roessler) o órgão ambiental competente no estado do Rio Grande do Sul para licenciar a atividade de comércio varejista de combustíveis e serviços. As licenças exigidas para a legalização ambiental dos postos de combustíveis são: LP (Licença Prévia), LI (Licença de Instalação) e LO (Licença de Operação), com o princípio das ações de promoção do controle dos diversos tipos de resíduos gerados por essa atividade, que se não forem adequadamente gerenciados, contribuirão com a poluição do meio ambiente, requerendo, assim, mudança de comportamento de seus proprietários e colaboradores (BRASIL, 2000).

Fica determinado ainda pela Resolução do CONAMA nº 273/2000, que todas as atividades referentes ao setor de armazenamento e distribuição de combustíveis, deverão ser realizadas em conformidade com as normas técnicas expedidas pela ABNT ou pelo órgão ambiental competente (BRASIL, 2000).

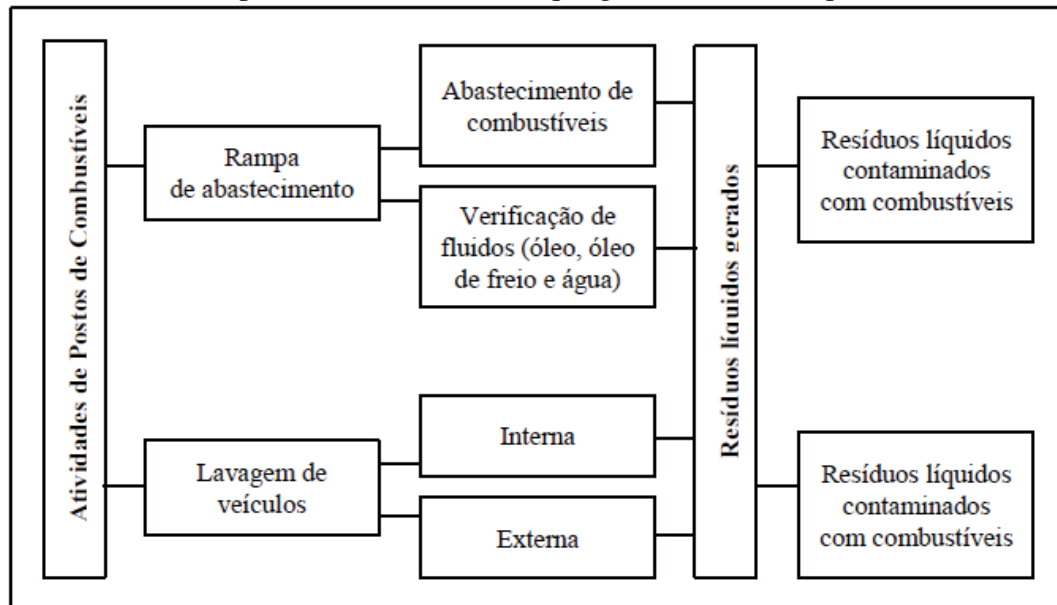
A Resolução 273 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) de 29 de novembro de 2000 (BRASIL, 2000) considera que toda instalação e sistemas de armazenamento de derivados de petróleo e outros combustíveis, configuram-se como empreendimentos potencialmente ou parcialmente poluidores e geradores de acidentes ambientais. Estabelece ainda as diretrizes para o licenciamento ambiental, tendo nesse instrumento o princípio das ações de promoção do controle dos diversos tipos de resíduos gerados por essa atividade, que se não forem adequadamente gerenciados, contribuirão com a poluição do meio ambiente.

2.3. Geração de resíduos em postos de combustíveis

Dentre os diversos resíduos gerados em um posto de abastecimento de combustível, destacam-se: embalagens de papelão, embalagens plásticas de óleo lubrificante, embalagens metálicas de óleo lubrificante, garrafas PET, filtros de óleo, filtros de combustível, filtro de ar, óleo lubrificante, terra contaminada com óleo, panos e estopas usadas contaminadas (COSTA; FERREIRA, 2008).

Na Figura 1 é apresentado o fluxograma dos serviços desenvolvidos em postos de abastecimento de combustíveis, relacionados com a geração de resíduos líquidos.

Figura 1: Atividades de postos de combustíveis que geram resíduos líquidos.



O efluente gerado por atividades de limpeza de automóveis pode conter quantidades significativas de óleos e graxas, sólidos em suspensão, metais tóxicos, surfactantes e substâncias orgânicas (TEIXEIRA, 2003).

Para Teixeira (2003), este efluente contém óleo, graxa, partículas de poeira, carbono e asfalto carregados da superfície do carro. Pode conter fluido hidráulico e óleo proveniente do motor e sistema de freios. Por isso sua composição é bastante complexa, constituindo uma fonte significativa de DQO.

Braile e Cavalcanti (2012) afirmam que o tratamento de despejos contendo detergentes é um dos grandes problemas da engenharia sanitária. Estes compostos contêm nutrientes como fosfato e nitrogênio além de compostos fenólicos, que afetam propriedades organolépticas da água. Podem causar a formação de emulsões estáveis dificultando a sua remoção. Após seu lançamento, podem provocar a formação de espumas disformes nos corpos de água, facilitando o transporte de uma série de microrganismos, principalmente bactérias e exercendo o papel de veículo de parasitas.

2.4. Biorremediação

A biorremediação baseia-se na capacidade de alguns organismos (microrganismos e/ou plantas) crescerem na presença de contaminantes, removendo estas substâncias devido à ação de seu metabolismo ou mesmo acumulando tais compostos (SILVA, 2009).

O uso de microrganismos na biorremediação pode ocorrer por espécies autóctones, alóctones ou combinação de ambos, que através do metabolismo correspondente podem formar compostos menos tóxicos ou promoverem total mineralização do contaminante produzindo dióxido de carbono e água (BOOPATHY, 2000).

2.4.1. Biorremediação de resíduos oleosos em efluentes

No ambiente subsuperficial contaminado por gasolina contendo etanol, o etanol, por sua alta solubilidade, estará presente na água subterrânea em concentrações muito superiores as dos BTEX. Dessa forma, o etanol e seus subprodutos de transformação, como o acetato e o metano, podem causar uma grande demanda de receptores de elétrons que poderiam ser utilizados na degradação dos compostos aromáticos mais tóxicos. No caso da presença simultânea de etanol e compostos BTEX em águas subterrâneas, estudos demonstram que o etanol é o substrato preferencial dos micro-organismos tanto em condições aeróbias como anaeróbias (COSTA et al., 2008).

A biodegradação dos BTEX em ambientes de subsuperfície está integralmente relacionada à biodegradação do etanol é necessário o desenvolvimento de metodologias de remediação que considerem as características específicas da gasolina comercial brasileira, isto é, a natureza da mistura gasolina/etanol em ambientes de subsuperfície. Muitas das tecnologias de remediação são baseadas na adição de oxigênio para facilitar a biodegradação. Entretanto, devido às dificuldades em se manter as condições aeróbias em um aquífero contaminado (baixa solubilidade do oxigênio, alta produção de biomassa, baixa porosidade do solo), tem crescido a utilização da injeção de receptores de elétrons alternativos para estimular a biodegradação anaeróbia dos contaminantes (COSTA et al., 2008).

A biorremediação surgiu inicialmente como uma técnica para tratamento de solos contaminados (ZAWIERUCHA et al., 2011). A técnica foi sendo ampliada para outras matrizes e os estudos apontaram a biorremediação para o tratamento de lodos gerados na indústria petroquímica, como apresentado no trabalho de Cerqueira et al. (2011) e no paper de revisão sobre o tema de Hu et al. (2013). A introdução desta técnica para tratamento de águas

de compostos orgânicos recalcitrantes é recente (SEMRANY et al., 2012), e há um número menor envolvendo a biorremediação em águas e efluentes, no entanto, o trabalho de Herrero; Stuckey (2014) mostra um panorama de aplicações da biorremediação em águas e efluentes. Em geral, os estudos voltam-se para águas contaminadas com algum composto tóxico ou produtos que apresentem persistência à degradação.

Castillo et al. (2012) relatam o estudo realizado para a degradação de cloro-fenol presente em efluentes de processamento de cortiça. O trabalho de Cheng et al. (2014) apresenta estudos de biorremediação em lodo ativado para tratamento de efluentes de refinarias de petróleo para a remoção de naftaleno. Há casos também de biorremediação em estação de tratamento de esgoto doméstico (GUO et al., 2010). Gargouri et al. (2011) utilizaram biorremediação de efluentes de uma refinaria de petróleo e o trabalho de Semrany et al. (2012) apresenta um estado da arte relativo a diversos exemplos de biorremediação de águas e efluentes contaminados com compostos organoclorados, nitrobenzênicos, resíduos de corantes e outros.

2.4.2. Microrganismos utilizados no processo de biorremediação

A microbiota altamente heterogênea do solo inclui a presença de um grande número de microrganismos capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia. Dentre os vários agentes que possuem a habilidade de degradar hidrocarbonetos estão as bactérias e os fungos. Porém, a contribuição de cada um varia com os fatores ambientais e as propriedades físico-químicas do solo (SILVA, 2009).

A distribuição da população microbiana está tipicamente associada ao conteúdo de matéria orgânica natural, a qual serve como estoque de micronutrientes (ferro, manganês, zinco, cobre, molibdênio, cloro e boro) e macronutrientes (carbono, nitrogênio, potássio, cálcio, magnésio, fósforo e enxofre (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

A diversidade metabólica e o curto tempo de geração das bactérias caracterizam-nas como boas iniciadoras das reações de biodegradação de hidrocarbonetos. Dentre os gêneros de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos (hidrocarbonoclasticas) predominam *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Nocardia*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* e *Micrococcus* (BOOPATHY, 2000).

Alguns grupos de bactérias associadas às cianobactérias formam um consórcio eficiente para a degradação de hidrocarbonetos (ATAGANA et al., 2006).

A Figura 2 apresenta os principais gêneros degradadores de petróleo e seus derivados, encontrados por Silva (2009).

Figura 2: Gêneros microbianos degradadores de hidrocarbonetos.

Bactérias	Fungos			
	Actinomicetos	Leveduras	Bolores	
<i>Achromobacter</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Candida</i>	<i>Acremonium</i>	<i>Graphium</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Endomyces</i>	<i>Debaryomyces</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Humicola</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>Aureobasidium</i>	<i>Lulworthia</i>
<i>Agrobacterium</i>		<i>Sporobolomyces</i>	<i>Beauveria</i>	<i>Mortierella</i>
<i>Alcaligenes</i>		<i>Yarrowia</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Mucor</i>
<i>Arthrobacter</i>		<i>Picchia</i>	<i>Ceriporiopsis</i>	<i>Oxyoirus</i>
<i>Bacillus</i>			<i>Chrysosporium</i>	<i>Paecilomyces</i>
<i>Brevibacterium</i>			<i>Cladosporium</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Burkholderia</i>			<i>Cochliobolus</i>	<i>Phialophora</i>
<i>Chromobacterium</i>			<i>Colorospora</i>	<i>Phoma</i>
<i>Comamonas</i>			<i>Coniothyrium</i>	<i>Pleurotus</i>
<i>Corynebacterium</i>			<i>Coriolopsis</i>	<i>Rhizopus</i>
<i>Cytiphaga</i>			<i>Cryphonectria</i>	<i>Scolecobasidium</i>
<i>Flavobacterium</i>			<i>Cylindrocarpon</i>	<i>Scopulariopsis</i>
<i>Gluconobacter</i>			<i>Dendosporium</i>	<i>Sprotrichum</i>
<i>Micrococcus</i>			<i>Dendryphiella</i>	<i>Spicaria</i>
<i>Mycobacterium</i>			<i>Drechslera</i>	<i>Tolyposcladium</i>
<i>Pasteurella</i>			<i>Fusarium</i>	<i>Trametes</i>
<i>Proteus</i>			<i>Geotrichum</i>	<i>Trichoderma</i>
<i>Pseudomonas</i>			<i>Glicocladium</i>	<i>Varicosporina</i>
<i>Rhodococcus</i>			<i>Gongronella</i>	<i>Verticillium</i>
<i>Sarcina</i>				
<i>Serratia</i>				
<i>Streptomyces</i>				
<i>Vibrio</i>				
<i>Xanthomonas</i>				

Fonte: SILVA, 2009.

Os fungos são considerados mais eficientes sob condições adversas do processo, como valores extremos de pH, limitação de nutrientes e baixo teor de umidade. Adicionalmente estes não apresentam prioridade quanto ao ataque ao substrato, embora os mecanismos de biodegradação sejam praticamente idênticos ao bacteriano. Dentre os fungos filamentosos, algumas linhagens de *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. são citadas como sendo capazes de degradar uma maior quantidade de hidrocarbonetos (ATAGANA et al., 2006).

Em alguns estudos envolvendo a utilização de hidrocarbonetos de petróleo por leveduras, relatou-se que diferentes espécies do gênero *Candida* demonstraram preferência

em degradar hidrocarbonetos de cadeias lineares. Outros trabalhos relevaram que leveduras pertencentes aos gêneros *Sporobolomyces* e *Rhodotorula* foram capazes de degradar hidrocarbonetos alifáticos, cíclicos e aromáticos (DEL'ARCO; FRANÇA, 1999).

Oliveira (2001) verificou que um consórcio microbiano constituído por linhagens dos gêneros *Pseudomonas*, *Serratia*, *Bacillus*, *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Streptomyces* foi capaz de degradar 100% dos *n*-alcanos, compreendidos entre o decano e o eicosano, e 40% dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos avaliados (1-metil-naftaleno, 2-metil-naftaleno, fluoreno, pireno, criseno, fenantreno, benzo (a), antraceno e benzo (b), fluoretano).

2.4.3. Biodegradação dos hidrocarbonetos

A biodegradabilidade dos componentes do petróleo é dependente primeiramente de sua estrutura química, sendo influenciada também pelo estado físico e pela toxicidade dos compostos. O aumento das cadeias implica em uma maior complexidade estrutural e, conseqüentemente, em uma diminuição do número de microrganismos capazes de degradar estes compostos. Algumas das maiores estruturas moleculares são insolúveis e a maioria das bactérias pode somente utilizar os compostos dissolvidos em água (ATLAS, 1995).

A degradação pode ocorrer através do metabolismo de respiração aeróbia ou anaeróbia. Na primeira atuam inicialmente as enzimas oxigenases para inserir átomos de oxigênio na molécula de hidrocarboneto e, posteriormente, este elemento funciona como aceptor final de elétrons, sendo os produtos finais do metabolismo dióxido de carbono, água ou compostos resultantes da degradação parcial dos hidrocarbonetos (SILVA, 2009).

2.4.4. Fatores que influenciam a biodegradação

As condições ambientais são de fundamental importância para a sobrevivência e crescimento microbiano. Se condições tais como pH, temperatura, umidade e aeração não são adequadas, o desempenho da microbiota é afetado de modo adverso. A manipulação e a otimização destes fatores são fundamentais para a obtenção de bons resultados. (BOOPATHY, 2000).

Uma forma de viabilizar a biodegradação é a adaptação dos microrganismos à fonte de carbono. Este processo visa reduzir o tempo de tratamento, aumentar a eficiência de remoção e evitar inibição do crescimento (OLLIVIER; MAGOT, 2005).

2.4.4.1. Aceptores de elétrons

Um dos principais fatores que governam a biodegradação é o tipo e a biodisponibilidade de aceptores de elétrons. No Quadro 2 é apresentada a relação entre a forma de respiração microbiana, os aceptores de elétrons, as características e o potencial de oxi-redução. O potencial de oxi-redução mede a tendência de uma substância doar ou receber elétrons e, por conseguinte, é uma medida quantitativa da energia livre envolvida na transferência de elétrons. Doadores e aceptores de elétrons são denominados redutores e oxidantes, respectivamente (MADIGAN et al., 2010).

Figura 3: Relação entre a forma de respiração microbiana, aceptores de elétrons e potencial redox.

Forma de Respiração	Aceptor de Elétrons	Produto	Característica	Potencial Redox (mV)
Aeróbia	O ₂	H ₂ O	Aeróbios facultativos e estritos	+400
Redução de Ferro III	Fe ³⁺	Fe ²⁺	Aeróbios, facultativos e anaeróbios estritos	+77 (em pH 2-3)
Redução do Nitrato	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻ , N ₂ O, N ₂	Aeróbios facultativos	-100
Redução de Sulfato	SO ₄ ²⁻	HS ⁻	Anaeróbios estritos	-160 a -200
Metanogênica	CO ₂	CH ₄	<i>Archaea</i> metanogênica	-300

Fonte: MADIGAN et al. (2010).

Verifica-se que O₂/H₂O é o mais eletropositivo; mais energia é disponibilizada quando o O₂ é usado do que quando outro aceptor de elétrons é empregado.

Em ambiente rico em matéria orgânica, os processos aeróbios consomem rapidamente o oxigênio, estabelecendo uma condição de anaerobiose. Se mais de um aceptor de elétrons está presente, somente um predominantemente suprirá mais energia aos microrganismos nativos e estes tenderão a dominar o ambiente. Essa sucessão de espécies microbianas é função do pH e do potencial redox. À medida que o potencial diminui, ocorre transição da predominância de aeróbios para facultativos e, em seguida, anaeróbios (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

2.4.4.2. Umidade

A umidade é essencial para a biodegradação uma vez que a maioria dos mecanismos de degradação ocorre na interface água-hidrocarboneto. A água é importante para o movimento dos microrganismos unicelulares que, por isso, são restritos aos filmes de água, enquanto fungos filamentosos e actinomicetos podem atravessar os vazios insaturados de solo, através do crescimento micelial (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

2.4.4.3. Temperatura

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que afetam o desenvolvimento de microrganismos. Para a maioria dos microrganismos, mesófilos, a medida que a temperatura aumenta, as reações enzimáticas e químicas na célula ocorrem em maiores taxas e o crescimento torna-se mais rápido, enquanto que em temperaturas mais baixas há um declínio da velocidade das reações químicas e bioquímicas (MADIGAN et al., 2010).

Em ambientes de baixa temperatura a volatilização de hidrocarbonetos é desfavorecida, assim, os compostos de menor cadeia carbônica tendem a permanecer no solo e, por conseguinte, viabilizar a solubilização da membrana dos microrganismos, o que diminui a eficiência do processo. Em temperaturas mais elevadas pode ocorrer a inativação de enzimas e/ou inviabilidade de alguns microrganismos, o que também limita o tratamento por biorremediação (ATLAS, 1995).

2.4.4.4. pH

O pH é um fator determinante da taxa de crescimento dos microrganismos. Além disso, esse parâmetro pode influenciar a solubilidade de micro e macronutrientes, a mobilidade do material tóxico e a reatividade dos minerais. O ferro, o alumínio e o manganês apresentam características tóxicas em pH abaixo de 5,0. O fósforo está menos biodisponível em valores extremos de pH (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

As bactérias são consideradas agentes iniciadores da biorremediação e sua atividade metabólica situa-se na faixa de pH de 6,5 a 8,0. O controle desse parâmetro no solo pode maximizar a biodegradação (SILVA, 2009).

Del'Arco (1999) descreve que o pH é um parâmetro de seleção de grupos microbianos, além de um fator de otimização da biorremediação. A autora descreve que valores de pH ácido favoreceram o crescimento de fungos filamentosos e leveduras, e valores de pH na faixa de 6,0 a 7,0 favoreceram o crescimento de bactérias. Em processos de biorremediação *in situ*, a microbiota nativa pode ser o agente do tratamento. Neste caso, estes microrganismos estão adaptados ao pH do local, viabilizando a biodegradação por técnicas de bioestimulação que não necessariamente incluem a correção do pH. No entanto, cabe destacar que durante o metabolismo de hidrocarbonetos ocorre a formação de intermediários ácidos que podem alterar o pH do meio, desfavorecendo a biodegradação.

2.4.4.5. Nutrientes

Os microrganismos são formados da combinação de elementos que são os componentes de seu material genético, moléculas estruturais, enzimas e plasma intracelular. O metabolismo microbiano e o crescimento são dependentes da disponibilidade de nutrientes essenciais (SILVA, 2009).

2.4.5. Biossurfactantes

Os biossurfactantes são compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, e consistem em sub-produtos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras. Podem ser produzidos extracelularmente ou como parte da membrana celular desses microorganismos (SCHMTZ, 2013).

Surfactantes são moléculas anfipáticas com uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, podendo ser sintéticos, obtidos a partir de sínteses químicas, ou biossurfactantes, produzidos por microrganismos. Eles se acumulam em interfaces apresentando diferentes polaridades, em especial óleo/água, ar/água, e agindo como agentes umectantes em superfícies sólidas (água/sólido). Esse processo dinâmico é baseado na habilidade dos biossurfactantes de reduzir a tensão superficial pelo remanejamento molecular, através do acúmulo na superfície de compostos insolúveis, influenciando as ligações de hidrogênio e outras interações hidrofóbicas-hidrofílicas, aumentando a área superficial destes, levando a um aumento da biodisponibilidade e consequente biodegradabilidade (COLLA; COSTA, 2003).

Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de

polaridade (óleo/água e água/óleo). A formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, reduz a tensão interfacial e superficial, sendo responsável pelas propriedades peculiares dos surfactantes (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Substâncias ativas de superfície ou surfactantes são molécula anfipática, que tende a diminuir tensão de superfície de fluidos. Além disso, eles têm a capacidade de orientar-se na interface dos dois compostos não miscíveis (MOO et al., 2011).

A produção de biosurfactantes está associada aos processos de biorremediação de resíduos oleosos em solos e águas. Se os microrganismos possuem esta capacidade, é provável que sejam bons agentes de biorremediação para resíduos oleosos. Surfactantes microbiológicos apresentam características para o auxílio ambiental, a possibilidade de produção através de fermentações e suas potenciais aplicações em áreas como a proteção ambiental, recuperação de resíduos de óleos, cuidados à saúde e indústrias de processamento de alimentos (KIM et al., 2000).

2.5. Técnicas de biorremediação

Diversas tecnologias têm sido utilizadas na remediação de solos e águas subterrâneas impactadas com hidrocarbonetos de petróleo. Quando os processos naturais de atenuação são limitados pela disponibilidade de nutrientes e receptores de elétrons, tecnologias de remediação ativas são utilizadas (MADEIRA, 2010).

De acordo com Silva (2009), existem alguns métodos aplicados à biorremediação para acelerar a biodegradação de hidrocarbonetos. Estes métodos são a bioestimulação e a bioaumentação.

Numa estratégia de biorremediação podem-se considerar três métodos hierarquizados por complexidade crescente: atenuação natural, bioestimulação e bioaumentação (IWAMOTO et al., 2001).

As tecnologias de biorremediação podem ainda ser classificadas como *in situ* e *ex situ*. Os processos são classificados como *in situ* quando as operações são realizadas nos locais contaminados, ou seja, sem que haja a remoção do material. Quando o tratamento ocorre fora do local atingido, classifica-se o processo como *ex situ* (SILVA, 2009).

2.5.1. Atenuação natural

A atenuação natural consiste em monitorizar o progresso natural de degradação, em determinados pontos de recolha de amostras, ao longo do tempo (IWAMOTO et al., 2001).

Na atenuação natural, a degradação do poluente orgânico presente no solo ocorre sem adequação de qualquer condição ambiental, onde a desestruturação do poluente é realizada pelos micro-organismos nativos do local, devido à adaptação natural destes à presença do contaminante (PERELO, 2010).

Os microrganismos passam a utilizar o composto orgânico poluente como fonte de carbono, ocasionando assim uma redução da sua concentração ao longo do tempo. Nesse sistema não só os processos biológicos estão envolvidos, mas também, processos físicos e químicos podem ser responsáveis pela redução da concentração do poluente (BEZERRA, 2009).

2.5.2. Bioestimulação

A bioestimulação é utilizada quando a degradação natural dos contaminantes não se dá ou é muito lenta, manipulando o ambiente de modo a que a biorremediação seja estimulada. Essa estimulação é feita através da adição de nutrientes com doadores de elétrons e/ou fontes de carbono. Contudo esta adição tem de ser efetuada de forma bastante controlada, uma vez que em muitos dos casos os compostos químicos adicionados ao ambiente são tóxicos, havendo a necessidade de monitorar cuidadosamente todo o processo. É expectável, pela acumulação de evidências científicas, que a aplicação *in-situ* da bioestimulação se torne numa tecnologia segura de descontaminação (IWAMOTO et al., 2001).

A bioestimulação é definida como a melhoria dos fatores ambientais e, dentre eles, destacam-se o pH, o teor de umidade, a temperatura, a correção de nutrientes (fontes de carbono orgânico, fósforo, nitrogênio, etc.) e de aceptores finais de elétrons (OLLIVIER; MAGOT, 2005).

O processo de bioestimulação consiste em introduzir nutrientes adicionais na forma de fertilizantes orgânicos e/ou inorgânicos na área contaminada, incentivando o crescimento de micro-organismos capazes de degradar os poluentes existentes no meio (MILLER, 2010) e, com isso, promovendo o aumento da população microbiana e consequentemente, uma degradação mais rápida do contaminante (KANISSERY; SIMS, 2011).

2.5.3. Bioaugmentação

Consiste na maximização das capacidades de biodegradação dos locais contaminados, através da inoculação de bactérias que apresentem as capacidades catalíticas desejáveis de forma a degradar os contaminantes alvo. Considera-se que esta é uma abordagem bastante eficiente, apresentando, contudo, a desvantagem de poder causar efeitos desconhecidos no ecossistema, uma vez que são introduzidas grandes quantidades de bactérias. Após a remediação é necessário confirmar que as bactérias injetadas não se mantêm viáveis, de forma a não afetarem por um longo período a comunidade biológica autóctone do local (IWAMOTO et al., 2001).

A bioaugmentação é a aceleração e aumento da eficiência de degradação do poluente pela inserção de linhagens hidrocarbonoclasticas alóctones que vão agir concomitantemente com os microrganismos autóctones (OLLIVIER; MAGOT, 2005).

Segundo Bento et al. (2005), a melhor performance da bioaugmentação pode ser atingida pelo emprego dos microrganismos previamente selecionados aumentando assim a população e diversidade microbiana. A partir desse pressuposto, o aumento da comunidade microbiana específica, em conjunto com a adição de nutrientes, promove uma redução substancial no tempo de tratamento.

A adição de materiais estruturantes aos solos torna as características físicas do mesmo mais propícias a biorremediação. Solos com uma baixa permeabilidade, por exemplo, são difíceis de aerar, e frequentemente formam aglomerados, tornando difícil a distribuição de umidade, ar, adição de nutrientes (bioestímulo) e de microrganismos (bioaumento). Desta forma, materiais de baixa densidade (agentes estruturantes) são adicionados ao solo para reduzir a sua densidade bulk, aumentar a porosidade e possibilitar maior difusão de oxigênio. Alguns trabalhos encontrados na literatura reportam o aumento da degradação de compostos (RHYKERD et al., 1999, MOLINA et al., 2004).

2.6. Uso de microrganismos encapsulados em processos de biorremediação

A imobilização celular consiste no confinamento físico das células em uma região definida de espaço, na qual são mantidas suas atividades catalíticas em processos de operação contínua ou descontínua possibilitando a reutilização das mesmas. A maioria dos processos fermentativos industriais convencionais utiliza células livres em suspensão, porém o uso de

microrganismos imobilizados permite um aumento da produtividade devido à elevada concentração de células (COVIZZI et al., 2007).

A maior concentração de células microbianas garante a síntese dos metabólitos e aumenta a eficiência da fermentação. Além disso, facilita a recuperação dos produtos do metabolismo de interesse e ajuda na manutenção dos fermentadores, uma vez que não apresenta problemas de adesão e obstrução aos eletrodos e tubos (MOREIRA et al., 1998, KOURKOUTAS et al., 2004, BERGMAIER; CHAMPAGNE; LACROIX, 2005).

A imobilização de células surgiu como alternativa à imobilização de enzimas, pois não requer etapas de extração, isolamento e purificação. Desde então, o processo de imobilização tem conseguido vários avanços, principalmente na área da biotecnologia, permitindo a obtenção de metabólitos microbianos de maneira mais eficiente (COVIZZI, et al. 2007).

Técnicas de imobilização adicionado a células bacterianas pode ser uma solução para gerar barreiras de proteção em torno de microrganismos, e também para aumentar a atividade metabólica. A imobilização pode ser uma forma eficiente para proteger os microrganismos do ataque por protozoários, bem como reduzindo a perda de biomassa causada por lavagem (HERRERO; STUCKEY, 2014).

Polímeros de carboidrato como alginato, poliacrilamida e carragenas têm sido utilizados para imobilizar fungos e enzimas, representando uma forma flexível de imobilização. A matriz ou suporte de imobilização é o fator chave para aplicação ambiental da biomassa imobilizada. Os polímeros da matriz determinam a resistência final das partículas imobilizadas (TAM et al., 2011).

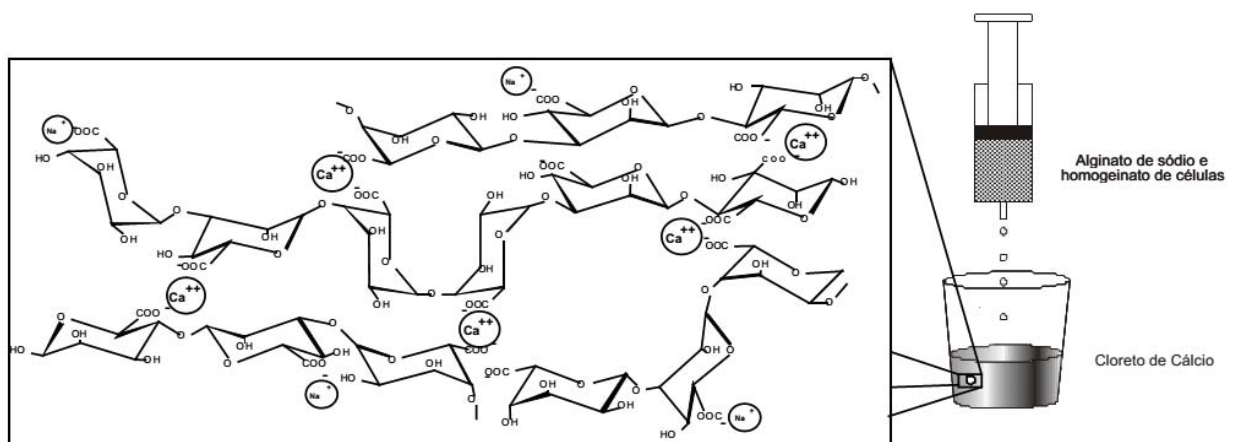
Técnicas de imobilização microbiana, incluindo o encapsulamento em gel, têm várias vantagens e são melhores que o cultivo tradicional de microrganismos em meio de cultura (FENICE et al., 2000). O método de encapsulamento consiste em misturar uma suspensão micelial em uma solução de alginato de sódio, seguido de um gotejamento numa solução de cloreto de cálcio. A troca iônica do sódio pelo cálcio resulta em esferas solidificadas de alginato. O tamanho das esferas pode ser facilmente controlado pelo dispositivo de gotejamento. O sistema oferece grande flexibilidade, como adição de cargas para melhorar a estabilidade e conservação dos grânulos. A distribuição da biomassa de forma homogênea nas cápsulas é garantida por meio da constante agitação da suspensão micelial (MAUPERIN et al., 1987).

Covizi et al. (2007) citam que as técnicas de imobilização podem ser naturais (quando envolvem a formação de biofilmes e adsorção em suportes) ou artificiais (quando incluem a encapsulação em matrizes). Embora a imobilização por adsorção em suportes tenha sido a

técnica preferencial para tratamento de efluentes, concentrações celulares maiores podem ser obtidas por encasulamento, apesar do método requerer a adição de produtos químicos (HERRERO; STUCKEY, 2014). A encapsulação por engaiolamento é um método e está baseado na inclusão artificial das células, que ficam inseridas em uma malha rígida, ou semi-rígida, que impede a difusão destas para o meio de cultivo. Este aprisionamento do microrganismo possibilita a troca de nutrientes, metabólitos e gases durante o processo fermentativo.

O mecanismo clássico de imobilização por engaiolamento é a mistura de células microbianas com um composto polimérico que apresenta cargas negativas (alginato, pectato, ou outro polímero orgânico com cargas negativas). Esta mistura é gotejada em uma solução com íons Ca^{2+} , por exemplo, conforme ilustra a Figura 4. O íon Ca^{2+} promove a formação de ligações iônicas, que resultam na formação de um gel consistente e insolúvel, o qual imobiliza o microrganismo.

Figura 4: Formação do gel de alginato de cálcio por engaiolamento.



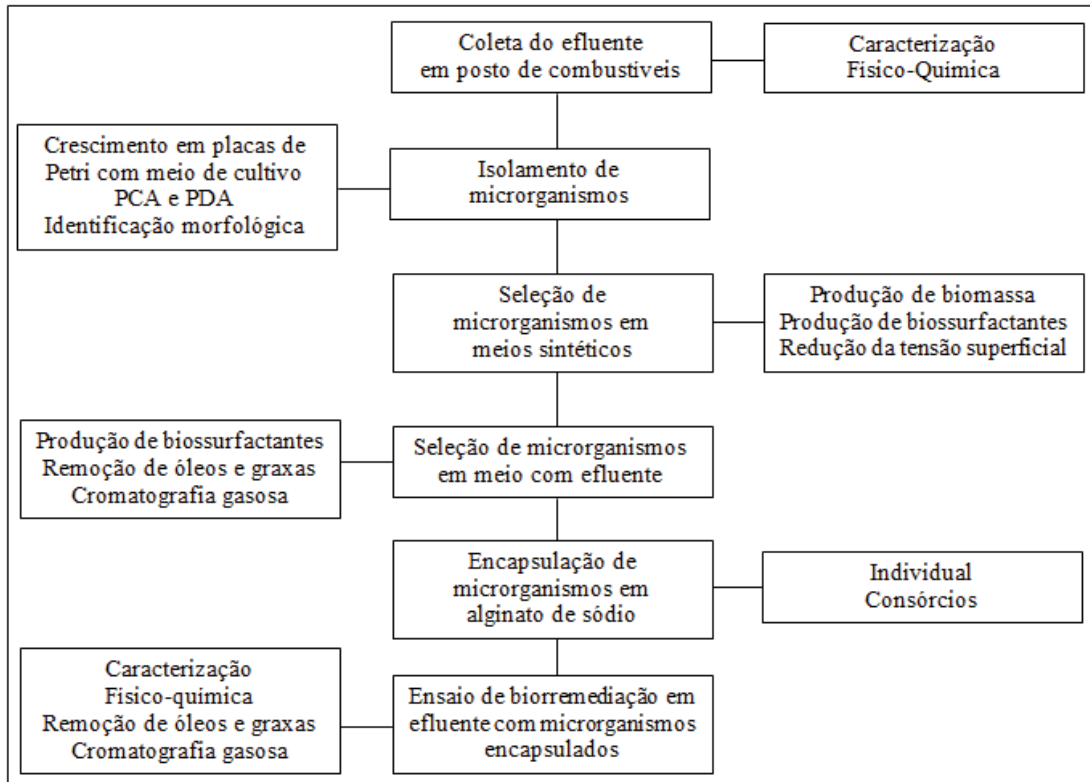
Fonte: COVIZI et al., (2007).

Este trabalho, a partir do isolamento de microrganismos oriundos do efluente de posto de combustíveis, apresenta uma alternativa para a melhoria dos sistemas de tratamento utilizados pelos mesmos. A encapsulação permite o controle dos microrganismos utilizados, possibilitando sua retirada do meio após o tratamento, evitando maior contaminação do efluente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental contou com diversas etapas que estão descritas na Figura 5 onde apresenta-se o fluxograma geral dos materiais e métodos.

Figura 5: Fluxograma geral dos materiais e métodos.



A fim de atender os objetivos específicos, coletou-se e caracterizou-se o efluente da caixa de separação de água e óleo de um posto de combustíveis. A partir do efluente coletado, realizou-se o isolamento de microrganismos (fungos e bactérias). Selecionou-se os microrganismos com potencial de produção de biossurfactantes, redução da tensão superficial, produção de biomassa e remoção de óleos e graxas. Encapsulou-se os consórcios dos microrganismos com potencial de degradação de resíduos oleosos em efluentes líquidos. Simulou-se um processo de biorremediação de efluentes líquidos de posto de combustíveis por bioaugmentação, utilizando os consórcios microbianos encapsulados.

3.1. Coleta e caracterização do efluente

O efluente foi coletado na saída da caixa de separação de água e óleo de um posto de combustíveis do município de Passo Fundo, que é lançado na rede municipal de coleta de esgotos. Foram realizadas quatro coletas instantâneas de 5 L de efluente em um recipiente de polietileno e enviados imediatamente para a caracterização.

A caracterização seguiu os métodos sugeridos por American Public Health Association (APHA, 2000). Os parâmetros analisados foram Temperatura, Demanda Química de Oxigênio (DQO), Óleos e graxas, Sólidos Suspensos, pH, Turbidez, Nitrogênio Total, Fósforo, Sólidos Sedimentáveis e Cor.

3.2. Isolamento, identificação e manutenção dos microrganismos

Com o efluente da primeira coleta foi realizada a diluição seriada até 10^{-7} . 1 mL de cada diluição foi inoculado na superfície de meios sólidos em placas de Petri. Os meios utilizados foram apropriados para o isolamento de bactérias (Plate Count Agar – PCA), e fungos (Plate Dextrose Agar - PDA). As placas foram incubadas em estufa durante 24 a 48 h a 25°C (meio PDA) e 35°C (meio PCA). Colônias individuais foram repicadas sucessivamente para meios PCA e PDA até a obtenção de colônias puras. Os microrganismos isolados foram identificados quanto à suas características macroscópicas (formato da colônia, cor, etc.) e microscópicas. Os fungos foram submetidos à técnica de microcultivo enquanto que bactérias que foram submetidas à coloração de Gram. A microscopia foi realizada em microscópio ótico marca Carl Zeiss - Germany (980898).

As colônias isoladas foram mantidas em meio PCA e PDA em tubos inclinados em estufas às mesmas temperaturas acima descritas (RIBEIRO; SOARES, 2000).

3.3. Seleção de microrganismos capazes de biorremediar resíduos oleosos a partir de meios sintéticos

Os microrganismos isolados foram utilizados para a realização de cultivos em meios líquidos sintéticos contendo óleo diesel como fonte de carbono. A resposta para estes ensaios foi o crescimento de microrganismos, avaliado pela produção de biomassa, pela produção de biossurfactantes e pela redução da tensão superficial.

Os biossurfactantes são surfactantes sintetizados por diferentes microrganismos e que facilitam o acesso destes a substratos hidrofóbicos (SOUZA et al., 2014). A sua presença pode reduzir a tensão superficial do meio ou causar a emulsificação de misturas bifásicas e por esse motivo, a tensão superficial e a atividade emulsificante, juntamente com o crescimento de biomassa, foram selecionados como resposta do sistema nesta etapa do trabalho.

O inóculo foi preparado em erlenmeyers de 250 mL que continham 30 mL do meio PC (Tabela 1) e 2% de óleo diesel. Foi adicionada 1 alçada do microrganismo e após incubado em agitador orbital a 100 rpm, por 48 h, a 30 °C.

Para o primeiro ensaio, adicionou-se 95 mL do Meio 1 (Tabela 1), 5 mL do inóculo (descrito acima) e 2% de óleo diesel, em erlenmeyers de 250 mL. Os cultivos foram incubados em agitador orbital a 100 rpm e 30°C por 14 dias. Foram retiradas amostras nos tempos inicial e final, as quais foram centrifugadas por 20 min a 5000 rpm. As células foram utilizadas para a análise de produção de biomassa e o sobrenadante para as análises de produção de biossurfactantes e tensão superficial.

O segundo ensaio foi realizado com 30 mL de inóculo, 70 mL do Meio 2 (Tabela 1) e apenas 1% de óleo diesel, pois o efluente continha óleos e graxas, em erlenmeyers de 250 mL. Os cultivos foram incubados em agitador orbital a 100 rpm, a 30°C por 5 dias. Foram retiradas amostras nos tempos inicial e final, centrifugadas por 20 minutos a 5000 rpm. As células foram utilizadas para a análise de produção de biomassa e o sobrenadante para as análises de produção de biossurfactantes e tensão superficial.

Tabela 1: Meios de cultivos para crescimento dos microrganismos.

Preparo do inóculo		Meio 1		Meio 2	
PC (Plate Count)		Bushnell-Haas		Arakaki (2010)	
Triptona	5 g	KH ₂ PO ₄	1 g	Extrato de levedura	10 g
Extrato de levedura	2,5 g	K ₂ HPO ₄	1 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
Glicose	1 g	NH ₄ NO ₃	1 g	KH ₂ PO ₄	5 g
Água destilada	1 L	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,02 g	MgSO ₄	0,5 g
		FeCl ₃	0,05 g	Água destilada	1 L
		CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02 g		
		Água destilada	1 L		

A avaliação da capacidade de crescimento dos microrganismos foi realizada pela determinação do peso seco de células no início e no final dos cultivos. 10 mL dos cultivos foram centrifugados em centrífuga CT 5000 R. Os sólidos foram secos em cadinhos de

alumínio e tarados em estufa por 24 h. Após realizou-se a pesagem dos cadinhos com a amostra seca diminuindo-se o peso do cadinho, obtendo-se assim o crescimento da biomassa durante os cultivos.

