

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Rachel de Moraes Ferreira

Tratamento de águas contaminadas por óleos lubrificantes usando biomassa da *Salvinia* sp. como adsorvente e suporte para consórcio bacteriano com potencial biodegradação

Rio de Janeiro

2021

Rachel de Moraes Ferreira

Tratamento de águas contaminadas por óleos lubrificantes usando biomassa da *Salvinia* sp. como adsorvente e suporte para consórcio bacteriano com potencial biodegradação

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Toxicologia Ambiental

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria de Fátima Ramos Moreira.

Coorientadores: Prof.^a Dra. Danielle Marque de Araújo Stapelfeldt e Prof. Dr. Rodrigo Pires do Nascimento.

Rio de Janeiro

2021

Título do trabalho em inglês: Treatment of contaminated water by lubricating oils using *Salvinia sp.* as adsorbent and support for bacterial consortium with potential biodegradation.

Catálogo na fonte
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde
Biblioteca de Saúde Pública

F383t Ferreira, Rachel de Moraes.
Tratamento de águas contaminadas por óleos lubrificantes usando biomassa da *Salvinia sp.* como adsorvente e suporte para consórcio bacteriano com potencial biodegradação / Rachel de Moraes Ferreira. — 2021.
206 f. : il. color. ; graf. ; mapas ; tab.

Orientadora: Maria de Fátima Ramos Moreira.
Coorientadores: Danielle Marque de Araújo Stapelfeldt e Rodrigo Pires do Nascimento.
Tese (doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2021.

1. Biodegradação Ambiental. 2. Adsorção. 3. Óleos Industriais. 4. Navios. 5. Esgotos - análise. 6. *B. pseudomycooides*. 7. *B. subtilis*. 8. *B. tequilensis*. 9. *B. cihuensis*. I. Título.

CDD – 23.ed. – 628.3

Rachel de Moraes Ferreira

**Tratamento de águas contaminadas por óleos lubrificantes usando biomassa da *Salvin...*
sp. como adsorvente e suporte para consórcio bacteriano com potencial biodegradação**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Toxicologia Ambiental

Aprovada em: 8 de junho de 2021.

Banca Examinadora

Prof.^a Dra. Tainah Silva Galdino de Paula
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio

Prof. Dr. Renato Marçullo Borges
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof.^a Dra. Adriana Sotero Martins
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof. Dr. Jaime Lopes da Mota Oliveira
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof. Dr Rodrigo Pires do Nascimento (Coorientador)
Universidade Federal do Rio de Janeiro-Escola de Química

Prof.^a Dra. Danielle Marque de Araújo Stapelfeldt (Coorientadora)
Universidade Federal do Rio de Janeiro- Campus Macaé- Instituto de Química

Prof.^a Dra. Maria de Fátima Ramos Moreira (Orientadora)
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Rio de Janeiro

2021

Dedico este trabalho à minha maior
incentivadora, minha mãe e parceira de todas as
horas.

AGRADECIMENTOS

A Deus “*inteligência suprema, causa primária de todas as coisas*”

A meus orientadores queridos, cada um a seu modo auxiliou para a prosperidade desta jornada. Há um pouco da contribuição de cada um deles nestas páginas que seguem.

A minha família querida, minha mãe Sonia, meu pai João, minha irmã Sabrina e meu cunhado Hosano que estão sempre comigo em todos os momentos.

A minha madrinha Suely Moraes pela acolhida em seu lar.

A generosidade de todos os pesquisadores que tive a sorte de encontrar e, prontamente recebi de forma espontânea conhecimentos que enriqueceram a construção deste trabalho: Dr Raimundo Damasceno, Dra. Mirian Crapez, Dra. Diana Negrão, Dr Jaime Oliveira e Dra. Lucy Seldin. A eles todo o carinho e admiração por seu amor à Ciência.

Aos meus amigos trabalhadores do CESTEH, MSc Leandro Carvalho, MSc Júlio Rosa e Dr Renato Borges por toda presteza e atenção.

Aos pesquisadores Dr Fábio Correia e Dr Enrico Saggiaro por conceder espaço no laboratório Ecotox para nossas atividades.

Ao Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental (DSSA) por conceder parte de sua estrutura para nossas análises.

A todos os funcionários do setor administrativo da ENSP pela atenção e competência. Em especial as Secretárias da Pós-graduação Selma Ribeiro e Márcia Gonçalves pelo eficiência e carinho para com todos.

A MSc Beatriz Dias por todo auxílio, paciência e generosidade em me assistir e ensinar todo o processo de análise de extração e preparo das amostras para sequenciamento do DNA das bactérias deste estudo.

A minha amiga Dra Gabrielle Alves Ribeiro da Silva por dispor do seu tempo para colaborar com parte deste trabalho.

As minhas amigas MSc Denise Alves, de Lima e MSc Bruna Garcia Pagliari pela amizade, apoio, carinho e confiança.

Aos meus amigos queridíssimos que me ajudaram a fazer esta caminhada menos solitária.

A minha prima e amiga Dra Liliane Moraes que sempre está presente em minha vida.

Aos pesquisadores Dra. Adriana Sotero Martins, Dr. Jaime Lopes da Mota Oliveira, Dra. Tainah Silva Goudino, Dr. Renato Maçullo Borges, Dra Ana Cristina Simões Rosa e Dra. Joseli Maria Nogueira, que me honraram ao aceitar meu convite para compor a banca avaliadora. Muito obrigada pela a atenção e contribuição!

A FAPERJ pela concessão da bolsa de Doutorado Nota 10.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Faço minhas as palavras de Emmanuel: *“Agradecer não será tão-somente problema de palavras brilhantes; é sentir a grandeza dos gestos, a luz dos benefícios, a generosidade da confiança e corresponder; espontaneamente, estendendo aos outros os tesouros da vida”* (Emmanuel, 2015)¹

Agradeço aos meus orientadores Fátima, Danielle e Rodrigo pela atenção, orientação e amizade. O apoio de cada um de vocês foi imprescindível. Com carinho, sempre.

¹ Emmanuel, Livro Pão Nosso – Psicografia de Francisco Cândido Xavier – Editora FEB 30ª.Ed 399p, 2015

“Fé eterna na sciencia”

Cruz, (*ex-libris*).

RESUMO

A poluição aquática por águas oleosas, provenientes de vazamentos de petróleo e derivados e descarte inadequado de efluentes, é um problema à manutenção da sustentabilidade do Planeta. O incentivo ao Desenvolvimento, Saúde e Inovação é uma das metas da Agenda 2030, que visa promover o desenvolvimento sustentável. Com base nessa iniciativa, o objetivo deste trabalho é o de desenvolver um método para tratamento de águas contaminadas por compostos derivados do petróleo com o uso da adsorção e da biotecnologia. Para tal, foi realizado o estudo da adsorção em emulsão de água e óleos lubrificantes com o uso da biomassa da macrófita *Salvinia* sp. *in natura* (SS) e com tratamento químico (SOH). O Capítulo 1 foi composto pelos procedimentos de coleta, preparo da biomassa e modificação química, seguidos pelos testes de caracterização físico-química das biomassas, como: Valores de pH, Ponto de Carga Zero, Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura e Sistema de Energia Dispersiva, Determinação dos Grupos Funcionais por Titulação de Boehm, Caracterização por Espectrometria no Infravermelho e Análise da Área Superficial e Porosidade. Foi possível verificar que o tratamento químico promoveu a mudança na estrutura de SOH comparada a SS e, também, favoreceu a adsorção de óleo pela biomassa SOH, com $q_{\text{máx.}}$ de 898 mg.g⁻¹ e 3,49g.g⁻¹ em adsorção em batelada e coluna de leito fixo, respectivamente. No Capítulo 2 foi realizado o isolamento de 105 cepas de bactérias do gênero *Bacillus* Gram-positivo, provenientes de sedimentos da Baía de Guanabara, seguido de testes de triagem para seleção de bactérias com potencial de degradação de óleo usado de motor de navio, que foram: teste de emulsificação, teste de deslocamento do óleo e teste de biodegradação pelo indicador redox sal de sódio 2,6 dicloroindofenol (DCPIP). Após a seleção das cepas com potencial capacidade de biodegradação foi realizada a identificação molecular de 22 cepas. Em novos testes de biodegradação as espécies que obtiveram os melhores resultados foram *B. pseudomycooides*; *B. subtilis*; *B. tequilensis* e *B. cihuensis* com degradação do óleo de 49,43%, 40,40%, 51,35% e 62,4%, respectivamente, em cinco dias ($C_0=4,5$ g.L⁻¹). No Capítulo 3, após a seleção do consórcio bacteriano, foram realizados testes de imobilização com as biomassas SS e SOH e testes de biodegradação com variação de parâmetros, como: células livres e imobilizadas, bactérias individuais e consórcio, variação da concentração de óleo, bioestimulação, reinoculação, adição de NaCl e teste com o biorreator em escala de bancada. O biorreator produzido foi capaz de biodegradar o óleo de forma eficaz com média de remoção de 52,9% e taxa de degradação de 0,027 d⁻¹. Foram realizados testes toxicológicos dos efluentes que apresentam elevado grau de toxicidade. Por fim, os resultados alcançados apontam para a possibilidade, por meio de estudos futuros, de que a metodologia desenvolvida venha a ser uma tecnologia sustentável e economicamente viável.

Palavras chave: Biodegradação, adsorção, óleo usado de navio, *B. pseudomycooides*; *B. subtilis*; *B. tequilensis* e *B. cihuensis*.

ABSTRACT

Aquatic pollution by oily water from oil and oil product spills and inadequate disposal effluents is a problem for maintaining the Planet sustainability. The incentive to Health a Innovation Development is one goal of 2030 Agenda, with aims to promote the sustainable development. Based in these initiatives the objective of this work is to develop a method for the treatment of contaminated water by compounds derived from petroleum, with the use of adsorption and biotechnology. Therefore, the study of adsorption in water emulsion and lubricating oils was carried out using the biomass from macrophyte *Salvinia* sp. in natura (SS) and with chemical treatment (SOH). Chapter 1 was composed by the procedures of collection, preparation of the biomass and chemical modification, followed by the tests of biomass physical-chemical characterization as: pH Values, Point of Zero Charge, Scanning Electron Microscopy, Energy Dispersive System, Determination of Functional Groups by Boehm Titration, Characterization by Infrared Spectroscopy, Surface Area Analysis, and Porosity . It was possible to verify that the chemical treatment promoted a change in SOH structure compared to SS and also favored the oil adsorption by the biomass SOH, with q_{max} of 898 $mg.g^{-1}$ and 3.49 $g.g^{-1}$ in batch adsorption and fixed bed column, respectively. In Chapter 2, 105 bacteria strains from genus *Bacillus* Gram-positive were isolated from sediments of the Guanabara Bay, after that the screening tests to select bacteria with potential for degradation of ship engine oil used was done, which were: emulsification test, oil displacement test and biodegradation test by redox indicator sodium salt 2,6 dichloroindophenol (DCPIP). After selecting the strains with potential biodegradation capacity, the molecularly identification were done to this 22 strains. New biodegradation tests whose species that obtained the best results were *B. pseudomycoides*; *B. subtilis*; *B. tequilensis* and *B. cihuensis* with oil degradation of 49.43%, 40.40%, 51.35% and 62.4%, respectively, in five days ($C_0=4.5 g.L^{-1}$). In Chapter 3, after selecting the bacterial consortium, immobilization tests with biomass were performed with SS and SOH and biodegradation tests with variation of parameters such as: free and immobilized cells, individual bacteria and consortium, variation in oil concentration, biostimulation, reinoculation, and addition of NaCl and bench scale bioreactor test. The produced bioreactor was able to efficiently biodegrade the oil with an average removal of 52.9% and a degradation rate of $0.027 d^{-1}$. Toxicological tests were carried out on effluents with a high toxicity degree. Finally, the results achieved point to the possibility, through future studies, that the developed methodology will become a sustainable and economically viable technology.

Keywords: Biodegradation, adsorption, used ship oil, *B. pseudomycoides*; *B. subtilis*; *B. tequilensis* and *B. cihuensis*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3	REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1	A INOVAÇÃO TECNOLÓGICA E SAÚDE PÚBLICA	21
3.2	PETRÓLEO E ÓLEOS LUBRIFICANTES.....	23
3.3	O PETRÓLEO E DERIVADOS COMO CONTAMINANTES E SEUS IMPACTOS À SAÚDE.....	23
3.4	POLUIÇÃO AQUÁTICA, EFLUENTES OLEOSOS E OS IMPACTOS AMBIENTAIS.....	24
3.5	TRATAMENTO PARA REMOÇÃO DE ÓLEOS E LEGISLAÇÃO.....	26
3.6	ADSORÇÃO.....	28
3.6.1	Modelos matemáticos e o estudo dos mecanismos de adsorção	28
3.6.1.1	Langmuir.....	29
3.6.1.2	Freundlich.....	30
3.6.1.3	Estudo cinético	30
3.6.2	Termodinâmica	31
3.6.3	Adsorção em coluna	32
3.6.4	Caracterização físico-química do biossorvente	34
3.7	<i>SALVINIA</i> SP.	35
3.8	BIODEGRADAÇÃO.....	36
3.8.1	Estudos de biodegradação por bactérias	36
3.8.2	Consórcios bacterianos	37
3.8.3	Teste de antagonismo	38
3.8.4	Biossurfactantes	38
3.8.5	Biorreatores	39
3.8.6	Imobilização	40
3.8.7	Biorreatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada	40
3.9	ECOTOXICIDADE.....	41
	REFERÊNCIAS	42

4	BIOMASSA DE SALVÍNIA SP. COMO MATERIAL ADSORVENTE DE ÓLEOS LUBRIFICANTES.....	46
4.1	INTRODUÇÃO.....	46
4.2	METODOLOGIA.....	47
4.2.1	Coleta e Conservação das Amostras.....	47
4.2.2	Preparo dos biossorventes quimicamente modificados.....	47
4.2.3	Caracterização Físico-química dos biossorventes.....	47
4.2.3.1	Determinação dos valores de pH dos biossorventes.....	47
4.2.3.2	Ponto de Carga Zero (PCZ).....	48
4.2.3.3	Caracterização dos biossorventes por Microscopia Eletrônica de Varredura e Sistema de Energia Dispersiva.....	48
4.2.3.4	Determinação dos grupos funcionais – método Boehm.....	48
4.2.3.5	Caracterização das biomassas por Espectrometria no Infravermelho (IV).....	49
4.2.3.6	Análise da área superficial e porosidade.....	49
4.2.4	Teste de liberação de substâncias em solução aquosa.....	49
4.2.5	Preparo das emulsões.....	50
4.2.6	Extração de óleo por clorofórmio.....	50
4.2.7	Quantificação dos óleos presentes na emulsão.....	50
4.2.8	Testes de adsorção em batelada.....	50
4.2.8.1	Efeito da concentração inicial de óleo e Isotermas de adsorção.....	51
4.2.8.2	Tempo de contato e variação da temperatura.....	51
4.2.8.3	Efeito da variação do pH.....	52
4.2.8.4	Teste de dessorção.....	52
4.2.9	Teste de recuperação.....	52
4.2.10	Testes de adsorção em coluna de leito fixo.....	52
4.2.11	Testes estatísticos.....	53
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.3.1	Modificação da biomassa.....	54
4.3.2	Caracterização Físico-química dos biossorventes.....	55
4.3.2.1	Determinação dos valores de pH dos biossorventes.....	55
4.3.2.2	Ponto de Carga Zero (PCZ).....	55
4.3.2.3	Caracterização dos biossorventes por Microscopia Eletrônica de Varredura e Sistema de Energia Dispersiva.....	56

4.3.2.4	Determinação dos grupos funcionais – Método Boehm.....	58
4.3.2.5	Caracterização das biomassas por Espectrometria no Infravermelho (IV).....	59
4.3.2.6	Análise da área superficial e porosidade.....	60
4.3.3	Teste de liberação de substâncias em solução aquosa.....	62
4.3.4	Quantificação dos óleos presentes na emulsão e extração de óleo por clorofórmio.....	62
4.3.5	Testes de adsorção com óleo de Carro.....	62
4.3.5.1	Efeito da concentração inicial de óleo e isothermas de adsorção.....	63
4.3.5.2	Tempo de contato e variação da temperatura.....	66
4.3.5.3	Efeito da variação do pH.....	70
4.3.6	Testes de adsorção com óleo de Navio.....	71
4.3.6.1	Efeito da concentração inicial de óleo e isothermas de adsorção.....	72
4.3.6.2	Tempo de contato e variação da temperatura.....	75
4.3.6.3	Efeito da variação do pH.....	79
4.3.6.4	Testes de adsorção em coluna de leito fixo.....	81
4.3.6.5	Teste de dessorção.....	83
4.3.6.6	Teste de recuperação.....	83
4.3.6.7	Efeito do tempo de contato.....	83
	REFERÊNCIAS.....	86
5	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS NA BIODEGRADAÇÃO DE ÓLEO.....	90
5.1	INTRODUÇÃO.....	90
5.2	METODOLOGIA.....	91
5.2.1	Área de amostragem e coleta.....	91
5.2.2	Isolamento das bactérias a partir do sedimento in natura.....	92
5.2.3	Isolamento das bactérias a partir do sedimento contaminado.....	92
5.2.4	Caracterização morfológica das bactérias isoladas.....	92
5.2.5	Pré-seleção das bactérias potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos.....	93
5.2.5.1	Teste de emulsificação.....	93
5.2.5.2	Teste de deslocamento do óleo.....	93
5.2.5.3	Determinação preliminar de biodegradabilidade usando o indicador redox DCPIP.....	93

5.2.6	Identificação das espécies de bactérias selecionadas com maior potencial para degradação.....	95
5.2.6.1	Extração do DNA.....	95
5.2.6.2	BOX-PCR.....	95
5.2.6.3	Identificação molecular.....	95
5.2.7	Capacidade do microrganismo para acessar a fonte de carbono em meio sólido.....	96
5.2.8	Teste de crescimento microbiano na presença de hidrocarbonetos.....	96
5.2.9	Teste piloto de quantificação de biodegradação de óleo.....	96
5.2.10	Teste de antagonismo.....	97
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	97
5.3.1	Coleta, contaminação do sedimento com óleo e isolamento de microrganismos.....	97
5.3.2	Caracterização morfológica dos microrganismos.....	101
5.3.3	Teste de emulsificação.....	102
5.3.4	Teste de deslocamento do óleo.....	102
5.3.5	Determinação preliminar de biodegradabilidade usando o indicador redox DCPIP.....	104
5.3.6	Análise dos resultados para pré-seleção das bactérias potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos.....	106
5.3.7	Identificação das espécies de bactérias.....	108
5.3.7.1	Extração do DNA.....	108
5.3.7.2	BOX-PCR.....	108
5.3.7.3	Identificação molecular.....	109
5.3.8	Capacidade do microrganismo para acessar a fonte de carbono em meio sólido.....	110
5.3.9	Teste de crescimento microbiano na presença de hidrocarbonetos.....	111
5.3.10	Teste piloto para quantificação da biodegradação de óleo.....	112
5.3.11	Análise dos resultados para seleção do consórcio.....	115
5.3.12	Teste de antagonismo com as bactérias selecionadas para compor o consórcio bacteriano.....	116
5.4	CONSIDERAÇÕES.....	117
	REFERÊNCIAS.....	118

6	BIOMASSA DE SALVINIA SP. COMO MATERIAL SUPORTE PARA CONSÓRCIO DE BACILLUS SP. PROMOVENDO A ADSORÇÃO E A BIODEGRADAÇÃO DE ÓLEO.....	122
6.1.	INTRODUÇÃO.....	122
6.2	METODOLOGIA.....	123
6.2.1	Imobilização de bactérias nos biossorventes.....	123
6.2.2	Tempo de crescimento bacteriano.....	124
6.2.3	Teste de reinoculação.....	125
6.2.4	Comparação da eficiência de biodegradação das cepas individual X consórcio.....	125
6.2.5	Comparação da eficiência de biodegradação do consórcio de células livres X imobilizada.....	126
6.2.6	Comparação da eficiência de biodegradação em água ultrapura X água marinha sintética.....	126
6.2.7	Variação da concentração de óleo.....	127
6.2.8	Tempo de crescimento do consórcio por bioestimulação.....	127
6.2.9	Teste de eficiência com bioestimulação.....	127
6.2.10	Análise físico-química do óleo bruto.....	128
6.2.10.1	Caracterização do óleo usado de navio por Espectroscopia no Infravermelho (IV).....	128
6.2.10.2.	Caracterização do óleo usado de navio por CG/FID.....	128
6.2.11	Teste com biorreator em escala de bancada.....	128
6.2.11.1	Cálculos de eficiência do biorreator.....	129
6.2.12	Análise toxicológica dos efluentes.....	130
6.2.12.1	Ensaio de fitotoxicidade com <i>Lactuca Sativa</i>	130
6.2.12.2	Teste de fitotoxicidade com <i>Phaseolus vulgaris</i>	130
6.2.12.3	Ensaio de letalidade com <i>Artemia Salina Leach L</i>	131
6.2.12.4	Teste de toxicidade aguda com <i>Vibrio fisheri</i>	131
6.2.13	Testes estatísticos.....	132
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	132
6.3.1	Imobilização de bactérias nos biossorventes.....	132
6.3.2	Tempo de crescimento bacteriano.....	133
6.3.3	Teste de reinoculação.....	135

6.3.4	Comparação da eficiência de biodegradação das cepas individuais X consórcio.....	136
6.3.5	Comparação da eficiência de biodegradação do consórcio de células livres X imobilizada.....	137
6.3.6	Comparação da eficiência de biodegradação em água ultrapura X água marinha sintética.....	139
6.3.7	Variação da concentração de óleo.....	140
6.3.8	Tempo de crescimento do consórcio por bioestimulação.....	141
6.3.9	Teste de eficiência com bioestimulação.....	143
6.3.10	Análise físico-química do óleo bruto.....	144
6.3.10.1	Caracterização do óleo usado de navio por Espectroscopia no Infravermelho (IV).....	144
6.3.10.2	Caracterização do óleo usado de navio por cromatografia gasosa (CG).....	146
6.3.11	Teste com biorreator em escala de bancada.....	146
6.3.11.1	Cálculos de eficiência do biorreator.....	150
6.3.12	Análise toxicológica dos efluentes.....	150
6.3.12.1	Ensaio de fitotoxicidade com <i>Lactuca Sativa</i>	150
6.3.12.2	Fitotoxicidade com <i>Phaseolus vulgaris L.</i>	152
6.3.12.3	Ensaio de letalidade com <i>Artemia Salina Leach</i>	153
6.3.12.4	Teste de toxicidade aguda com <i>Vibrio fisheri</i>	154
6.4	CONSIDERAÇÕES.....	155
7	CONCLUSÃO.....	158
	REFERÊNCIAS.....	159
	APÊNDICE A-Lista de Reagente utilizados.....	162
	APÊNDICE B – Análise de dados estatísticos do capítulo 1.....	163
	APÊNDICE C – Análise de dados estatísticos do capítulo 2.....	170
	APÊNDICE D – Análise de dados estatísticos do capítulo 3.....	170
	APÊNDICE E - Imagens macroscópicas e microscópicas das bactérias isoladas.....	174
	APÊNDICE F-Árvores filogenéticas das bactérias identificadas.....	185

1 INTRODUÇÃO

Na atualidade, iniciativas globais para a promoção da saúde e do bem-estar têm sido realizadas, dentre elas a Agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável, considerada a protagonista desses movimentos. Nela foram estabelecidos os Objetivos para o Desenvolvimento Sustentável (ODS), dentre eles a erradicação da pobreza, a promoção da saúde e educação, proteção ao ambiente, sistema igualitário e crescimento econômico, sendo essas as bases do desenvolvimento sustentável (Rocha, 2017).

O desenvolvimento sustentável passou a ser uma meta global. A busca por novas tecnologias que visem a melhora da qualidade de vida da população e a sustentabilidade dos recursos naturais são amplamente defendidas e incentivadas (Rocha, 2017; Costa *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2020). A aplicação de medidas de uso sustentável da água, através do tratamento adequado de efluentes, como também de novos métodos de fitorremediação de ambientes contaminados, são pautados em movimentos globais ao longo da história, como a Conferência de Estocolmo, a ECO-92, a Agenda 21, a Conferência das Partes (Protocolo de Kyoto), a Cúpula de Johannesburgo (Rio +10), e a Rio +20 (Metas de Desenvolvimento Sustentável). A inovação tecnológica deve ser reorientada para a preservação do meio ambiente e ao desenvolvimento sustentável. O desenvolvimento de um país está intimamente relacionado às oportunidades oferecidas à sua população em busca do seu bem-estar, sendo uma das formas através do incentivo à produção de conhecimentos que visem tecnologias socialmente desejáveis e sustentáveis (Costa *et al.*, 2013).

Como consequência, a crescente conscientização ambiental associada às rigorosas legislações vigentes têm contribuído significativamente para a implantação de estações de tratamento de efluentes como uma etapa obrigatória no ciclo produtivo dos processos industriais (Heck, 2013; Mesquita; Leite, 2017).

Atualmente, um dos grandes problemas na produção industrial é a contaminação de sistemas terrestres e aquáticos por resíduos tóxicos produzidos por vários processos químicos. Contaminantes ambientais típicos são constituídos por compostos orgânicos e metais. No caso específico dos compostos orgânicos, a exploração econômica do petróleo e derivados e seu intensivo uso em diversas aplicações são responsáveis por muitas das agressões ambientais como, por exemplo, derramamentos acidentais de óleo e derivados no mar, rodovias, fábricas e postos de gasolina. Suas consequências para o meio ambiente e ser humano são amplamente divulgadas na mídia, como o vazamento de mais de 1000 toneladas de petróleo em águas brasileiras em 2019. Para minimizar tais problemas, as leis de controle ambiental, cada vez mais

rigorosas, têm determinado limites menores para contaminação no meio ambiente e estabelecidas multas pesadas para os responsáveis por tal poluição. Como resultado, as empresas devem estar preparadas para tratar efluentes líquidos contendo substâncias perigosas, utilizando métodos mais eficientes para prevenção da contaminação ambiental (Heck, 2013; Mesquita; Leite, 2017).

Um dos primeiros métodos empregados no tratamento da poluição de petróleo e seus derivados é a adsorção. Essa operação corresponde à transferência de massa, onde moléculas de uma fase fluida (gás, vapor ou líquido) se concentram espontaneamente sobre uma superfície, geralmente sólida. Esta é uma propriedade fundamental da matéria, tendo sua origem nas forças atrativas entre as moléculas (Elanchezhian *et al.*, 2018), sendo utilizados vários adsorventes como por exemplo as zeólitas, o carvão ativado, a turfa e a vermiculita. Estes materiais geram um elevado custo industrial, sendo interessantes novas pesquisas em busca de adsorventes naturais que minimizem estes custos operacionais (Tran *et al.*, 2015; Foletto *et al.*, 2009; Schneider, 1995).

Biomassas de diferentes fontes vegetais têm sido amplamente estudadas, com o resultado de que vários biossorventes produzidos mostraram ser adequados para remoção de um espectro de contaminantes presentes em efluentes. As principais vantagens no uso de plantas adsorventes para remoção de óleos são devido a sua alta oleofilicidade, abundância na natureza, baixo custo e não ser necessário uma regeneração após a adsorção, visto que podem ser utilizadas em fornos para a produção de energia ou prensadas para a recuperação do óleo após a adsorção (Schneider, 1995).

A possibilidade da utilização da *Salvinia sp.* na remoção de óleos presentes em efluentes petroquímicos procede de estudos anteriores que revelam sua versatilidade de adsorver satisfatoriamente diversos contaminantes como metais, corantes e óleos (Schneider, 1995; Oliveira *et al.*, 2015; Ferreira *et al.*, 2016; Ferreira, *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2020). Outro ponto importante a destacar sobre esta macrófita é que possui rápida proliferação e grande capacidade de adaptação ecológica. Em especial na região norte fluminense o seu crescimento excessivo nos corpos hídricos prejudica a biota aquática, diminuindo a oxigenação da água, dificultando a penetração dos raios solares, impedem a navegação, prejudica esportes náuticos e obstruem canais, o que torna necessário o manejo periódico dessas plantas (Esteves, 1988). O destino dado a essa matéria orgânica é um problema, no geral acabam indo para os lixões das cidades. Esses fatores tornam esta linha de pesquisa bastante vantajosa (Schneider, 1995; Foletto *et al.*, 2009).

Da mesma forma, estudos que utilizam a biodegradação para a biorremediação, bem como o tratamento dos efluentes contendo compostos orgânicos são promissores. A biodegradação é a transformação de compostos orgânicos por atividade metabólica, especialmente de microrganismos, resultando na formação de água, CO₂ e biomassa, (Xu *et al.*, 2018). Esse processo é utilizado para degradar os compostos de hidrocarbonetos derivados do petróleo, cujas cadeias são grandes, estáveis e difíceis de romper suas ligações de forma espontânea, o que faz necessário o emprego de técnicas que permitam a retirada ou formação de subprodutos inócuos ao ecossistema, por isso o emprego desses microrganismos (Sakthipriya *et al.*, 2018; Al-Sayegh *et al.*, 2015).

Com base nos conhecimentos sobre adsorção da macrófita aquática *Salvinia* sp. e biodegradação, dois possíveis métodos foram desenvolvidos, empregando a biomassa quimicamente modificada dessas plantas como adsorvente e seu uso como suporte para microrganismos na biodegradação destes compostos em biorreator. O intuito é que uma vez a biomassa impregnada de óleo sirva de suporte para que o microrganismo se fixe em sua superfície, assim acesse de forma mais rápida e eficaz a fonte de carbono, proveniente do óleo, otimizando o processo de biodegradação.

Já existem estudos sobre o tratamento de águas residuais com o uso de biomassa morta, biodegradação com fungos e bactérias. E pesquisas com reatores biológicos que utilizam biomassa imobilizada como meio de suporte para bactérias têm mostrado bons resultados. Portanto, o aprofundamento das investigações na otimização deste processo de tratamento é necessário (Sakthipriya *et al.*, 2018).

As propostas deste trabalho são pertinentes, uma vez que se utilizou a capacidade natural de adsorção da *Salvinia* sp., porém potencializada. Além disso, essa macrófita servirá como suporte para microrganismos a fim de adsorver e biodegradar compostos orgânicos, sendo conseqüentemente, uma técnica sustentável, eficaz e de fácil aplicação, disponível para águas contaminadas por compostos orgânicos derivados do petróleo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método para tratamento de águas contaminadas por compostos orgânicos derivados do petróleo, com o uso da adsorção e da biotecnologia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a capacidade de remoção por adsorção com biomassa produzida a partir da macrófita *Salvinia* sp com tratamento químico e sem tratamento químico (*in natura*) em emulsões de água e óleo lubrificante;
- b) Estudar a interação entre os compostos orgânicos e esses bio-sorventes;
- c) Avaliar o potencial de remoção de óleo usado de motor de navio por colunas de adsorção formadas por biomassa produzida a partir da da macrófita *Salvinia* sp. com e sem modificações químicas;
- d) Identificar e isolar bactérias coletadas em sedimento da Baía da Guanabara;
- e) Verificar a capacidade de biodegradação de óleo lubrificante usado de motor de navio;
- f) Analisar a capacidade de imobilização de cepas bacterianas isoladas e consorciadas em biomassa produzida a partir da *Salvinia* sp. (com e sem tratamento químico) com potencial de biodegradação de óleo lubrificante usado;
- g) Investigar as condições limitantes na produção da biomassa de bactérias imobilizadas;
- h) Avaliar o potencial de biodegradação de óleo usado em embarcações em biorreator em batelada em escala de bacada com cepas bacterianas imobilizadas em biomassa da *Salvinia* sp.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 A INOVAÇÃO TECNOLÓGICA E SAÚDE PÚBLICA

Há 73 anos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu a saúde como “*um completo bem-estar físico, mental e social e, não apenas a ausência de doença ou de enfermidade*”. Desde então, a saúde passou a ser vista como uma questão transversal, não só do campo da saúde física, mas regida como um conjunto de circunstâncias inter-relacionadas como o social, econômico e ambiental (Rocha, 2017).

“*A saúde é um valor intemporal*” (Rocha, 2017). O bom estado de saúde do indivíduo é uma premissa para o trabalho e uma determinante do desenvolvimento sustentável. Os determinantes da saúde e os sociais precisam estar conectados, com o objetivo de definir ações eficazes para melhorar a saúde das populações. Para tal, a OMS tem como objetivo a aquisição do nível de saúde mais elevado possível de forma universal. A organização adota que a saúde é um direito fundamental do ser humano que deve ser garantido e defendido através da cooperação dos indivíduos e dos Estados (Rocha, 2017).

Na atualidade, iniciativas globais para a promoção da saúde e do bem-estar, temos a Agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável, que estabeleceu os Objetivos para o Desenvolvimento Sustentável ODS, reconhece que para a melhoria da saúde é necessário que haja justiça social, proteção ao ambiente e prosperidade coletiva, que são essas as bases do desenvolvimento sustentável. Para a Agenda continuam a ser prioridades a erradicação da pobreza, a promoção da saúde e educação, a garantia da segurança alimentar e a nutrição. No entanto ela também integra as dimensões do desenvolvimento sustentável econômica, social e ambiental, assim garantir o princípio subjacente de “*não deixar ninguém para trás*” (Rocha, 2017). Sendo o Brasil um dos signatários da Agenda 2030.

No que tange a políticas internas, no Brasil, a promulgação da Constituição Federal de 1988 destaca e fortalece no Brasil a indissolubilidade entre saúde e desenvolvimento. Ao afirmar que a saúde é um direito de todos e um dever do Estado. A partir desta premissa é possível verificar a saúde como um elemento estruturante do Estado de Bem-Estar, o que ressalta sua integração no processo de desenvolvimento. Conseqüentemente, a visão da saúde é ampliada e entendida como um direito de cidadania com acesso igualitário e universal (Costa *et al.*, 2013).

A promoção da saúde e da sustentabilidade é gerada pela Política Nacional da Promoção da Saúde (PNPS), que propicia desenvolvimento seguro, saudável e sustentável, a fim de minimizar a vulnerabilidade e o risco à saúde, frutos do atual sistema de consumo e produção.

A instituição de territórios saudáveis e sustentáveis são protegidos pela Atenção e Vigilância em Saúde através de redes de governança que mediam os diversos interesses que unem atores sociais, econômicos e agentes governamentais em prol do desenvolvimento sustentável do território (Machado *et al.*, 2020).

Um exemplo disso é a área de segurança química, que relaciona as situações de risco para saúde com interligação entre as dimensões global e local. Para tal existem inúmeras normas nacionais e internacionais que visam a regulamentar a área, tais como: o Acordo Nacional do Benzeno, a Convenção de Estocolmo sobre os Poluentes Orgânicos Persistentes (POPS), a Convenção de Basileia sobre o Controle de Movimentos Transfronteiriços de Resíduos Perigosos e seu Depósito, a Convenção de Roterdã sobre o Procedimento de Consentimento Prévio Informado (PIC) Aplicado a Certos Agrotóxicos e Substâncias Químicas Perigosas Objeto de Comércio Internacional, a Convenção de Minamata sobre Mercúrio, entre outras (Machado *et al.*, 2020).

Dessa forma, a análise dos riscos ou das contaminações ambientais em diferentes territórios, nos quais essas normas instituídas pelas convenções internacionais se aplicam ou não, se manifestam através das múltiplas expressões da vida humana, como as relações econômicas, sociais, políticas e culturais. Cabe destaque ao caso de vigilância do benzeno no Brasil, em que as operações de controle e gestão de situações de risco, envolvem diversos setores e organizam variados mecanismos de governança (Machado *et al.*, 2020).

Outro caráter do papel estratégico da saúde é também no processo de desenvolvimento, que promove a articulação dos setores de sistema produtivo, de base industrial (química, biotecnológica, mecânica, eletrônica e de materiais) e de serviços. A esse conceito foi designado como complexo econômico-industrial da saúde (CEIS), que visa através do incentivo à inovação, produção de insumos e produtos para a prestação de serviço a saúde, estender seus efeitos diretos ao setor econômico e social. Ou seja, trata de uma concepção de desenvolvimento que admite variáveis econômicas e inovativas como promotoras do bem-estar coletivo (Costa *et al.*, 2013).

Nesse sentido, o CEIS visa promover a inovação tecnológica orientada para a melhoria do padrão de vida da população, na qual o desenvolvimento de um país está correlacionado com as oportunidades disponibilizadas à sua população com o objetivo de fornecer bem-estar. Para tal se faz necessário o incentivo a novas tecnologias que promovam a responsabilidade social e a sustentabilidade (Costa *et al.*, 2013).

3.2 PETRÓLEO E ÓLEOS LUBRIFICANTES

O petróleo é uma riqueza natural não renovável que foi e ainda continua sendo responsável pela construção do modelo econômico e influenciador na estruturação da civilização moderna. Ele faz parte da vida do homem há mais de dois mil anos, sendo ele já utilizado pelas civilizações mais avançadas de seu tempo, como os fenícios, que o utilizavam nas embarcações e na construção civil. Os egípcios já faziam uso do óleo na forma de asfalto e betume, enquanto que gregos e romanos lançaram mão para fins bélicos (Fontana, 2016). Sendo até hoje uma importante fonte energética para todos os países (Xu *et al.* 2018).

O petróleo é constituído basicamente por uma mistura complexa de hidrocarbonetos, com uma quantidade significativa de isômeros e por outros compostos como asfaltenos, resinas, compostos sulfurados, oxigenados, nitrogenados e organometálicos (Mayer, 2016; Fontana, 2016).

Um dos compostos advindos do refino do petróleo é o óleo lubrificante, que mesmo após o processo de refino ainda possui as mesmas características do óleo cru, geralmente constituído por grupos aromáticos, parafínicos, naftênicos e uma pequena porcentagem de enxofre, oxigênio e nitrogênio (Silveira *et al.*, 2010).

Com o avanço da tecnologia as máquinas atualmente possuem alto desempenho, exigindo cada vez mais melhora na capacidade de lubrificação para que possam funcionar perfeitamente sob condições severas, o que demanda uma melhor laboração de óleos lubrificantes. Atualmente o óleo lubrificante possui aditivos em sua composição afim de melhorar sua cor, viscosidade, ponto de fluidez, capacidade antidesgaste, propriedade anticorrosiva e antioxidante (Silveira *et al.* 2010).

O óleo lubrificante passa então a funcionar como um solvente para aditivos, controlando o volume e propriedades da superfície, cujos aditivos possuem metais, tais como, bário, cálcio, zinco, chumbo, cromo, magnésio, antimônio, níquel, cádmio, mercúrio e molibdênio, que são assim adicionados ao óleo para melhorar seu desempenho (Silveira *et al.*, 2010).

3.3 O PETRÓLEO E DERIVADOS COMO CONTAMINANTES E SEUS IMPACTOS À SAÚDE

Contaminante é considerado qualquer substância que esteja em ambiente ao qual não pertença (Mesquita; Leite, 2017), sendo o petróleo e seus derivados considerados como tal, quando acidentalmente ou através do descarte de efluentes, advindos do processo de extração ou refino, transporte, processamento entre outras etapas de destino, são despejados nos corpos hídricos.

Os hidrocarbonetos podem ser divididos em quatro classes que relaciona sua complexidade e toxicidade. Os aromáticos apresentam alta toxicidade, sendo associados a efeitos crônicos e carcinogênicos e apresentam degradação lenta. Os alcanos, que possuem cadeias simples e ramificadas, apresentam baixa toxicidade e são mais fáceis de degradar. Os alcenos, encontrados em maior quantidade na gasolina, e os cicloalcanos possuem cadeias fechadas, saturadas e homogêneas, o nível de toxicidade varia com sua estrutura molecular e são resistentes à degradação (Mesquita; Leite, 2017). Os alcenos que dependendo de sua conformação podem pertencer aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, podem se acumular na cadeia alimentar, levando a efeitos mutagênicos e /ou carcinogênicos. Além disso, asfaltos são os compostos que possuem estruturas moleculares complexas e mais resistentes à biodegradação (Gurav *et al.*, 2017).

O óleo lubrificante, além de possivelmente ter em sua composição os grupos listados acima, também possui diversos aditivos em sua constituição, cujos danos à saúde humana incluem necrose e congestão hepática, degeneração gordurosa e dissociação de hepatócitos. A exposição à alta concentração de óleo pode causar doenças renais, danos à medula óssea e pode aumentar o risco de câncer (Bhurgri *et al.*, 2017).

Outro grupo de contaminantes de destaque, vindos do óleo lubrificante, são metais, como ferro, cobre, cádmio, níquel, zinco e chumbo, que, além de estarem na composição do óleo, suas concentrações tendem a aumentar com o uso do óleo. Isso ocorre devido ao desgaste das ligas metálicas que compõem as peças do motor (Silveira *et al.*, 2017). Os efeitos de carcinogenicidade, neurotoxicidade, nefrotoxicidade, danos aos sistemas endócrino, reprodutivo e respiratório são amplamente estudados e divulgados em estudos sobre risco à exposição desses metais (Miranda *et al.*, 2019; Moreira *et al.*, 2016).

3.4 POLUIÇÃO AQUÁTICA, EFLUENTES OLEOSOS E OS IMPACTOS AMBIENTAIS

O mar encontra-se no centro do comércio internacional, por ser via de comunicação, que favorece as trocas econômicas internacionais, e por abrigar infinitos recursos exploráveis, que só aumentam em função do progresso tecnológico (Heck, 2013).

O transporte marítimo é viabilizado por uma frota de 50.000 navios, sendo atualmente quase 8.000 navios petroleiros, navegando pelos mares e oceanos. A quantidade de petróleo transportada por essas embarcações é estimada em cerca de 1,9 bilhão de toneladas a cada ano (Heck, 2013).

Quando um navio-tanque descarrega o petróleo transportado, ele deve encher seus tanques com água do mar para garantir o equilíbrio da embarcação, em que é exigida a

separação dos compartimentos que contêm água do mar para estabilidade, petróleo ou outra carga. Entretanto, também é necessário que esses navios petroleiros e os demais façam a limpeza de seus tanques no porto, em instalações apropriadas. Desta forma, em números, a poluição intencional causada por petroleiros representa entre 0,7 e 1,5 milhão de toneladas de hidrocarbonetos, ou seja, 1 milhão de toneladas por ano em média. Além disso, calcula-se que outros 4,8 milhões de toneladas de hidrocarbonetos sejam descartados no mar por navios não petroleiros (Heck, 2013).

Além da poluição causada pelos navios e acidentes com vazamentos provenientes da extração do petróleo, outras atividades também são responsáveis pela contaminação ambiental com derivados do petróleo. A maior parte do óleo que chega aos oceanos vem de atividades como derramamentos acidentais durante a perfuração, produção e transporte, rompimentos de tanques, vazamentos em tubulações durante a limpeza de equipamentos, descarga durante o transporte de tanques de navios, óleo lubrificante descartado em águas pluviais, portos, terminais de petróleo, falhas no gasoduto e sistemas de esgoto (Santisti *et al.*, 2015; Foletto *et al.*, 2009).

No ano de 2018, a Petrobras produziu 2,83 milhões de barris de petróleo, gerando 120 mil toneladas de resíduos perigosos. Para essas operações, recolheu 182,3 milhões de m³ de água dos recursos hídricos, dos quais reutilizou 84 milhões de m³ de água e descartou 289,1 milhões de m³ de efluentes. Quanto aos vazamentos acidentais, foram 16 casos, totalizando 18,47 m³ de petróleo (Petrobras, 2019).

Os óleos derivados do petróleo podem entrar no meio ambiente através do vazamento de petroleiros, refinarias de petróleo, indústrias petroquímicas, processamento de metais, lubrificantes, lavagem de carros e operações por mecânicos de automóveis. Essas fontes difusas causam os principais problemas ambientais, especialmente na água (Bhurgri *et al.*, 2017). Os vazamentos de óleo são prejudiciais ao ecossistema aquático e causam forte impacto econômico, com ênfase àqueles que exploram os recursos marinhos como fonte de renda. São exemplos de setores que sofrem grandes prejuízos com esses vazamentos, as áreas costeiras, onde são exercidas atividades de recreação, turismo, portos, estaleiros, empresas que dependem de águas limpas para operação, bem como áreas de exploração e criação de recursos marinhos (Foletto *et al.*, 2009).

Um exemplo, em 2010, foi o vazamento de 5 mil barris de petróleo no Golfo do México (cerca de 800 mil litros), que produziu uma mancha de 175 mil Km², área equivalente a 11 vezes a cidade do Rio de Janeiro, o que causou um prejuízo de 600 milhões de dólares, além de

danos ambientais sem precedentes (Tran *et al.*, 2015). No ano seguinte, 2011, no Brasil ocorreu acidente similar na bacia de Campos. A petroleira americana Chevron, operadora do campo, foi a responsável pelo acidente, de onde vazaram 3.700 barris de óleo (cerca de 580 mil litros), produzindo uma mancha de 163 Km² (Almeida *et al.*, 2017). Em agosto de 2019, o Brasil sofreu o maior desastre ambiental já registrado no litoral brasileiro, em que o vazamento de petróleo contaminou 2 mil Km do litoral. Sua origem ainda é desconhecida, nenhum responsável foi reconhecido e devidamente responsabilizado (Pena *et al.*, 2020). Os danos ao meio ambiente causados por esses derramamentos são devidos às propriedades físicas e composição química do petróleo, como também pelas atividades de limpeza (Foletto *et al.*, 2009).

Outro ponto de destaque na área de poluição ambiental por derivados do petróleo são as águas de porão de navio, que se trata da mistura a água com fluidos oleosos, lubrificantes, fluidos de limpeza e outros resíduos que ficam condicionados na parte mais baixa do navio. Se descartadas sem tratamento essas águas também contribuem para a contaminação dos corpos hídricos (Babicz, 2015).

É indubitável que a exploração do petróleo e as atividades industriais continuam sendo essenciais para os avanços da sociedade moderna, e ainda continuarão. Dessa forma, é imprescindível o estudo contínuo de tecnologias, que ajudem na sustentabilidade dessas operações, mitigando, recuperando e preservando o meio ambiente.

3.5 TRATAMENTO PARA REMOÇÃO DE ÓLEOS E LEGISLAÇÃO

Existem três situações em que o uso de técnicas para remoção de óleos se faz necessário. A primeira são os derramamentos, em que, uma vez ocorrido o acidente, é preciso dispor de tecnologias rápidas e eficientes de contenção imediata e limpeza. A segunda é a remediação de áreas contaminadas e, por último, o tratamento de efluentes industriais.

O dano ambiental causado pelo derramamento de óleo pode ser reduzido através do desenvolvimento de estratégias eficazes de mitigação e limpeza. Limpezas mecânicas, biológicas e químicas são três dos métodos mais utilizados para minimizar e mitigar os efeitos do vazamento. A limpeza mecânica envolve o uso de equipamentos e máquinas, tais como barreiras, skimmers e materiais absorventes para facilitar a captura e o armazenamento de óleo derramado. O tratamento biológico envolve o uso de microrganismos para a biodegradação de componentes oleosos, enquanto que o método químico inclui a combustão dos óleos flutuantes e o uso de agentes dispersantes e solidificantes. As queimadas são frequentemente consideradas como último recurso, devido à grande produção de fuligem e estufas. No meio de todos os

procedimentos utilizados para a reparação de óleo, a extração mecânica de óleo por sorventes (adsorção) é considerada um dos métodos mais eficientes e econômicos (Tran *et al.*, 2015).

Até o momento, uma ampla gama de materiais, como adsorventes naturais, polímeros microporosos sintéticos e nanomateriais à base de carbono, algodão, fibra de algodão, casca de arroz, fibra de arroz, prolipropileno e perlita, foram utilizados e estudados para remoção de derramamentos de óleo (Foletto *et al.*, 2009; Tran *et al.*, 2015).

Os adsorventes são materiais que podem ser distribuídos na superfície da água e adsorvem o produto químico líquido, necessitando que o sorvente seja menos denso que a água. Os mecanismos de sorção para todos os produtos químicos líquidos são diferentes. Para adsorção de óleo, o sorvente deve ser altamente seletivo e possuir propriedades oleofílicas e hidrofóbicas para a separação de misturas óleo-água (Tran *et al.*, 2015).

Técnicas convencionais de remediação para as águas residuais oleosas foram usadas através de vários métodos, empregando diferentes tecnologias biológicas, químicas e físicas. Os procedimentos de remediação física incluem adsorção, flotação do ar, filtração por membrana, extração, entre outros, enquanto os métodos químicos incluem eletrocoagulação, oxidação úmida, oxidação eletrolítica e oxidação catalítica por ozônio. Embora os tratamentos físicos e químicos possam ser usados para limpar efluentes oleosos de forma rápida, são muito caros, podem gerar produtos tóxicos adicionais, como também produzir facilmente contaminação secundária (Kureel *et al.*, 2017; Tian *et al.*, 2018).

Para o tratamento de efluentes industriais métodos convencionais incluem a separação por gravidade, filtragem com membranas, coagulação química, osmose inversa, biorremediadores, processos biológicos, coalescedores e ultra filtração (Cunha, 2017; Kayvani *et al.*, 2016). Contudo, estes métodos possuem limitações e desvantagens para a remoção de óleo, visto que alguns possuem elevado gasto de energia e alto custo operacional e até mesmo incrustações. Tais fatores estimulam o desenvolvimento de processos e\ou novos materiais para o tratamento desses efluentes de forma eficiente e econômica (Hackbarth, 2014).

Uma técnica de tratamento de elevada eficiência e amplamente utilizada para a remoção de diversos contaminantes presentes em efluentes industriais é a adsorção. Sua principal vantagem é a transferência das espécies de contaminantes do efluente para uma fase sólida, reduzindo o volume de descarte ao mínimo. Ainda, trata-se de um processo de elevada flexibilidade, simplicidade, facilidade de operação e de insensibilidade aos compostos tóxicos. Como vantagens sobre outras operações de separação, a adsorção apresenta um baixo consumo

de energia, possibilita a separação de misturas e não necessita do uso de outros componentes para a ajudar a separação (Costa, 2016; Scheer, 2002).

A busca por tratamentos eficientes, de baixo custo, e provenientes de fontes renováveis que não necessitam de regeneração após o uso, fez com que estudos com biossorventes se tornassem promissores na remoção dos contaminantes oleosos (Costa, 2016).

No Brasil, o lançamento de efluentes no meio ambiente é regulamentado pelos órgãos ambientais e de saúde pública. No entanto, é necessário passar por algum tipo de tratamento a fim de se adequar aos requisitos para disposição final no ambiente a que se destina (Costa, 2016).

A resolução do CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011, dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, que estabelece o limite permitido para efluente oleoso de 20 mg L^{-1} (Brasil, 2011). Independentemente da forma como o óleo se apresenta, seu descarte somente é permitido após a remoção dos sólidos em suspensão (Costa, 2016).

A Resolução nº 393 do CONAMA, de 2007, estabelece que o descarte da água oleosa gerada na produção e/ou exploração do petróleo deve obedecer à concentração média mensal de óleos e graxas de até 29 mg L^{-1} , com valor máximo diário de 42 mg L^{-1} . A mesma resolução também sinaliza outros parâmetros de controle no futuro, como monitoramento semestral de frações orgânicas solúveis, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), Benzenos, Toluenos, Etilbenzenos e Xilenos (BTEX), hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) (Brasil, 2007).