A produção de biossurfactantes foi medida pela atividade emulsificante (AE). Esta foi medida pela atividade água em óleo (A/O) e de óleo em água (O/E) segundo método proposto por Martins et al., (2006) de acordo com o procedimento de Decesaro et al. (2013). 3,5 mL de extrato e 2 mL de combustível (fase orgânica da emulsão: diesel, gasolina ou biodiesel) foram adicionados em tubos de 10 mL. Os postos comercializam estes três combustíveis à base de hidrocarbonetos, e por esse motivo decidiu-se testar a capacidade de emulsificação perante utilizando aos três como fase orgânica da emulsão. A mistura foi agitada em agitador vórtex a 700 m^{-1} , por 1 min. Após 60 min de repouso, foi lida a absorbância do meio emulsificado O/A em espectrofotômetro a 610 nm. Após 24 h de repouso foi realizada a leitura da altura da emulsão A/O formada e da altura total (altura da emulsão mais altura da camada remanescente de óleo). A atividade emulsificante A/O foi calculada a partir das Equações 2 e 3. O branco foi realizado utilizando-se água destilada no lugar dos extratos dos cultivos com os microrganismos.

$$AE_{O/A} = (ABS_{amostra} - ABS_{branco}) \quad (1)$$

$$AE_{A/O} = (E_{amostra} - E_{branco}) \quad (2)$$

$$E = (h_{emulsão} / h_{total}) \cdot 100 \quad (3)$$

Sendo:

AE = atividade emulsificante (UE);

O/A = óleo em água;

ABS = absorbância;

A/O = água em óleo;

E = relação centesimal entre a altura da emulsão água/óleo e a altura total;

A medida da tensão superficial foi realizada de acordo com o método do anel denominado Du-Nuoy's ring method. Neste método, a amostra é colocada em um recipiente com o anel inicialmente submerso, o anel sobe romper a ligação com a água. A força exercida sobre o anel no momento em que a lâmina do líquido se rompe, dá a medida da tensão superficial. Segundo Matsuura (2004) para verificar a produção de biossurfactante numa

cultura microbiana é necessário haver um método para determinar a atividade surfactante e o método mais empregado é a medição da tensão superficial do sobrenadante.

3.4. Seleção de microrganismos capazes de biorremediar resíduos oleosos a partir de meios contendo efluente

Os microrganismos selecionados a partir dos ensaios em meios sintéticos foram submetidos a um novo cultivo, contendo 70% de efluente de posto de combustíveis e 30% de meio nutritivo PC (Plate Count), onde os microrganismos cresceram por 14 dias. Nos tempos inicial e final, foram avaliadas a produção de biossurfactantes e a remoção de óleos e graxas pelo método de Soxhlet, utilizando hexano como solvente e 4 h de extração segundo recomendações de APHA (2000). Identificou-se, as cadeias carbônicas que sofreram degradação, para isso foi realizada uma extração utilizando-se 10 mL de amostra e quatro extrações sucessivas com 10 mL de hexano em funil de extração, separando-se a fração hidrofóbica. O solvente era evaporado e a fase oleosa ressolubilizada em 2 mL de hexano e submetido a cromatografia gasosa. A cromatografia foi realizada em um cromatógrafo gasoso com espectrômetro de massa em série tipo Triplo Quadrupolo (Perkin Elmer). A coluna (RTX-5MS) possuía dimensões de 30 m x 0,25 µm x 0,25 mm. O forno era programado do seguinte modo: temperatura inicial de 90 °C (3,0 min), incremento de temperatura de 6 °C/min até 185 °C (0 min), incremento de temperatura de 2 °C/min até 300 °C (1 min). A temperatura do injetor foi 250°C. Hélio foi o gás de arraste a vazão de 0,95 mL.min⁻¹ e 1 µL de amostra foi injetado. O software foi o GC Solution versão 4.11.

3.5. Encapsulação dos microrganismos selecionados

Os três microrganismos que apresentaram os melhores resultados nas etapas anteriores foram encapsulados individualmente e após em consórcios, delineados em todas as combinações possíveis entre eles para a aplicação em ensaios de biorremediação do efluente.

Construiu-se as curvas de crescimento de cada microrganismo (Apêndice A) para a verificação do tempo que permaneceriam em fase exponencial. A concentração celular foi obtida a partir da leitura da absorbância a 610 nm (curvas padrão apresentadas no Apêndice B), para que a encapsulação fosse realizada com o microrganismo ainda em sua fase de crescimento.

Um inóculo em meio PC foi preparado e os microrganismos selecionados cresceram por tempo determinado pela curva de crescimento. Ao atingirem a fase exponencial leu-se a absorbância e calculou-se o volume de células necessárias para a encapsulação, a partir da concentração de células.

Os microrganismos foram imobilizados utilizando-se alginato de sódio segundo metodologia utilizada por Pashova et al. (1999). O alginato de sódio de concentração final 3% (p/v) foi suspenso em solução tampão fosfato 1 mol/L pH 7,0 aquecido a 95°C e em seguida, resfriada a 40°C. A seguir, 50 mL da suspensão de células foram adicionados em 50 mL da solução de alginato de sódio.

A pasta (células e gel de alginato) foi gotejada com auxílio de bomba peristáltica sobre uma solução de CaCl₂ 2,0% (p/v), permanecendo em repouso por 2 horas a 4°C. Após 3 lavagens sucessivas das esferas de polímero de alginato de cálcio/espores com água destilada estéril, as esferas foram utilizadas nos ensaios de biorremediação numa proporção de 5 g de capsulas para 50 mL de efluente, ou seja, 10 % de cápsulas em relação ao volume do efluente.

As cápsulas (células e gel de alginato) contendo os microrganismos, foram avaliadas a fim de verificar a sobrevivência dos microrganismos. Foram adicionados 10 gramas das mesmas em liquidificador estéril e trituradas com 100 mL de água peptonada estéril (0,1%). A partir disso foram realizadas diluições seriadas em água peptonada estéril (0,1%) de até 10⁻⁸. Foram preparados os meios PCA (*Plate Count Agar*) e PDA (*Potato Dextrose Agar*) para cultivo em placas de Petri. Os consórcios que continham bactérias e fungos foram plaqueados nos dois meios de cultivo. Os meios e os materiais foram esterilizado a 121°C durante 20 mim. Após realizado o plaqueamento de 0,1 mL de cada diluição da solução e incubado por 48 h a 35 °C.

3.6. Biorremediação de efluente com microrganismos encapsulados

A simulação de biorremediação foi realizada em erlenmeyers de 250 mL, contendo 150 mL de efluente e 15 g de microrganismos encapsulados, numa proporção de 10 %. Os ensaios permaneceram por 14 dias em agitador orbital a 100 rpm e 25°C. Os parâmetros Temperatura, DQO, Óleos e graxas, Sólidos Suspensos, pH, Turbidez, Nitrogênio Total Kjeldahl, Fósforo, Sólidos Sedimentáveis, Cor e Surfactantes, foram determinados no efluente bruto e após a biorremediação. A análise cromatográfica foi realizada nos tempos inicial e final.

3.7. Tratamento dos dados

Os resultados foram submetidos à análise de variância, seguida da comparação de médias pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, ao nível de 95% de confiança, por meio do pacote computacional STATISTICA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do efluente

A Tabela 2 apresenta as caracterizações do efluente do posto de combustíveis, após o tratamento em caixa de separação de água e óleo. Observou-se uma oscilação dos parâmetros analisados entre cada coleta. Os motivos podem ser os mais variados, como a vazão de efluentes lançados (resultando em um menor tempo de residência na caixa de separação), maior carga inicial devido aos diferentes veículos lavados na rampa de lavagem, entre outros.

Tabela 2: Valores encontrados para os parâmetros analisados do efluente coletado, comparado com a legislação vigente.

Parâmetro	Caracterização do Efluente				Consema 128
	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4	
DQO (mg/L)	295±77,51 ^a	702±25,50 ^c	403±31,00 ^b	845±4,00 ^d	360
Sólidos Suspensos (mg/L)	10±2,82 ^a	62±7,57 ^b	63±7,00 ^b	150±28,00 ^c	155
Fósforo (mg/L)	2,7±0,038 ^b	2,0±0,02 ^b	0,04±0,01 ^a	0,15±0,01 ^a	4
Óleos e Graxas (mg/L)	142,2±10,97 ^a	306±39,03 ^b	95±23,00 ^a	255±57,00 ^b	10
Sólidos Sedimentáveis (mL/L)	0,11±0,01 ^a	6,05±0,07 ^c	0,26±0,01 ^b	0,26±0,01 ^b	<0,1
Turbidez (NTU)	24,3±0,06 ^a	69,77±0,06 ^c	63,05±0,07 ^b	157±2,12 ^d	-
Cor (Hazen)	11,83±0,06 ^a	12,13±0,06 ^a	569,5±00,73 ^c	199,5±21,92 ^b	Ausente
Temperatura (°C)	29,05±0,07 ^d	27,10±0,14 ^c	20,55±0,78 ^a	25,05±0,07 ^b	<40
pH	6,5±0,1 ^b	5,5±0,1 ^a	7,1±0,1 ^c	7,2±0,1 ^c	6 e 9
Nitrogênio (mg/L)	0,57±0,02 ^a	2,26±0,06 ^b	7,02±0,43 ^c	2,55±0,47 ^b	20

*ND: Não detectado.

Letras iguais na mesma linha indicam que não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança. Para simples comparação, foi considerada uma vazão entre 20 m³.d⁻¹ e 100 m³.d⁻¹.

A partir dos resultados de DQO verificou-se que esta foi superior à legislação ambiental em três das quatro coletas realizadas, demonstrando que o efluente de posto de combustíveis necessita de uma maior atenção referente ao seu sistema de tratamento de efluentes. Além disso, esta carga poluidora pode ser composta também por argila (proveniente da lavagem de veículos), acrescentando sólidos suspensos e sedimentáveis, cor e turbidez. Os postos de combustíveis, de um modo geral, não possuem tanques de equalização, e os tempos de residência dentro da caixa de separação são variáveis, o que prejudica o tratamento.

Referente ao parâmetro óleos e graxas, observou-se que este foi superior a 10 mg/L nas quatro coletas realizadas. Esta remoção de óleos e gorduras é dificultada pela presença

dos detergentes utilizados na lavagem da rampa de abastecimento e dos carros, mantendo as gotículas de óleo em emulsão e retardando sua ascensão na caixa de separação. Há, portanto, a necessidade de melhorias e complementação destes tratamentos.

4.2. Isolamento e identificação dos microrganismos

O Quadro 1 apresenta os quatorze microrganismos isolados que cresceram nos meios de cultivo PDA e PCA, mostrando a presença de bactérias e fungos no efluente de postos de combustíveis, com as principais diferenças encontradas entre as colônias, observadas em microscópio óptico.

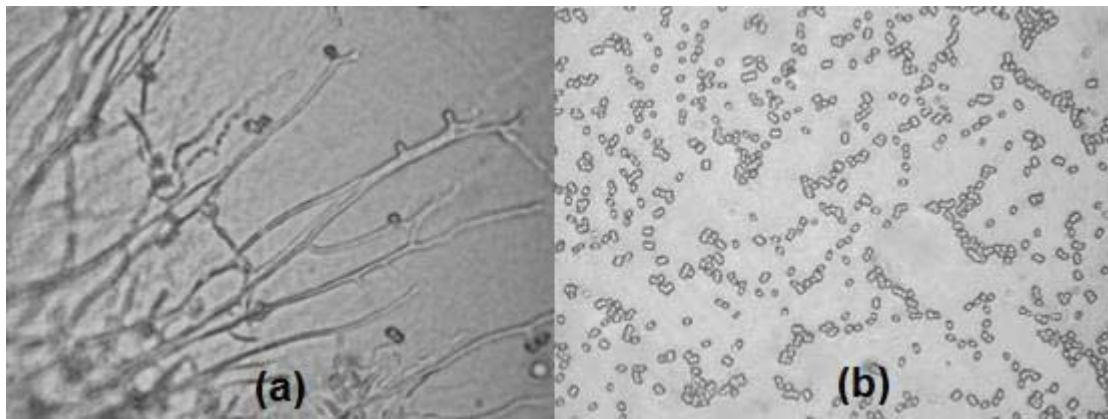
Quadro 1: Análise de características morfológicas dos fungos e bactérias encontrados no efluente.

Microrganismo	Meio de cultivo	Morfologia Macroscópica	Morfologia Microscópica	Identificação
X1	PDA	Creмоса, esbranquiçada e puntiforme.	Forma oval	Levedura
X2	PDA	Creмоса, amarelada e puntiforme.	Forma oval	Levedura
X3	PDA	Creмоса, esbranquiçada e puntiforme.	Forma oval	Levedura
X4	PDA	Creмоса, amarelada e puntiforme.	Forma oval	Levedura
X5	PDA	Filamentoso e esbranquiçado.	Hifas	Fungo
X6	PDA	Filamentosa com formação micélio e esporos. Cor escura.	Hifas	Fungo
X7	PDA	Filamentosa com formação de micélio e esporos. Cor escura.	Hifas	Fungo
X8	PDA	Filamentosa com formação de micélio e esporos. Cor escura.	Hifas	Fungo
X9	PDA	Creмоса, rosada e puntiforme.	Hifas	Levedura
X10	PDA	Creмоса, rosada e puntiforme.	Hifas	Levedura
X11	PCA	Esbranquiçada com crescimento em círculos.	Cocos Gran-negativa	Bactéria
X12	PCA	Esbranquiçada	Bacilos Gran-negativa	Bactéria
X13	PCA	Esbranquiçada	Bacilos Gran-positiva	Bactéria
X14	PCA	Esbranquiçada	Bacilos Gran-negativa	Bactéria

Microrganismos podem ser diferenciados por suas características fenotípicas como cor, dimensões, forma e contorno (TORRES; BARBOSA, 1998), estrutura e arranjo (RIBEIRO; SOARES, 2000).

A Figura 6 apresenta a imagem de duas microscopias óticas realizadas, mostrando hifas de um fungo filamentososo isolado do efluente (microrganismo X6) e bactérias (cocos) gram positivos (microrganismo X11). Fungos, bactérias e leveduras também encontravam-se presentes em solos contaminados de postos de combustíveis e oficinas mecânicas, sendo identificadas, em um primeiro passo, por microscopia (JOO et al., 2008).

Figura 6: Microscopia mostrando a morfologia de fungo filamentososo (a) e de bactéria (cocos) gram-positivos (b), isolados do efluente de posto de combustíveis, aumento de 1000 vezes.



4.3. Seleção de microrganismos capazes de biorremediar resíduos oleosos a partir de meios sintéticos

A partir dos cultivos realizados em meios líquidos (Meio 1 e Meio 2) observou-se que no Meio 1 houve baixo crescimento dos microrganismos em comparação com o Meio 2, provavelmente devido a este meio apresentar unicamente como fonte de carbono assimilável pelos microrganismos o óleo diesel.

4.3.1. Produção de biomassa

A produção de biomassa é resultado da adaptação e desenvolvimento dos microrganismos no meio de cultivo. Os microrganismos em questão ao permanecerem por 14 dias no meio de cultivo 1 produziram uma quantidade baixa de biomassa, provavelmente

devido a este meio apresentar unicamente como fonte de carbono assimilável pelos microrganismos o óleo diesel. Ao serem cultivados no meio de cultivo 2, que continha mais nutrientes em relação ao primeiro, por cinco dias, todos os microrganismos apresentaram maior produção de biomassa.

A Tabela 3 mostra que não houve aumento de biomassa no tempo final da fermentação com o meio de cultivo 1 em relação ao tempo inicial, para todos os microrganismos. O Meio 2 apresentou-se mais eficiente para o crescimento de biomassa para 10 dos 14 microrganismos analisados, isso deve-se ao fato do meio 2 ser um meio mais nutritivo, favorecendo o crescimento dos mesmos.

Tabela 3: Produção de biomassa obtida ao longo do tempo com os microrganismos crescidos em Meio 1 e Meio 2.

Microrganismo	Produção de Biomassa (mg)			
	Meio 1		Meio 2	
	Tempo 0	Tempo 14	Tempo 0	Tempo 5
1		ND		10±2 ^a
2		ND		20±3 ^b
3		ND		ND
4		ND		20±4 ^b
5		ND		20±4 ^b
6		ND		ND
7		ND		20±2 ^b
8	ND	ND	ND	30±5 ^c
9		ND		30±2 ^c
10		ND		30±2 ^c
11		ND		ND
12		ND		30±3 ^c
13		ND		ND
14		ND		20±1 ^b

*ND: Não detectado.

Letras iguais na mesma coluna indicam que não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança.

4.3.2. Produção de biossurfactante

As Tabelas 4, 5 e 6 apresentam as atividades emulsificantes O/A e A/O obtidas nos tempos inicial e após 14 dias de cultivo dos microrganismos, em Meio 1 e utilizando como fase orgânica da determinação, respectivamente, óleo diesel, biodiesel e gasolina.

Para a fase orgânica diesel, apresentada na Tabela 4, após 14 dias de cultivo em Meio 1, os microrganismos 2 e 5 foram os que apresentaram maior $AE_{O/A}$ ($p < 0,05$), e para $AE_{A/O}$, os microrganismos 4, 5 e 8 apresentaram os melhores resultados ($p < 0,05$).

Tabela 4: Atividades emulsificantes de cada microrganismo cultivados no Meio 1 utilizando óleo diesel como fase orgânica da emulsão.

Microrganismo	AE O/A (UE)		AE A/O (UE)	
	Tempo 0	Tempo 14	Tempo 0	Tempo 14
1		0,122±0,009 ^a		0,290±0,069 ^a
2		0,444±0,058 ^{ef}		0,618±0,606 ^a
3		0,326±0,045 ^{bcde}		1,010±0,555 ^a
4		0,378±0,024 ^{cde}		6,610±4,202 ^{ab}
5		0,594±0,072 ^f		14,11±3,386 ^{ab}
6		0,251±0,014 ^{abc}		0,193±0,017 ^a
7		0,368±0,026 ^{cde}		0,209±0,008 ^a
8	0,025±0,004	0,248±0,050 ^{abc}	0,1915±0,059	11,77±3,185 ^{ab}
9		0,288±0,007 ^{bcd}		2,107±2,637 ^a
10		0,305±0,060 ^{bcde}		0,177±0,334 ^a
11		0,20±0,004 ^{ab}		3,501±2,117 ^a
12		0,320±0,016 ^{bcde}		3,583±0,038 ^a
13		0,432±0,018 ^{de}		2,636±1,063 ^a
14		0,100±0,003 ^a		0,212±0,069 ^a

*Letras iguais na mesma linha indicam que não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança.

Na Tabela 5, cuja fase orgânica utilizada na determinação era o biodiesel, os microrganismos 1, 6, 8, 9, 10, 11, 13 e 14 obtiveram a maior atividade emulsificante O/A ($p < 0,05$), após 14 dias de cultivo em Meio 1. Alguns microrganismos apresentaram atividade emulsificante A/O, após 14 dias de cultivo em Meio 1, porém estas emulsões não se mantiveram nas 24 h subsequentes aos testes, não sendo possível sua avaliação quantitativa. Para a avaliação qualitativa se destacaram os microrganismos 1, 3, 4, 6, 11, 13 e 14.

Tabela 5: Atividades emulsificantes de cada microrganismo cultivados no Meio 1 utilizando biodiesel como fase orgânica da emulsão.

Microrganismo	AE O/A (UE)		AE A/O (UE)	
	Tempo 0	Tempo 14	Tempo 0	Tempo 14
1	0,205±0,047 ^a	1,441±0,062 ^{cd}	-	+
2	0,705±0,110 ^a	0,411±0,193 ^a	-	-
3	0,332±0,057 ^a	0,136±0,007 ^a	-	+
4	0,765±0,161 ^a	0,601±0,067 ^{ab}	-	+
5	0,774±0,254 ^a	0,283±0,076 ^a	-	-
6	0,345±0,480 ^a	1,493±0,502 ^{cd}	-	+
7	0,341±0,016 ^a	0,276±0,057 ^a	-	-
8	0,368±0,021 ^a	1,496±0,039 ^{cd}	-	-
9	0,435±0,033 ^a	1,731±0,026 ^{cd}	-	-
10	0,235±0,089 ^a	1,121±0,229 ^{bc}	-	-
11	0,439±0,032 ^a	1,849±0,182 ^d	-	+
12	0,504±0,034 ^a	0,550±0,033 ^{ab}	-	-
13	0,513±0,082 ^a	1,962±0,042 ^d	-	+
14	0,358±0,079 ^a	1,913±0,148 ^d	-	+

*Letras iguais na mesma linha indicam que não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança.

Para a fase orgânica gasolina, apresentada na Tabela 6, os microrganismos não apresentaram diferença significativa quanto a AE_{O/A} após 14 dias de cultivo em Meio 1, já para atividade A/O o microrganismo 3 apresentou a maior produção (p<0,05).