3.6 ADSORÇÃO

A adsorção é um fenômeno físico-químico em que ocorre transferência de massa do meio líquido ou gasoso para a superfície sólida de um material (Leite *et al.*, 2017). Como a adsorção é uma técnica de separação muito simples e versátil, existe farta literatura sobre os diversos materiais capazes de remover hidrocarbonetos de soluções aquosas (Costa, 2016; Leite *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2017; Elanchezhayan *et al.* 2018; Huang; Yan, 2018; Franco *et al.*, 2014; Diraki *et al.*, 2018).

3.6.1 Modelos matemáticos e o estudo dos mecanismos de adsorção

No estudo dos materiais adsorventes, é importante entender os mecanismos de adsorção e de fatores internos e externos responsáveis por esse processo para que, a partir dessas informações, se possam manipular esses fatores a fim de otimizar a adsorção. Para tal, são

utilizados modelos matemáticos que definem como e de que forma são regidos esses mecanismos.

O equilíbrio de adsorção é considerado essencial para aquisição de informações relevantes no processo de separação por adsorção. Quando uma determinada quantidade de um sólido (adsorvente) entra em contato com certo volume de um líquido, contendo um soluto adsorvível (adsorvato), o processo de adsorção ocorre até que o equilíbrio seja alcançado (Nascimento *et al.*, 2015).

Uma isoterma de adsorção mostra a relação de equilíbrio entre a concentração do adsorbato na fase líquida e a sua concentração retida nas partículas adsorventes a temperatura constante. A isoterma é normalmente utilizada para avaliar a capacidade do material para adsorver uma molécula em particular. Existem diferentes modelos matemáticos que podem ser utilizados para se estimar os mecanismos de adsorção e para tal são necessários experimentos utilizando uma quantidade fixa de adsorvente com variação da concentração de adsorbato e assim medindo-se a sua concentração no equilíbrio (C_e) em uma determinada temperatura. A partir da variação destes parâmetros, pode-se construir uma curva utilizando estas medições e, assim, conhecer o modelo matemático que melhor se ajusta ao material em questão (Fontana, 2016).

3.6.1.1 Langmuir

O modelo de Langmuir, apresentado pela equação 1, é um dos modelos mais utilizados para representação dos processos de adsorção. Para isso, é preciso se considerar os pressupostos de que existe um número definido de sítios ativos de mesma energia, onde as moléculas adsorvidas não interagem umas com as outras, e a adsorção ocorre em monocamada, cujo sítio ativo somente interage com uma única molécula adsorvida (Nascimento *et al.*, 2015).

$$q = \frac{q_{max} \times K_L \times C_e}{1 + K_L \times C_e} \quad \text{Equação 1}$$

Onde, q : quantidade do soluto adsorvido por grama de adsorvente no equilíbrio (mg g^{-1}); q_{max} : capacidade máxima de adsorção (mg g^{-1}); K_L : constante de interação adsorvato com adsorvente (L mg^{-1}); C_e : concentração do adsorvato no equilíbrio (mg L^{-1}).

Por meio dos valores obtidos para as constantes, q_{max} e K_L , é possível calcular o valor R_L (fator de separação) pela equação 2, que corresponde ao grau de desenvolvimento do processo de adsorção.

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L \times q_{max}} \quad \text{Equação 2}$$

Obtido o valor de R_L , é possível inferir que, na maioria das situações de adsorção, o adsorvato tem preferência pela fase sólida do que a fase líquida. Então, a adsorção é dita

favorável, quando $0 < R_L < 1$. Caso o soluto tenha maior afinidade pela fase líquida ao invés da sólida, $R_L > 1$ indica adsorção não favorável. Da mesma forma, $R_L = 1$ corresponde a uma isoterma linear, ou seja, adsorção baixa (Nascimento et al., 2015).

3.6.1.2 Freundlich

O segundo modelo também comumente utilizado é o modelo de Freundlich. Este modelo empírico pode ser aplicado a sistemas não ideais, em superfícies heterogêneas, com adsorção em multicamadas. Considera vários tipos de sítios de adsorção, que, por consequência, possuem diferentes energias adsorptivas. A equação 3, representa o modelo matemático.

$$q_e = K_F \times C_e^{\frac{1}{n}} \quad \text{Equação 3}$$

Onde, q_e : quantidade de soluto adsorvido (mg g^{-1}); C_e : concentração de equilíbrio em solução (mg L^{-1}); $1/n$: constante relacionada à heterogeneidade da superfície; K_F : constante de capacidade de adsorção de Freundlich ($\text{mg}^{-1-(1/n)} (\text{g}^{-1}) \text{L}^{1/n}$).

A partir dos valores obtidos pela equação, é possível inferir que a adsorção é favorável no caso de $1 < n < 10$. Entretanto, quanto maior for o valor de n , mais forte a interação entre o adsorvato e o adsorvente, indicando adsorção irreversível (Nascimento *et al.*, 2015).

3.6.1.3 Estudo cinético

A cinética de adsorção é expressa como a taxa da quantidade de material adsorvido na solução em função do tempo. Pelo comportamento obtido, é possível verificar se a remoção das moléculas ocorre em direção ao interior da partícula do adsorvente, as quais deverão migrar até as regiões mais internas da partícula através dos macroporos (Nascimento *et al.*, 2015).

Pseudo-segunda ordem

O modelo de pseudo-segunda ordem, desenvolvido por Ho em 1998, considera que a adsorção ocorre pela interação do adsorvato com dois sítios ativos do adsorvente e baseia-se na capacidade de adsorção no equilíbrio (Nascimento *et al.*, 2015). Este modelo é representado pela equação 4.

$$\frac{t}{(q_e - q_t)} = \frac{1}{q_e^2} + k_2 \times t \quad \text{Equação 4}$$

Onde, k_2 : constante da taxa de adsorção de pseudo-segunda ordem ($\text{g mg} \cdot \text{min}^{-1}$) e q_t : quantidade de soluto adsorvido no tempo t (mg g^{-1})

Elovich

A equação de Elovich, desenvolvida em 1934, assume que a superfície do adsorvato possui sítios ativos de diferentes energias, e que o processo inverso (dessorção) e as interações

entre as próprias moléculas não podem afetar a cinética de adsorção (Fontana, 2016). A equação 5 representa o modelo.

$$q_t = \frac{1}{\beta} \times \ln(1 + \alpha \times \beta \times t) \quad \text{Equação 5}$$

Onde, α : taxa de adsorção inicial ($\text{mg g} \cdot \text{min}^{-1}$); β : constante de dessorção (mg g^{-1}); q_t : quantidade de soluto adsorvido no tempo t (mg g^{-1}); t : tempo.

Difusão intrapartícula

O modelo de difusão intrapartícula, desenvolvido por Weber e Morris, considera que o adsorvato entra nos poros do adsorvente. A equação deste modelo pressupõe que a isoterma obtida segue o modelo de Freundlich (Nascimento *et al.*, 2015). O modelo em questão é representado pela equação 6.

$$q_t = K_d \times t^{0,5} + C \quad \text{Equação 6}$$

Onde, q_t : quantidade de adsorvato adsorvida na fase sólida ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) em determinado tempo t (min); K_d : coeficiente de difusão intrapartícula ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-0,5}$); C : constante relacionada com a resistência à difusão ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$).

Vale destacar que este modelo não leva em consideração parâmetros importantes como a porosidade, raio da partícula e o comportamento cinético nos tempos iniciais do processo, nas proximidades de $t = 0$, uma vez que o tempo é $t^{1/2}$ na equação do modelo (Nascimento *et al.*, 2015).

3.6.2 Termodinâmica

A termodinâmica é a parte das ciências físicas, que examina os fluxos de energia entre sistema e vizinhança. No processo de adsorção, esses fluxos de energia acontecem para que forças atrativas atuem e assim ocorra o processo de interação adsorvente-adsorvato. Esse fluxo é medido pela energia de Gibbs, cuja variação da energia negativa ($\Delta G < 0$), a uma dada temperatura, indica que esse processo de adsorção é espontâneo. O oposto vale para valores positivos ($\Delta G > 0$), ou seja, processo não espontâneo (Cambium, 2009), sendo calculado pela equação 7.

$$\Delta G = \Delta H - T \times \Delta S \quad \text{Equação 7}$$

Onde, ΔH : variação de entalpia; ΔS : variação de entropia do processo de adsorção.

Os valores de entalpia auxiliam a compreender os mecanismos de adsorção, em que ΔH de até 25 KJ mol^{-1} pode ser indicativo de uma fisissorção, enquanto que a adsorção pode ser classificada como quimissorção para 40 KJ mol^{-1} (Cambium, 2009).

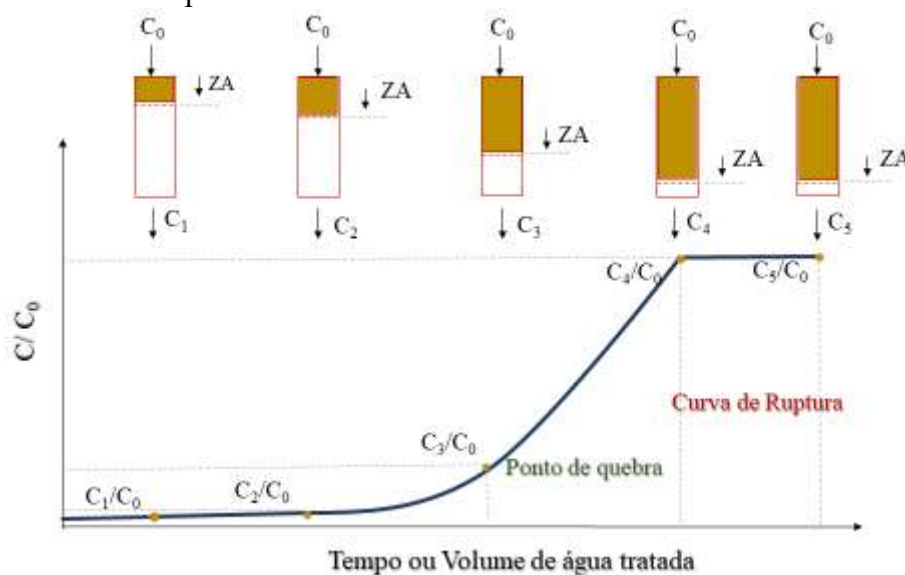
A variação de entropia negativa indica que nenhuma mudança significativa ocorre na estrutura interna do adsorvente, após o processo de adsorção, bem como uma diminuição na aleatoriedade na interface sólido-solução (Cambium, 2009).

3.6.3 Adsorção em coluna

O processo de adsorção pode ser realizado em diferentes sistemas, dentre os mais comuns estão os sistemas de adsorção em batelada e em coluna de leito fixo. Geralmente, a adsorção em batelada é mais utilizada em escala laboratorial, pois seu sistema operacional é simples, utiliza equipamentos de baixo custo, e, por se tratar de um sistema fechado, permite melhor controle de todo o processo. O sistema de adsorção em colunas de leito fixo é o mais utilizado em escala industrial, visto que permite melhor aproveitamento do material adsorvente, bem como um tratamento mais rápido e contínuo do efluente (Figueredo, 2014).

O estudo da eficiência de adsorção em coluna de leito fixo se baseia na construção da curva de ruptura, ponto em que ocorre a saturação do adsorvente, em que já reteve o máximo de adsorvato possível. A curva de ruptura é afetada por diversos fatores, dentre eles a vazão de alimentação, a concentração inicial de soluto, altura de empacotamento do adsorvente e natureza do equilíbrio do processo de adsorção. A Figura 1 representa o esquema de uma curva de saturação para uma coluna de adsorção em leito fixo, em que a região inicial até o ponto de saturação é denominada Zona de Transferência de Massa (ZTM), região onde efetivamente ocorre a transferência de massa do processo de adsorção, cuja concentração do adsorvato varia entre 5 e 95% referente à inicial (Ribas, 2016). Em outras palavras, é de acordo com a área desta região que se pode verificar a eficiência adsortiva da coluna.

Figura 1: Curva de ruptura em Coluna de leito fixo.



O tempo total do processo de adsorção em coluna de leito fixo é calculado pela Equação 8 e é definido como proporcional à capacidade máxima de adsorção da coluna.

$$t_t = \int_0^{t_\infty} \left(1 - \frac{C_s}{C_0}\right) dt \quad \text{Equação 8}$$

Onde, C_s : Concentração de saída do leito (mg L^{-1}); C_0 : Concentração inicial (mg L^{-1}).

O tempo útil do processo de adsorção em coluna de leito fixo é calculado pela Equação 9, e é definido como o instante percorrido até o ponto de ruptura.

$$t_r = \int_0^{t_q} \left(1 - \frac{C_q}{C_0}\right) dt \quad \text{Equação 9}$$

Onde, C_q : Concentração de saída do leito no ponto de quebra (mg L^{-1}); C_0 : Concentração inicial (mg L^{-1}); t_q : Tempo de quebra (min).

A altura útil representa a altura total de empacotamento da coluna com o material adsorvente, utilizado durante todo o processo de adsorção até o ponto de ruptura, dado pela equação 10.

$$H_u = \frac{t_u}{t_t} \times H_t \quad \text{Equação 10}$$

Onde, t_u : Tempo útil (min); t_t : Tempo total (min); H_t : Altura total de empacotamento da coluna (cm).

Por fim, o parâmetro mais importante, a capacidade de saturação da coluna, ou seja, a capacidade total de adsorção do adsorvente, calculada pela equação 11.

$$q_t = \frac{C_e \times \varpi}{m_{ads}} \times t_t \quad \text{Equação 11}$$

Onde, ϖ : Vazão volumétrica de alimentação (mL min^{-1}); m_{ads} : Massa do adsorvente (g).

Após os cálculos dos parâmetros da coluna, é feito o estudo do modelo de adsorção em coluna por Bohart-Adams (Equação 12). Esse modelo se baseia que a taxa de adsorção é proporcional à concentração das espécies e que o equilíbrio não é instantâneo. Geralmente ele é utilizado para descrever a parte inicial da curva de ruptura (Sonobe, 2018).

$$\ln \left(\frac{C_s}{C_e} \right) = K_{AB} \times C_e \times t - K_{AB} \times N_0 \times \frac{H_t}{\phi} \quad \text{Equação 12}$$

Onde, K_{AB} : constante cinética de Bohart-Adams ($\text{mL.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$); N_0 : capacidade de adsorção da biomassa (cm.g^{-1}).

O estudo do modelo foi realizado com o gráfico de $\ln (C_t/C_0)$ versus t que fornece o valor do coeficiente de correlação (R^2), constante cinética (K_{AB}) e concentração de saturação (N_0).

3.6.4 Caracterização físico-química do biossorvente

A caracterização físico-química é um conjunto de análises que permite fazer um mapeamento das principais características do material produzido, no caso deste estudo, o biossorvente. Com isso, é possível prever seu comportamento sob determinadas condições e manipular agentes externos como pH, temperatura, concentração do adsorbato e tempo de contato, a fim de melhorar os resultados objetivados. Assim, conhecer os principais grupamentos funcionais é de suma importância para entender as principais características estruturais do objeto de estudo.

O Ponto de Carga Zero (PCZ), é um dos primeiros testes feitos. Ele permite verificar o pH no qual a carga superficial total do adsorvente é nula. Uma vez obtido esse valor de pH é possível prever de acordo com o pH do meio, se a distribuição das cargas no material é positivamente carregada quando o pH da solução é menor que o pH_{PCZ} e se é negativamente carregada quando o pH da solução é mais alto que o pH_{PCZ} (Zago, 2010).

Os grupos funcionais superficiais de materiais adsorventes derivados do carbono dependem, essencialmente, do conteúdo de heteroátomos e, principalmente, do conteúdo de complexos superficiais de oxigênio, que determinam, além da carga da superfície, a sua hidrofobicidade. Dentre os heteroátomos presentes na superfície dos carvões, o mais importante destes elementos é o oxigênio, que pode estar ligado na forma de vários grupos funcionais, tais como ácidos carboxílicos, lactonas, fenóis, cetonas, quinonas, álcoois e éteres. Esses grupos tornam os materiais adsorventes, derivados do carbono, mais hidrofílicos e ácidos, diminuindo o valor do pH e do ponto de carga zero. As cetonas e os éteres podem ser os responsáveis pelas propriedades básicas da superfície desses materiais, juntamente com as pironas e os cromenos. Alguns complexos superficiais com oxigênio são aptos a atuar como sítios básicos, devido à existência de regiões ricas em elétrons π nas camadas grafênicas, que atuam como base de Lewis e recebem prótons em solução (Zago, 2010).

Métodos para determinação dos grupos funcionais superficiais incluem a espectroscopia de ressonância magnética nuclear, medidas eletrocinéticas, técnicas titulométricas, espectroscopia de infravermelho, espectroscopia fotoeletrônica de raios-X, entre outras (Boehm, 2002).

Outro fator decisivo no processo de adsorção é a porosidade, que permite a acessibilidade do adsorbato na superfície do material através de seus poros. Os poros são classificados em microporos ($\varnothing < 20 \text{ \AA}$), mesoporos ($20 < \varnothing < 500 \text{ \AA}$) e macroporos ($\varnothing > 500 \text{ \AA}$) (IUPAC, 1995).

Os microporos contribuem para adsorção de moléculas com dimensões pequenas, tais como gases e solventes comuns. Por outro lado, os mesoporos são responsáveis por adsorver moléculas grandes, como os corantes, enquanto que os macroporos servem como meio de transporte para as moléculas gasosas (Zago, 2010).

É possível determinar experimentalmente a área superficial dos sólidos porosos, pelo método criado por Brunauer, Emmett e Teller (BET). Esses autores desenvolveram uma equação, que relaciona os valores de referência com aqueles obtidos a partir das isotermas de adsorção. Desta forma, é possível obter a área específica do sólido, e também quantificar o volume total de poros do material (Zago, 2010).

3.7 SALVINIA SP.

A vegetação de macrófitas aquáticas de água doce tem um papel ecológico muito importante, pois são consideradas filtros d'água. No Brasil, devido ao clima apropriado, diversas espécies apresentam altos índices de reprodução, como no caso de Macaé e Rio das Ostras (RJ), que possuem uma produção expressiva dessas macrófitas (Esteves, 1998; Kissman, 1991; Carvalho, 2012).

Em 1995, Schineider aponta o uso da biomassa de macrófitas secas e trituradas como proposta à bioadsorção de metais. Dentre as vantagens observadas, pode-se destacar a facilidade de armazenamento, transporte e diminuição da produção de resíduos (Schineider, 1995). Apresentam um custo de produção bem mais baixo, quando comparado com outros materiais, como, por exemplo, carvão ativado (Muramoto, 1983).

A *Salvinia* sp. é um dos gêneros da família Salviniaceae, tendo a forma biológica de macrófita aquática flutuante livre. São plantas inferiores, pteridófitos com estrutura simplificada (Kissman, 1991). Sua forma pode ser observada na Figura 2.

Figura 2: Forma biológica da *Salvinia* sp.



Estudos sobre a adsorção tem buscado o uso de diferentes materiais para a remoção de óleo em diferentes materiais e finalidades. Dentre eles, as pesquisas relacionadas ao uso do carvão ativado produzido pela *Causuarina equisitifolia* para a remoção de hidrocarbonetos (Leite *et al.*, 2017), a membrana feita de quitosana celulase para separação de óleo emulsionado (Yu *et al.*, 2017), aerogel de grafeno na separação de emulsão óleo/água (Huang; Yan, 2018), nanosílica funcionalizada para remoção de óleo em água de perfuração de petróleo (Franco *et al.*, 2014) e nanoplaquetas de grafeno para remoção de óleo em emulsão (Diraki *et al.*, 2018).

O uso de materiais adsorventes alternativos, obtidos a partir de resíduos orgânicos, é considerado atualmente como método eficaz no processo de remoção de contaminantes em solução, de baixo custo e de baixa complexidade (Costa, 2016).

Estudos sobre remoção de óleo proveniente de derramamentos compararam a capacidade de adsorção, entre os óleos nujol e lubrificante SAE 15W/40, com adsorventes *Salvinia* sp., casca de amendoim, casca de arroz in natura, cinzas de casca de arroz, borra de café, sabugo de milho triturado, carvão ativado, serragem e turfa canadense (comercial). O adsorvente com o melhor resultado para ambos os óleos foi a macrófita *Salvinia* sp. (Foletto *et al.*, 2009).

3.8 BIODEGRADAÇÃO

Em paralelo às pesquisas sobre adsorção, a área de biodegradação de compostos orgânicos com diversos microrganismos vem crescendo e apontando para a viabilidade de utilização desses microrganismos no tratamento de efluentes derivados do petróleo, incluindo a recuperação de áreas degradadas (Lima *et al.*, 2019; Bhurgri *et al.*, 2017). Dentre os diversos mecanismos de biodegradação propostos atualmente, um dos mais eficientes é o uso de suporte de material mesoporoso para a fixação do microrganismo (Ke *et al.*, 2018). Para tal, de acordo com a literatura, bactérias potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos foram isoladas de sedimentos e/ou águas contaminadas (Lima *et al.*, 2019; Bhurgri *et al.*, 2017).

3.8.1 Estudos de biodegradação por bactérias

A biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo recebeu maior atenção nos últimos anos devido ao seu potencial de biodegradação apontar, não só para sua aplicação na biorremediação, como também na recuperação aprimorada de petróleo e correção de problemas em plantas onshore e offshore (Sakthipriya *et al.*, 2018).

O uso de bactérias para degradar poluentes ambientais tornou-se uma tecnologia promissora, devido ao seu baixo custo e sustentabilidade. O contínuo desenvolvimento e

aperfeiçoamento de tecnologias de biorremediação também forneceu informações importantes para remediar a poluição por hidrocarbonetos de petróleo, trazendo resultados que atraíram muita atenção para o aprimoramento e aplicação deste método (Al-Sayegh *et al.*, 2015; Gurav *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2018; Sakthipriya *et al.*, 2018; Tian *et al.*, 2018).

As bactérias produzem compostos diferentes, como biossurfactantes, enzimas, emulsificantes, dentre outros compostos, que ajudam na captação e biodegradação de óleos brutos (Al-Sayegh *et al.*, 2015).

Muitas espécies bacterianas advindas de diversos ambientes foram isoladas e utilizadas como biodegradadoras de hidrocarbonetos do petróleo. A biodegradação ou biotransformação do petróleo bruto é um processo de conversão das cadeias pesadas do petróleo bruto em compostos mais leves. Devido à sua versatilidade, as bactérias desempenham um papel importante durante essa biotransformação de hidrocarbonetos. Entretanto, não há espécies únicas que degradem completamente hidrocarbonetos complexos. Existem mais de 175 gêneros de bactérias relatados, que utilizam apenas hidrocarbonetos ou quando misturados com outros nutrientes, são capazes de se desenvolver. Dentre algumas delas, estão *Achromobacter* sp., *Actinobacteria* sp., *Arthrobacter aureescens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus cibi*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Coprothermobacter* sp., *Desulfitobacter* sp., *Desulfosporosinus* sp., *Gammaproteobacteria* sp., *Methanobacterium* sp., *Methanosaeta* sp., *Mycobacterium givum*, *Novosphingobium pentaromativorans*, *Ochrobactrum* sp., *Pantoea agglomerans*, *Planomicrobium alkanoclasticum*, *Pseudomona* sp., *Pseudomona aeruginosa*, *Rhodobacter* sp., *Rhodococcus erythropolis* e *Stenotrophomonas acidaminiphila* (Al-Sayegh *et al.*, 2015).

Estudos mostraram que as vias de degradação de uma variedade de hidrocarbonetos de petróleo (por exemplo, alifáticos e poliaromáticos) empregaram reações oxidantes. No entanto, essas vias diferem bastante devido às oxigenases específicas encontradas em diferentes espécies bacterianas. Por exemplo, algumas bactérias podem metabolizar alcanos específicos, enquanto que outras quebram frações aromáticas ou de resina de hidrocarbonetos. Esse fenômeno está relacionado à estrutura química dos componentes de hidrocarbonetos de petróleo, bactérias degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo e o tipo de componentes de petróleo que sofrem degradação (Xu *et al.*, 2018).

3.8.2 Consórcios bacterianos

Devido à estrutura química complexa dos hidrocarbonetos derivados do petróleo, ainda não foi relatado na literatura uma espécie de microrganismo capaz de sozinha degradar todas

as diversas cadeias de hidrocarbonetos. Por isso, é estudado o uso de consórcios de microrganismos, que possam, em ação conjunta de cooperação, promover a maior degradação possível das diferentes cadeias carbônicas advindas do petróleo e seus derivados (Santisti *et al.*, 2015; Gurav *et al.*, 2017; Tian *et al.*, 2018).

Recentemente, o uso de consórcios, ou seja, a combinação de várias espécies bacterianas, para biodegradação de petróleo tem apresentado maior eficiência de degradação na remediação de hidrocarbonetos, devido às atividades enzimáticas mais amplas (Tian *et al.*, 2018).

Um consórcio microbiano fornece ativos enzimáticos mais amplos e redes metabólicas disponíveis, que facilitam a biodegradação de compostos recalcitrantes, através do co-metabolismo e comensalismo por táxons distintos, como bactérias e fungos (Gurav *et al.*, 2017).

3.8.3 Teste de antagonismo

Estudos apontam que, durante o processo de crescimento, os microrganismos produzem enzimas e outros metabólitos, que podem inibir o crescimento concomitante de outra espécie de microrganismo diferente. Dessa forma, se faz necessário verificar as interações sinérgicas ou antagônicas dos diferentes microrganismos selecionados para formação do consórcio em questão (Dantas, 2016).

3.8.4 Biossurfactantes

Biossurfactantes são moléculas anfipáticas, que compreendem uma classe importante de compostos químicos. Os biossurfactantes são extraídos biologicamente da membrana celular da bactéria ou levedura (Dadrasnia; Ismail, 2015).

Nos últimos anos, tem havido um interesse crescente em biossurfactantes microbianos por várias razões, primeiramente devido à sua origem natural. Os biossurfactantes são geralmente relatados como substâncias relativamente não tóxicas e facilmente biodegradáveis (De Oliveira *et al.*, 2016).

As propriedades de vários biossurfactantes microbianos produzidos foram amplamente estudadas por possuírem estruturas únicas, e por sua ampla gama de aplicações em potencial, da biotecnologia à limpeza ambiental, sendo mais adequados do que os surfactantes químicos sintéticos e tradicionais. As propriedades dos biossurfactantes os tornam adequados para inúmeros usos industriais, envolvendo detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade de formação de espuma, capacidade de umedecimento, solubilização e dispersão de fases. Na indústria do petróleo, podem ser aplicados em recuperação aprimorada de óleo, derramamentos

de óleo de limpeza, limpeza de navios contaminados com óleo, controle de viscosidade, emulsificação de óleo e remoção de óleo bruto do lodo (Montagnoli *et al.*, 2015).

Os biossurfactantes auxiliam na promoção da biodegradação, pois reduzem a tensão interfacial e a superficial causada pelo contato de compostos polares com apolares, como também colaboram para redução da concentração crítica de micelas (Dadrasnia; Ismail, 2015).

Dois mecanismos podem ser empregados para melhorar a degradação de hidrocarbonetos com biossurfactantes. O primeiro melhora a transferência de contaminantes para a fase aquosa por interação com contaminantes solúveis, enquanto o segundo aumenta a disponibilidade e solubilidade de hidrocarbonetos, reduzindo a tensão superficial. Esses mecanismos permitem o contato da superfície celular bacteriana com substratos hidrofóbicos (Dadrasnia; Ismail, 2015). A estabilidade do biossurfactante, sob condições extremas de pH, temperatura e salinidade, permite sua aplicação em vários processos industriais (De Oliveira *et al.*, 2016).

3.8.5 Biorreatores

Estudos mostraram que, entre os procedimentos para biodegradação, os biorreatores tornaram-se uma alternativa promissora, por serem sistemas completamente fechados com controle das emissões. Apresentam ainda vantagens, como monitoramento efetivo do processo, maior controle de pH, temperatura, melhor incorporação de aditivos e redução do tempo de processo. Além disso, comparado às demais técnicas, os biorreatores ocupam menos espaço e possibilitam o controle e manipulação de todo o processo de degradação, tornando-se uma alternativa atrativa pelo seu custo-benefício (Kereel *et al.*, 2017; Banerjee; Ghoshal, 2016).

Vale ressaltar que estas técnicas são *ex situ*, portanto existe um custo para a remoção do material contaminado do ambiente para tratamento. No entanto, as que são possíveis de serem utilizadas diretamente no ambiente é importante primeiramente testá-las em ambiente controlado, como laboratório, para verificar não só a sua eficiência, mas também possíveis problemas que possam ocorrer. Por exemplo, a solubilidade e/ou biodisponibilidade de determinados compostos que podem representar um problema ainda maior de toxicidade no ambiente (Weber; Santos, 2013).

Os biorreatores podem ter diversos arranjos e configurações, onde os microrganismos podem crescer em suspensão ou imobilizados. O leito do reator pode ser fluidizado ou fixo, além de aeróbicos e anaeróbicos (Mayer, 2016).

Os biorreatores com biomassa imobilizada possuem a vantagem de não ser necessária uma etapa de separação da biomassa dos microrganismos da fase líquida ao final do processo (Mayer, 2016), como é o caso do biorreator proposto por esse estudo.

3.8.6 Imobilização

O uso de suportes capazes de imobilizar o microrganismo permite aumentar o tempo médio de contato do contaminante com a biomassa responsável pela degradação, no interior dos reatores, favorecendo o processo de forma contínua e estável, controlável e com elevada eficiência (Kureel *et al.*, 2017; Lin, *et al.*, 2014; Lin, *et al.*, 2015).

Diferentes suportes para microrganismos foram verificados, dentre eles carvão ativado, bambu, bagaço, contas de cinzas, cerâmica, esponja de polietileno, esferas de gel de polivinil álcool/alginate, espuma de poliuretano e partículas de zeolito, para diferentes contaminantes (Lin *et al.*, 2015; Ke *et al.*, 2018; Quan *et al.*, 2011; Zang *et al.*, 2010). A principal característica desses suportes é a estrutura porosa, que favorece a fixação de microrganismos. Esse atributo também foi verificado na biomassa da *Salvinia* sp., que, além de possuir estrutura porosa, tem grandes áreas de superfície específicas, alta capacidade de sorção, hidrofobicidade e flutuação, particularidades que a qualificam como material promissor para imobilização de bactérias (Wang *et al.*, 2014).

3.8.7 Biorreatores em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada

Como visto anteriormente, os biorreatores apresentam diversas vantagens no tratamento de efluentes, devido ao seu caráter prático e compacto. Os biorreatores em batelada sequenciais são mais adequados para indústrias, que trabalhem com padrões de lançamento de efluentes mais restritivos ou de difícil degradação, uma vez que esse tipo de reator permite maior controle de qualidade do efluente descartado por se tratar de sistema fechado (Pinheiro Filho, 2008).

Geralmente, as etapas de tratamento de efluentes com esse tipo de reator consistem de quatro etapas, entrada do efluente a ser tratado no reator, reação onde há a conversão dos produtos pelos microrganismos, sedimentação para separação da fase líquida da sólida e, por fim, a descarga do efluente tratado (Pinheiro Filho, 2008).

A vantagem do uso de um material para imobilizar a biomassa de microrganismos é a eliminação da etapa de sedimentação, reduzindo o tempo de tratamento do efluente e otimizando assim o processo. Outra vantagem da imobilização dos microrganismos está na maior concentração da biomassa, o que aumenta a atividade metabólica e acelera o processo de biodegradação dos compostos (Pinheiro Filho, 2008).

3.9 ECOTOXICIDADE

Ecossistemas contaminados e, seguidamente, submetidos à remediação não têm seu processo de recuperação findado, sendo necessário também promover ensaios toxicológicos para verificar sua ecotoxicidade. Da mesma forma, essa verificação é necessária para o descarte seguro de efluentes industriais nos corpos hídricos. Entretanto, a legislação brasileira vigente permite que sejam descartados os mais diversos compostos, mesmo em baixas concentrações. Dessa forma, testes ecotoxicológicos são importantes para medir o grau de toxicidade que os resíduos possam apresentar para os organismos de ambientes terrestres e aquáticos (Maciel, 2013).

Os testes ecotoxicológicos apontam para efeitos sobre os organismos de forma qualitativa e quantitativa, sendo uma ferramenta complementar às análises químicas, que confirmam a presença desses contaminantes. O cruzamento desses dados permite determinar se presença e/ou concentração desses contaminantes causam riscos para o ecossistema (Maciel, 2013).

Durante o processo de degradação de diversas substâncias, os produtos gerados podem tornar-se mais tóxicos ou mutagênicos do que o composto original, sendo necessário o monitoramento desses produtos. Os estudos ecotoxicológicos têm como objetivo analisar os efeitos que substâncias tóxicas podem causar ao ecossistema sob condições reais de poluição (Maciel, 2013).

Os ensaios laboratoriais sobre os efeitos tóxicos ao ecossistema são feitos por meio de testes a organismos específicos, selecionados de acordo com sua importância no grupo ecológico ao qual pertence, bem como sua disponibilidade. Em geral, utilizam-se plantas, sementes, crustáceos, microalgas, peixes, entre outros, para esses estudos (Maciel, 2013).

De acordo com a Norma Operacional Padrão (NOP) nº86/2018 publicada pelo INEA (2018), não é permitido o lançamento de efluentes com um número de unidades de toxicidade superior ao fator de diluição (FD) maior que oito a partir do segundo ano de publicação dessa norma, e para quatro anos após a publicação dessa norma não será permitido o lançamento do efluente que obtiver toxicidade superior ao FD maior que quatro.

REFERÊNCIAS

- MACHADO, J. M. H.; *et al.*, **Territórios saudáveis e sustentáveis: contribuição para saúde coletiva, desenvolvimento sustentável e governança territorial**. Comunicação em Ciências da Saúde, 28(02), 243-249, 2017.
- COSTA, L. S., *et al.*, A. **O complexo produtivo da saúde e sua articulação com o desenvolvimento socioeconômico nacional**. Revista do Serviço Público, 64(2), 177-199, 2013.
- ROCHA, E. **Saúde e objetivos de desenvolvimento sustentável**. Revista Factores de Risco, (45), 12-19, 2017.
- ALMEIDA, D. G., *et al.*, **Biodegradation of marine fuel MF-380 by microbial consortium isolated from seawater near the petrochemical Suape Port, Brazil**. International Biodeterioration & Biodegradation, 2017.
- AL-SAYEGH, A., *et al.*, **Microbial enhanced heavy crude oil recovery through biodegradation using bacterial isolates from an Omani oil field**. Microbial cell factories, 2015.
- API - American Petroleum Institute, Fate of spilled oil in marine waters: where does it GO? What does it do? How do dispersants affect it?. API Publication, n. 4691, USA. 1999.
- BABICZ, J. **Wärtsilä Encyclopedia of Ship Technology** Second Edition (Second Edi).Helsinki: Wärtsilä Corporation, 2015
- BANERJEE, A., & GHOSHAL, A. K. **Biodegradation of real petroleum wastewater by immobilized hyper phenol-tolerant strains of *Bacillus cereus* in a fluidized bed bioreactor**, 3 Biotech, 2016.
- BARROS, I., *et al.*, **Hidrocarbonetos no Material Particulado em Suspensão da Baía de Guanabara: Avaliação do Estado de Contaminação**. Geochimica Brasiliensis, 2018.
- BHURGRI, S., *et al.*, **Isolation of *Bacillus cereus* from botanical soil and subsequent biodegradation of waste engine oil**. International Journal of Environmental Science and Technology, 2018.
- BRASIL, Resolução CONAMA 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes e complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 2011.
- BRASIL, Resolução CONAMA nº 393 de 2007. Dispõe sobre o descarte contínuo de água de processo ou de produção em plataformas marítimas de petróleo e gás natural, e dá outras providências. Diário Oficial da União nº 152, 2007.
- CARVALHO, S. L. B. V., **Remoção de Ferro Por Adsorção Pela Macrófita Aquática *Eichhornia Crassipes***, Dissertação, Universidade Federal de Pernambuco, 2012.
- COSTA, P. D., **Tratamento de Águas Oleosas por Meio da Flotação por Ar Dissolvido (Fad) com o Uso de Biossurfactantes e Adsorção Utilizando Bioadsorventes**, Dissertação, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 2016.
- CUNHA R. S. S., **Preparação e caracterização de membranas compósitas tubulares aplicadas a separação de emulsão óleo/água**. Tese Universidade Federal de Campina Grande, 2017.
- DADRASNIA, A., & ISMAIL, S., **Biosurfactant production by *Bacillus salmalaya* for lubricating oil solubilization and biodegradation**. International journal of environmental research and public health, 2015.
- DANTAS, C. P., **Utilização de protótipo de biorreator de imersão temporária na biodegradação de petróleo em sedimento de manguezal**, Dissertação, Universidade Federal da Bahia, 2016.

- DE OLIVEIRA, D. W., *et al.*, **Aquatic toxicity and biodegradability of a surfactant produced by *Bacillus subtilis* ICA56.** *Journal of Environmental Science and Health*, Part A, 2017.
- DIRAKI, A, MACKAY, H, MCKAY, G, ABDALA, A, **Removal of oil from oil–water emulsions using thermally reduced graphene and graphene nanoplatelets.** *Chemical Engineering Research and Design*, 2018
- ELANCHEZHIAN, S. S., PRABHU, S. M., & MEENAKSHI, S., **Effective adsorption of oil droplets from oil-in-water emulsion using metal ions encapsulated biopolymers: Role of metal ions and their mechanism in oil removal.** *International journal of biological macromolecules*, 2018.
- ESTEVES, F. de A. **Fundamentos de Limnologia.** 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência. 602 p. 1998
- FERREIRA, R. M.; CAMPISTA, A. L. D. M.; STAPELFELDT, D. M. A. ; MOREIRA, M. F. R. **Emulsified oil separation by bioadsorption: A sustainable proposal.** *Environmental Technology*, v. 41, p. 1-13, 2020.
- FERREIRA, R. M.; CAMPISTA, A. L. D. ; TAKASE, I. ; STAPELFELDT, D. M. A. . **Studies of selective adsorption, desorption and reuse of chemically altered biomass produced from aquatic macrophytes for treatment of metal-containing wastewater.** *Water Science And Technology*, v. 75, p. 2083-2093, 2017.
- FERREIRA, R.M; DE SOUZA, M. D. P. ; TAKASE, I. ; DE ARAUJO STAPELFELDT, D. M. . **Pb(II) adsorption by biomass from chemically modified aquatic macrophytes, *Salvinia* sp. and *Pistia stratiotes*.** *Water Science and Technology*, v. 73, p. 2670-2679, 2016.
- FIGUEIREDO, R. D. S. **Estudo da adsorção de manganês em batelada e coluna de leito fixo utilizando zeólita sintética.** Dissertação, Universidade Federal de Ouro Preto, 2014.
- FOLETTI, E. L., DA ROS, S., CARLESSO, F., & JAHN, S. L., **Uso de biomassa como absorvente para a contenção de derramamento de óleo.** *Revista Acta Ambiental Catarinense*, 2009.
- FONTANA, J. F., **Modificação superficial de adsorventes para a adsorção de dibenzotiofeno presente em óleo lubrificante,** Tese, Universidade Federal de Santa Catarina, 2016
- FRANCO, C. A., *et al.*, **Water remediation based on oil adsorption using nanosilicates functionalized with a petroleum vacuum residue.** *Adsorption Science & Technology*, 2014.
- GURAV, R., *et al.*, **Degradation of n-alkanes and PAHs from the heavy crude oil using salt-tolerant bacterial consortia and analysis of their catabolic genes.** *Environmental Science and Pollution Research*, 2017.
- HACKBARTH, F V, *et al.*, **Benzene, toluene and o-xylene (BTX) removal from aqueous solutions through adsorptive processes.** Springer Science Business Media New York, 2014.
- HECK, M., **A ação normativa da Organização Marítima Internacional e seus instrumentos em face da poluição marítima por óleo causada por navios.** *Revista de Direito Internacional*, 2013.
- HU, X.; BEKASSY-MOLNAR, E.; VATAI, G. **Study of ultrafiltration behaviour of emulsified metalworking fluids.** *Desalination*, 2002.
- HUANG, J., & YAN, Z., **Adsorption mechanism of oil by resilient graphene aerogels from oil–water emulsion.** *Langmuir*, 2018.
- INEA- **Norma Operacional Padrão nº86** publicada em 14 de dezembro de 2018, dispõe sobre Critérios e Padrões para Controle da Ecotoxicidade Aguda em Efluentes Líquidos. Disponível em < <http://www.inea.rj.gov.br/wp-content/uploads/2019/01/NOP-INEA-08.pdf>> Acesso em 24jun2021
- KAYVANI FARD, A.; *et al.*, **Enhancing oil removal from water using ferric oxide nanoparticles doped carbon nanotubes adsorbents.** *Chemical Engineering Journal*, 2016.

- KE, Q., *et al.*, **Sustainable biodegradation of phenol by immobilized *Bacillus* sp. SAS19 with porous carbonaceous gels as carriers.** Journal of environmental management, 2018.
- KISSMANN, K. G. **Plantas infestante e nocivas**, Tomo I São Paulo: BASF Brasileira S.A. p608, 1991
- KUREEL, M.K., *et al.*, **Biodegradation and kinetic study of benzene in bioreactor packed with PUF and alginate beads and immobilized with *Bacillus* sp.-M3**, Bioresource Technology, 2017.
- LEITE, N. S., *et al.*, **Remoção de hidrocarbonetos de efluentes aquosos utilizando carvão ativado de cones de Casuarina equisetifolia.** Scientia Plena, 2017.
- LIMA, S. D., *et al.*, **Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from gas station leaking-contaminated groundwater in the Southern Amazon, Brazil.** Brazilian Journal of Biology, 2019.
- LIN, J, GAN, L, CHEN, Z., NAIDU, R, **Biodegradation of tetradecane using *Acinetobacter venetianus* immobilized on bagasse**, Biochemical Engineering Journal, 2015
- LIN, M., LIU, Y., CHEN, W., WANG, H., & HU, X., **Use of bacteria-immobilized cotton fibers to absorb and degrade crude oil.** International Biodeterioration & Biodegradation, 2014.
- LOPES, C. F.; MILANELLI, J. C. C.; POFFO, I. R. F. **Ambientes costeiros contaminados por óleo: procedimentos de limpeza – manual de orientação.** São Paulo: Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2007.
- MACIEL, J. M. **Estudo comparativo da degradação de óleo diesel por culturas isoladas e em consórcio**, Dissertação, Universidade Federal de Pernambuco, 2013.
- MAYER, D. A., **Estudo cinético da biodegradação dos compostos BTX monocomponente em um reator de leito fixo com biomassa imobilizada**, dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.
- MENICONI, M. D. F. G. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no meio ambiente: diferenciação de fontes em sedimentos e metabólitos em bile de peixes**, Tese, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.
- MESQUITA, M. V., & DA SILVA LEITE, M., **Processos de remediação para hidrocarbonetos e etanol resultantes da contaminação dos postos de combustíveis.** Revista Engenharia e Tecnologia Aplicada-UNG-Ser, 2017
- MIRANDA, A. L., *et al.* **Percepção de risco: estudo com trabalhadores de um estaleiro expostos a metais.** Cadernos Saúde Coletiva, 2019.
- MONTAGNOLLI, R. N., LOPES, P. R. M., & BIDOIA, E. D., **Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products.** Environmental monitoring and assessment, 2015.
- MOREIRA F. R, FERREIRA A. P, ARAÚJO U. C., **Determinação dos níveis de exposição de metais em trabalhadores da construção naval: impactos e desafios.** Rev Bras Med Trab. 2016.
- MURAMOTO, S.; OKI, Y. **Removal of some heavy metals from polluted water by water hyacinth (*Eichhornia crassipes*).** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1983.
- OLIVEIRA, N. M. ; FERREIRA, R. M. ; BARBOSA, S. M. ; STAPELFELDT, D. M. A. . **Crystal Violet Dye Adsorption By A Biosorbent Mixture Obtained From *Salvinia biloba* and *Pistia stratiotes*.** Journal of Basic and Applied Research International, v. 13, p. 222-231, 2015.
- OLIVEIRA, J. C. G.; FERREIRA, R. M. ; STAPELFELDT, D. M. A. **Use of *Salvinia* sp. on the Adsorption of Hexavalent Chromium.** Environmental Science and Pollution Research, v. 26, p. 1-9, 2019.

- PENA, P. G. L., *et al.*, **Derramamento de óleo bruto na costa brasileira em 2019: emergência em saúde pública em questão**. Cad. Saúde Pública; v. 36(2) p.1-5, 2020.
- PETROBRAS, **Relatório anual de sustentabilidade do ano de 2018, publicado em 27 de fevereiro de 2019**, disponível em <<https://www.investidorpetrobras.com.br/resultados-e-comunicados/relatorios-anuais/>> acesso em 05 de maio de 2020.
- PINHEIRO FILHO, J. D. **Degradação de alquilbenzeno linear sulfonado em reator anaeróbio operado em bateladas seqüenciais com biomassa imobilizada em carvão vegetal**, Tese, Universidade de São Paulo, 2008.
- QUAN, L.M. *et.al.* **Reject water treatment by improvement of whole cell Anammox entrapment using polyvinyl alcohol/alginate gel**. Biodegradation, 2011.
- RESENDE, L. L., *et al.*, **Nível de contaminação por hidrocarbonetos na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro-RJ**. Revista Brasileira de Iniciação Científica, 2016.
- RIBAS, M. C. **Remoção de corantes têxteis pelo processo de adsorção utilizando carvão ativado produzido a partir de subprodutos agroindustriais: estudos em batelada e coluna de leito fixo**, Tese, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.
- SAKTHIPRIYA, N., DOBLE, M., & SANGWAI, J. S., **Kinetic and thermodynamic behavior of the biodegradation of waxy crude oil using *Bacillus subtilis***. Journal of Petroleum Science and Engineering, 2018.
- SANTISI, S., *et al.* **Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium**. Brazilian Journal of Microbiology, 2015.
- SCHEER, A. P. **Desenvolvimento de um sistema para simulação e otimização do processo de adsorção para avaliação da separação de misturas líquidas**, Tese, Faculdade de Engenharia Química, 2002.
- SCHNEIDER, I. A. H., **Bissorção de metais pesados com a biomassa de macrófitos aquáticos**. Tese, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.
- SILVEIRA, E. L. C., *et al.*, **Determinação de metais em óleos lubrificantes, provenientes de motores de ônibus urbano, utilizando a FAAS**. Química Nova, 2010.
- SOUZA, R. S. *et al.* **Adsorção de óleo diesel em sistema de leito diferencial com biomassa bagaço de cana-de-açúcar**. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, 2011.
- TIAN, X., *et al.*, **Isolation, screening, and crude oil degradation characteristics of hydrocarbons-degrading bacteria for treatment of oily wastewater**. Water Science and Technology, 2018.
- TRAN, D. N., KABIRI, S., SIM, T. R., & LOSIC, D., **Selective adsorption of oil–water mixtures using polydimethylsiloxane (PDMS)–graphene sponges**. Environmental Science: Water Research & Technology, 2015.
- WANG, X., *et al.*, **Adsorption–synergic biodegradation of diesel oil in synthetic seawater by acclimated strains immobilized on multifunctional materials**. Marine pollution bulletin, 2015.
- WEBER, B.D.; SANTOS, A.A. **Utilização da Biorremediação como Ferramenta para o controle da Degradação Ambiental Causada pelo Petróleo e seus Derivados**. Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia 10(1): 1-13, 2013.
- XU, X., *et al.*, **Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: a perspective analysis**. Frontiers in microbiology, 2018.
- YU, H., *et al.*, **Separation of oil-water emulsion and adsorption of Cu (II) on a chitosan-cellulose acetate-TiO₂ based membrane**. Chemosphere, 2019.
- ZHANG, L. *et. al.* **Treatment capability of an up-flow ANAMMOX column reactor using polyethylene sponge strips as biomass carrier**. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010.

4 BIOMASSA DE *SALVÍNIA* SP. COMO MATERIAL ADSORVENTE DE ÓLEOS LUBRIFICANTES

4.1 INTRODUÇÃO

Óleos lubrificantes por serem muito utilizados comercialmente e devido aos impactos ambientais causados por águas oleosas não tratadas quando descartadas indevidamente nos corpos hídricos, como discutido anteriormente. Este trabalho se dedica ao estudo do tratamento de emulsões oleosas a partir de óleos lubrificante de motor de carro e óleo lubrificante usado de navio.

A escolha do óleo de Carro se deu por conta de sua composição, maior viscosidade e por ser amplamente comercializado no Brasil. O óleo de Navio foi gentilmente cedido pela Marinha do Brasil e é utilizado em sua frota nacional. O uso de ambos semparadamente se deu com o intuito de conferir maior versatilidade ao tratamento proposto por este estudo.

A adsorção, como referida anteriormente, é uma das técnicas mais utilizadas atualmente devido a sua grande eficiência no tratamento de efluentes e de água residual. Ela consegue remover tanto contaminantes em alta concentração como em concentrações traço, e ainda possui versátil aplicabilidade para os mais variados contaminantes (Nascimento *et al.*, 2014).

Para que a adsorção ocorra de modo eficiente os mecanismos estérico, de equilíbrio e cinético precisam ser avaliados (Nascimento *et al.*, 2014). No mecanismo estérico, os poros do material são analisados a fim de verificar se seu tamanho é adequado às dimensões da molécula de adsorbato, para que seja possível a adsorção. No equilíbrio é observado a habilidade de diferentes adsorventes interagirem com várias espécies de contaminantes, bem como sua seletividade. E por fim, o mecanismo termocinético que determina a rapidez com que uma alteração térmica no sistema afeta a interação entre adsorvente adsorbato (DO, 1998).

Entender como funcionam os mecanismos de adsorção e a estrutura superficial do adsorvente é essencial para otimizar o processo de remoção do contaminante de interesse. Elementos como grupos químicos superficiais, distribuição de poros, principais elementos constituintes e estrutura superficial, trazem informações importantes para entender como o processo de adsorção ocorre.

A aplicação de diferentes condições como variação de contração, uso de diferentes contaminantes, variação de pH e temperatura, foram experimentados para que fosse possível melhor compreender e otimizar o processo de remoção de óleo da água através da adsorção. Esses elementos são abordados neste capítulo, visando atingir os objetivos específicos deste trabalho:

- a) Avaliar a capacidade de remoção por adsorção com biomassa produzida a partir da macrófita *Salvinia* sp com tratamento químico e sem tratamento químico (*in natura*) em emulsões de água e óleo lubrificante;
- b) Estudar a interação entre os compostos orgânicos e esses bioSORVENTES;
- c) Avaliar o potencial de remoção de óleo usado de motor de navio por colunas de adsorção formadas por biomassa produzida a partir da da macrófita *Salvinia* sp. com e sem modificações químicas;

4.2 METODOLOGIA

Os reagentes utilizados neste capítulo seguem no APÊNDICE A em uma lista com suas especificações.

4.2.1 Coleta e Conservação das Amostras

A macrófita *Salvinia* sp. foi coletada na Lagoa do Iriri, em Rio das Ostras- RJ. Após coleta, o procedimento realizado foi lavar em água corrente, e em seguida com água destilada, a fim de retirar os sais e impurezas ainda presentes em sua superfície, provenientes da lagoa. Secas ao sol e em seguida secas em estufa a 60°C por 8 horas. Por fim, foram trituradas e armazenadas em recipientes de plástico. A biomassa produzida foi identificada como *Salvinia in natura* (SS).