Tabela 6: Atividades emulsificantes de cada microrganismo cultivados no Meio 1 utilizando gasolina como fase orgânica da emulsão.

Microrganismo	AE O/A (UE)		AE A/O (UE)	
	Tempo 0	Tempo 14	Tempo 0	Tempo 14
1	0,121±0,020 ^a	0,287±0,074 ^a		0,421±0,105 ^a
2	0,323±0,323 ^{ab}	0,618±0,161 ^a		7,454±3,734 ^b
3	0,140±0,031 ^{ab}	0,273±0,028 ^a		22,59±0,360 ^d
4	0,402±0,193 ^{ab}	0,238±0,084 ^a		0,307±0,034 ^a
5	0,434±0,034 ^{ab}	0,259±0,065 ^a		0,386±0,057 ^a
6	0,121±0,154 ^a	0,442±0,395 ^a		0,332±0,124 ^a
7	0,134±0,105 ^{ab}	0,348±0,033 ^a	ND	0,395±0,031 ^a
8	0,306±0,009 ^{ab}	0,592±0,092 ^a		0,356±0,042 ^a
9	0,490±0,284 ^{ab}	0,575±0,126 ^a		0,384±0,075 ^a
10	0,136±0,013 ^{ab}	0,339±0,108 ^a		0,345±0,036 ^a
11	0,174±0,034 ^{ab}	0,219±0,001 ^a		0,282±0,039 ^a
12	0,272±0,084 ^{ab}	0,108±0,080 ^a		17,84±0,698 ^c
13	0,590±0,072 ^b	0,490±0,079 ^a		0,376±0,026 ^a
14	0,135±0,145 ^{ab}	0,468±0,092 ^a		0,340±0,027 ^a

*ND: Não detectado.

Letras iguais na mesma linha indicam que não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança.

Pela produção de biossurfactantes, das atividades emulsificantes O/A e A/O realizadas com os microrganismos que cresceram em meio de cultivo 1, a partir dos indutores de emulsão, óleo diesel, biodiesel e gasolina, destacam-se os microrganismos 3, 4, 5, 6, 8, 11, 13 e 14.

A Tabela 7, 8 e 9 apresentam as atividades emulsificantes O/A e A/O obtidas nos tempos inicial e após 5 dias de cultivo dos microrganismos, em Meio 2 e utilizando como fase orgânica da determinação, respectivamente, óleo diesel, biodiesel e gasolina

Utilizando como fase orgânica óleo diesel, verificou-se na Tabela 7, que o microrganismo 5 apresentou a mais elevada atividade emulsificante O/A ($p < 0,05$), quando analisado após 5 dias de cultivo em Meio 2, em comparação aos demais microrganismos. Para atividade A/O o microrganismo 12 apresentou maior eficiência ($p < 0,05$).

Tabela 7: Atividades emulsificantes de cada microrganismo cultivados no Meio 2 utilizando óleo diesel como fase orgânica da emulsão.

Microrganismo	AE O/A (UE)		AE A/O (UE)	
	Tempo 0	Tempo 5	Tempo 0	Tempo 5
1		0,884±0,001 ^l		15,10±0,021 ^e
2		0,647±0,001 ^f		9,098±0,002 ^d
3		0,517±0,003 ^b		0,231±0,003 ^a
4		0,674±0,001 ^h		28,64±0,007 ^h
5		1,320±0,003 ⁿ		30,13±0,021 ⁱ
6		0,614±0,001 ^e		0,224±0,004 ^a
7		0,587±0,001 ^d		0,221±0,003 ^a
8	0,106±0,032	0,373±0,002 ^a	0,248±0,011	0,274±0,002 ^{ab}
9		0,925±0,001 ^m		15,85±0,021 ^f
10		0,367±0,003 ^a		9,025±0,035 ^c
11		0,708±0,002 ⁱ		24,48±0,028 ^g
12		0,664±0,002 ^g		38,37±0,021 ^j
13		0,557±0,002 ^c		0,311±0,002 ^b
14		0,864±0,002 ^j		0,214±0,003 ^a

*ND: Não detectado.

Letras iguais na mesma linha indicam que não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança.

Para a fase orgânica biodiesel, apresentada na Tabela 8, os microrganismos 6 e 9 ($p < 0,05$) apresentaram maior atividade emulsificante O/A, após 5 dias de crescimento em Meio 2. Para atividade A/O os microrganismos 1, 4, 6, 11 e 13 ($p < 0,05$) apresentaram maior eficiência.

Tabela 8: Atividades emulsificantes de cada microrganismo cultivados em Meio 2 utilizando biodiesel como fase orgânica da emulsão.

Microrganismo	AE O/A (UE)		AE A/O (UE)	
	Tempo 0	Tempo 5	Tempo 0	Tempo 5
1	ND	1,352±0,024 ^{fg}	0,276±0,002 ^f	27,58±3,469 ^{bcd}
2	0,164±0,002 ^h	1,445±0,048 ^{gh}	0,264±0,002 ^e	2,128±2,768 ^a
3	0,107±0,002 ^f	0,555±0,032 ^{bc}	0,214±0,002 ^d	0,236±0,031 ^a
4	0,074±0,002 ^c	0,943±0,062 ^{de}	0,414±0,001 ⁱ	13,98±0,832 ^{abcd}
5	0,065±0,002 ^b	1,440±0,003 ^{gh}	0,372±0,002 ^h	10,72±14,89 ^{abc}
6	0,043±0,003 ^a	1,729±0,028 ^{ij}	0,256±0,004 ^e	34,99±1,417 ^d
7	0,927±0,002 ^j	0,077±0,072 ^{cd}	0,223±0,002 ^d	0,256±0,001 ^a
8	0,084±0,003 ^d	0,296±0,090 ^a	0,255±0,003 ^e	0,252±0,022 ^a
9	0,104±0,001 ^f	1,872±0,072 ^j	0,315±0,004 ^g	0,217±0,008 ^a
10	0,186±0,002 ⁱ	0,371±0,033 ^{ab}	0,203±0,002 ^c	9,259±3,261 ^{ab}
11	0,136±0,004 ^g	0,813±0,016 ^d	0,177±0,001 ^b	26,36±2,789 ^{bcd}
12	0,191±0,002 ⁱ	1,591±0,068 ^{hi}	0,214±0,004 ^d	9,882±8,144 ^{abc}
13	0,094±0,001 ^e	0,547±0,109 ^{bc}	0,286±0,004 ^f	31,62±0,405 ^{cd}
14	0,057±0,001 ^b	1,170±0,042 ^{ef}	0,157±0,003 ^a	6,935±9,427 ^{ab}

*ND: Não detectado.

Letras iguais na mesma linha indicam que não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança.

Tabela 9: Atividades emulsificantes de cada microrganismo cultivados em Meio 2 utilizando gasolina como fase orgânica da emulsão.

Microrganismo	AE O/A (UE)		AE A/O (UE)	
	Tempo 0	Tempo 5	Tempo 0	Tempo 5
1	0,164±0,002 ^f	0,167±0,021 ^{abc}	0,298±0,002 ^a	18,73±0,063 ^{cde}
2	0,112±0,001 ^e	0,430±0,142 ^{cd}	0,248±0,001 ^a	12,96±0,364 ^{bc}
3	0,234±0,002 ⁱ	0,068±0,026 ^a	0,272±0,001 ^a	0,309±0,020 ^a
4	0,166±0,002 ^f	0,613±0,073 ^d	0,515±0,001 ^a	31,82±0,395 ^f
5	0,203±0,002 ^h	0,127±0,027 ^{ab}	0,309±0,001 ^a	18,93±3,627 ^{cde}
6	0,049±0,002 ^b	0,204±0,012 ^{abc}	0,224±0,003 ^a	27,06±1,043 ^{def}
7	0,277±0,001 ^j	0,128±0,026 ^{ab}	11,98±0,002 ^b	6,395±8,672 ^{ab}
8	0,231±0,002 ⁱ	0,177±0,038 ^{abc}	0,367±0,003 ^a	0,402±0,013 ^a
9	0,197±0,002 ^h	0,474±0,039 ^{cd}	0,263±0,003 ^a	0,290±0,037 ^a
10	0,274±0,002 ^j	0,189±0,060 ^{abc}	0,283±0,001 ^a	17,03±0,975 ^{bcd}
11	0,085±0,002 ^d	0,287±0,210 ^{abcd}	12,27±0,099 ^b	26,74±3,309 ^{def}
12	0,011±0,001 ^a	0,617±0,445 ^{bcd}	20,39±0,155 ^c	28,95±4,021 ^{ef}
13	0,072±0,002 ^c	0,464±0,118 ^{cd}	24,48±0,359 ^d	24,80±1,504 ^{cdef}
14	0,172±0,001 ^g	0,414±0,063 ^{bcd}	30,67±0,179 ^e	19,64±2,065 ^{cde}

ND: Não detectado.

Letras iguais na mesma linha indicam que não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança.

Para a fase orgânica gasolina, apresentada na Tabela 9, os microrganismos 2, 4, 9, 11, 12, 13 e 14 apresentaram a mais elevada atividade emulsificante O/A ($p < 0,05$), após serem

cultivados por 5 dias em Meio 2 e para a atividade emulsificante A/O os microrganismos 4, 6, 11, 12 e 13 apresentaram maior eficiência ($p < 0,05$).

Pela produção de biossurfactantes, das atividades emulsificantes A/O e O/A realizadas com os microrganismos que cresceram em meio de cultivo 2, a partir dos indutores de emulsão, óleo diesel, biodiesel e gasolina, destacaram-se os microrganismos 4, 6, 11, 12, 13.

Na análise conjunta das atividades emulsificantes A/O e O/A realizadas com os microrganismos cultivados nos Meios 1 e 2 e com todos indutores de emulsão (óleo diesel, biodiesel e gasolina), destacaram-se os microrganismos 3, 4, 5, 6, 8, 11, 12, 13 e 14.

Nesse estudo a maior atividade emulsificante verificada foi de 38 UE para $AE_{A/O}$ e 1,96 UE para $AE_{O/A}$, valores estes inferiores aos verificados por Decesaro (2013) que, utilizando os mesmos meios de cultivo, obteve emulsões em torno de 201 UE para $AE_{A/O}$ e 7,16 UE para $AE_{O/A}$. Isto pode ser explicado pelo fato de que os microrganismos utilizados neste estudo foram isolados de efluente de posto de combustíveis, diferentemente dos utilizados por Decesaro (2013) que utilizou microrganismos com capacidade comprovada para produção de biossurfactantes.

4.3.3. Tensão superficial

Schultz (2010), ao avaliar microrganismos com potencial de degradação de diesel e biodiesel, utilizando um meio mineral semelhante ao Meio 1, encontrou medidas de tensão superficial inicial de 51 mN/m e ao final de 14 dias aumentaram para 53 mN/m, onde concluiu que nenhuma das bactérias incubadas foram eficientes para produzir compostos que reduzissem a tensão superficial apenas na presença de óleo diesel. Esse resultado é semelhante ao que obtivemos, sendo que os microrganismos podem ter utilizado os biossurfactantes do meio para suprir a falta de carbono.

A medida de tensão superficial foi utilizada como um dos parâmetros de seleção de microrganismos produtores de biossurfactantes. A propriedade de todo o surfactante é sua capacidade em reduzir a tensão superficial de um meio líquido. Um surfactante efetivo, produzido por microrganismos, pode reduzir a tensão superficial da água destilada de 73 mN/m para 30 mN/m. Por essa razão a técnica é utilizada em pesquisas que envolvem detecção de biossurfactantes (JAQUES; SILVA; BENTO, 2010). Para os microrganismos estudados, pode-se dizer, portanto, que houve pouca redução da tensão superficial do meio, caracterizando também uma produção .

A partir dos cultivos realizados em Meio 1, verificou-se que houve aumento da tensão superficial após 14 dias de cultivo. Porém, os microrganismos 1, 9, 5 e 14, após os cinco dias de crescimento, reduziram a tensão superficial do meio de cultivo 2, comprovando sua eficiência para redução de tensão superficial, como pode-se observar na Tabela 10.

Tabela 10: Valores obtidos para tensão superficial nos tempos inicial e final de crescimento dos microrganismos nos meios de cultivo 1 e 2.

Microrganismo	Tensão Superficial (mN/m)			
	Meio 1		Meio 2	
	Tempo 0	Tempo 14	Tempo 0	Tempo 5
1		48,67±1,53 ^{cdef}		40,33±1,15 ^a
2		53,33±2,08 ^g		44,67±4,04 ^{ab}
3		53,00±0,00 ^{fg}		51,00±0,00 ^{bcde}
4		52,00±0,00 ^{efg}		52,67±3,06 ^{cde}
5		43,33±2,08 ^a		44,33±3,21 ^{ab}
6		45,33±2,08 ^{abc}		51,00±2,00 ^{bcde}
7	36,33±1,52	53,33±1,53 ^g	47,66±3,05	57,33±3,79 ^e
8		48,00±0,00 ^{bcde}		53,67±2,08 ^{de}
9		43,67±1,15 ^{ab}		43,67±2,08 ^{ab}
10		51,33±2,08 ^{defg}		52,33±1,53 ^{cde}
11		50,00±0,00 ^{defg}		48,00±0,00 ^{bcd}
12		53,00±0,00 ^{fg}		55,67±2,52 ^e
13		47,00±0,00 ^{abcd}		50,67±2,52 ^{bcde}
14		49,67±3,06 ^{cdefg}		45,67±3,06 ^{abc}

*ND: Não detectado.

Letras iguais na mesma linha indicam que não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança.

Os resultados qualitativos obtidos em termos de crescimento de biomassa, produção de biossurfactantes e redução de tensão superficial nos cultivos realizados nos Meios 1 e 2, estão apresentados no Quadro 2. Todos os microrganismos apresentaram crescimento de biomassa nos meios sintéticos. A hipótese destes serem biodegradadores de óleos e graxas (derivados de petróleo) foi realizada pelas respostas produção de biossurfactantes e tensão superficial do meio. A presença de biossurfactantes no meio é um indicativo de que o microrganismo é degradador de hidrocarbonetos (DESAI; BANAT, 1997), pois o biossurfactante auxilia na formação da micela induzindo a porção hidrofóbica do hidrocarboneto para o centro desta. Deste modo, a tensão superficial é entre água e hidrocarboneto é reduzida, aumentando a

exposição do hidrocarboneto às células e oxigênio, favorecendo sua biodegradação (SOBERÓN; MAIER, 2011). Portanto, a produção de biossurfactantes pode ser acompanhada da redução da tensão superficial do meio, e ambos os parâmetros podem ser indicativos de que os microrganismos são degradadores de hidrocarbonetos. No entanto, nem sempre a produção do biossurfactante é acompanhada da tensão superficial, pois o segundo mecanismo de biodegradação envolve interações entre biossurfactante e superfície da célula, promovendo modificações na membrana (aumento da hidrofobicidade) e facilitando a aderência do hidrocarboneto nela (APHARNA et al., 2012). Logo, pode haver a produção de biossurfactante sem a real redução da tensão superficial.

O critério utilizado para seleção de microrganismos, foi de no mínimo duas respostas positivas, em análise qualitativa, para as análises de crescimento de biomassa, produção de biossurfactantes e redução da tensão superficial, sendo os microrganismos 1, 2, 4, 5, 9, 12 e 14 foram selecionados para a etapa posterior.

Quadro 2: Resposta de cada microrganismo aos testes de produção de biomassa, produção de biossurfactantes e redução da tensão superficial.

Microrganismo	Produção de Biomassa	Produção de Biossurfactantes	Redução da tensão superficial
1	+	-	+
2	+	-	+
3	-	+	-
4	+	+	-
5	+	+	+
6	-	+	-
7	+	-	-
8	+	-	-
9	+	-	+
10	+	-	-
11	-	+	-
12	+	+	-
13	-	+	-
14	+	+	+

*+: Positivo; -: Negativo;

4.4. Seleção de microrganismos cultivados em meios contendo efluente de postos de combustíveis

Os sete microrganismos selecionados a partir dos testes em meios sintéticos que foram submetidos a um novo ensaio com meio de cultivo contendo 70% de efluente e 30 % de inóculo. As variáveis de resposta foram as atividades emulsificantes e a remoção de óleos e graxas.

4.4.1. Produção de biossurfactantes

A produção de biossurfactantes apresentada nas Tabelas 11 e 12 foi dada pela subtração da atividade inicial pela atividade final, obtendo-se a atividade emulsificante real.

Tabela 11: Atividades emulsificantes água em óleo (A/O) dos extratos obtidos a partir dos cultivos com microrganismos em meio de cultivo com 70% de efluente de posto de combustível, utilizando óleo diesel, biodiesel e gasolina como fase orgânica da emulsão.

Microrganismo	AE A/O – extrato final (UE)		
	Diesel	Biodiesel	Gasolina
X1	1,85±0,03 ^a	6,16±0,04 ^e	ND
X2	10,18±0,02 ^f	0,87±0,02 ^a	ND
X4	7,25±0,04 ^c	5,75±0,03 ^d	24,26±0,04 ^c
X5	ND	5,12±0,04 ^c	ND
X9	9,29±0,05 ^d	8,30±0,03 ^f	ND
X12	9,70±0,14 ^e	3,11±0,03 ^b	9,31±0,04 ^b
X14	2,65±0,02 ^b	5,18±0,04 ^c	0,52±0,05 ^a

*ND: Não detectado.

Letras iguais na mesma coluna indicam que não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança.

Na Tabela 11 observa-se que todos os microrganismos foram capazes de aumentar a atividade emulsificante quando testados com biodiesel como fase orgânica. Quando utilizado diesel, somente o meio bioaumentado com o fungo X5 não foi capaz de produzir atividade emulsificante. Destaque foi dado à levedura X4 e bactérias X12 e X14, pois estes foram os únicos microrganismos que produziram biossurfactantes para emulsionar gasolina ao meio aquoso.

Tabela 12: Atividades emulsificantes óleo em água (O/A) dos extratos obtidos a partir dos cultivos com microrganismos em meio de cultivo com 70% de efluente de posto de combustível, utilizando óleo diesel, biodiesel e gasolina como fase orgânica da emulsão.

Microrganismo	AE O/A – extrato final (UE)		
	Diesel	Biodiesel	Gasolina
X1	ND	0,76±0,04 ^c	ND
X2	0,14±0,01 ^a	ND	ND
X4	ND	0,45±0,01 ^b	ND
X5	0,34±0,03 ^b	1,71±0,03 ^c	ND
X9	ND	0,03±0,02 ^a	ND
X12	ND	0,06±0,01 ^a	ND
X14	ND	1,19±0,03 ^d	ND

*ND: Não detectado.

Letras iguais na mesma coluna indicam que não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança.

Referente à $AE_{O/A}$, a Tabela 12 mostra que nenhum dos meios bioaumentados produziu biossurfactantes de modo promover a emulsão de gasolina. O diesel foi emulsionado somente nos meios contendo os microrganismos X2 e X5, sendo o aumento da $AE_{O/A}$ dos demais nulo. Quando utilizado biodiesel, vários meios bioaumentados permitiram a emulsão deste combustível, com exceção do meio aumentado com a levedura X2.

É desejável que o biossurfactante produzido seja capaz de emulsificar os três combustíveis, óleo diesel, biodiesel e gasolina, pois o efluente gerado nos postos de abastecimento conterà resíduos misturados destas três fontes. Portanto, da Tabela 11, somente a levedura X4 e bactérias X12 e X14 foram capazes de aumentar a AE do meio contendo estes três combustíveis, embora outros microrganismos apresentassem maior AE, comprovado estatisticamente, para um determinado combustível. Referente à Tabela 12, os mesmos microrganismos produziram biossurfactantes para emulsificar biodiesel, demonstrando apresentar também $AE_{O/A}$. Logo, os microrganismos X4, X12 e X14 são possíveis cepas para bioaumentação deste efluente, pois apresentaram AE em quatro situações dentre as seis condições demonstradas nas Tabelas 11 e 12.

A AE A/O produzida por *Pseudomonas sp* isoladas de efluente de refinaria de petróleo oscilaram entre 20% e 50% (DI MARTINO et al., 2012) e somente a levedura X4 deste trabalho produziu AE nesta faixa para a emulsificação de gasolina. No entanto, este fato não reduz o mérito desta etapa da seleção, pois outros autores isolaram microrganismos que apresentaram baixas atividades emulsificantes, mas os mesmos microrganismos apresentaram bons resultados de biorremediação na degradação de solo contaminado com óleo. Joo et al.

(2008) isolaram sete cepas de microrganismos de solos contaminados e algumas destas cepas apresentaram $AE_{O/A}$ inferiores a 0,1 (em diesel), mas os microrganismos demonstraram boa capacidade de biorremediação. Deve-se ressaltar que nem sempre a ação do biossurfactante produzido resulta em aumento da AE ou mesmo na redução da tensão superficial do meio. Os biossurfactantes também podem alterar a hidrofobicidade da membrana celular (não sendo obrigatoriamente liberados no meio) e facilitando o acesso de compostos hidrofóbicos (como os hidrocarbonetos) à célula (APHARNA et al., 2012, apud SOUZA et al., 2014).