4.2.2 Preparo dos bioSORVENTES quimicamente modificados

Foram colocados 20 g de SS com 500 mL de solução H₂SO₄ 20% (m/m) e 500 mL álcool etílico PA, em agitação por 3 horas. Após esse período foi feita a filtração e lavagem com água destilada até que o pH da água de enxágue fosse neutro. Em seguida a biomassa com 900 mL de NaOH 1,0 mol L⁻¹ foi colocada em agitação por 3 horas, após esse período foi repetido o processo de filtração e lavagem com água destilada até pH neutro. Subsequentemente foi feita lavagem com etanol e acetona e, finalmente, a secagem na estufa a 60°C por duas horas. O bioSORVENTE produzido foi denominado **SOH**.

4.2.3 Caracterização Físico-química dos bioSORVENTES

4.2.3.1 Determinação dos valores de pH dos bioSORVENTES

Foi adicionado a 10 mL de água destilada 100 mg de bioSORVENTE em seguida aquecida a mistura até ebulição por cinco minutos. Após resfriamento, foi adicionado mais 10 mL de água destilada e medido o pH da mistura utilizando pHmetro previamente calibrado modelo

JK-PHM-005 com precisão de $\pm 0,01$ pH (Cambuim, 2009; JIS 1992). Todos os testes foram feitos em triplicata.

4.2.3.2 Ponto de Carga Zero (PCZ)

Foi adicionado 50 mg de bioissorvente em 50mL de água destilada com 12 diferentes condições de pH inicial, (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11), utilizando HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para ajuste dos diferentes pHs. Após 24 horas em repouso o pH final das soluções foi medido (Regabulto e Robles, 2004). Todos os testes foram feitos em triplicata.

4.2.3.3 Caracterização dos bioissorventes por Microscopia Eletrônica de Varredura e Sistema de Energia Dispersiva

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), foi feita em aparelho modelo JEOL JSM6390 e uma tensão de 20 KV. Colocou-se as amostras sobre a superfície do suporte de alumínio com fita de carbono dupla face. Em seguida cobriu-se as amostras com uma fina camada de ouro em um metalizador marca EMITECH, modelo JEOL JSM6390

A análise de Sistema de Energia Dispersiva (SED), para verificação dos principais elementos constituintes das amostras foi feita em aparelho modelo JEOL JSM6390 e uma tensão de 20 KV. Colocou-se as amostras sobre a superfície do suporte de alumínio com fita de carbono dupla face. Em seguida cobriu-se as amostras com uma fina camada de carbono em um metalizador modelo JEOL JSM6390, marca EMITECH.

4.2.3.4 Determinação dos grupos funcionais – método Boehm

A determinação dos grupos funcionais do bioissorvente foi realizada pela técnica de Boehm (Boehm, 1994). Ela consiste na titulação de neutralização dos grupos funcionais a partir das soluções padronizadas de HCl (0,1N), NaOH (0,1N), Na_2CO_3 (0,1N) e NaHCO_3 (0,1N) (Boehm 1994; Boehm 2002).

Deixou-se 100 mg do bioissorvente sob agitação com 50 mL por 24 horas com cada uma das soluções padronizadas, em becher vedado. Após esse período filtrou-se a solução e retirou-se alíquotas de 10 mL para titulação. Os testes foram feitos em triplicata.

Para a biomassa em agitação com a solução de HCl adicionou-se 15 mL de NaOH à alíquota de 10 mL previamente filtrada, em seguida fez-se a titulação de retorno com indicador fenolftaleína. O mesmo procedimento foi feito para a biomassa em agitação com NaOH, porém adicionando a solução de HCl.

Para a alíquota com solução de NaHCO_3 adicionou-se 20mL de HCl e aqueceu-se até ebulição, após resfriamento da solução titulou-se com NaOH usando indicador fenolftaleína.

E para a alíquota de Na₂CO₃ adicionou-se 15 mL de HCl, aqueceu-se até ebulição, após resfriamento da solução, titulou-se com NaOH.

O cálculo para quantificação do total de grupos básicos por grama de adsorvente em mEq.g⁻¹ foi determinado pela diferença do volume de HCl adicionado pelo branco na titulação, como mostra a equação 13 (Zago, 2010). O mesmo foi realizado para os grupos fenólicos, carboxílicos e lactânicos com Na₂CO₃, NaHCO₃ e NaOH respectivamente.

$$mEq = \frac{V_t \times N_a \times (V_{am} - V_a)}{V_{al}} \quad \text{Equação 13}$$

Onde, V_t = volume total da solução de Na₂CO₃, NaOH, HCl e NaHCO₃; N_a = concentração da solução de HCl (Eqg L⁻¹); V_a = volume de solução padrão HCl gasto nas titulações do volume do branco e V_{am} = volume da amostra (mL); e V_{al} = volume da alíquota do filtrado (mL);

4.2.3.5 Caracterização das biomassas por Espectrometria no Infravermelho (IV)

A espectroscopia de infravermelho foi feita em equipamento do tipo Infrared Spectrophotometer, RAffimty-1, Shimadzu, os espectros de absorção na região do infravermelho são obtidos na região de 400 a 4000 cm⁻¹.

Para esta análise, as biomassas foram trituradas até que se obtivessem partículas homogêneas e com menor diâmetro possível, em seguida, foram liofilizadas e guardadas em dessecador à vácuo. Preparou-se pastilhas da mistura de KBr e o biossorvente em proporção 1:100.

2.3.6 Análise da área superficial e porosidade

A determinação das medidas de área superficial específica, o volume de microporo e o diâmetro médio de poro foram feitos usando-se o analisador de área superficial e porosidade ASAP 2420 Micromeritics. O método empregado foi o de adsorção de nitrogênio gasoso de alta pureza, utilizando-se banho de nitrogênio líquido em condições criogênicas (T = -196°C).

4.2.4 Teste de liberação de substâncias em solução aquosa

Para verificar o comportamento do biossorvente, em solução aquosa, após a modificação química em relação a liberação de substâncias, tais como lignina, celulose, fósforo entre outros, que possa ocorrer durante o processo de adsorção, o seguinte teste foi realizado: 50 mL de água destilada foram deixados em contato com 50 mg de SOH em agitação por 15 minutos, após a agitação a mistura foi filtrada e feita a leitura do filtrado no espectrofotômetro absorção UV-vis modelo 2600 SHIMADZU, realizando uma varredura de 800 a 200 nm. O mesmo procedimento foi realizado para a SS (Oliveira *et. al.*, 2019).

4.2.5 Preparo das emulsões

Para os testes de adsorção foram preparados quatro tipos de emulsão com óleo de motor de carro Lubrax 25W50 e óleo usado de motor de navio Mobil delvac SAE 40, uma emulsão em água destilada e outra em água destilada e NaCl a 5 g L^{-1} (água marinha sintética). Todas em pH=2, a fim de estabilizar as emulsões mais concentradas. Agitou-se a solução por 20 minutos a uma rotação de aproximadamente 7000 rpm para a formação da emulsão (Curbelo, 2002).

4.2.6 Extração de óleo por clorofórmio

A extração de óleos em água por clorofórmio foi um método desenvolvido por Curbelo (2002), que consiste em adicionar em uma alíquota de 5 mL de amostra igual volume de clorofórmio (5 mL), deixar em agitação por 5 minutos e retirar com auxílio de pipeta de Pauster, a fase solvente (óleo + clorofórmio). Em seguida fazer a leitura no espectrofotômetro em 262 nm. De acordo com o autor, a relação de 1:1 de solvente/volume da amostra numa única etapa de extração e agitação de 5 minutos é suficiente para extrair o óleo da amostra.

Testes de extração com variação do tempo de contato do clorofórmio com as amostras foram feitos, variando o tempo de 5 a 30 minutos para verificar a completa extração.

4.2.7 Quantificação dos óleos presentes na emulsão

Após a extração do óleo foi feita a quantificação das emulsões pelo método clorofórmio que consistiu em quantificar o teor de óleo existente na amostra por meio de absorvância utilizando o Espectrofotômetro de UV – Visível modelo UV-2600 SHIMADZU.

Preparou-se uma curva de calibração com soluções de óleo lubrificante em clorofórmio em concentrações que variaram de 0 a 120 mg L^{-1} , com comprimento de onda de 245 nm para o óleo de motor de carro e 239 nm para o óleo usado de motor de navio. A absorvância nessas faixas de comprimentos de onda é usualmente utilizada para quantificar a concentração de óleos em emulsões em amostras de água e em águas de produção (APHA 1985; Henderson *et al.*, 1999). Este procedimento teve como finalidade padronizar a determinação concentração das emulsões.

4.2.8 Testes de adsorção em batelada

Os testes de adsorção que seguem foram feitos para a biomassa sem tratamento químico (SS) e para modificada quimicamente (SOH) todos em triplicata. Para todos os testes também foram feitos brancos em duplicata, em que o mesmo procedimento foi realizado, porém sem biomassa, usando a média dos valores dos brancos para os cálculos de quantificação.

4.2.8.1 Efeito da concentração inicial de óleo e Isotermas de adsorção

Pesou-se 50 mg de cada bioissorvente e deixou em agitação por 15 minutos, em temperatura ambiente, com 50 mL da emulsão cujas concentrações de óleo variaram de 50 a 2000 mg L⁻¹. Após o tempo de contato retirou-se alíquotas de 5 mL e fez-se a extração pelo método clorofórmio para análise da concentração utilizando o Espectrofotômetro de UV – Visível, como descrito no item 2.7. O mesmo procedimento descrito acima foi feito para as emulsões, que este trabalho denominou como branco, feitos em duplicata.

Para obtenção da relação miligrama de óleo adsorvida por grama de biomassa foi feito cálculo de acordo com a Equação 14. Os gráficos das isotermas de adsorção para cada bioissorvente foram obtidos através do gráfico $q_e \times C_e$.

$$q_e = (V_0 \times C_0 - V_e \times C_e) / m \quad \text{Equação 14}$$

Onde, q_e = massa de óleo adsorvidas por grama de adsorvente, mg g⁻¹; V_0 = Volume inicial da emulsão (branco), L; C_0 = Concentração inicial da emulsão, mg L⁻¹; V_e = Volume final da emulsão, L; C_e = Concentração final da emulsão, mg L⁻¹; m = massa de biomassa, g.

Os estudos das isotermas foram feitos com a aplicação dos modelos de Langmuir e Freundlich na forma não linear, utilizando o método Solver no Excel para obtenção dos valores das constantes específicas dos modelos.

4.2.8.2 Tempo de contato e variação da temperatura

Pesou-se 150 mg de cada bioissorvente e colocou-se em agitação com 150 mL de emulsão com concentração de 100 mg L⁻¹ de óleo, retirando alíquotas de 3mL nos tempos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 minutos. Em seguida, para cada alíquota, fez-se a extração com clorofórmio para posterior análise em UV-Visível. O teste foi realizado nas seguintes temperaturas 10, 25 e 35°C, mantidas constantes durante todo o processo em equipamento de banho termostaticado modelo TE-184 Tecnal. O total de alíquotas retiradas de cada sistema foi inferior a 20% do volume total para que não houvesse diferença significativa de concentração do óleo.

O valor da capacidade de adsorção em mg de óleo por g de biomassa (q_e) foi feito através da Equação 14 para cada alíquota retirada. Com os resultados obtidos construiu-se o gráfico q_e x tempo.

Os estudos dos modelos cinéticos foram feitos pela aplicação na forma não linear, utilizando o método Solver no Excel para obtenção dos valores das constantes referentes aos modelos cinéticos de pseudo-segunda ordem, Elovich e difusão intrapartícula.

4.2.8.3 Efeito da variação do pH

Pesou-se 50 mg do bioissorvente e deixou em agitação por 15 minutos com 50 mL de emulsão com concentração de 200 mg L⁻¹ de óleo cujos pHs foram ajustados para 2, 4, 6 e 8 com NaOH (0,1 mol L⁻¹) e HCl (0,1 mol L⁻¹). Após o tempo de contato fez-se a extração com clorofórmio para posterior análise em UV-Visível.

O valor da capacidade de adsorção em mg de óleo por g de biomassa (q_e) foi feito através da Equação 14 para cada alíquota retirada. Com os resultados obtidos construiu-se o gráfico q_e x pH.

4.2.8.4 Teste de dessorção

A biomassa (50 mg) foi deixada em contato com 50 mL de emulsão com concentração de 200 mg L⁻¹ em pH 2 por 15 min, após esse período foi retirada uma alíquota de 5 mL para análise da concentração, em seguida foi adicionado ao sistema 5 mL de HNO₃ 10% (v/v). Deixou-se em agitação por 15 min e posteriormente retirada alíquota de 5 mL para a quantificação. Assim como os testes anteriormente descritos, todos foram feitos em triplicata e brancos em duplicata, as alíquotas passaram pelo processo de extração e quantificação em UV-Visível.

O mesmo procedimento descrito acima foi realizado, porém adicionando no lugar de HNO₃, solução de NaOH 5 mol L⁻¹.

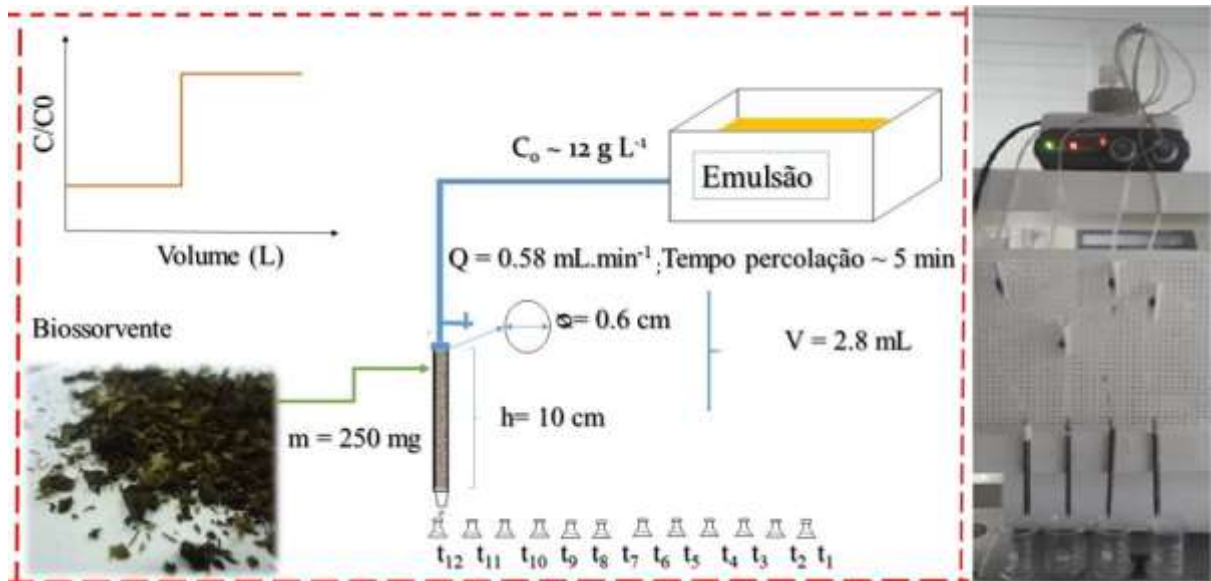
4.2.9 Teste de recuperação

Foi deixado em agitação, 25 mg de biomassa com 25 mL de emulsão 200 mg L⁻¹ em pH 2 por 15 min, em seguida foi feito no sistema o processo de extração com clorofórmio, adicionando-se 25 mL de clorofórmio e deixando em agitação em sistema fechado para evitar evaporação, com auxílio de uma pipeta de Pasteur a fase orgânica (clorofórmio+ óleo), foi removida para análise em UV-Visível.

4.2.10 Testes de adsorção em coluna de leito fixo

Um sistema composto por uma coluna de polipropileno de dimensões 6mm de diâmetro por 10 cm de altura foi montado. O escoamento do efluente sintético constituído pela emulsão oleosa foi feito de forma decrescente por gravidade, em que o controle da vazão foi realizado por uma válvula. Como segue abaixo na Figura 3, o sistema foi construído. De tempos em tempos alíquotas foram retiradas até o ponto de saturação da coluna.

Figura 3: Sistema de montagem da coluna de adsorção



Para verificar a quantidade de óleo retida pela biomassa contida na coluna, após o processo de adsorção, a biomassa foi removida da coluna e lavada exaustivamente com clorofórmio. Essa solução foi quantificada em UV-visível.

Após os cálculos dos parâmetros da coluna, foi aplicado o modelo de adsorção para colunas Bohart-Adams. O estudo do modelo foi realizado com o gráfico de $\ln(C_t/C_0)$ versus t , que fornece o valor do coeficiente de correlação (R^2), constante cinética (K_{AB}) e concentração de saturação (N_0).

4.2.11 Testes estatísticos

Para testes analíticos quantitativos foram aplicados testes estatísticos de medidas de dispersão e para conjunto de dados. Todos os dados neste capítulo, tabelas e gráficos foram representados pelas médias e desvio padrão (δp), devidamente identificados para o conjunto de réplicas.

Nos testes de pH, PCZ e de adsorção, foi realizado o teste estatístico t -Student pareado para comparação de médias de populações independentes com nível de confiança de 95%, no Excel. Para tal, foi realizado teste normalidade pelo Teste Shapiro-Wilk e teste descritivo do conjunto de dados, seguido do teste de homogeneidade pelo Teste de Levene, todos realizados no Excel pela ferramenta Real statistics. Para o conjunto de dados não paramétricos foi realizado o teste Man-Whitney não paramétrico com nível de confiança de 99%, também com a mesma ferramenta estatística. As tabelas com os valores obtidos encontram-se no APÊNDICE

B no final deste trabalho. As interpretações dos resultados foram inseridas no tópico Resultados e Discussão referente a cada teste.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Modificação da biomassa

A *Salvinia* sp coletada foi devidamente solicitada o pedido de autorização na Secretaria Municipal de Meio Ambiente de Rio das Ostras para coleta em área de preservação ambiental. E também foi realizado cadastro da coleta no Sistema Nacional de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) de Número de cadastro AAB138D.

A *Salvinia* sp. foi coletada na lagoa do Iriri e após o a secagem e trituração, a uma parte foi realizada a modificação química adquirindo aparência de um material grânuloso mais compacto como pode ser observado na Figura 4.

Figura 4: Lagoa do Iriri, local de coleta da *Salvinia* sp e aparência das biomassas *Salvinia in natura* e *Salvinia* modificada (SOH)



A *Salvinia* sp. é uma biomassa vegetal composta por materiais lignocelulósicos, constituídos por celulose, hemicelulose, lignina, cinzas inorgânicas e extrativos. Esses elementos, especialmente a celulose, são responsáveis pela interação da biomassa com moléculas polares devido à composição de suas estruturas. Esse contato mantém a umidade da biomassa vegetal e provoca o aumento da sua hidrofiliabilidade (Silva, 2016).

O método adaptado, organosolve, utilizado no processo de modificação da biomassa é capaz remover e/ou alterar, pelo uso de solventes orgânicos, materiais lignocelulósicos, com

ênfase na lignina. O ácido empregado serve para degradar e remover os demais constituintes (Silva, 2016). Desta forma, a hidrofilicidade da biomassa é reduzida, aumentando consequentemente sua hidrofobicidade. Esse procedimento permite maior afinidade da biomassa com moléculas apolares. Esta técnica facilita o processo de adsorção com os óleos aqui utilizados, bem como diminui a competição da água no processo de adsorção e remove interferentes, que se desprendem naturalmente da biomassa morta, possivelmente pelo seu processo de degradação.

4.3.2 Caracterização Físico-química dos bioissorventes

4.3.2.1 Determinação dos valores de pH dos bioissorventes

De acordo com a análise do valor de pH superficial das biomassas, a SS apresentou um pH igual a 5,34 e a SOH, 7,33, enquanto que o pH da água destilada foi de 5,67. A partir desses dados, é possível observar que houve uma mudança na distribuição de cargas da biomassa SOH após o tratamento químico, com leve predomínio de grupamentos básicos, deixando um maior número de cargas negativas em sua superfície. Em estudos anteriores, a SS havia apresentado pHs levemente ácidos, iguais a 6,10 (Oliveira *et al.*, 2019) e 6,49 (Ferreira *et al.*, 2016). Em todos os testes descritos, a SS apresentou caráter levemente ácido. Em ambas as pesquisas citadas, a SS também passou por tratamento químico. Na primeira, a biomassa foi submetida ao método Organossolve com H₂SO₄, apresentando pH 3,56 após o tratamento químico (Oliveira *et al.*, 2019). Por outro lado, quando a SS foi tratada com NaOH, alcançou pH alcalino 8,33 (Ferreira *et al.*, 2016). Em todos os casos, pode-se observar que a biomassa na *Salvinia* sp., ao ser submetida a diferentes tratamentos químicos, apresenta capacidade de rearranjo de seus grupamentos funcionais, resultando na mudança de seu pH final.

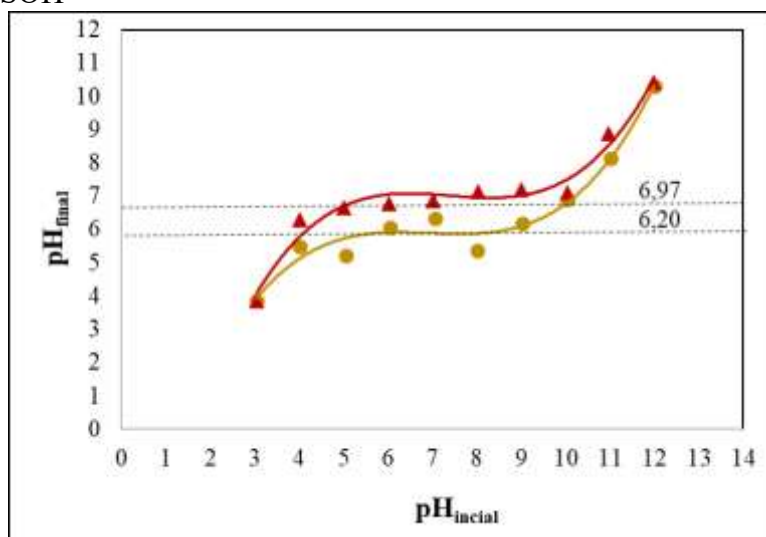
Na análise estatística de comparação de médias populacionais, o resultado da mudança de pH foi confirmado, com nível de significância de 5%, há evidências de que os valores de pH referentes ao pH da SS e da SOH são diferentes.

4.3.2.2 Ponto de Carga Zero (PCZ)

O pH em que o ponto de cargas superficiais do bioissorvente é zero foi avaliado para melhor entender a interação entre as cargas das biomassas e as emulsões oleosas. O PCZ obtido para a SS foi de 6,20 e para a SOH foi de 6,97. A comparação dos PCZs após tratamento químico (Figura 5) mostra que a SOH obteve maior PCZ, indicando aumento no seu caráter alcalino e maior distribuição de cargas negativas em sua superfície. Tal resultado também foi verificado no teste anterior (3.2.1), com o valor do pH superficial da SS e SOH.

Segundo a literatura, quando o pH do meio é maior do que o pH_{PCZ} do adsorvente sua superfície tem distribuição de cargas com predominância negativa, e o inverso quando o pH da solução é menor que o pH_{PCZ} (Mokhtar *et al.*, 2017). Com base nesta premissa, o conhecimento do pH_{PCZ} do bioissorvente permite manipular o pH do sistema para maximizar o processo de adsorção. É o caso deste estudo, em que as emulsões foram acidificadas e aumentaram a capacidade de adsorção do óleo, visto que há maior interação eletrostática entre os grupos funcionais de carga aniônica do adsorvente com concentração mais elevada de íons H^+ (Contreras *et al.*, 2012).

Figura 5: PCZ para os bioissorventes SS e SOH. Condições experimentais: 50 mg de bioissorvente em 50 mL de água destilada com 12 diferentes condições de pH por 24h (dp 0,63 a 1,24). (●) SS (▲) SOH



Entretanto, na comparação de medianas populacionais (teste Mann-Whitney) ao nível de 1% de significância, não há evidências de que os valores de pH referentes ao PCZ da SS e da SOH sejam diferentes. Esse resultado possivelmente ocorreu devido à proximidade dos valores médios de pHs obtidos entre as duas biomassas.

4.3.2.3 Caracterização dos bioissorventes por Microscopia Eletrônica de Varredura e Sistema de Energia Dispersiva

A Figura 6 apresenta a combinação das imagens por MEV e por tamanho real das biomassas deste estudo. É possível observar a estrutura granulosa, heterogênea e fibrosa das biomassas nas imagens A e B. Após o tratamento químico, a SOH obteve aumento do caráter fibroso, o que pode ser verificado nas imagens por MEV ampliadas 1000 vezes para ambas as biomassas, SS e SOH (Figura 6, C e D respectivamente). Essa estrutura fibrosa é composta por dobraduras e, após o tratamento químico, houve uma diminuição dos espaços entre essas

dobraduras. Esse aumento de enrugamento aponta para maior interação entre os grupos funcionais da biomassa SOH quando comparada à SS. Isso significa uma mudança na estrutura da biomassa no pós- tratamento químico.

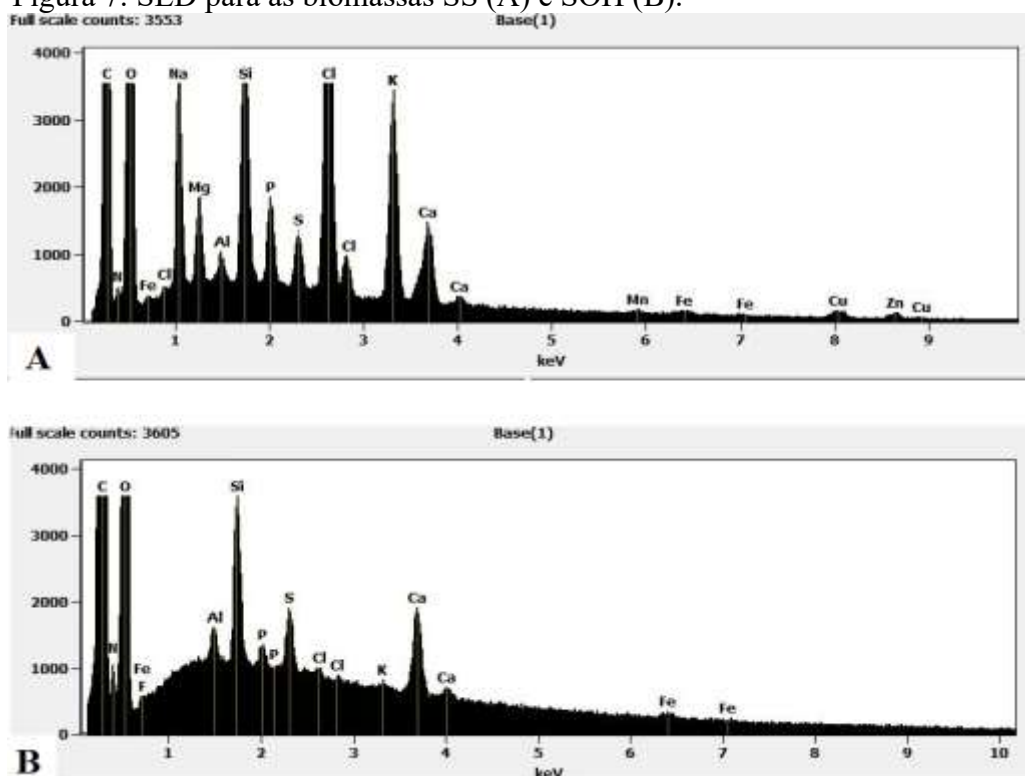
A modificação na estrutura superficial de materiais adsorventes após tratamento químico alcalino também foi verificada para resíduos de azeitonas, transformados em carvão ativado e posteriormente modificados com KOH (Enaime *et al.*, 2017).

Figura 6: (A) imagem estrutura em tamanho real da SS; (B) imagem estrutura em tamanho real da SOH; (C) MEV 1000 x ampliado SS; (D) MEV 1000 x ampliado SOH.



Na análise por Sistema de Energia Dispersiva (SED), não foi observada diferença significativa entre os biossorventes, Figura 7. Ambas as biomassas apresentaram quase os mesmos elementos constituintes, a exceção dos metais Na, Mg, Mn, Cu e Zn, que não foram encontrados na SOH (Figura 7, B). Possivelmente, esses metais foram removidos durante o processo químico. É importante destacar que o método de análise SED é de caráter qualitativo, apenas para verificar os principais elementos constituintes da amostra. Não foi possível constatar se houve de fato uma redução da concentração desses metais na composição da SOH quando comparada com a SS. Contudo, de acordo com o resultado obtido, ambas as biomassas possuem grande quantidade de carbono em sua composição, ou seja, matéria orgânica, comum aos materiais vegetais.

Figura 7: SED para as biomassas SS (A) e SOH (B).



4.3.2.4 Determinação dos grupos funcionais – Método Boehm

De acordo com a Tabela 1, a biomassa SOH apresentou um aumento de quase cinco vezes dos grupos básicos. Esses dados estão de acordo com o propósito de aumentar as cargas negativas da biomassa com a modificação química aplicada. Os grupamentos carboxílicos (-COOH) da SOH também tiveram aumento expressivo, cerca de sete vezes. A formação desse ácido pode ter ocorrido na primeira etapa do método, em que a biomassa ficou em contato com ácido e álcool, o que pode ter favorecido a formação deste grupamento. Entretanto, a biomassa SOH possui maior caráter alcalino, como pode ser observado nos testes de pH e PCZ, assim como nos valores para grupos básicos de 0,5758 e carboxílicos, 0,3419 mEq.

Quanto ao grupo dos lactônicos, não foram encontrados para ambas as biomassas, o que não significa necessariamente a ausência dos mesmos, posto que a técnica pode não ser capaz de detectar pequenas quantidades (Zago, 2010).

Os compostos fenólicos estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares ou proteínas, sendo também responsáveis pela cor (Soares, 2002). De acordo com o resultado alcançado, a eliminação ou diminuição desse grupo após a modificação química pode ter ocorrido pela remoção dos compostos como lignina e celulose.

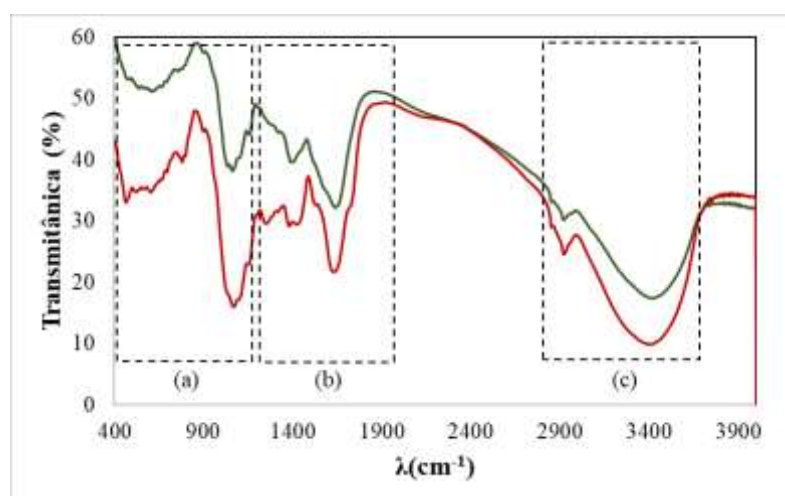
Tabela 1: Valores dos grupos funcionais em mEq obtidos para os biossorventes pelo método Boehm.

Grupos funcionais	SS (mEq)	dv (\pm)	SOH (mEq)	dv (\pm)
Básicos	0,1080	0,06	0,5758	0,06
Carboxílicos	0,0480	0,01	0,3419	0,04
Lactônicos	0	-	0	0
Fenólicos	0,3599	0,09	0	0

4.3.2.5 Caracterização das biomassas por Espectrometria no Infravermelho (IV)

De acordo com a Figura 8, a terceira região selecionada (c) para ambas as biomassas apresentaram bandas pouco intensas, características de deformação fora do plano. Merecem destaques as bandas de baixa intensidade na região de 754 cm^{-1} para a SOH e 779 cm^{-1} para a SS, que indicam a presença de anel aromático nessa região (Silverstein e Webster, 1998).

Figura 8: Análise no IV das biomassas. Comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} . SOH (—), SS (—).



Na análise comparativa dos espectros da SOH e da SS, foi possível observar a presença de leves bandas perto de 1421 e 1510 cm^{-1} , que são bandas correspondentes a lignina presente na biomassa sem tratamento químico. Essas bandas não estavam presentes no espectro da SOH, o que indica uma diminuição da lignina após o tratamento químico. Também foi possível observar uma intensidade menor das bandas da SS nas regiões de 1068 , 1625 , 2880 , e 3400 cm^{-1} , que correspondem à hemicelulose. Na região de 1068 cm^{-1} , a banda intensa representa os polissacarídeos, um dos constituintes da celulose e hemicelulose. Esses dados indicaram que o tratamento químico promoveu a redução de lignina, celulose e hemicelulose na composição da SOH. A celulose e hemicelulose são polissacarídeos responsáveis pela promoção da hidratação do vegetal, o que confere hidrofobicidade à biomassa SS. Logo, durante o processo de adsorção,

existe uma maior probabilidade de a água competir com o óleo pela adesão na superfície do bioadsorvente (Jmaa; Kallel, 2019; Ju *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007).

Abaixo, a Tabela 2 apresenta os detalhes das bandas para cada biomassa e suas respectivas descrições. Esses resultados no infravermelho apresentados concordam com aqueles da titulação de Boehm, pois admite a presença de compostos básicos com banda característica de OH em 3400 cm^{-1} , assim como os ácidos carboxílicos na região próxima de 1640 cm^{-1} e, por fim, o grupo dos fenólicos com a presença do pico próximo de 780 cm^{-1} para aromáticos.

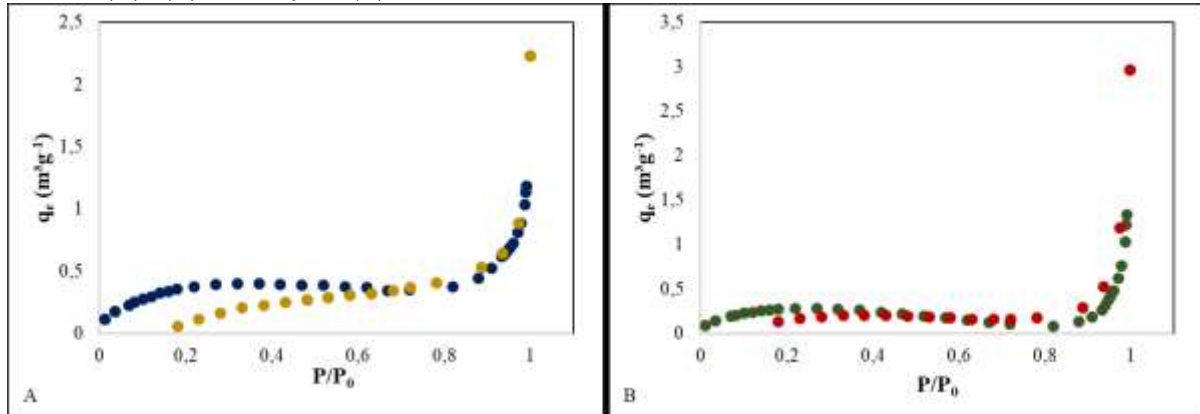
Tabela 2: Valores obtidos no IV para as biomassas com suas respectivas descrições.

ν do pico em cm^{-1} e sua característica		Descrição
SS	SSOH	
779, fraco	754, fraco	C-H aromático
-	1035, forte	Álcool
1068, forte	1061, forte	Álcool primário
-	1154, médio	C-O e C-C
1249, fraco	-	C-O de ésteres e éteres
1382e 1429 duplete	-	CH ₂ dimetil geminal
-	1402, médio	CH ₂
1631, forte	1643, forte	C=O
2851, muito fraco	2851, muito fraco	CH ₃ e CH ₂ alifáticos
2920, fraco	2920, fraco	C-H, metila
3400, largo	3400, largo	O-H

4.3.2.6 Análise da área superficial e porosidade

A área superficial da SOH apresentou alteração em relação à SS, como pode ser observado na Figura 9 (A). A isoterma, obtida pelo método BET, mostra uma relação linear entre o aumento da pressão relativa com a adsorção de N₂. Segundo a classificação da IUPAC (1995), a isoterma que melhor representa o comportamento das biomassas deste estudo é a do Tipo II, específica para adsorventes mesoporosos e macroporosos, em que a adsorção de N₂ acontece em multicamadas. Esta categoria de isoterma é caracterizada por possuir dois pontos de inflexão. O primeiro, côncavo para o eixo P/P₀, indica que a monocamada foi preenchida, enquanto que o segundo, com inflexão convexa ao eixo P/P₀, designa o ponto de saturação. A parte linear, entre os dois pontos de inflexão, assinala a adsorção em multicamadas (Sing, 1982).

Figura 9: Isoterma de adsorção de N₂ para os biossorventes SS (A) (●) Dessorção, (●) Adsorção e SOH (B). (●) Adsorção, (●)



A isoterma da biomassa SS obteve uma primeira inflexão levemente côncava, o que sugere que a monocamada pode não ser totalmente preenchida antes de ocorrer a adsorção em camadas superiores. A biomassa SOH apresentou laços ou “loops” de histerese do tipo H3 e a SS do tipo H4. Segundo a IUPAC (1995), esses tipos de histereses são observados em agregados de partículas, tipo placas, que dão origem a poros em forma de fenda, e apresentam inchamento de uma estrutura porosa não rígida devido à isoterma apresentar um “loop” de histerese a baixas pressões (Sing, 1982).

É possível verificar que as isotermas obtidas para as biomassas com pressão relativa próxima a 1 obtêm uma tendência maior de subida vertical, o que reflete a presença de macroporos. Caso a extensão desses macroporos seja muito grande, maior é a tendência vertical da reta (Sing, 1982).

De acordo com a Tabela 3, o diâmetro médio obtido pelo método BET revelou predominância de mesoporos para as duas biomassas. Na comparação da SOH com a SS, a primeira apresentou diminuição do tamanho dos poros. Conseqüentemente, houve aumento da área superficial específica da SOH em relação à SS.

Tabela 3: Valores da área superficial e diâmetros dos poros pelo método BET para as biomassas.

Biomassas	S _{BET} (m ² g ⁻¹)	S _{EXT} (m ² g ⁻¹)	S _{INT} (m ² g ⁻¹)	Diâmetro (Å)
SS	1,0622	0,9181	0,1441	254,011
SSOH	1,4959	1,7712	-0,2762	44,446

S_{BET} (m²g⁻¹): Área superficial específica de acordo com o método Brunauer, Emmett e Teller (BET)

S_{EXT} (m²g⁻¹): Área externa do sólido

S_{INT} (m²g⁻¹): Área interna do sólido

Diâmetro (Å): diâmetro médio dos poros

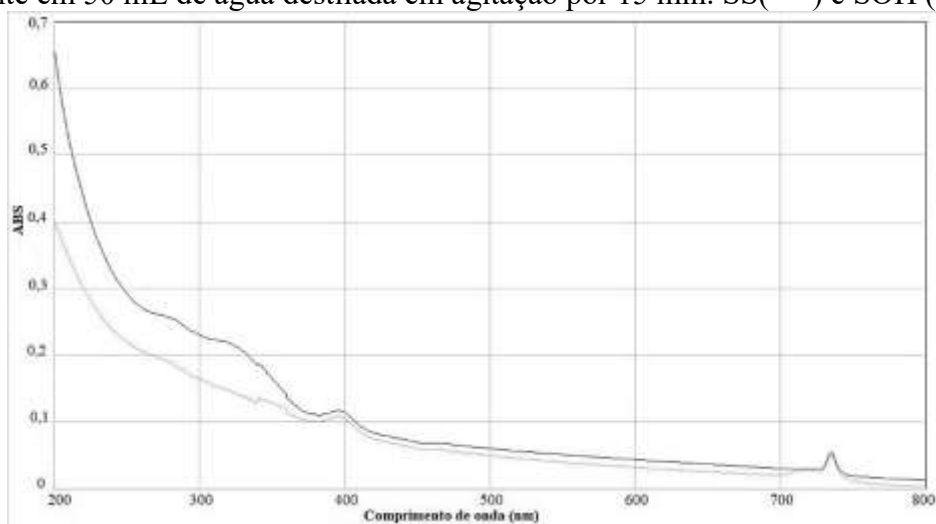
Com esse resultado, é possível inferir que a modificação química provocou aumento da área superficial da biomassa SOH quando comparada com a SS. De acordo com esse aumento

da área superficial existe conseqüentemente um aumento da superfície de contato do adsorvente com o adsorbato e assim ocorre o aumento da capacidade adsortiva da biomassa.

4.3.3 Teste de liberação de substâncias em solução aquosa

De acordo com a Figura 10, a varredura dos comprimentos de onda no intervalo de 200 a 400 nm verificou a presença de interferentes em ambas as biomassas. Entretanto, aponta para uma redução desses interferentes após a modificação química. Foram necessários outros testes para verificar a natureza físico-química desses interferentes e sua toxicidade, realizados no Capítulo 4 deste trabalho.

Figura 10: Varredura em UV-visível de 200 a 800nm. Condições experimentais: 50 mg de biossorvente em 50 mL de água destilada em agitação por 15 min. SS(—) e SOH (—)



4.3.4 Quantificação dos óleos presentes na emulsão e extração de óleo por clorofórmio

Os testes realizados mostraram que o tempo de 5 minutos não foi suficiente para a completa extração dos óleos lubrificantes deste estudo, devido a fatores climáticos e de altitude. Por isso, efetuou-se a variação do tempo de contato do clorofórmio com as amostras e constatou-se que 15 minutos era o tempo necessário para a completa extração. Logo, o tempo utilizado na metodologia de Curbelo (2002) foi modificado de 5 para 15 minutos.

4.3.5 Testes de adsorção com óleo de Carro

O óleo lubrificante de motor de carro de marca Lubrax 25W50 foi empregado nos testes de adsorção, cujo objetivo era observar o comportamento dos biossorventes deste estudo na adsorção de derivados do petróleo com viscosidades e características distintas.

O óleo lubrificante foi escolhido pelo fato de possuir estrutura de hidrocarbonetos simples e ao mesmo tempo ser derivado do petróleo, e possuir algumas características em comum.

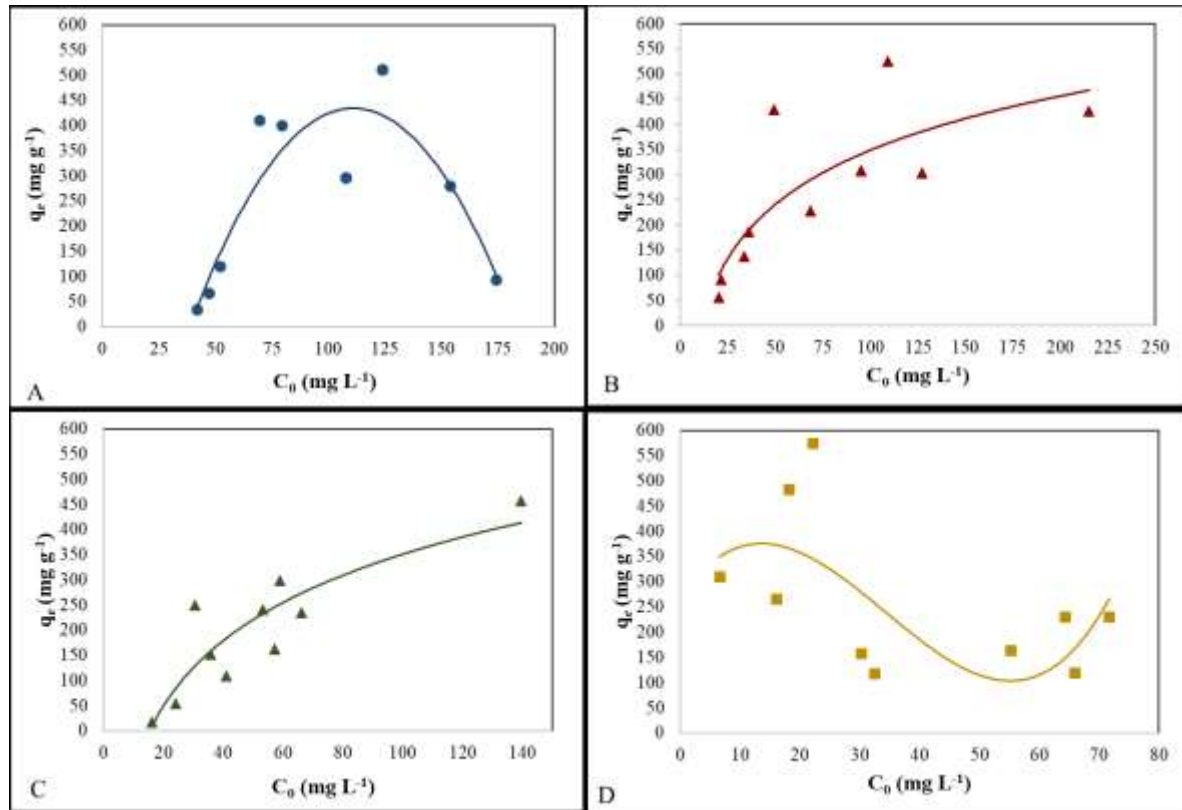
4.3.5.1 Efeito da concentração inicial de óleo e isothermas de adsorção

As isothermas de ambos os bioissorventes para as emulsões de óleo de motor de carro foram obtidas com águas ultrapura e água salgada. O objetivo foi observar a variação de resposta na ausência e presença do sal, simulando os ambientes aquáticos, além de verificar o comportamento das biomassas com a variação da concentração de óleo. Dessa forma, foi possível analisar o potencial de aplicabilidade das mesmas no tratamento de efluentes industriais, bem como descontaminação de ambientes marinhos.

A Figura 11 apresenta as isothermas obtidas com a variação da concentração de óleo de motor de carro. Os resultados mostram que ambas as biomassas tiveram comportamento diferenciado para as emulsões de água ultrapura e em água salgada. A SS alcançou o ponto de saturação com q_{\max} de 511,8 mg.g⁻¹ e baixo desempenho em concentrações mais altas (Figura 11-A). Em contrapartida, a SOH apresentou comportamento mais estável frente às concentrações mais elevadas, com tendência ao equilíbrio e q_{\max} de 525,92 mg.g⁻¹ (Figura 11-B). A adsorção de SS foi maior que a de SOH para isoterma com a emulsão de água ultrapura com óleo de carro, resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

O comportamento das biomassas se inverte com as emulsões em água salgada. De acordo com a Figura 11 (C), a SS mantém maior estabilidade em concentrações mais elevadas com q_{\max} de 457,44 mg.g⁻¹, enquanto a SOH, Figura 11 (D), teve queda brusca na capacidade adsorptiva para concentrações mais altas, obtendo q_{\max} de 574,86 mg.g⁻¹. Entretanto, o q_{\max} da SOH para emulsão em água salgada foi o maior entre as quatro emulsões com óleo de motor de carro. Uma hipótese seria a de que forças repulsivas poderiam ocorrer entre o material e as moléculas de óleo. Tal suposição seria explicada pelo crescimento das forças eletrostáticas como aquelas dos sítios ativos da superfície do material, já saturados pela molécula de óleo (Dirak *et al.*, 2018). Esse melhor resultado da SOH em relação à SS alcançou significância estatística, com 95% de confiança.

Figura 11: Adsorção de óleo de motor de carro nos bioissorventes em função da variação da concentração inicial de óleo. (A) SS em emulsão de óleo em água ultrapura (●); (B) SOH em emulsão de óleo em água ultrapura (▲); (C) SS em emulsão de óleo em água salgada (5 g L⁻¹ de NaCl) (▲); e (D) SOH em emulsão de óleo em água salgada (5 g L⁻¹ de NaCl) (■). Condições experimentais: 50 mg de bioissorvente, 50 mL de solução em pH 2, tempo de contato de 15 minutos em temperatura ambiente. (dp 0,63 a 19,43).



No estudo de revisão de Dai e colaboradores (2019), a adsorção de óleo por biocarvão foi verificada. O mecanismo de adsorção para remover poluentes orgânicos depende da natureza dos contaminantes e das propriedades químicas da superfície adsorvente. As diferenças na estrutura orgânica, propriedades elétricas da superfície e grupos funcionais da superfície do material adsorvente são propriedades importantes para os diferentes mecanismos de adsorção. No caso de adsorventes de origem vegetal o mecanismo de adsorção de contaminantes orgânicos pode ser dividido em atração eletrostática, preenchimento de poros, interação de elétron π - π com doador e receptor, ligação de hidrogênio, adsorção de complexos e interações hidrofóbicas. A capacidade de adsorção do material cresce com o aumento de grupos funcionais contendo oxigênio, que em parte ocorre devido à interação de elétrons π - π . Ainda de acordo com o estudo, os grupos ácido carboxílico, nitro e cetona na superfície do bioissorvente atuam como receptores de elétrons e formam a interação do receptor de doador de elétrons π - π com moléculas aromáticas. Diferentes tipos de grupos hidroxila e amina no bioissorvente também podem ser usados como locais doadores de elétrons π . Assim como a

SOH, a superfície do biocarvão é carregada negativamente, o que causa atração eletrostática entre o adsorvente e os compostos orgânicos carregados positivamente. A magnitude da atração eletrostática depende do tamanho de cada carga atômica e da distância entre dois átomos. O biossorvente com baixa oxidação superficial geralmente exibe hidrofobicidade e indica que a adsorção ocorre principalmente por interação hidrofóbica, preenchimento de poros, fração não carbonizada de partição e interação π - π . Quando a superfície do biossorvente é carregada negativamente, é fácil atrair eletrostaticamente o composto orgânico catiônico (Dai *et al.*, 2019).

Como o biocarvão e a SOH são de origem vegetal e possuem grupos superficiais análogos, é possível inferir que o mecanismo de adsorção da SOH ocorre de forma similar. A diminuição dos compostos hidrofílicos, como celulose e hemicelulose, removidos com a modificação química, conferem maior caráter hidrofóbico à SOH em comparação com a SS. Da mesma forma, a diminuição do tamanho médio dos poros possivelmente pode favorecer à aderência do óleo na superfície da biomassa.

A Tabela 4 mostra os resultados dos estudos isotérmicos pelos modelos de Langmuir e Freundlich na forma não linear. O modelo de Freundlich foi o mais adequado para os testes de adsorção com as biomassas deste estudo, com coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99 para SS e SOH. Esses resultados sugerem que o processo de adsorção não se restringe à formação de uma monocamada, e que a adsorção de várias camadas de óleo ocorre em locais de adsorção heterogêneos (Dirak *et al.*, 2018). O valor da constante n superior a 1, para ambas as biomassas, indica adsorção favorável (Almeida *et al.*, 2018).

O modelo de Langmuir obteve R^2 com valor de 0,1212 e 0,6105 para SOH para emulsão óleo em água e óleo em água salgada, respectivamente, e 0,9576 e 0,9913 para SS para emulsão óleo em água e óleo em água salgada, respectivamente. Não foi possível inferir que as biomassas foram ajustadas por este modelo. No entanto, pode-se observar que os valores obtidos a partir das constantes K_L e R_L ($0 < R_L < 1$) que também assinalam que a adsorção é favorável para as biomassas deste estudo (Leite *et al.*, 2017).

Tabela 4: Valores encontrados para os modelos não lineares de Langmuir e Freundlich a partir das isotermas das emulsões oleosas em água ultrapura e salgada com óleo de motor de carro para os bioissorventes SS e SOH.