4.4.2. Remoção de óleos e graxas

A Tabela 13 mostra a remoção de óleos e graxas dos meios bioaumentados com os diferentes microrganismos isolados.

Tabela 13: Remoção de óleos e graxas nos ensaios de biorremediação com meio misto contendo 70% efluente e 30% meio PC inoculados com os sete microrganismos pré-selecionados.

Microrganismo	Remoção de óleos e graxas (mg/L)		Remoção (%)
	Tempo 0	Tempo 14	
X1		43±17	85
X2		58±19	81
X4		82±21	73
X5	306±39	17±16	94
X9		46±19	84
X12		80±24	73
X14		46±31	84

A Tabela 13 mostra que a remoção de óleos e graxas foi superior a 70% nos sete ensaios de biorremediação contendo os microrganismos pré-selecionados. Embora os sete microrganismos não tenham promovido uma alta atividade emulsificante, os mesmos apresentaram crescimento no meio contendo 70% de efluente e foram capazes de remoção de óleos e graxas. Ensaios de biorremediação com *Pseudomonas sp.* em meios com 10% de querosene atingiram 18% de remoção (DI MARTINO et al., 2012), embora os mesmos microrganismos não tenham removido óleo diesel nos ensaios. Observa-se, contudo, que a concentração de hidrocarbonetos foi muito superior à concentração destes compostos no efluente de postos de combustíveis encontrado nas coletas realizadas, conforme Tabela 2 (142,2 mg/L; 306 mg/L; 95 mg/L; 255 mg/L).

A literatura traz muitos trabalhos contendo relatos de biorremediação com derivados e resíduos de petróleo em solos (COVINO et al., 2014, BENTO et al., 2005, SASIDHARAN et al., 2014, CHAGAS et al., 2012, ROY et al., 2014, LEBKOWSKA, 2011, JOO et al., 2008), mas há uma certa limitação de estudos envolvendo a biorremediação destes hidrocarbonetos em meios aquosos. Semrany et al. (2012) apresentam um contexto de estudos de biorremediação em águas e efluentes com diversos poluentes denominados Compostos Orgânicos Bio-refratários (Bio-ROCs). A revisão traz exemplos de biorremediação envolvendo compostos orgânicos clorados, resíduos de pigmentos e corantes, com eficiências de remoção em uma faixa de 43% a 99%, dependendo de cada estratégia, microrganismo e reator utilizado. A revisão destes autores, contudo, não traz informações específicas sobre remoção de hidrocarbonetos em águas e efluentes.

As remoções dos hidrocarbonetos presentes foram melhor estudadas por meio de análise cromatográfica. Os cromatogramas de todos os microrganismos testados encontram-se no Apêndice C. A Figura 7 apresenta o cromatograma do efluente antes do ensaio de biorremediação. Observa-se os picos típicos de cadeias carbônicas de derivados de petróleo. Em geral, estes hidrocarbonetos apresentam de 12 a 40 carbonos em suas cadeias, e na Figura 7 identificou-se cadeias entre 16 e 30 carbonos. Perfil semelhante a este foi encontrado por Gargouri et al. (2011) em efluentes de indústrias petroquímicas (Figura 8) tipicamente devido à presença de hidrocarbonetos provenientes de derivados de petróleo.

Figura 7: Análise cromatográfica para quantificação das cadeias carbônicas dos hidrocarbonetos presentes no efluente de posto de combustíveis.

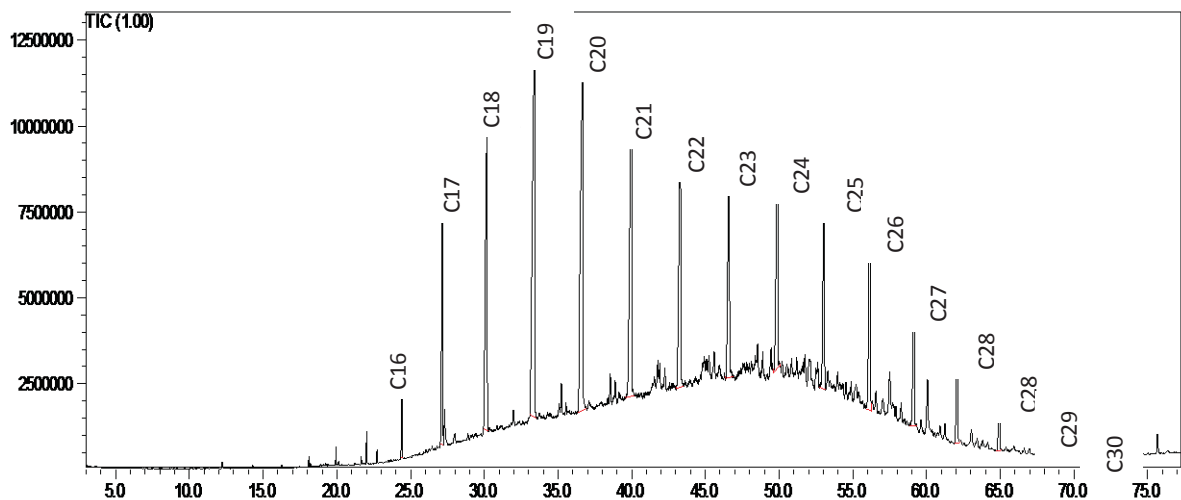
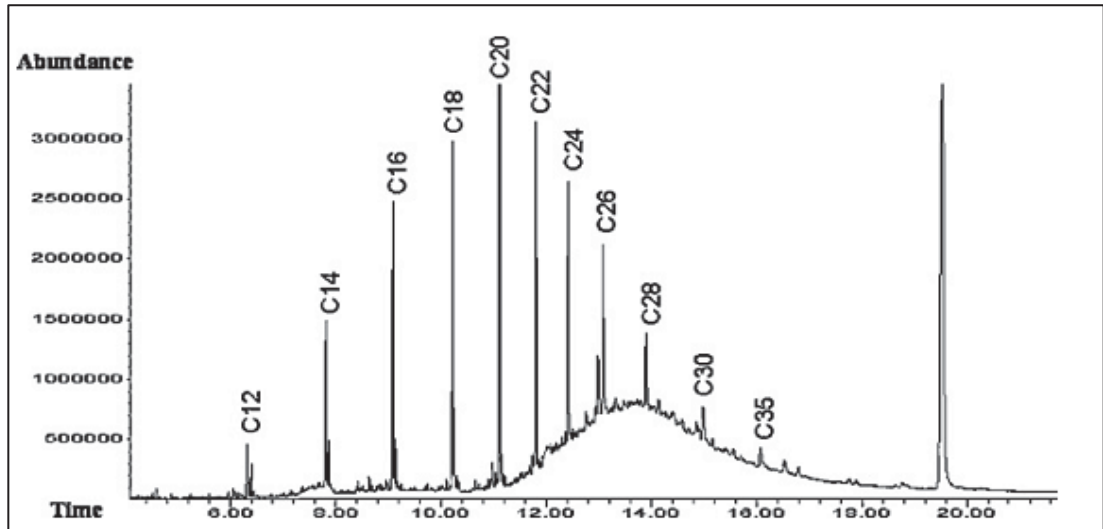


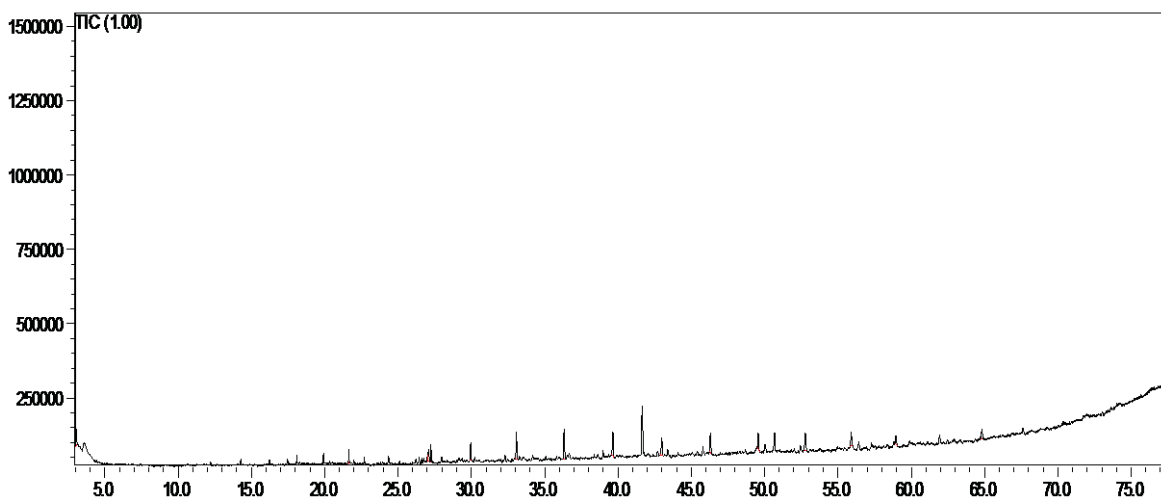
Figura 8: Cromatograma do efluente de uma refinaria de petróleo



Fonte: GARGOURI et al., (2011).

A Figura 9 apresenta o cromatograma do efluente após tratamento de biorremediação realizada pelo microrganismo X2, mostrando a redução quase total dos picos das cadeias carbônicas.

Figura 9: Análise cromatográfica do efluente de posto de combustíveis tratado por biorremediação com o microrganismo X2.



A Tabela 14 mostra o percentual de remoção das cadeias carbônicas obtida por cada microrganismo pelo tratamento de biorremediação do efluente, após 14 dias.

Tabela 14: Percentual de degradação das cadeias carbônicas presentes no efluente em relação ao tempo inicial do cultivo, realizada pelos microrganismos.

Microrganismo	Degradação das cadeias carbônicas (%)														
	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26	C27	C28	C29	C30
X1	37	53	50	69	78	77	72	74	92	68	71	75	73	74	78
X2	77	91	92	91	91	91	91	91	91	91	84	92	100	92	100
X4	45	94	79	76	76	76	74	73	72	67	68	62	57	54	61
X5	100	90	72	72	73	72	73	71	74	65	68	64	65	59	55
X9	0	48	91	88	85	92	76	76	93	70	69	31	54	12	62
X12	71	54	83	85	100	99	84	72	94	76	72	66	100	89	93
X14	0	41	77	77	77	72	74	62	100	100	100	42	100	100	100

Joo et al. (2008) analisou percentuais de remoção das cadeias carbônicas de óleo diesel em ensaios de biorremediação de solo utilizando sete microrganismos. Embora a matriz do ensaio seja diferente (solo), o autor obteve uma capacidade variável na remoção dos diferentes tamanhos, sendo diferenciada para cada microrganismo. As remoções variaram de 0 a 90%, sendo que a maioria dos microrganismos por ele estudados removeu na faixa de 50%. De maneira análoga, a Tabela 14 mostra variadas remoções dos tamanhos de cadeias carbônicas, sendo que alguns microrganismos foram hábeis em remover 100% de algumas cadeias, enquanto que algumas cadeias de tamanhos pequenos não foram assimilados por alguns microrganismos.

O Quadro 3 mostra um resumo das respostas obtidas com os microrganismos inoculados em efluente de postos de combustíveis. Destacaram-se a levedura X4 e as bactérias X12 e X14, demonstrando resultados positivos para as três respostas.

Quadro 3: Microrganismos selecionados para a encapsulação

Microrganismo	Atividades Emulsificantes	Remoção de Óleos e Graxas	Cromatografia
1 Levedura	-	+	+
2 Levedura	-	+	+
4 Levedura	+	+	+
5 Fungo	-	+	+
9 Levedura	-	+	+
12 Bactéria	+	+	+
14 Bactéria	+	+	+

+: Positivo; -: Negativo;

4.5. Biorremediação de efluente com microrganismos encapsulados

Os microrganismos X4, X12 e X14 selecionados a partir dos ensaios anteriores, foram encapsulados, bem como os consórcios dos microrganismos X4/X12; X4/X14; X4/X12/X14; X12/X14.

Os microrganismos encapsulados individualmente e nos consórcios foram utilizados em ensaio de biorremediação por 14 dias e sua capacidade de remoção de contaminantes foi analisada comparando-se com a caracterização inicial do efluente, como apresentado nas Tabelas 15 e 16.

Tabela 15: Caracterização inicial do efluente e após o tratamento por biorremediação com microrganismos encapsulados individualmente.

Parâmetro	Caracterização do Efluente			
	Efluente Tempo inicial	Mic. X4 Tempo 14	Mic. X12 Tempo 14	Mic. X14 Tempo 14
DQO (mg/L)	403,69±31,01 ^a	311,29±46,51 ^a	334,78±4,43 ^a	352,01±6,64 ^a
Sólidos Suspensos (mg/L)	63,00±7,07 ^a	47,20±3,96 ^a	51,90±2,69 ^a	48,10±4,95 ^a
Fósforo (mg/L)	0,04±0,01 ^a	ND	0,39±0,01 ^b	0,30±0,13 ^{ab}
Óleos e Graxas (mg/L)	95,00±23,48 ^a	65,50±11,46 ^a	46,10±0,71 ^a	86,00±19,80 ^a
Sólidos Sedimentáveis (mL/L)	0,25±0,03 ^a	0,24±0,03 ^a	0,25±0,06 ^a	0,25±0,04 ^a
Turbidez (NTU)	62,50±3,54 ^a	431,50±2,12 ^c	155,50±4,95 ^b	142,50±2,12 ^b
Cor (Hazen)	570,00±2,83 ^d	113,00±2,83 ^c	53,00±2,83 ^b	35,00±2,83 ^a
Temperatura (°C)	21,5±0,71 ^a	25,0±2,83 ^a	22±2,83 ^a	26,5±2,12 ^a
pH	6,40±0,14 ^a	7,65±0,07 ^b	7,50±0,07 ^b	7,48±0,11 ^b
Nitrogênio (mg/L)	7,21±0,41 ^{ab}	6,63±0,41 ^a	8,94±0,41 ^{ab}	10,38±1,63 ^b

*ND: Não detectado.

Letras iguais na mesma linha indicam que não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança.

Avaliando-se a remoção de óleos e graxas, observa-se que não houve diferença significativa nos ensaios com os microrganismos encapsulados com relação ao efluente bruto. Em comparação com os ensaios com os microrganismos não encapsulados, verifica-se que o percentual remoção de óleos e graxas diminuiu, o que pode ter ocorrido por falta de nutrientes, já que esse ensaio foi realizado apenas com o efluente.

Houve remoção de cor ($p < 0,05$) e não houve acréscimo de sólidos sedimentáveis ($p > 0,05$), em todos os ensaios realizados com microrganismos encapsulados individualmente em comparação com o efluente bruto, o que é muito importante para o tratamento, pois esses sólidos poderiam ser carregados junto com o efluente na saída da caixa de separação.

A DQO não foi reduzida em nenhum dos ensaios, sendo os valores obtidos não permitidos pela legislação (360 mg/L).

Houve aumento de nitrogênio apenas no ensaio realizado com o microrganismo X14, e aumento de turbidez em todos os ensaios, o que pode ter sido ocasionado pelas cápsulas de alginato que contém nitrogênio em sua composição e ao longo do tempo se dissolveram no efluente, aumentando a concentração destes compostos.

A concentração de fósforo aumentou no ensaio realizado pelo microrganismo X2.

Ao analisarmos um experimento realizado por Herrero; Stuckey (2014), a atividade de bioaugmentação de um reator contendo as células imobilizadas foi comparado com um reator com células inoculadas em suspensão, revelando que após 30 dias de inoculação as células em suspensão se degradaram e não removeram o contaminante devido a uma diminuição da atividade metabólica. No entanto, a libertação lenta e crescente das células imobilizadas para o meio de lodo ativado resultou em um maior número de células ativas, e foi responsável pela degradação de quase 90% dos contaminantes. Este fato não foi observado nesta etapa do trabalho, na qual os microrganismos individualmente encapsulados não foram capazes de reduzir, principalmente, DQO e Óleos e Graxas.

Tabela 16: Caracterização inicial do efluente e final após o tratamento por biorremediação com microrganismos encapsulados em consórcios.

Parâmetros	Caracterização do Efluente				
	Efluente Tempo inicial	X4 e X12 Tempo 14	X4; X12 e X14 Tempo 14	X4 e X14 Tempo 14	X12 e X14 Tempo 14
DQO (mg/L)	846,9±2,2 ^b	234,6±53,2 ^a	399,0±59,8 ^a	364,5±90,8 ^a	181,3±75,3 ^a
Sólidos Suspensos (mg/L)	150,0±28,3 ^b	80,3±0,4 ^a	65,1±0,1 ^a	81,3±0,4 ^a	62,2±0,3 ^a
Fósforo (mg/L)	0,197±0,08 ^a	0,535±0,04 ^b	0,543±0,04 ^b	0,483±0,03 ^b	0,550±0,03 ^b
Óleos e Graxas (mg/L)	238,5±23,62 ^b	145,4±21 ^a	77,2±0,21 ^a	92,1±8,91 ^a	76,0±37,62 ^a
Sólidos Sedimentáveis (mL/L)	0,251±0,01 ^a	0,252±0,01 ^a	0,251±0,01 ^a	0,252±0,01 ^a	0,251±0,01 ^a
Turbidez (NTU)	157,1±0,141 ^e	60,1±0,141 ^b	63,1±0,071 ^c	53,1±0,071 ^a	86,1±0,141 ^d
Cor (Hazen)	199,5±21,92 ^b	50,05±0,07 ^a	50,07±0,07 ^a	50,15±0,07 ^a	50,10±0,14 ^a
Temperatura (°C)	25±0,07 ^c	22±0,14 ^a	23±0,14 ^b	22±0,07 ^a	22±0,07 ^a
pH	7,27±0,01 ^b	7,31±0,01 ^c	7,29±0,01 ^{bc}	7,11±0,1 ^a	7,15±0,01 ^a
Nitrogênio (mg/L)	10,96±0,816 ^{ab}	13,27±3,263 ^b	5,77±2,447 ^{ab}	5,77±1,631 ^{ab}	4,03±0,005 ^a
Surfactantes (mg/L)	0,72±0,001 ^e	0,26±0,001 ^c	0,38±0,001 ^d	0,23±0,001 ^b	0,17±0,001 ^a

ND: Não detectado.

Letras iguais na mesma linha indicam que não apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança.

Nos ensaios realizados com os microrganismos encapsulados em consórcios, obteve-se remoção para a maioria dos parâmetros analisados, como DQO, Sólidos suspensos, Óleos e graxas, turbidez e Cor. O uso de consórcios de microrganismos justificou-se, pois as remoções foram superiores quando comparadas com as remoções obtidas pelos microrganismos encapsulados de modo individual.

As remoções obtidas nos ensaios de biorremediação com microrganismos encapsulados foram inferiores aquelas obtidas pelos microrganismos sem a encapsulação. O alginato pode ter ocasionado uma redução da transferência de massa e de acesso dos microrganismos ao substrato (óleos e graxas). Deste modo as remoções verificadas na Tabela 16 foram inferiores aquelas apresentadas na Tabela 13. No entanto as cápsulas de tamanho aproximado de 3 mm sedimentavam facilmente, possibilitando a separação da biomassa do efluente, o que justifica a sua aplicação para o tratamento de efluentes de postos de combustíveis.

Houve a redução na concentração de surfactantes, possivelmente pelo uso dos próprios microrganismos, que o consomem como fonte de carbono. As concentrações de Fósforo aumentaram em todos os ensaios, em comparação ao efluente antes do tratamento ($p < 0,05$), o que pode ser explicado pela migração destes compostos das cápsulas para o efluente.

Os ensaios realizados com o efluente e cápsulas sem microrganismos, para comprovar a ocorrência de atenuação natural, resultou no valor final de óleos e graxas de 262 mg/L, mostrando que este processo não ocorreu. Do mesmo modo, os testes com cápsulas de alginato sem os microrganismos que foram realizados, para verificar se as mesmas possuíam capacidade de remoção, resultaram na DQO do efluente tratado reduzida para 419 mg/L, o que pode ser explicado pela possível adsorção de outros contaminantes não oleosos no alginato.

Os microrganismos encapsulados individualmente e em consórcios ao serem submetidos ao teste de sobrevivência, resultaram no crescimento de diversas colônias possibilitando sua contagem nas placas de Petri.

A Tabela 17 apresenta a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) crescidas no plaqueamento realizado com os microrganismos encapsulados individualmente.

Tabela 17: Contagem em placas dos microrganismos encapsulados individualmente para verificação da sobrevivência dos mesmos após 7 dias e após 14 dias do ensaio de biorremediação.