		Biossorvente			
		Emulsão em água ultrapura		Emulsão em água salgada	
		SS	SOH	SS	SOH
Langmuir	$q_{\max}(\text{mg.g}^{-1})$	512,6	56,8	1614,3	265,5
	$K_L (\text{L.mg}^{-1})$	0,0135	3,6	0,0028	3444,4
	R^2	0,9579	0,1212	0,9913	0,6105
	R_L	0,1263	0,0049	0,1792	1E-06
	K_F	37,36	32,84	14,62	14,62
Freundlich	n	2,2654	1,9968	1,0067	1,0067
	$1/n$	0,4414	0,5008	0,9934	0,9934
	R^2	0,9912	0,9886	0,9999	0,9999

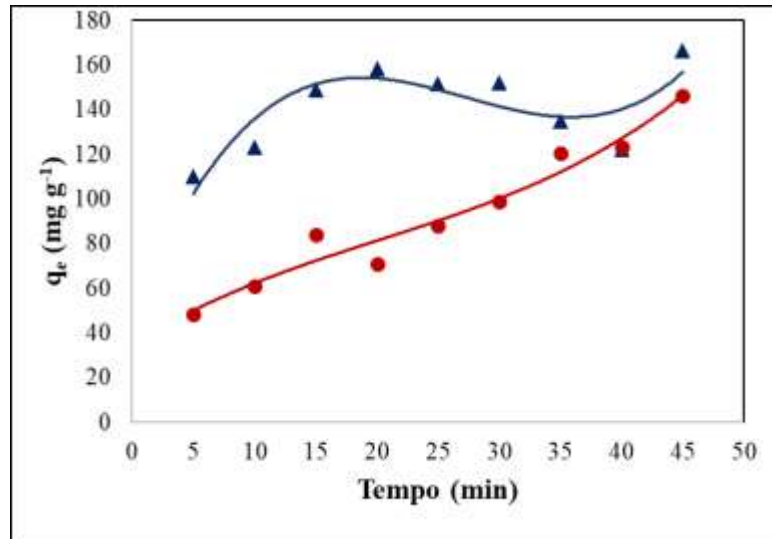
4.3.5.2 Tempo de contato e variação da temperatura

No teste cinético, Figura 12, as biomassas apresentaram instabilidade ao longo do tempo, com tendência à dessorção após 15 minutos de contato, sem estabelecer equilíbrio termodinâmico até 45 minutos. Essa variabilidade pode estar diretamente relacionada à instabilidade inerente às emulsões água/ óleo (Su *et al.*, 2006).

A SS obteve melhor desempenho em relação à SOH, que, por sua vez, manteve maior estabilidade durante todo o período, demonstrando maior tendência para retenção do óleo adsorvido. A adsorção de SS foi maior que SOH, na temperatura de 25°C, para emulsão de óleo de carro, de acordo com análise estatística e $p < 0,05$.

As duas biomassas apresentaram uma boa resposta quanto à adsorção nos primeiros 15 minutos, tendo a SS obtido adsorção em 15 minutos de 149,5mg g⁻¹ e a SOH 83,1 mg g⁻¹ como pode ser observado na Figura 12. Após esse período, ambas continuaram com tendência crescente de adsorção, embora tenham atingido pontos de dessorção após 45 minutos. Essa rápida reação também foi verificada para a adsorção de Negro de Eriocromo T em carvão ativado, produzido a partir do lodo de estação de tratamento de águas, que já apresentou boa resposta em 5 minutos, com a adsorção tendendo ao equilíbrio em 15 minutos (Souza; Carvalho, 2020).

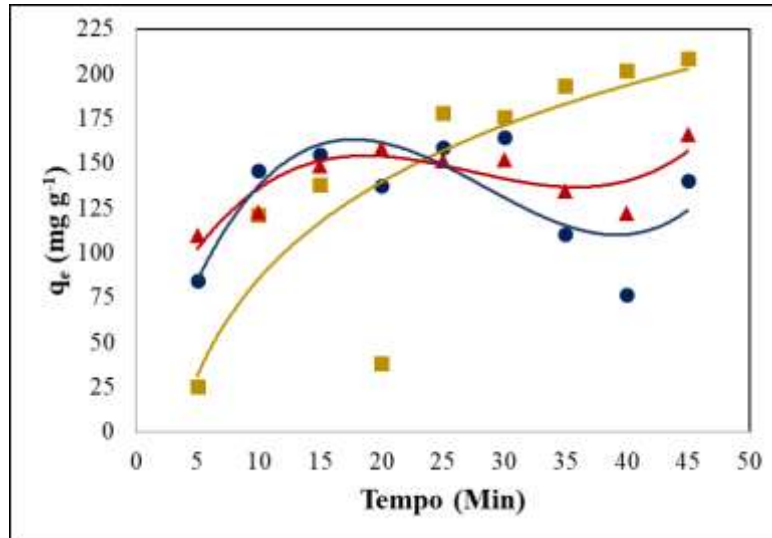
Figura 12: Tempo de equilíbrio. Condições experimentais: 150 mg de biomassa com 150 mL de emulsão de água e óleo de carro (200 mg L^{-1}) a 25°C (dv 0,4 a 1,1) (\blacktriangle) SS e (\bullet) SOH



O tempo de contato foi realizado em diferentes temperaturas a fim de verificar o comportamento termodinâmico das biomassas. Os resultados estatisticamente significativos mostraram que a adsorção de SS foi maior do que SOH nas temperaturas de 15 e 25°C para emulsão com óleo de carro.

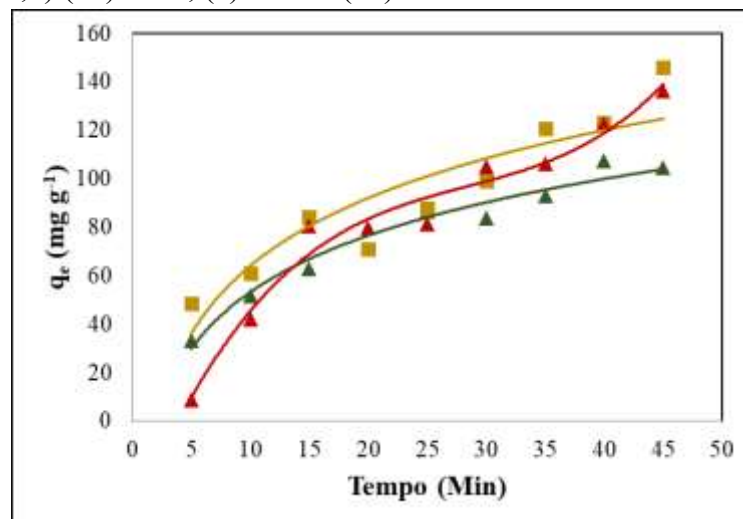
Como já verificado no teste cinético, a SS teve uma boa resposta de adsorção nos primeiros minutos. No entanto, revelou certa instabilidade, com pontos de expressiva dessorção com o tempo, após 20 min. A Figura 13 mostra o comportamento da SS para três temperaturas 15, 25 e 35°C . Nas três temperaturas, ocorreu dessorção após 20 minutos, com aumento da resposta de adsorção em $15^\circ\text{C} > 25^\circ\text{C} > 35^\circ\text{C}$. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre a adsorção na emulsão com óleo de carro e a variação de temperatura, de acordo com o teste *t*-Student. Cabe destacar que apesar da aparente mudança de resposta adsortiva com variação da temperatura, os dados estatísticos revelam que essa variação não é significativa, o que sugere resposta adsortiva positiva para diferentes temperaturas.

Figura 13: Adsorção com a variação da temperatura ao longo do tempo. Condições experimentais: SS 150 mg de biomassa com 150 mL de emulsão de água e óleo de carro (200 mg L⁻¹) (dv 0,2 a 1,8) (■) 15°C, (▲) 25°C e (●) 35°C.



A SOH obteve adsorção crescente ao longo do tempo para todas as temperaturas, como pode ser visto na Figura 14. Não foi possível verificar uma relação direta entre a resposta de adsorção e a variação da temperatura. As temperaturas de 25 e 35°C tiveram pouca diferença na adsorção, enquanto em 15°C foi verificado baixo desempenho. Para o teste estatístico t-student de diferença de médias populacionais ao nível de significância de 5%, há evidências de que existe diferença de adsorção de emulsão com óleo de carro com a variação de temperatura de 15 para 25°C para a SOH.

Figura 14: Adsorção com a variação da temperatura ao longo do tempo. Condições experimentais: SOH 150 mg de biomassa com 150 mL de emulsão de água e óleo de carro (200 mg L⁻¹) (dv 0,9 a 1,7) (▲) 15°C, (■) 25°C e (▲) 35°C



Esse comportamento não linear também foi encontrado em outros materiais biossorventes, como o sabugo de milho impregnado com hidróxidos de ferro na remoção de arsênio de solução aquosa (Silva, 2020), e alumina em adsorção de óleo (Franco *et al.*, 2014).

Estudos dos modelos cinéticos Difusão intrapartícula, de Elovich e Pseudo-segunda ordem foram aplicados nas três diferentes temperaturas para ambas as biomassas. Os resultados das análises não lineares dos modelos cinéticos são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5: Modelos cinéticos

		Biossorventes					
		15°C		25°C		35°C	
		SS	SOH	SS	SOH	SS	SOH
Difusão Intrapartícula	K_d	30,336	14,734	12,587	23,836	0,0487	18,65
	C	0	0	100,34	0,002	130,4	0
	R^2	0,9894	0,9826	0,9894	0,9894	0,9894	0,9894
	α	0,00	0,009	0,035	0,012	0,402	0,118
Elovich		7					
	β	10,72	4,088	366,78	10,70	5,38E22	2,15E11
	R^2	0,9833	0,9908	0,9562	0,9766	0,9558	0,9558
Pseudo-segunda ordem	K_2	142,46	92,01	160,62	151,64	130,35	125,43
	q_e	22E6	0,003	1,71	0,002	1,487	0,001
	R^2	0,8302	0,8308	0,8302	0,8306	0,8302	0,8308

O modelo que melhor se ajustou às duas biomassas em todas as temperaturas foi o de difusão intrapartícula, que tem como pressuposto excluir o modelo de pseudo-segunda ordem (Juang *et al.*, 2002). De acordo com o modelo de difusão intrapartícula, os processos de adsorção podem ocorrer em duas ou mais etapas. A primeira em que a adsorção é tem rápida resposta, como pode ser visto nos gráficos de variação de temperatura para SS e SOH (Figuras 13 e 14, respectivamente), visto que já mostraram adsorção em 5 minutos. A segunda etapa é a adsorção gradual, observada no intervalo de tempo de 5 a 15 min. A terceira etapa é a fase final de equilíbrio, onde a difusão intrapartícula começa a desacelerar devido à baixa concentração de soluto na solução e ao menor número de locais disponíveis (Juang *et al.*, 2002). Embora as isotermas não tenham atingido o equilíbrio total ao longo dos 45 minutos, foi possível observar os três estágios distintos para as curvas no teste. Esse modelo também foi verificado para a adsorção de óleo por nanopartículas funcionalizadas de alumina (Franco *et al.*, 2014).

Vale ressaltar que o estudo do mecanismo de adsorção por biossorventes neste trabalho considerou o mecanismo cinético global, e não os diferentes tipos de interação solvente-soluto, devido ao grande número de matrizes de diferentes grupos funcionais das superfícies das

biomassas (Juang *et al.*, 2002). A caracterização físico-química pela titulação de Boehm e análise infravermelho das biomassas constatou a presença de grupos carboxílicos, lactonas, fenóis, entre outros.

Os cálculos termodinâmicos para SS e SOH, que apresentaram comportamentos diferentes com a variação da temperatura, alcançaram valores opostos para as energias de entalpia e entropia, conforme descrito na Tabela 6.

Tabela 6: Valores de ΔH e ΔS para biomassa no óleo de navio

Biossorvente	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)
SS	0,776	-0,002
SOH	-2,621	0,008

A SS obteve valor positivo e baixo de entalpia (inferior a 40 kJ mol⁻¹), característico de processo endotérmico e de adsorção do tipo física (Sahmoune, 2019). A energia de entropia do sistema foi baixa e negativa, com ligeira alteração no sistema, o que representou baixa reversibilidade no processo de adsorção (Sahmoune, 2019).

A SOH obteve energia de entalpia negativa, indicando processo exotérmico e adsorção física, enquanto que a energia de entropia baixa e positiva mostrou não haver alteração significativa na estrutura da biomassa (Sahmoune, 2019). Esses resultados sugerem possível reversibilidade do processo de adsorção de SOH.

A energia de Gibbs foi calculada para as três temperaturas a partir dos valores de entalpia e entropia, conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7: Valores de ΔG para os biossorventes em diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	ΔG	
	SS	SOH
15	1,507	-5,078
25	1,532	-5,163
35	1,558	-5,248

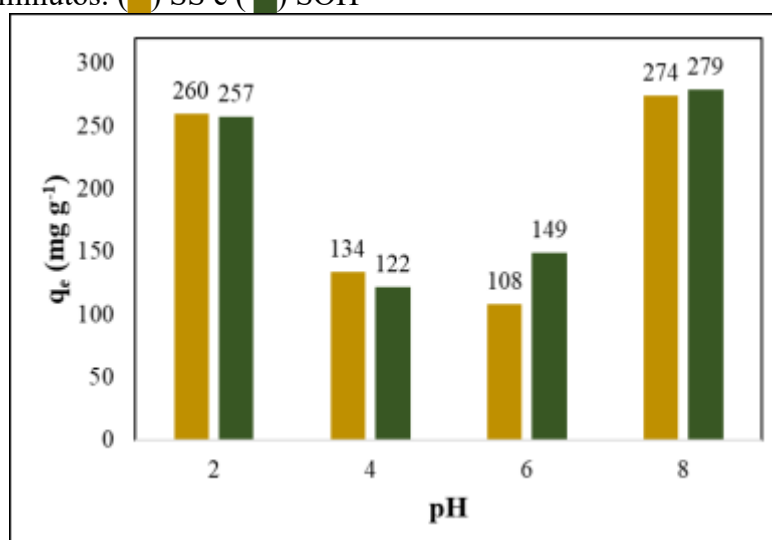
Os valores de energia de Gibbs para SOH foram negativos em todas as temperaturas, mostrando que o processo de adsorção é espontâneo (Cambuim, 2009). Entretanto, o contrário ocorreu para SS, ou seja, o processo de adsorção não foi espontâneo. Esse fato não impede que o processo ocorra, uma vez que houve adsorção pela biomassa em todos os testes. Valores negativos para energia de Gibbs também foram encontrados na adsorção de óleo por biopolímeros encapsulados com metal (Elanchezhian *et al.*, 2018).

4.3.5.3 Efeito da variação do pH

A variação de pH, Figura 15, apresentou comportamento não convencional para materiais adsorventes, no qual ambas as biomassas apresentaram melhores resultados para pHs

extremos. Esse desempenho levanta a hipótese de que o controle do mecanismo de adsorção para os óleos utilizados neste estudo se limita à diferença significativa entre íons livres no sistema, que possivelmente deslocam a nuvem eletrônica dos constituintes de hidrocarbonetos do óleo, causando um momento dipolo, favorecendo assim à interação dipolo-dipolo com os sítios ativos da biomassa. Existem estudos que apontam para uma diminuição na adsorção de hidrocarbonetos (Elanchezhiyan *et al.*, 2018; Franco *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2019), como também para um aumento na capacidade de adsorção (Akar *et al.*, 2018) com subida do pH. Entretanto, a pesquisa relacionada com a adsorção de espumas poliméricas à base de ácido em óleo emulsionado verificou que a resposta da adsorção não foi proporcional aos valores de pH. A melhor resposta foi alcançada em pH=5,6 com q_e de 1066 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, enquanto que, para os pHs =3,6 e 9,6, os valores de q_e ficaram em 497,1 e 85,2 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente (Cherukupally *et al.*, 2017).

Figura 15: Capacidade de adsorção de óleo de carro por SOH e SS de acordo com o pH. Condições experimentais: 50 mg do bioissorvente 50 mL de emulsão 200 mg L^{-1} de óleo em agitação por 15 minutos. (■) SS e (■) SOH



Para os pHs=2 e 4, a SS obteve maior adsorção quando comparada à SOH. Entretanto, os resultados não evidenciaram uma diferença estatisticamente significativa entre a adsorção de SS e SOH nos pHs=2, 4, 6 e 8 para emulsão com óleo de carro.

4.3.6 Testes de adsorção com óleo de Navio

Os testes de adsorção que seguem foram desenvolvidos em óleo lubrificante usado de motor de navio da marca Mobil delvac SAE 40.

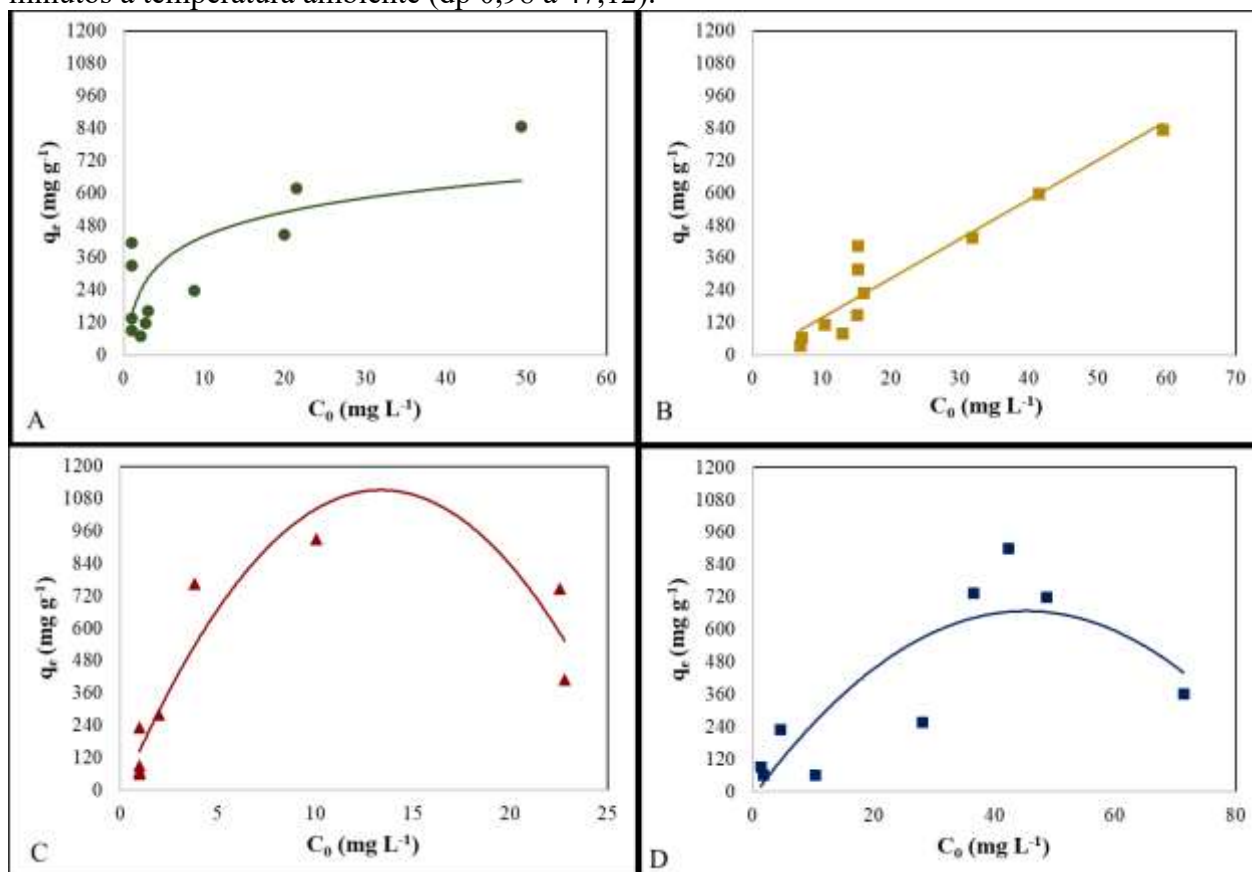
4.3.6.1 Efeito da concentração inicial de óleo e isothermas de adsorção

Da mesma forma que nos testes de adsorção para óleo de carro, as quatro isothermas foram obtidas com os dois bioissorventes para as emulsões com óleo usado de navio em água ultrapura e salgada. De acordo com a Figura 16, ambas as biomassas obtiveram boa resposta para a variação da concentração do óleo nos dois tipos de emulsão. Na Figura 16 (A), a SS, com q_{\max} de $846,51 \text{ mg g}^{-1}$, tendeu ao equilíbrio nos pontos de maior concentração. A SOH, Figura 16 (B), com q_{\max} ($836,42 \text{ mg g}^{-1}$) muito próximo ao da SS, obteve resposta linear crescente na capacidade adsorptiva conforme aumento da concentração inicial de óleo. Entretanto, não houve evidências com significância estatística de que a adsorção de SS fosse maior que SOH para isoterma com a emulsão em água ultrapura com óleo de navio.

Por outro lado, as emulsões com água salgada apresentaram tendência à saturação para concentrações mais elevadas. A SS, Figura 16 (C), obteve o maior q_{\max} de todas as isothermas, $930,59 \text{ mg g}^{-1}$, e o menor ponto de saturação. Embora a SS tenha obtido a melhor resposta, apresentou elevada instabilidade. Também a SOH, Figura 16 (D), exibiu tendência à saturação, porém de forma mais branda, e maior q_{\max} ($898,31 \text{ mg g}^{-1}$) em comparação a sua própria emulsão em água ultrapura. O melhor desempenho da SS relativo à adsorção foi estatisticamente comprovado ser maior do que SOH para isoterma de emulsão em água salgada com óleo de navio.

As emulsões em água salgada tanto para o óleo de carro e de navio a adsorção das biomassas foram maiores. De acordo com literatura os eletrólitos tendem a influenciar a solubilização das emulsões, no caso do cátion monovalente Na^+ compete pela água de hidratação do emulsionante provocando assim a diminuindo a solubilidade da emulsão (*salting out*), o que aumenta a adsorção de óleo na superfície dos adsorventes (Schmidts *et al.*, 2010; Dirak *et al.*, 2018). Por isso a resposta de adsorção foi maior para ambas as biomassas. Pesquisas sobre adsorção em emulsão oleosa com água doce e salgada para diferentes materiais obtiveram melhor resultado para adsorção em emulsão oleosa salgada. Um estudo sobre adsorção e dessorção em emulsão de óleo com membrana composta por fluoreto de polivinilideno termo-responsivo e sílica obteve aumento considerável da adsorção com a elevação da concentração de NaCl na emulsão (Ngang *et al.*, 2017). No caso de adsorção no biocarvão, a quantidade máxima adsorvida, medida experimentalmente, alcançada foi 80% maior em meio salgado do que na água doce, mostrando que a presença de sal na emulsão aumentou a adsorção do óleo (Franco *et al.*, 2014).

Figura 16: Adsorção de óleo de motor de navio em função da variação da concentração inicial de óleo pelos bioissorventes. (A) SS em emulsão de óleo em água ultrapura (●); (B) SOH emulsão de óleo em água ultrapura (■); (C) SS em emulsão de óleo em água salgada (5 L⁻¹ de NaCl) (▲); e (D) SOH em emulsão de óleo em água salgada (5g L⁻¹ de NaCl) (■). Condições experimentais: 50 mg de bioissorvente, 50 mL de solução em pH 2, tempo de contato igual a 15 minutos à temperatura ambiente (dp 0,98 a 47,12).



A partir das isotermas acima, os modelos não lineares de Langmuir e Freundlich foram aplicados, e os resultados mostrados na Tabela 8. Assim como nos testes de adsorção para óleo de motor de carro, os desfechos foram similares, com o modelo de Freundlich sendo o de melhor ajuste para as biomassas, que possuem sítios de adsorção heterogêneos e adsorção favorável com os valores de n maior que 1 para ambos os bioissorventes (Almeida *et al.*, 2018).

Baseado nos resultados de caracterização físico-químicos das biomassas, estas possuem grupamentos superficiais distintos como os carboxílicos e básicos, observados nos testes de titulação de Boehm e infravermelho, no qual possivelmente os sítios ativos responsáveis pela adsorção podem ser, sim, distintos como aponta o modelo proposto por Freundlich. Para a análise BET observou-se que as biomassas não necessariamente apresentam adsorção completa da primeira camada e que possuem poros em forma de fendas, o que destaca estrutura irregular como também foi verificado no MEV.

Quanto ao modelo de Langmuir, o R^2 foi menor, o que corrobora os postulados para este modelo, que pressupõem adsorção em monocamada e sítios ativos igualmente distribuídos (Stafussa, 2014).

Tabela 8: Valores encontrados para os modelos não lineares de Langmuir e Freundlich, a partir das isotermas das emulsões oleosas em água ultrapura e salgada com óleo de motor de navio para os bioissorventes SS e SOH

		Biossorventes			
		Emulsão em água ultrapura		Emulsão em água salgada	
		SS	SOH	SS	SOH
Langmuir	$q_{max}(mg/g)$	1074,71	15153,2	818,75	629,39
	$K_L (L/mg)$	0,0554	0,0098	0,3542	0,0836
	R_L	0,0165	0,0631	0,0034	0,0186
	R^2	0,9706	0,9999	0,8503	0,8329
Freundlich	K_F	14,62	14,62	246,08	246,08
	n	1,0067	1,0067	2,8837	2,8837
	$1/n$	0,9934	0,9934	0,3468	0,3468
	R^2	0,9999	0,9999	0,9605	0,9286

Ao comparar os resultados obtidos na Tabela 9 com aqueles descritos na literatura, as biomassas deste estudo estão entre os melhores resultados, em especial, para sorção de óleo em emulsões oleosas, cujas capacidades máximas de adsorção variaram entre 50 a 5470 $mg\ g^{-1}$.