Microrganismos	Contagem em placa (UFC/0,1mL)	
	Tempo 7	Tempo 14
X4	130.10^3	232.10^8
X12	180.10^4	$>300.10^8$
X14	138.10^5	196.10^4

A Tabela 18 apresenta a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) crescidas no plaqueamento em meio PCA (bactérias) e meio PDA (fungos), realizado com os microrganismos encapsulados em consórcios.

Tabela 18: Contagem em placas dos microrganismos encapsulados em consórcios para verificação da sobrevivência dos mesmos após 7 dias e após 14 dias do ensaio de biorremediação.

Microrganismos	Contagem em placa (UFC/0,1mL)			
	Tempo 7		Tempo 14	
	PDA	PCA	PDA	PCA
X4 e X12	260.10^3	$>300.10^8$	86.10^5	$>300.10^8$
X4; X12 e X14	203.10^4	$>300.10^8$	96.10^4	105.10^6
X4 e 14	106.10^5	96.10^3	230.10^7	260.10^3
X12 e X14	-	$>300.10^8$	-	$>300.10^8$

Todos os microrganismos permaneceram vivos até o final do experimento. Houve crescimento nos meios de cultivo e a comprovação da sobrevivência dos microrganismos no interior das cápsulas.

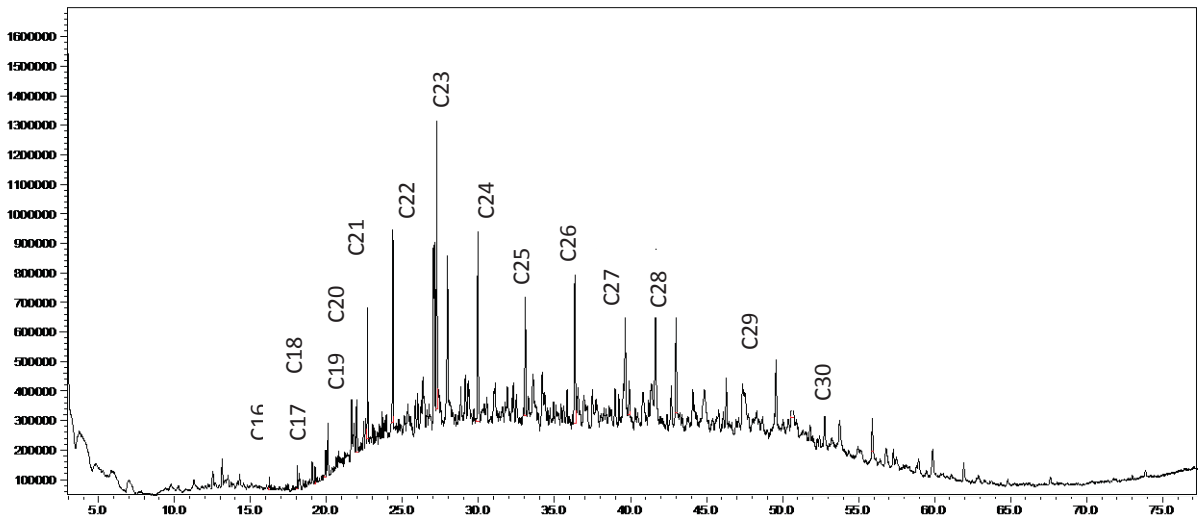
A Tabela 19 mostra a remoção de óleos e graxas realizada pelos microrganismos encapsulados em consórcios. Houve a remoção de óleos e graxas em uma faixa de 43% a 70% nos ensaios de biorremediação contendo os consórcios de microrganismos encapsulados.

Tabela 19: Remoção de óleos e graxas realizada pelos 4 consórcios de microrganismos encapsulados, após os 14 dias do ensaio de biorremediação.

Consórcios	Remoção de óleos e graxas		
	Tempo 0	Tempo 14	Remoção (%)
X4/X12		145±28	43
X4/X14	255±57	92±9	63
X4/X12/X14		77±13	69
X12/X14		76±38	70

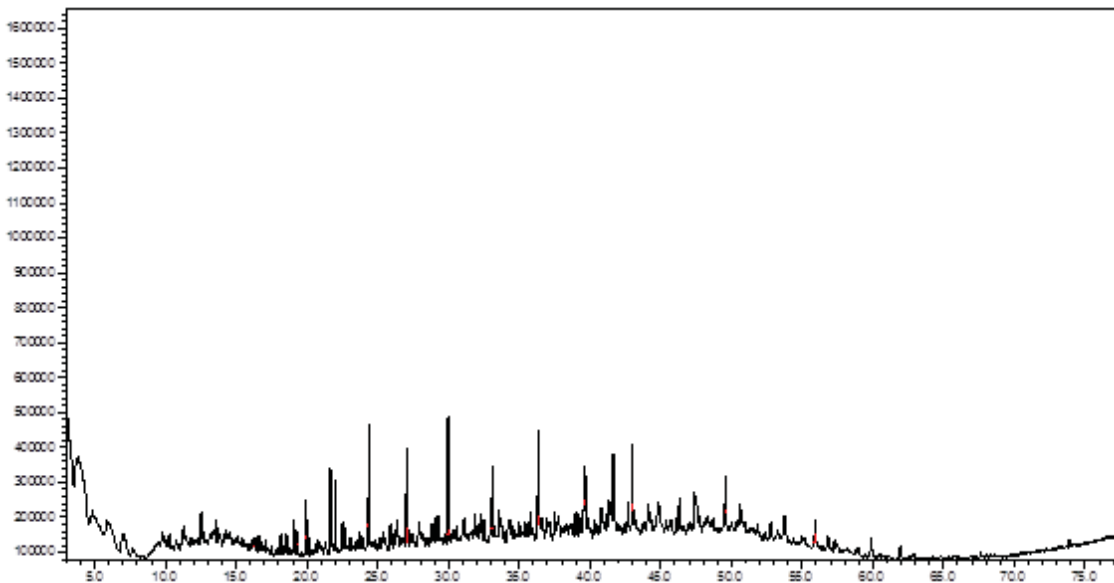
Com a realização da análise cromatográfica, foi possível verificar cada pico de hidrocarbonetos presente no efluente a ser tratado, e as remoções obtidas após os ensaios de biorremediação. Todos os gráficos de remoção de cadeias carbônicas encontram-se no Apêndice D. A Figura 10 apresenta a análise cromatográfica dos hidrocarbonetos presentes no efluente bruto. Ela apresenta um perfil cromatográfico semelhante ao analisado na Figura 6, ou seja, pequena quantidade de cadeias carbônicas menores e mais cadeias maiores.

Figura 10: Análise cromatográfica para quantificação das cadeias carbônicas dos hidrocarbonetos presentes no efluente de posto de combustíveis.



A Figura 11 mostra a análise cromatográfica do efluente após o tratamento pelo consórcio de microrganismos X4/X12. Os demais cromatogramas encontram-se no Apêndice 4. Da Figura 11 observa-se uma menor intensidade de praticamente todos os picos carbônicos, mostrando que houve uma redução dos hidrocarbonetos presentes no efluente.

Figura 11: Análise cromatográfica do efluente de posto de combustíveis tratado pelo consórcio microbiano encapsulado X4/X12.



A Tabela 20 mostra o percentual de remoção das cadeias carbônicas obtida por cada consórcio.

Tabela 20: Degradação das cadeias carbônicas presentes no efluente após 14 dias de tratamento por biorremediação por consórcios de microrganismos encapsulados.

Consórcios	Degradação das cadeias carbônicas (%)														
	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26	C27	C28	C29	C30
X4 X12	44	56	46	100	81	81	49	66	42	45	43	0	41	56	25
X4 X14	0	0	0	16	20	37	8	50	17	23	16	0	0	28	0
X4 X12 X14	24	50	5	32	39	74	22	41	7	1	0	0	0	5	0
X12 X14	42	48	16	80	76	31	64	30	65	65	58	0	31	56	22
Bruto¹	0	0	0	0	0	43	0	21	0	0	0	0	0	0	0
Branco²	0	0	0	0	0	19	0	30	0	0	0	0	0	0	0

¹: Efluente do posto de combustíveis sem as cápsulas com microrganismos (atenuação natural).

²: Efluente do posto de combustíveis com cápsulas sem os microrganismos .

As remoções foram também testadas em efluente sem as cápsulas (bruto) que permaneceu por 14 dias, havendo a remoção somente das cadeias C21 e C23, mostrando que não houve atenuação natural no meio. Referente ao “branco”, o qual era composto de cápsulas sem a biomassa, não houve remoção da maioria das cadeias carbônicas, mostrando que pode ter ocorrido a adsorção dos hidrocarbonetos nas cápsulas apenas por C21 e C23.

A remoção de hidrocarbonetos com microrganismos encapsulados (Tabela 20) foi menor que a remoção obtida pelos microrganismos livres (Tabela 14). É provável que a cápsula apresente uma barreira, dificultando o acesso dos microrganismos aos seus nutrientes presentes no efluente. No entanto, Joo et al. (2008) encontrou remoções na faixa de 50% quando realizou biorremediação de óleos diesel de solos.

5. CONCLUSÃO

O uso de microrganismos para o tratamento de efluentes lançados por postos de combustíveis apresentou muitas vantagens como o uso de pouco ou nenhum subproduto, a reutilização das cepas microbianas, o fato de os microrganismos estarem prontamente disponíveis, a possibilidade de sua caracterização, a alta diversidade encontrada, e, principalmente, o uso por eles de muitos contaminantes como fonte de nutrientes. Além disso, o poder de se adaptar e restaurar condições ambientais extremas.

A bioaugmentação é uma técnica de biorremediação promissora para melhoria dos sistemas de tratamento de efluente de postos de combustíveis, já que os parâmetros de caracterização desse tipo de efluente se apresentaram elevados.

Foi possível o isolamento de diversos microrganismos oriundos do efluente de postos de combustíveis, que apresentaram capacidade de produção de biomassa, produção de biosurfactantes, redução da tensão superficial e remoção de óleos e graxas, o que possibilitou a seleção daqueles com potencial de degradação de resíduos oleosos em efluentes líquidos para o uso em consórcios encapsulados nos ensaios de biorremediação.

Para uma melhor aplicação desses microrganismos, a encapsulação dos consórcios microbianos permitiu o tratamento do efluente de posto de combustíveis com a possibilidade de remoção da biomassa, o que o diferencia da simples adição de inóculos selecionados ao efluente.

A técnica de biorremediação, a partir da bioaugmentação com consórcios microbianos encapsulados, proposta como tratamento complementar ao tratamento convencional utilizado pelos postos de combustíveis para tratar o efluente lançado, apresentou bons resultados nos ensaios de biorremediação realizados, reduzindo diversos parâmetros de caracterização do efluente e, reduzindo principalmente, óleos e graxas, que se apresentavam em grande quantidade das amostras de efluente coletada.

Para trabalhos futuros sugere-se a identificação de gênero e espécie dos microrganismos isolados, a encapsulação com outro produto que diminua a barreira de contato do microrganismo com o meio e que seja realizado um ensaio de biorremediação em coluna de maior proporção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. **Standard Methods for examination of Water and Wastewater**. 19 ed. APHA, 2000.

ANP (Agência Nacional do Petróleo). Disponível em: <http://www.anp.gov.br>. Acesso em: 15 de outubro de 2014.

ARAKAKI, A. H. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de biomassa rica em cobre e zinco por fermentação submersa utilizando Leveduras isoladas do baru (*dipteryx alata vog.*) e testados em resíduos da agroindústria brasileira**. Tese de doutorado. Universidade Feral do Paraná. Curitiba/PR. 2010.

APHARNA, A. SRINIKETHAN, G. SMITHA, H. 2012. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. **Colloids Surf. B Biointer.** v. 95: p. 23-29, 2012.

ATAGANA, H.I. Bioremediation of creosote-contaminated soil in South Africa by landfarming. **Journal of Applied Microbiology.** v. 96: p. 510-520, 2006.

ATLAS, R.M. Bioremediation of petroleum pollutants. **Bioscience.** v. 45: p. 332-338, 1995.

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

BERGMAIER, D. CHAMPAGNE, C. P. LACROIX, C. Growth and exopolysaccharide production during free and immobilized cell chemostat culture of *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. **Journal of Applied Microbiology.** v. 98: p. 272-284, 2005.

BEZERRA, R. S. Avaliação da adição de PRP no tratamento de solo contaminado por petróleo. **In: jornada de iniciação científica**, 17. 2009, Ijuí. Anais, UNIJUI, 2009.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology.** v. 74: p. 63-67, 2000.

BRASIL. Resolução 273 de 29 de novembro de 2000. **Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA**. Brasília/DF. 2000.

BRASIL. Resolução 23 de 12 de dezembro de 1996. **Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA**. Brasília/DF. 1996.

BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, J. G. W. A. **Manual de Tratamento de Águas Residuárias Industriais**. São Paulo, SP. 2012.

CAMEOTRA, S.S. SINGH, P. 2008. Bioremediation of oily sludge using crude biosurfactants. **Int. Biodeter. Biodegr.** v. 62: p. 274-280, 2008.

CASTILLO, I. P. D. HERNANDEZ, A. LAFUENTE, I.D. RODRÍGUEZ-LLORENTE, M.A. CAVIEDES, E. PAJUELO. Self-bioremediation of cork-processing wastewaters by (chloro)phenol-degrading bacteria immobilised onto residual cork particles. **Water Research**. v. 46: p. 1723-1734, 2012.

COSTA, G. A.; FERREIRA, O. M. **Identificação dos resíduos gerados em postos de combustíveis**. Goiânia: UCG, 2008.

CHAGAS, A. O. SPINELLI, M. KATO, T. DE LIMA, E. S. GAVAZZA, S. Bioremediation of a tropical clay soil contaminated with diesel oil, **Journal of Environmental Management**. v. 113: p. 510-516, 2012.

CHENG, H. P. YOU. I. C. LAI, S. H. NING. H. Biodegradation of naphthalene in the oil refinery wastewater by enriched activated sludge. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 86: p. 272-277, 2014.

CERQUEIRA, V. S. HOLLENBACH, E. B. MABONI, F. VAINSTEIN, M. H. CAMARGO, F. A. O. PERALBA, M. C. R. BENTO, F. M. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. **Bioresource Technology**. v. 102: p. 11003–11010, 2011.

COLLA; L. M. COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor**. v. 13: p. 85-103, 2003.

COSTA, A. H. R.; CORSEUIL, H.; WENDT. M. F. Biorremediação com injeção de nitrato de águas subterrâneas contaminadas por vazamento de gasolina. In: Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas, 2006, São Paulo. **Anais do XIV ABAS**, Florianópolis, 2008.

COVINO, S. D'ANNIBALE, A. STAZI, S. R. CAJTHAML, T. ČVANČAROVÁ, M. STELLA, T. PETRUCCIOLI, M. Assessment of degradation potential of aliphatic hydrocarbons by autochthonous filamentous fungi from a historically polluted clay soil. **Science of the Total Environment**. v. 505: p. 545–554, 2014.

COVIZZI, L. G. GIESE, E. C. GOMES, E. DEKKER, R. F. H. SILVA, R. Immobilization of microbial cells and their biotechnological applications. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**. v. 28: p. 143-160, 2007.

DAS, S. DASH, H. R. Microbial Biorremediation: A Potential Tool for restoration of contaminated Areas. **Microbial Biodegradation and Bioremediation**. v. 90: p. 1-21, 2014.

DECESARO, A. RIGON, M. R. THOMÉ, A. COLLA, L. M. Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. **Quím. Nova**. v. 36: 7-10, 2013.

DENATRAN (Departamento Nacional de Trânsito). Disponível em: <http://www.denatran.gov.br>. Acesso em: 15 de outubro de 2014.

DEL'ARCO, J. P.; FRANCA, F. P. Biodegradation of crude oil in sandy sediment. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 44: p. 87-92, 1999.

DESAI, J.D. BANAT, I. M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol. Mol. Biol.** v. 61: p. 47-64, 1997.

DI MARTINO, C. LÓPEZ, N. I. IUSTMAN. L. J. R. Isolation and characterization of benzene, toluene and xylene degrading *Pseudomonas* sp. selected as candidates for bioremediation **International Biodeterioration & Biodegradation.** v. 67: 1-5, 2012.

FENICE, M. FEDERICI, F. SELBMANN, L. PETRUCCIOLI, M. Repeated-batch production of pigments by immobilized *Monascus purpureus*. **Journal of Biotechnology.** v. 80: p. 271-276, 2000.

FERREIRA, I.D. MORITA, D.M. Ex-situ bioremediation of Brazilian soil contaminated with pasticizers process wastes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering.** v. 29: p. 77- 86, 2012.

GALLEGO, J.L.R. GARCÍA-MARTÍNEZ, M.J. LLAMAS, J.F. BELLOCH, C. PELÁEZ, A.I. SÁNCHEZ, J. 2007. Biodegradation of oil tank bottom sludge using microbial consortia. **Biodegradation.** v. 18: p. 269–281, 2007.

GARGOURI, B. KARRAY, F. MHIRI, N. ALOUI, F. SAYADI, S. Application of a continuously stirred tank bioreactor (CSTR) for bioremediation of hydrocarbon-rich industrial wastewater effluents. **Journal of Hazardous Materials.** v. 189: p. 427–434, 2011.

GUO, J. WANG, J. CUI, D. WANG, L. MA, F. CHANG, C. YANG, C. J. 2010. Application of bioaugmentation in the rapid start-up and stable operation of biological processes for municipal wastewater treatment at low temperatures. **Bioresour. Technol.** v. 101: p. 6622–6629

GOETTEMS, E. **Reator batelada sequêncial (rbs) para tratamento de efluentes de estabelecimnto de lavagem de carros.** Trabalho de Conclusão de Curso. Passo Fundo: UPF, 2011.

GUO, J. WANG, J. CUI, D. WANG, L. MA, F. CHANG, C. YANG, C. J. 2010. Application of bioaugmentation in the rapid start-up and stable operation of biological processes for municipal wastewater treatment at low temperatures. **Bioresour. Technol.** v. 101, 6622–6629, 2010.

GARGOURI, B. KARRAY, F. MHIRI, N. ALOUI, F. SAYADI, S. Application of a continuously stirred tank bioreactor (CSTR) for bioremediation of hydrocarbon-rich industrial wastewater effluents. **Journal of Hazardous Materials.** v. 189: p. 427–434, 2011.

GARCIA, D. C. D'ANNIBALE, A. L. P. CROGNALE, F. Y, PETRUCCIOLI, S. M. EYMAR, E. Implications of polluted soil biostimulation and bioaugmentation with spent mushroom substrate (*Agaricus bisporus*). on the microbial community and polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation. **Science of the Total Environment.** v. 508: p. 20–28, 2015.

GOJGIC-CVIJOVIC, D. MILIC, J.S. SOLEVIC, T.M. BESKOSKI, V.P. ILIC, M.V. DJOKIC, L.S. NARANCIC, T.M. VRVIC, M. M. Biodegradation of petroleum sludge and

petroleum polluted soil by a bacterial consortium: a laboratory study. **Biodegradation**. v. 23: 1-14, 2006.

HERRERO, M. STUCKEY, D.C. Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: **A review**. **Chemosphere xxx**. In press. 2014.

HU, S. P. CHEN, X. C. SHEN, C. F. DOU, C. M. SHI, J. Y. CHEN, Y. X. Interaction of *Pseudomonas putida* CZ1 with clays and ability of the composite to immobilize copper and zinc from solution. **Bioresource Technology**. v. 100: p. 330-337, 2013.

IWAMOTO, T. NASU, M. Current bioremediation practice and erspective. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 92: p. 1-8, 2001.

JACQUES, R. J. S.; SILVA, K. J.; BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O. Bioremediation of a soil contaminated with anthracene under different chemical and physical conditions. **Ciência Rural**. v. 40: p. 280-287, 2010.

JOO, H. J. NDEGWA, P. M. SHODA, M. PHAE, C. G. Bioremediation of oil contaminated soil using *Candida catenulate* and food waste. **Environmental Pollution**. v. 156: p. 891–896, 2008.

KANISSERY, R. G.; SIMS, G. K. Biostimulation for the enhanced degradation of herbicides in soil. **Applied and Environmental Soil Science**. v. 11: p 10-20, 2011.

KIM, S. H.; LIM, E. J.; LEE, S.; O.; LEE, J. D.; LEE, T. H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. **Biotechnology Applied Biochemistry**. v. 31: p. 249-253, 2000.

KOURKOUTAS, Y. MCERLEAN, C. KANELLAKI, M. HACK, C. J. MARCHANT, R. BANAT, I. M. KOUTINAS, A. A. High-temperature wine making using the thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 112: p. 25-35, 2004.

ŁEBKOWSKAA, M. ZBOROWSKAA, E. KARWOWSKA, E. Miaskiewicz, P. MUSZYNSKI, A. TABERNACKA, A. NAUMCZYK, J. JECZALIKC, M. Bioremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native microorganisms: Field-scale processes in Poland. **Ecological Engineering**. v. 37: p. 1895–1900, 2011.

LORENZETT, D. B.; ROSSATO, M. V. A gestão de resíduos em postos de abastecimento de combustível. In: SEMEAD (Seminários em Administração), 2010, São Paulo. **XIII SEMEAD**, Santa Maria, 2010.

MA, J. QUAN, X. YANG, LI, Z. A. Biodegradation of a mixture of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and multiple chlorophenols by aerobic granules cultivated through plasmid pJP4 mediated bioaugmentation, **Chem. Eng.** v. 10: p. 181–182/ 144–151, 2011.

MADEIRA, J. **Remediação de aquíferos contaminados por nitratos (um caso de estudo por biorremediação)**. Lisboa: UL, 2010.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Brock Biology of Microorganisms**. 12 ed. New Jersey, 2010.

MARTINS, V. G. et al. Solid State Biosurfactant Production in a Fixed-Bed Column Bioreactor. **Z. Naturforsch.** v. 61: p. 721-726, 2006.

MATHEW, M.; TAN, L. R.; SU, Q.; YANG, X.; BAXTER, M.; SENIOR, E. Bioremediation of 6%[w/w] diesel-contaminated mainland soil in Singapore: comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. **Engineering Life Science**. v. 6: p. 63-67, 2006.

MATSUURA, A. B. J. **Produção e caracterização de biosurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação**. Campinas: UNICAMP, 2004.

MAUPERIN, C.H. MORTIER, F. TACON, F. CARR, G. Viability of anectomycorrhizal inoculum produced in a liquid medium and entrapped in calcium alginate gel. **Canadian Journal of Botany**. v. 36: p. 2326 - 2329, 1987.

MILLER, H. Bioestimulation as a form of bioremediation of soil pollutants. **Basic Biotechnology Journal**. v. 6: p. 7-12, 2010.

MOLINA, B. L. RODRÍGUEZ, V. R. HERNÁNDEZ, V. M. VEJA, J. C. ZAPATA, P. O. MENDOZA, C. A. ALBORES, A. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. **Applied Soil Ecology**. v.27: 165-175, 2004.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002.

MOREIRA, M. T. PALMA, C. FEIJOO, O. LEMA, J. M. Strategies for the continuous production of ligninolytic enzymes in fixed and fluidised bed bioreactors. **Journal of Biotechnology**. v.66: p. 27-39, 1998.

MOO, Y. M. BUTLER, M. WEBB, C. MOREIRA, A. GRODZINSKI, B. Z. F. C. AGATHOS, S. 2011. **Comprehensive Biotechnology**. v. 3: p. 695 – 699, 2011.

NEVES, A. A. C. **Estudo sobre resíduos sólidos em postos de combustíveis, funilarias e estabelecimentos de lavagem automotiva no município de São Carlos, visando indicadores de sustentabilidade**. Tese de doutorado. São Carlos, SP. 2010.

NITSCHKE, M. PASTORE, G.M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**. v. 25: p. 772–776. 2002.

OLIVEIRA, F.J.S. **Biorremediação de solo arenoso contaminado por óleo cru**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2001.

OLLIVIER, B.; MAGOT, M. **Petroleum Microbiology**. Washington D.C., USA, ASM Press, 2005.

PASHOVA, S. et al. Induction of polymethylgalacturonase biosynthesis by immobilized cells of *Aspegillusniger*. **Enz.Microb.Technol.** v. 24: p. 535-540, 1999.

PERELO, L. W. In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177: p. 81-89, 2010.

PETROBRAS (Petróleo Brasileiro S.A.) Disponível em: <http://www.petrobras.com.br>. Acesso em: 15 de outubro de 2014.

PUYOL, D. MOHEDANO, A. F. RODRIGUEZ, J. J. SANZ, J. L. Effect of 2,4,6-trichlorophenol on the microbial activity of adapted anaerobic granular sludge bioaugmented with *Desulfitobacterium* strains, **New Biotechnol.** v. 29: p. 79–89, 2011.

QU, Y. ZHANG, R. F. MA, J. ZHOU, Y. B. Bioaugmentation with a novel alkali-tolerant *Pseudomonas* strain for alkaline phenol wastewater treatment in sequencing batch reactor, **World J. Microbiol. Biotechnol.** v. 27: p. 1919–1926, 2011.

QUAN, X. TANG, H. MA, J. Effects of gene augmentation on the removal of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in a biofilm reactor under different scales and substrate conditions, **J. Hazard. Mater.** v. 185: p. 689–695, 2011.

RHYKERD, R. L. CREWS, B. MCINNES, K. J. WEAVER, R. W. Impact of bulking agents, forced aeration, and tillage on remediation of oilcontaminated soil. **Bioresource Technology.** v. 67: p. 279-285, 1999.

RIBEIRO, M.C. SOARES, M. M. **Microbiologia Prática: Roteiro e Manual, Bactérias e Fungos.** 1ª ed, Rio de Janeiro, Atheneu, 2000. p. 112. Cooper, D.G., Goldenberg, B.G., 1987.

ROY, A. S. BARUAH, R. BORAH, M. SINGH, A. K. BORUAH, H. P. D. N. S. DEKA, M. NIPU D. BORA, T. C. Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study. **International Biodeterioration & Biodegradation.** v. 94: p. 79-89, 2014.

SCHMITZ, R. **Produção de biossurfactantes a partir da Microalga *spirulina platensis* e seu uso em Biorremediação.** Dissertação de mestrado. Passo Fundo: UPF, 2013.

SOUZA, E. C. PENNA, T. C. V. OLIVEIRA, R. P. S. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. **International Biodeterioration & Biodegradation.** v. 89: p. 88-94, 2014.

SCHULTZ, F. M. **Avaliação de microrganismos com potencial de degradação de diesel e biodiesel.** Dissertação de mestrado. Unisinos, 2010.

SZULC, A. AMBROZEWICZ, D. SYDOW, M. LAWNICZAK, L. PIOTROWSKA-CYPLIK A. MARECIK, R. CHRZANOWSKI. L. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: Feasibility during field studies. **Journal of Environmental Management.** v. 132: p. 121 128, 2014.

SASIDHARAN, S. R. JOSEPH, J. A. ANANDAKUMAR, S. VENKATESAN, V. MADHAVAN, C. N. A. AGARWAL, A. Ameliorative Potential of *Tamarindus indica* on High Fat Diet Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Rats. **The Scientific World Journal.** v. 20: p. 10-12.

SEMRANY, S. FAVIER, L. DJELAL, H. TAHAC, S. AMRANEA, A. Bioaugmentation: Possible solution in the treatment of Bio-Refractory Organic Compounds (Bio-ROCs). **Biochemical Engineering Journal**. v. 69: p. 75–86, 2012.

SILVA, L. J. **Processo de Landfarming para Tratamento de Resíduos Oleosos**. Tese de doutorado. Rio de Janeiro: UFRJ, 2009.

SOBERÓN, C. G. MAIER, R. M. Biosurfactants: a General Overview. In: Soberón-Chávez G, editor. Biosurfactants. **Springer-Verlag**; Berlin, Germany: 2011. pp. 1–11.

SOUZA, E. C. PENNA, T. C. V. OLIVEIRA, R. P. S. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 89: p. 88-94, 2014.

TAM, S. K. DUSSEAULT, J. BILODEAU, S. LANGLOIS, G. HALLE, J. P. YAHIA, L. Factors influencing alginate gel biocompatibility. **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 98: p. 40–52, 2011.

TEIXEIRA, P. C. **Emprego da flotação por ar dissolvido no tratamento de efluentes de lavagem de veículos visando a reciclagem da água**. Dissertação de mestrado. Campinas: Unicamp, 2003.

TORRES, B. B. BARBOSA, H. R. **Microbiologia Básica**. São Paulo. Ed. Atheneu: 1998

VERMA, S. BHARGAVA, R. PRUTHI, V. Oily sludge degradation by bacteria from Ankleswar India. Int. **Biodeter. Biodegr.** v. 57: p. 207-213, 2006.

XU, Z. SHUAI, S. LUYI, Z. Research on degradation of Nitrobenzene by artificial enrichment bioaugmentation in the source water, in: 2011 International Conference on Remote Sensing, **Environment and Transportation Engineering**. v. 10: p. 7049–7052, 2011.

ZAWIERUCHA, I. MALINA, G. SINGH, A. PARMAR, N. KUHAD, R.C. Bioremediation of Contaminated Soils: Effects of Bioaugmentation and Biostimulation on Enhancing Biodegradation of Oil Hydrocarbons, **Springer, Berlin, Heidelberg**. v. 20: p. 187-201, 2011.

APÊNDICES

Apêndice A: Curvas de crescimento dos microrganismos.

Figura 12: Curva de crescimento do microrganismo 1.

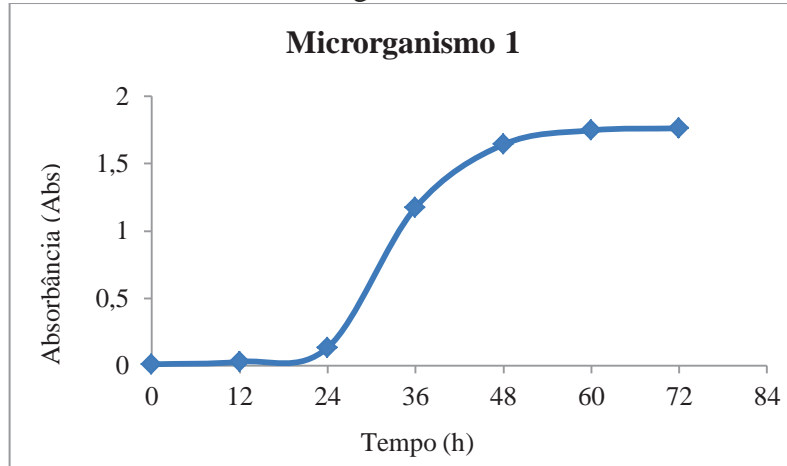


Figura 13: Curva de crescimento do microrganismo 2.

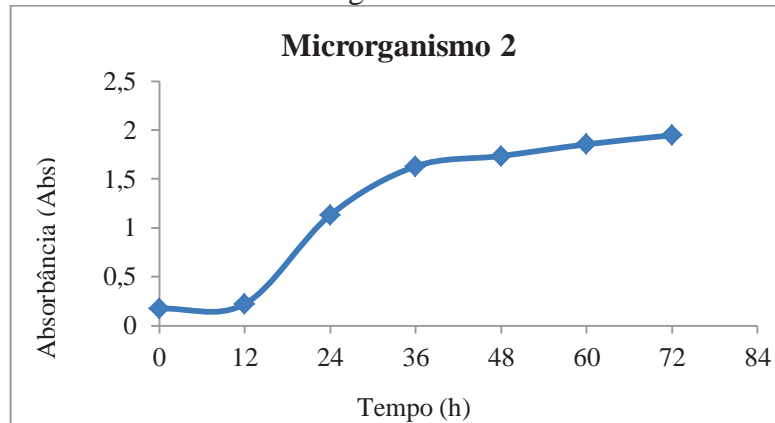


Figura 14: Curva de crescimento do microrganismo 4.

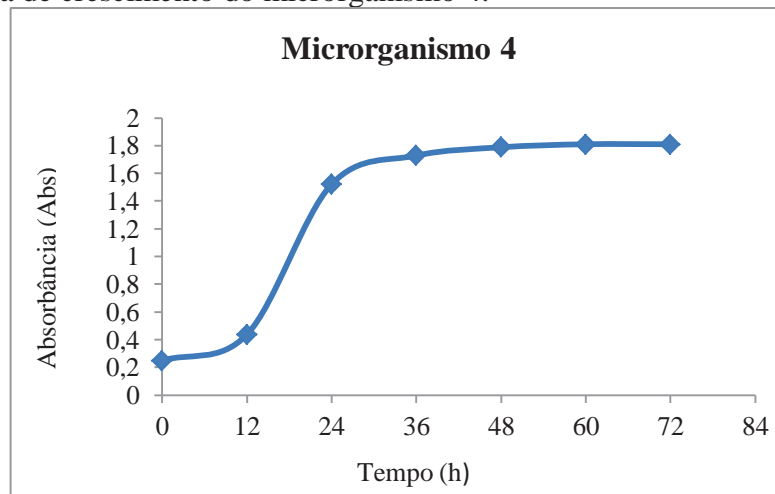


Figura 15: Curva de crescimento do microrganismo 5.

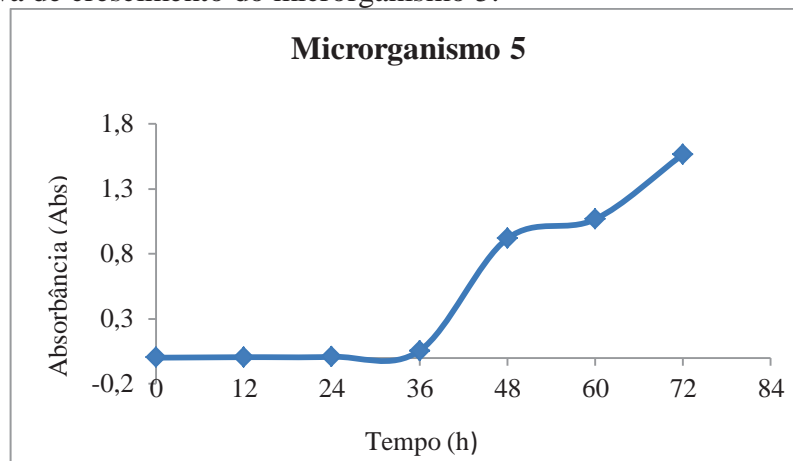


Figura 16: Curva de crescimento do microrganismo 9.

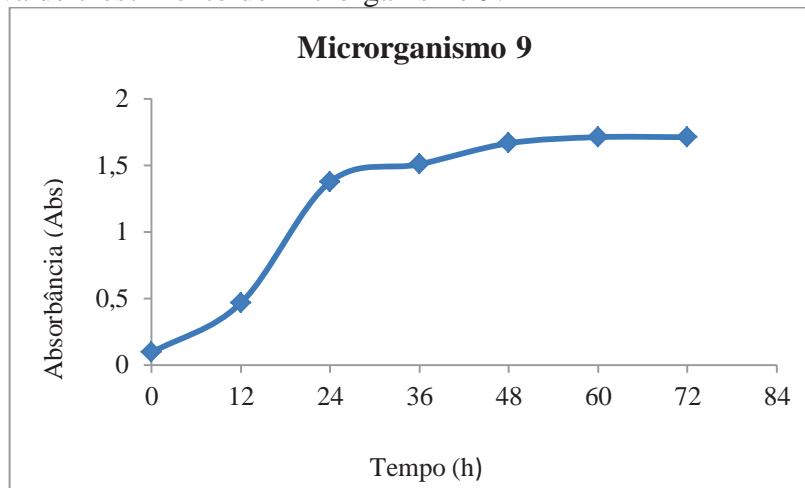


Figura 17: Curva de crescimento do microrganismo 12.

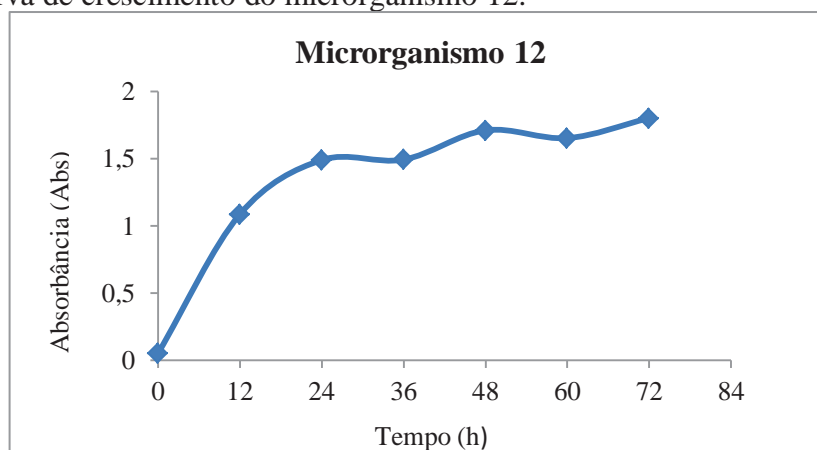
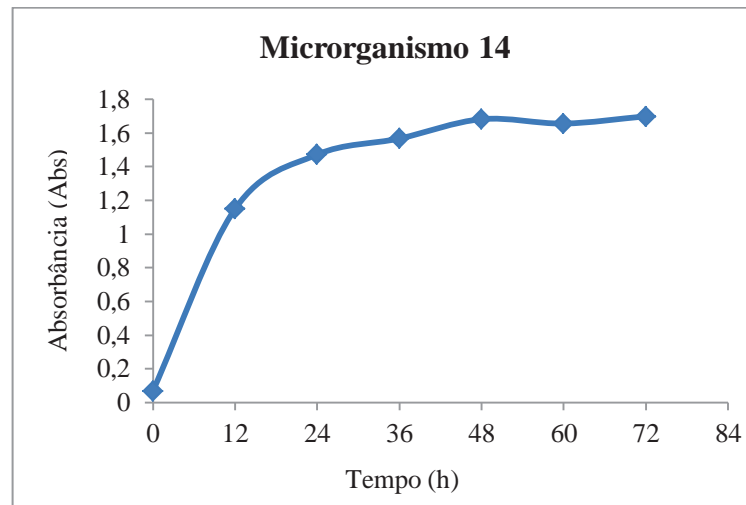


Figura 18: Curva de crescimento do microrganismo 14.



Apêndice B: Curvas padrão dos microrganismos.

Figura 19: Curva padrão do microrganismo 4.

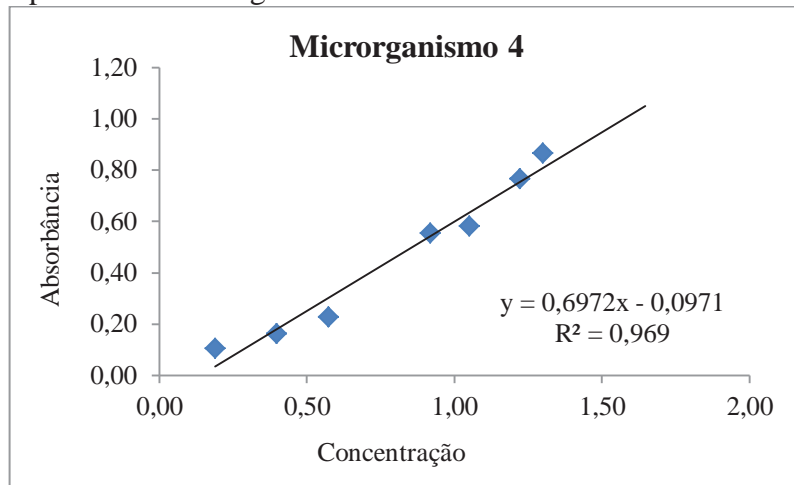


Figura 20: Curva padrão do microrganismo 12.

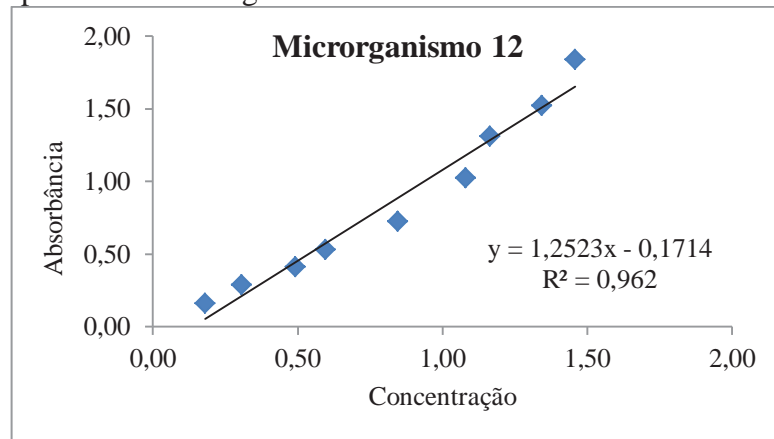
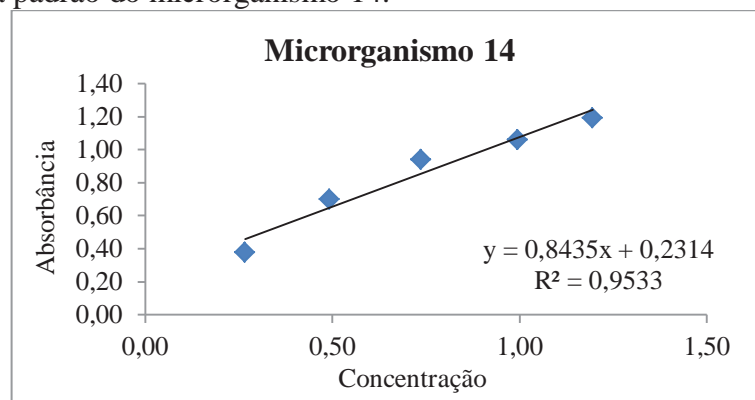


Figura 21: Curva padrão do microrganismo 14.



Apêndice C: Cromatografia dos picos de cadeias carbônicas presentes no efluente antes e após o tratamento com microrganismos livres.

Figura 22: Picos de cadeias carbônicas do efluente antes do tratamento.

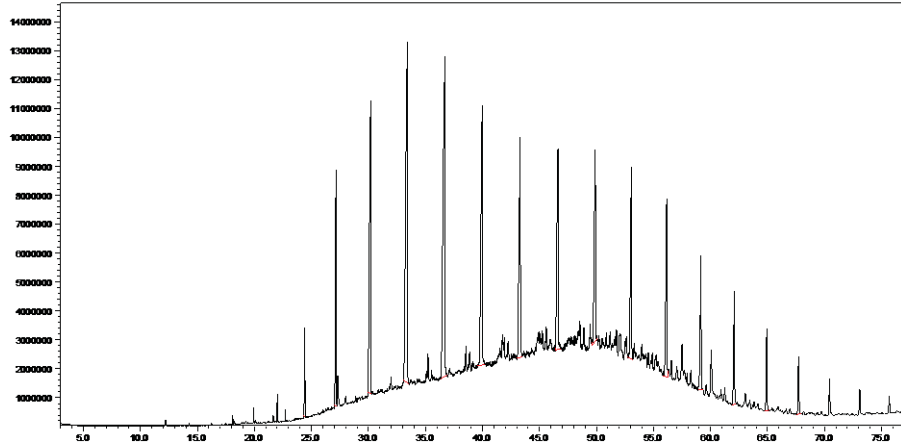


Figura 23: Picos de cadeias carbônicas do efluente tratado pelo microrganismo 1.

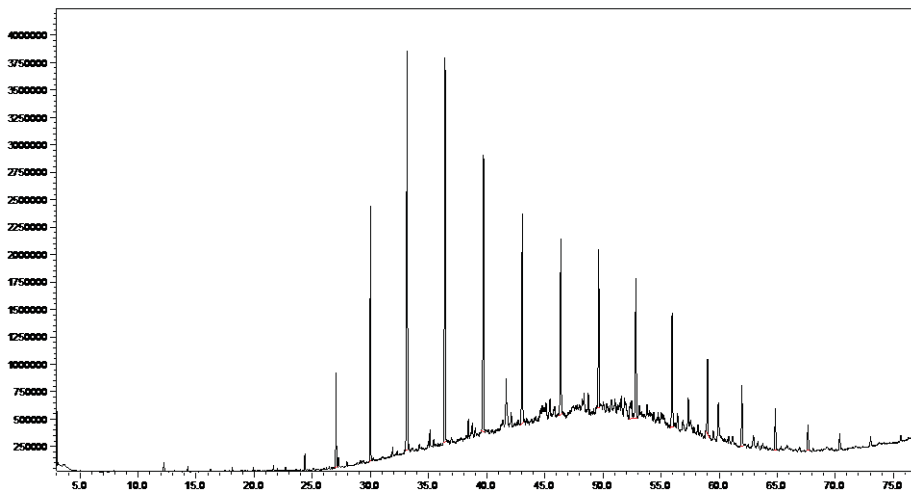


Figura 24: Picos de cadeias carbônicas do efluente tratado pelo microrganismo 2.

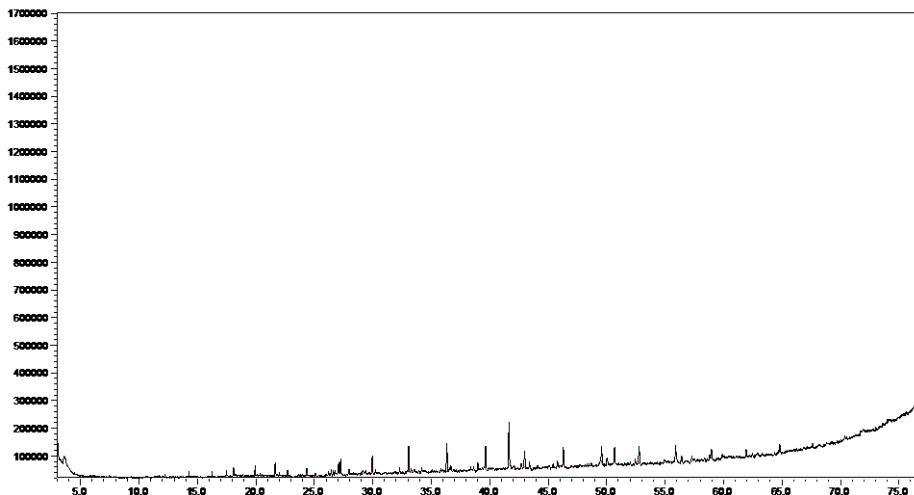


Figura 25: Picos de cadeias carbônicas do efluente tratado pelo microrganismo 4.

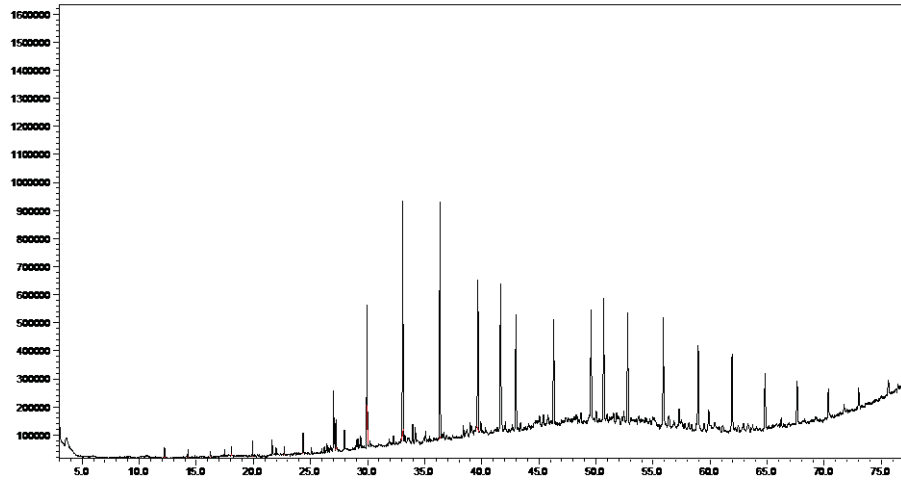


Figura 26: Picos de cadeias carbônicas do efluente tratado pelo microrganismo 5.

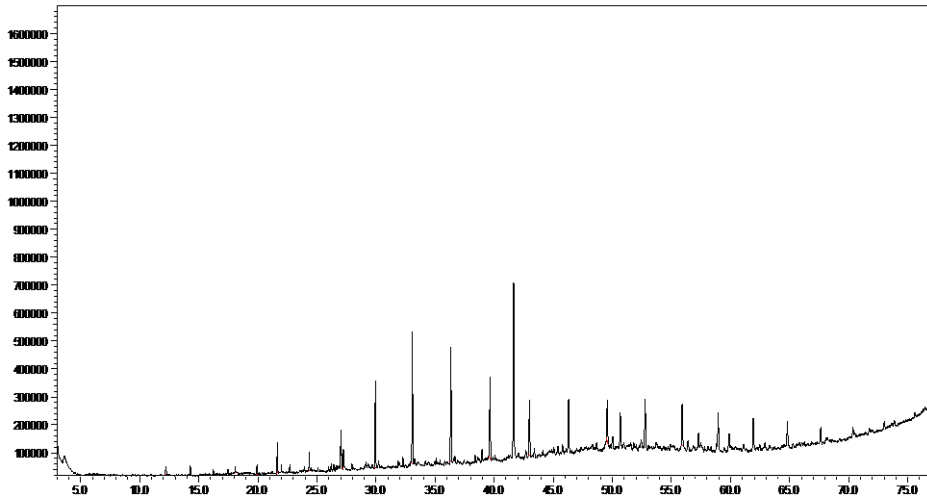


Figura 27: Picos de cadeias carbônicas do efluente tratado pelo microrganismo 9.

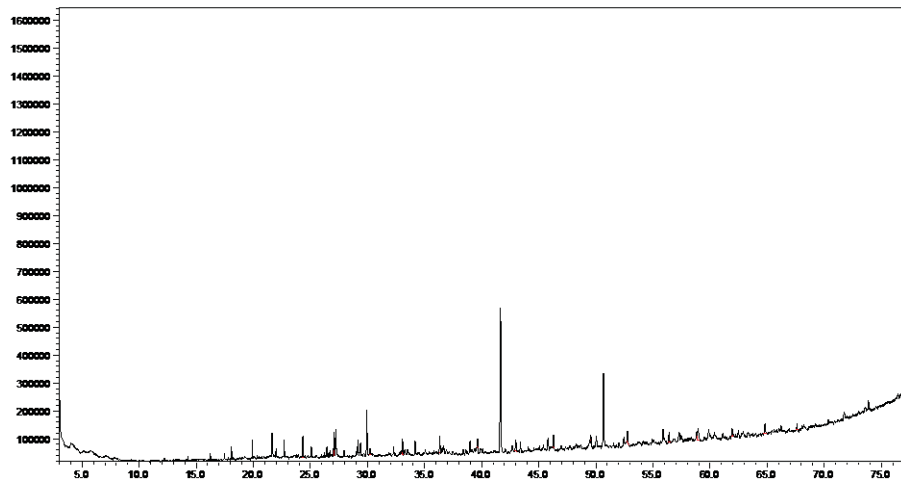


Figura 28: Picos de cadeias carbônicas do efluente tratado pelo microrganismo 12.

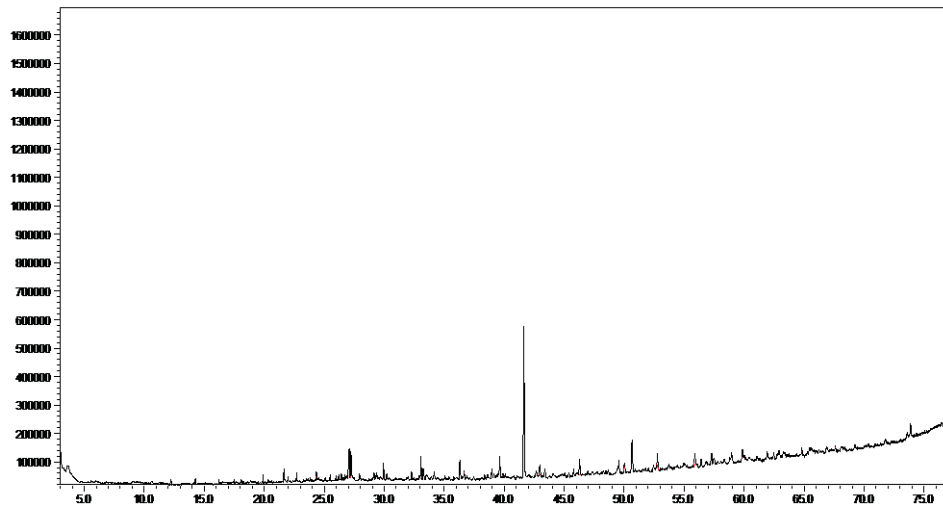
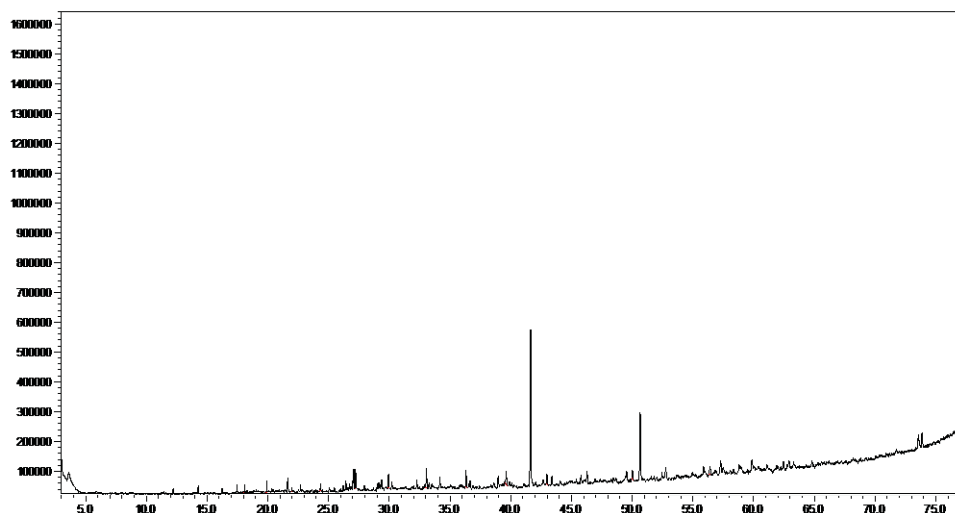


Figura 29: Picos de cadeias carbônicas do efluente tratado pelo microrganismo 14.



Apêndice D: Cromatografia dos picos de cadeias carbônicas presentes no efluente antes e após o tratamento com microrganismos encapsulados em consórcios.

Figura 30: Picos de cadeias carbônicas do efluente antes do tratamento.

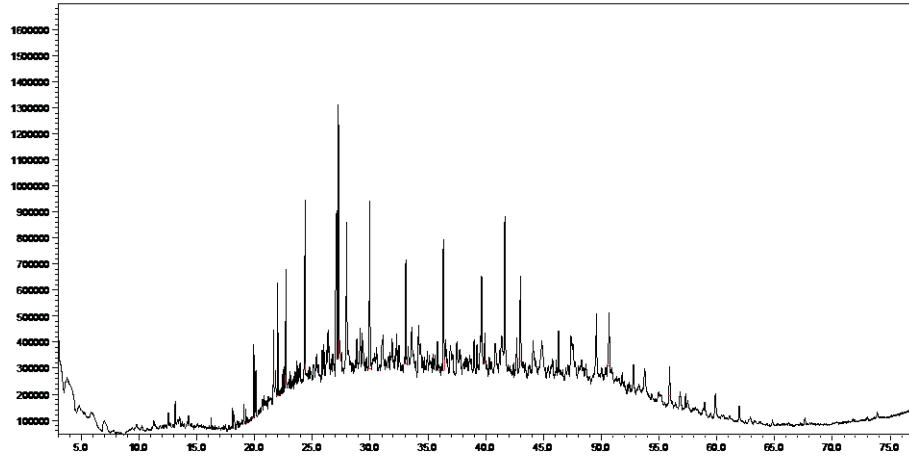


Figura 31: Picos de cadeias carbônicas do efluente tratado por atenuação natural.

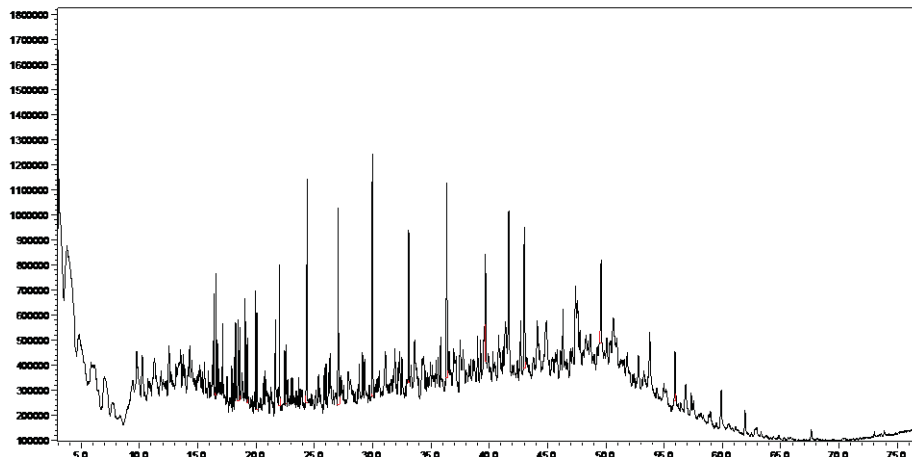


Figura 32: Picos de cadeias carbônicas do efluente tratado com capsulas de alginato sem microrganismo.

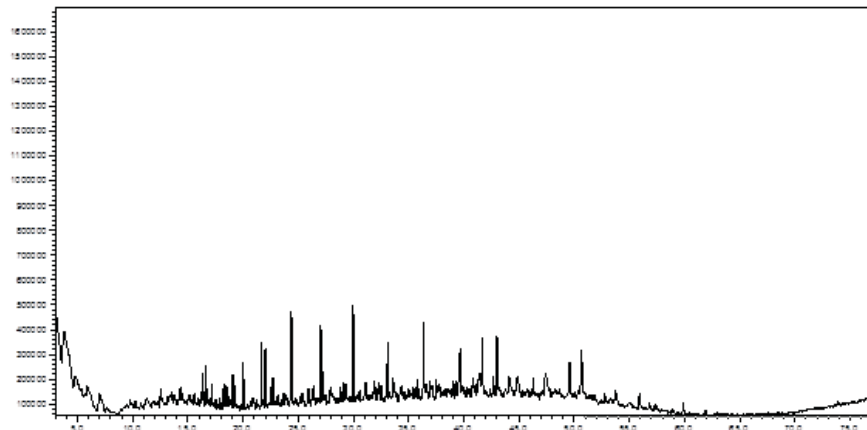


Figura 33: Picos de cadeias carbônicas do efluente tratado pelo consórcio de microrganismos X4/X12.

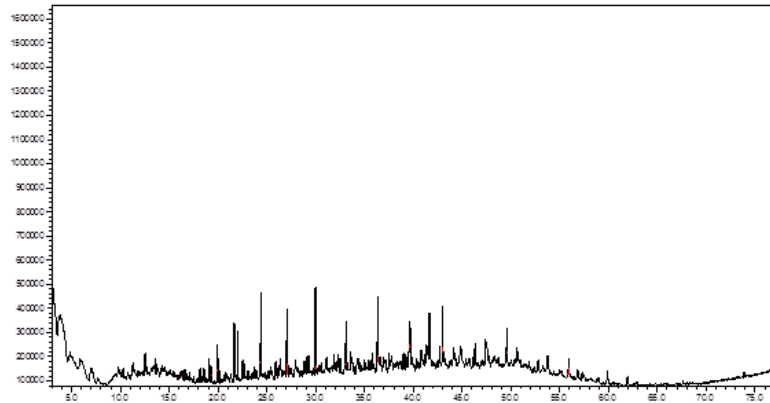


Figura 34: Picos de cadeias carbônicas do efluente tratado pelo consórcio de microrganismos X4/X12/X14.

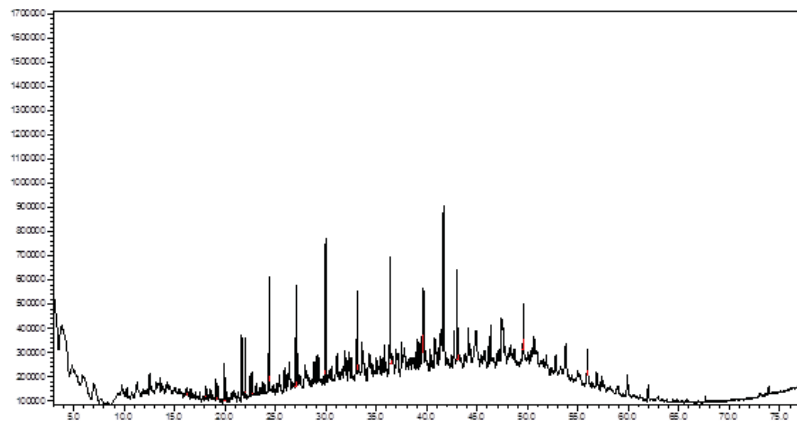


Figura 35: Picos de cadeias carbônicas do efluente tratado pelo consórcio de microrganismos X4/X14.

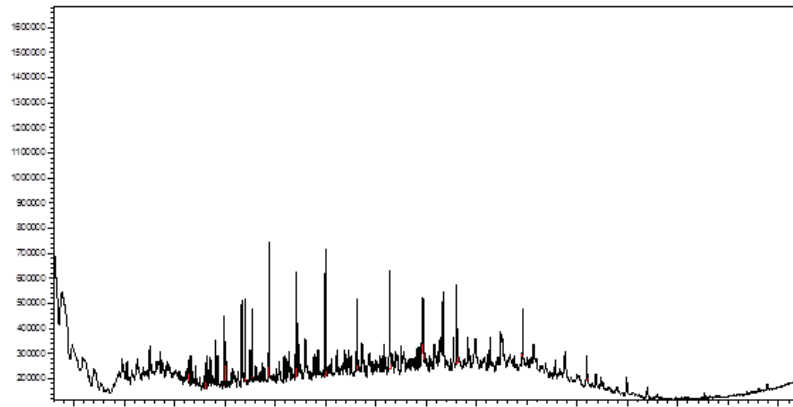


Figura 36: Picos de cadeias carbônicas do efluente tratado pelo consórcio de microrganismos X12/X14.