Tabela 9: Capacidade adsortiva de diferentes matérias em emulsões oleosas

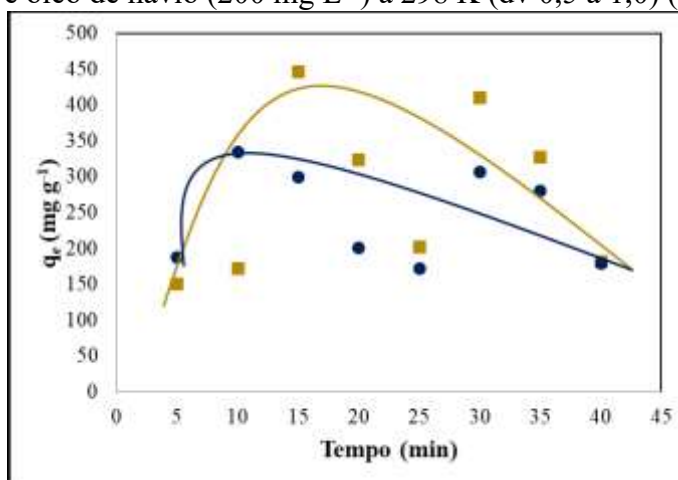
Adsorvente	Adsorbato	q_{max} ($mg\ g^{-1}$)	Referências
Bagaço de cana	Emulsão sintética	207	Silva, <i>et.al.</i> ,2019
Cinza de casca de arroz preto	Emulsão sintética	769	Razavi <i>et al.</i> , 2015
Carvão ativado de Casuarina	Emulsão sintética com querosene	50	Leite, <i>et al.</i> , 2017
Filme fino de carbono amorfo	Emulsão sintética	307	Fathy, <i>et al.</i> , 2018
Concha de <i>Xanthoceras sorbifolia</i>	Emulsão sintética	75,1	Liu, <i>et al.</i> , 2018
Carvão ativado em pó	Emulsão sintética	468,00	Okiel <i>et al.</i> , 2011
Bagaço de cana	Emulsão sintética	5470,00	Boni 2012
Alumina hidrofóbica	Emulsão sintética	180,65	<i>Franco et al.</i> , 2014
SS	Emulsão sintética de água ultrapura e óleo de navio	846,51	Este trabalho

SOH	Emulsão sintética de água ultrapura e óleo de navio	836,42	Este trabalho
SS	Emulsão sintética de água salgada e óleo de navio	930,59	Este trabalho
SOH	Emulsão sintética de água salgada e óleo de navio	898,00	Este trabalho
SS	Emulsão sintética de água ultrapura e óleo de carro	511,8	Este trabalho
SOH	Emulsão sintética de água ultrapura e óleo de carro	525,92	Este trabalho
SS	Emulsão sintética de água salgada e óleo de carro	457,44	Este trabalho
SS	Emulsão sintética de água salgada e óleo de carro	574,86	Este trabalho

4.3.6.2 Tempo de contato e variação da temperatura

A cinética de adsorção de ambas as biomassas para o óleo de navio foi similar à obtida no teste anterior para óleo de carro, ou seja, não apresentou estabilidade termodinâmica, e apresentou pontos de dessorção ao longo do tempo para ambas as biomassas, como mostra a Figura 17. Tal resultado corrobora a hipótese de que essa variabilidade de adsorção ao longo do tempo se deve à instabilidade da emulsão (Su *et al.*, 2006).

Figura 17: Tempo de equilíbrio. Condições experimentais: 150 mg de biomassa com 150 mL de emulsão de água e óleo de navio (200 mg L^{-1}) a 298 K (dv 0,5 a 1,0) (■) SS e (●)SOH



A SS apresentou melhor desempenho quando comparada à SOH com q_{max} em 15 min. Após esse período, obteve pontos de dessorção nos dois tempos seguintes e voltou a adsorver

em 30 min e, novamente, desorveu nos tempos de 35 e 40 min. Entretanto, a adsorção de SS maior do que SOH na temperatura de 25°C para emulsão com óleo de navio não foi confirmada estatisticamente.

A SOH apresentou a cinética de adsorção mais rápida, sendo seu ápice em 10 min. Seguiu o mesmo comportamento da SS, com pontos seguintes de desorção, novamente processo de adsorção em 30 min e desorção em 35 e 40 min.

Esse tipo de rápida adsorção para óleos também foi verificado por Barthlott *et al.*, (2020) na superfície da folha de *Salvinia* sp. em contato com um filme de óleo sobrenadante, tendo a adsorção completa do óleo acontecido em cerca de 50 segundos. De acordo com a pesquisa, essa alta velocidade de adsorção e transporte se deram devido à arquitetura da folha, que possui superfície hidrofóbica e oleofílica. Igualmente, a velocidade de transporte do óleo pela folha ocorre em razão da alta densidade de tricomas, visto que a distância média dos pelos foi de $244,29 \pm 38,27 \mu\text{m}$ na *Salvinia*. Segundo os autores, o pré-requisito mais importante para uma interação capilar alta entre os pelos da folha é a distância de separação, cujos pequenos tricomas muito próximos transportam o petróleo muito mais rápido.

Após adição desses resultados com aqueles dos modelos de adsorção de Freundlich e os obtidos para óleo de carro, é possível que o processo de adsorção de ambas as biomassas seja reversível, com possibilidade de reaproveitamento das mesmas para tratamento dos efluentes.

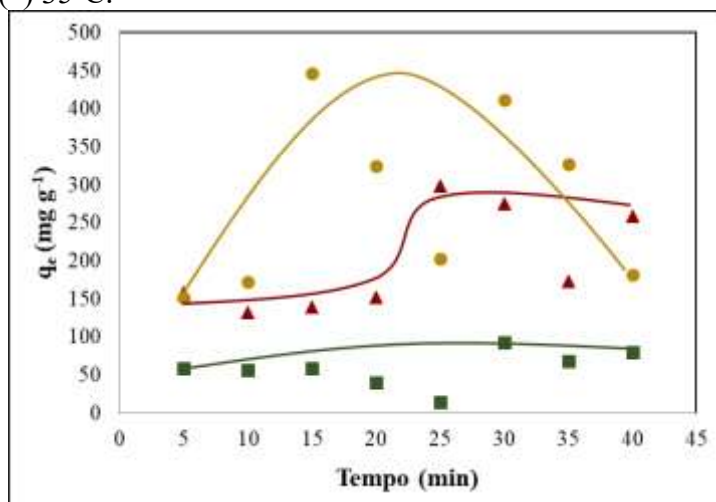
Nas temperaturas de 15, 25 e 35°C, a SS obteve melhor desempenho comparada a SOH. Contudo, os resultados de adsorção de SS maior do que SOH para as temperaturas de 15 e 35°C na emulsão com óleo de navio não foram estatisticamente significativos.

A variação da temperatura para a SS, Figura 18, não teve relação direta com a capacidade adsorptiva, cuja relação de temperatura com a adsorção foi de $25^\circ\text{C} > 15^\circ\text{C} > 35^\circ\text{C}$. A temperatura mais alta obteve menor desempenho para todos os pontos, porém apresentou maior estabilidade em sua curva. Houve diferença estatística na adsorção do óleo de navio entre as temperaturas 25 e 35°C. Por outro lado, a variação de temperatura de 15 para 25°C na adsorção de óleo de navio não se mostrou estatisticamente significativa para a SS.

Todas as temperaturas tiveram comportamento similar nos primeiros 15 min. A adsorção cresceu e, nos tempos subsequentes, houve desorção, seguida de nova adsorção. Dessa forma, o equilíbrio não foi atingido em até 40 min. Talvez esse equilíbrio ocorresse, caso a faixa de tempo do experimento fosse aumentada para verificar o tempo necessário. Entretanto, o foco deste estudo era verificar períodos curtos de adsorção para que um biorreator fosse

construído. Por isso, um período superior a 40 min não era interessante para os testes subsequentes.

Figura 18: Variação da temperatura ao longo do tempo. Condições experimentais: SS 150 mg de biomassa com 150 mL de emulsão de água e óleo de navio (200 mg/L) (dv 0,9 a 1,5). (●) 25°C, (▲) 15°C e (■) 35°C.

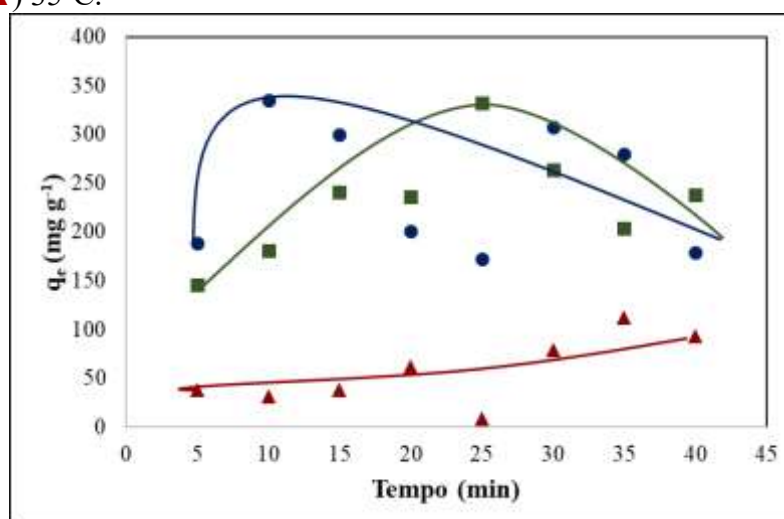


A SOH também apresentou comportamento similar a SS com a variação da temperatura, Figura 19, sendo a relação da temperatura com a adsorção igual a 25°C > 15°C > 35°C. Não houve diferença estatisticamente significativa para adsorção de óleo de navio entre as temperaturas de 15 e 25°C para a SOH. Em contrapartida, a diferença na adsorção de óleo de navio para a SOH entre 25 e 35°C alcançou significância estatística.

As curvas resultantes da variação da temperatura com o tempo se apresentaram côncavas para baixo em todas as temperaturas avaliadas. Contudo, os pontos máximos de adsorção foram diferentes, sendo em 10, 25 e 35 min para as temperaturas de 25, 15 e 35°C, respectivamente. A adsorção de hidrocarbonetos por carvão ativado a partir da *Causuarina equisetifolia* também não foi linear, assim como a adsorção foi menor para temperaturas mais altas (Leite *et al.*, 2017).

Em todos os testes, as biomassas apresentaram instabilidade. Todavia, é importante destacar que houve adsorção em todos os ensaios com 5 min, assim como as biomassas obtiveram rápida cinética independentemente da temperatura.

Figura 19: Variação da temperatura ao longo do tempo. Condições experimentais: SOH 150 mg de biomassa com 150 mL de emulsão de água e óleo de navio (200 mg/L) (dv 0,8 a 2,0) (●) 25°C, (■) 15°C e (▲) 35°C.



Modelos cinéticos na forma não linear foram testados com as três temperaturas, Tabela 10. O modelo mais ajustado a todas as temperaturas e ambas as biomassas foi novamente o de difusão intrapartícula. Anteriormente, também havia sido o melhor para a adsorção com óleo de carro. Dessa maneira, ratificou a ocorrência da interação adsorptiva entre essas biomassas e as emulsões oleosas em mais de uma etapa (Juang *et al.*, 2002). Esse fato pode ser observado em todos os gráficos cinéticos mostrados neste capítulo.

Tabela 10: Equações obtidas com modelos cinéticos não lineares para óleo de motor de navio

		Biossorventes					
		15 °C		25 °C		35 °C	
		SS	SOH	SS	SOH	SS	SOH
Difusão Intrapartícula	K_d	30,03	22,42	22,4	0,01	30,04	22,42
	C	61,83	127,95	175,009	245,26	61,83	127,95
	R^2	0,9811	0,9811	0,9811	0,9811	0,9811	0,9811
Elovich	α	2,6914	253,02	399,89	2,5E22	5,65E16	2,15E11
	β	0,001	0,0198	0,0177	0,2163	0,2017	0,1181
	R^2	0,9998	0,9213	0,9206	0,9189	0,9189	0,9189
	K_2	2,3E7	1,1E5	1,1E5	2,3E7	2,3E7	2,3E7
Pseudo-segunda ordem	q_e	198,72	230,12	277,19	245,26	198,72	230,12
	R^2	0,7054	0,7054	0,7054	0,7054	0,7054	0,7054

A Tabela 11 apresenta os cálculos termodinâmicos a partir da variação de temperatura. Ambas as biomassas apresentaram valor positivo e baixo de entalpia (inferior a 40 kJ/mol),

mostrando que o processo de adsorção para óleo de motor de navio é físico e endotérmico (Sahmoune, 2019). A energia de entropia do sistema foi reduzida e negativa, sinalizando uma alteração mínima no sistema, o que demonstra que a adsorção com emulsão de óleo de navio pode não ser totalmente reversível para as biomassas deste estudo (Sahmoune, 2019).

Tabela 11: Valores de ΔH e ΔS para as biomassas em óleo de navio.

Biossorvente	ΔH (kJ/mol)	ΔS (kJ/mol.K)
SS	1,048	$-3,6 \times 10^{-3}$
SOH	3,542	$-12,0 \times 10^{-3}$

A energia de Gibbs obtida foi positiva para as três temperaturas com as duas biomassas, como descrito na Tabela 12, comprovando que o processo de adsorção não é espontâneo. O ΔG variou pouco com a temperatura, em especial, para a SS.

Tabela 12: Valores de ΔG para os biossorventes em óleo de motor de navio nas diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	ΔG	
	SS	SOH
15	2,106	7,000
25	2,143	7,120
35	2,179	7,241

Embora os resultados termodinâmicos não tenham sido favoráveis para a SOH, os resultados experimentais de adsorção mostraram uma boa resposta da biomassa para a variação de concentração, bem como variação do tempo e temperatura. Estudos evidenciaram que processos endotérmicos não espontâneos não inviabilizam o potencial de aplicação do material como adsorvente (Ackacha e Meftah, 2014; Li *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016)

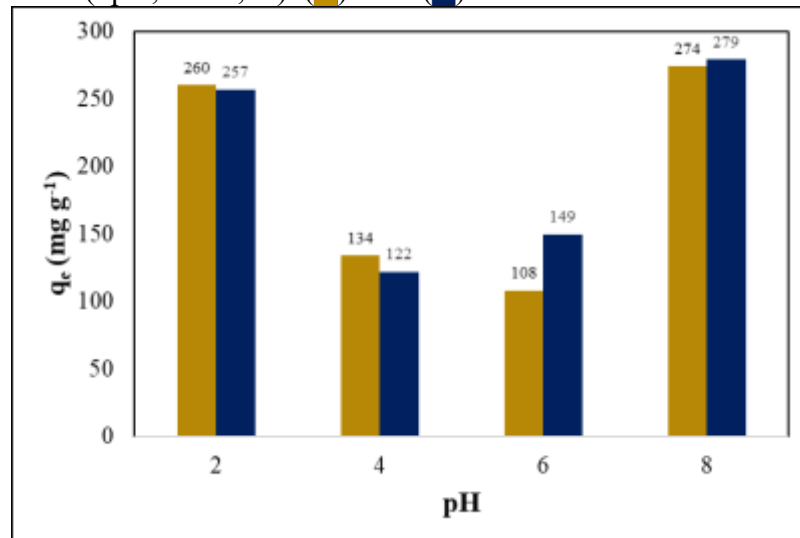
4.3.6.3 Efeito da variação do pH

O efeito da variação do pH na adsorção do óleo usado de motor de navio para as duas biomassas novamente foi incomum, como observado anteriormente para a emulsão com óleo de carro. Os pHs extremos apresentaram melhor resultado, o que reafirma a hipótese inicialmente apresentada sobre o excesso de íons no meio, negativos ou positivos, deslocarem a nuvem eletrônica das longas cadeias de hidrocarbonetos dos óleos. Deste modo, promovem um momento dipolo e facilitam assim a interação dipolo-dipolo com os sítios ativos das biomassas.

A comparação da eficiência entre a SS e a SOH, Figura 20, sugere que os valores de q_e entre SS e SOH com a variação do pH foram semelhantes. Estatisticamente não houve

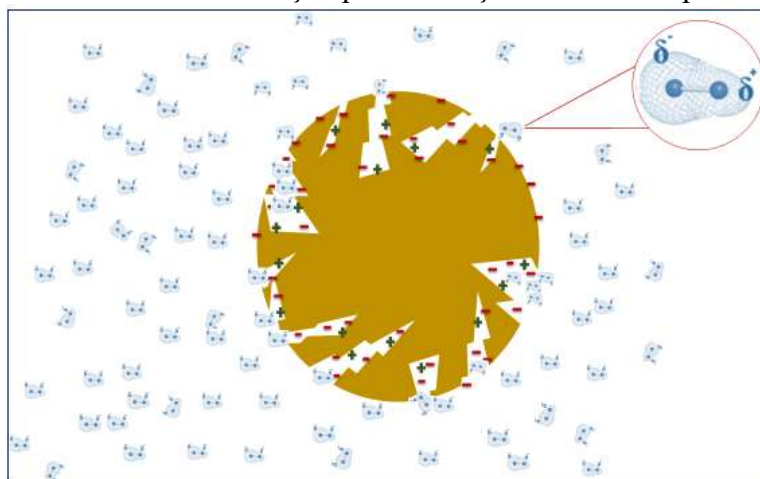
diferenças significativas em adsorção entre as biomassas para os quatro pHs avaliados no óleo de navio.

Figura 20: Capacidade de adsorção de óleo de navio por SOH e SS de acordo com o pH. Condições experimentais: 50 mg do bioissorvente 50 mL de emulsão 200 mg L⁻¹ de óleo em agitação por 15 minutos. (dp 2,09 a 4,23). (■) SS e (■) SOH



A Figura 21 ilustra a hipótese apresentada para formação do momento dipolo das moléculas de óleo e sua interação com a superfície da biomassa. É importante salientar que o pH do meio também interfere na distribuição de cargas na superfície da biomassa. Como discutido anteriormente, na caracterização físico-química do PCZ, o meio pode aumentar ou diminuir as cargas negativas e positivas do bioissorvente.

Figura 21: Ilustração do momento de adsorção pela interação momento dipolo-dipolo



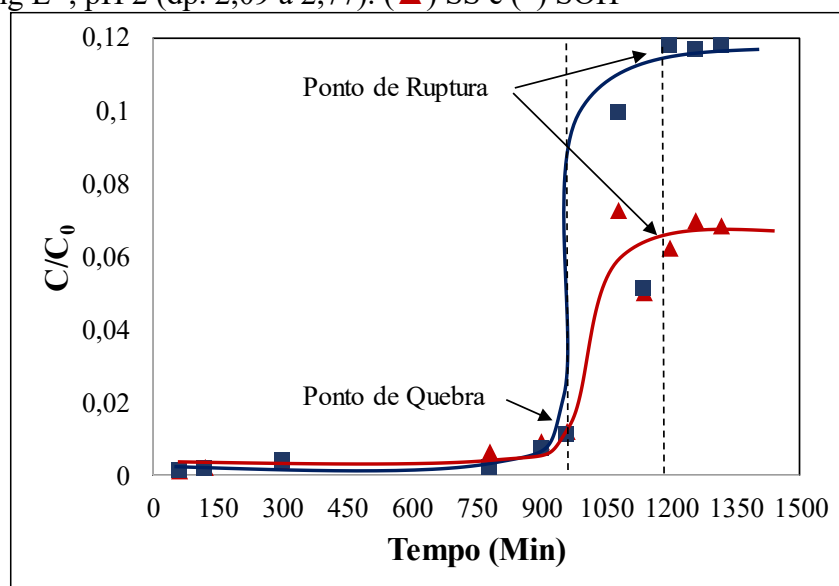
Comportamento inverso foi obtido no estudo de adsorção de nanosilicas em óleo, em que a adsorção foi maior em pH < pH_{pzc}. Esse fato foi atribuído ao aumento das forças de

dispersão em $\text{pH} < \text{pHpzc}$, assim como às forças repulsivas eletrostáticas dominadas em $\text{pH} > \text{pHpzc}$ (Franco *et al.*, 2014).

4.3.6.4 Testes de adsorção em coluna de leito fixo

As curvas de ruptura das colunas para as biomassas SS e SOH obtiveram ponto de quebra em 960 min com ambos os biossorventes, Figura 22. O ponto de ruptura aconteceu no mesmo tempo, 1200 min, para as duas biomassas, porém em concentrações distintas. De acordo com as curvas obtidas, a SS apresentou menor capacidade de adsorção do óleo devido a menor zona de transferência de massa quando comparada a SOH, cujo ponto de ruptura foi superior ao da SS.

Figura 22: Curva de ruptura da coluna de adsorção do óleo de navio para as biomassas SS e SOH. Condições experimentais: 220 mg de biomassa, vazão $0,58 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, concentração da emulsão 12963 mg L^{-1} , pH 2 (dp. 2,09 a 2,77). (\blacktriangle) SS e (\blacksquare) SOH



Os parâmetros para ambas as biomassas se encontram na Tabela 13. É possível observar que os parâmetros calculados para os biossorventes são muito próximos. As biomassas apresentaram um tempo útil expressivo e alta capacidade de saturação. Cabe ressaltar que esses valores são teóricos e se baseiam na concentração constante da emulsão oleosa, bem como no fato de que a mesma não fica presa às paredes do sistema. A comparação entre as duas biomassas foi realizada de acordo com o valor real de óleo retido em cada uma delas. Após a adsorção em coluna, o q_e obtido para a SOH foi de $3,49 \text{ g g}^{-1}$, enquanto que $2,99 \text{ g g}^{-1}$ foi alcançado para a SS. Logo, verificou-se que a SOH apresentou melhor capacidade adsortiva, como observado anteriormente na Figura 22, pela maior zona de transferência de massa.

Tabela 13: Parâmetros da coluna para as biomassas SS e SOH

	SS	SOH
Tempo total (min)	1255	1258
Tempo útil (min)	889	890
Altura útil (cm)	7,08	7,07
Capacidade de saturação (mg.g⁻¹)	42891,09	42993,62
q_e (g g⁻¹)	2,99	3,49

Um estudo separou óleo condensado da água produzida, usando filme fino de carbono amorfo preparado com folhas de dendezeiro, por técnicas de adsorção em leito fixo. Como resultado, encontrou uma adsorção de 132,77 mg g⁻¹ em 6 horas em temperatura ambiente (Fathy *et al.*, 2018).

Em outro estudo, a adsorção de tolueno, benzeno e σ -xilento foi realizada em coluna de leito fixo com carvão de casca de coco. A capacidade máxima de adsorção da coluna ficou em 124 mg.g⁻¹ para benzeno, 150,42 mg g⁻¹ para tolueno e 165,07 mg g⁻¹ para σ -Xilento (Luz, 2012).

Em outra proposta, a remoção de óleo diesel emulsificado e dissolvido em águas residuais de alta salinidade, com óxido de grafeno como adsorvente, obteve uma capacidade máxima de adsorção de 1335 mg g⁻¹, usando 200 mg L⁻¹ de diesel e 1 mg de óxido de grafeno (Diraki *et al.*, 2019).

O modelo de adsorção para colunas Bohart-Adams foi aplicado e suas respectivas constantes para as biomassas SS e SOH estão representadas na Tabela 14.

Tabela 14: Parâmetros obtidos pelo modelo de adsorção Bohart-Adams para as SS e SOH.

	SS	SOH
K_{BA} (mL min⁻¹ g⁻¹)	0,38	0,58
N₀ (cm g⁻¹)	10,185	13,58
R²	0,8767	0,9264

O modelo de Bohart-Adams foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais deste estudo. De acordo com as premissas deste modelo, as interações laterais afetam o processo de adsorção, assim como o sítio de adsorção vizinho mais próximo afeta a difusão do adsorbato na solução para a superfície do adsorvente. A constante K_{AB} mede a velocidade de transferência do adsorbato para o adsorvente, que depende das interações soluto-soluto, soluto-adsorvente e soluto-vizinhança (Almeida, 2019).

4.3.6.5 Teste de dessorção

Os testes de dessorção foram feitos apenas para a SOH, uma vez que, ao adicionar um ácido ou base para provocar a dessorção, a biomassa in natura sofreria reações químicas em sua superfície e não seria possível comparar os ciclos subsequentes com o inicial.

O teste com adição de HNO_3 para provocar a reversão da adsorção obteve resultado oposto ao esperado, pois a biomassa adsorveu ainda mais o óleo. Resultado interessante, uma vez que demonstra que a SOH adsorve em meio extremamente ácido.

O teste com adição de NaOH obteve dessorção de 39,43%, o que aponta para possível reaproveitamento da biomassa. Porém, são necessários estudos futuros sobre ciclos de adsorção, bem como aprimoramento da metodologia de dessorção e recuperação da biomassa.

4.3.6.6 Teste de recuperação

O teste de recuperação do óleo adsorvido pela SOH foi bem-sucedido, com 100% de recuperação do óleo após a lavagem da biomassa com clorofórmio. Esse resultado será de grande importância para os testes de biodegradação com o biorreator no Capítulo 4.

4.3.6.7 Efeito do tempo de contato

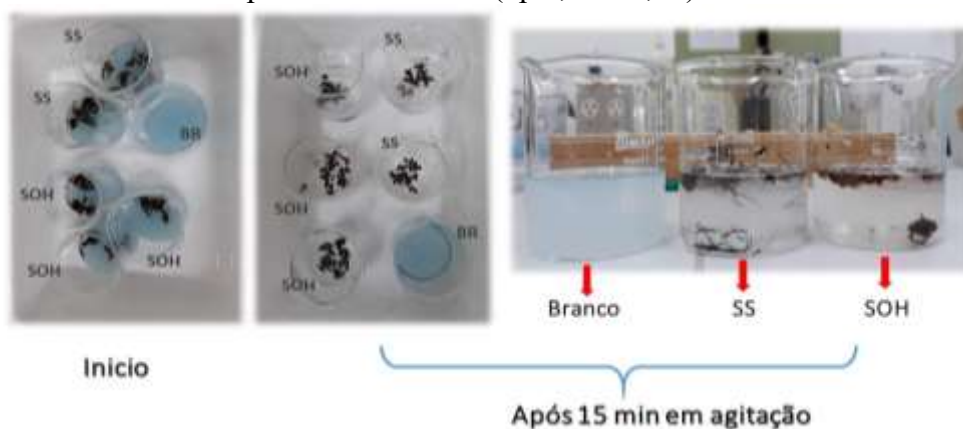
A Figura 23 ajuda a ilustrar a capacidade adsortiva da *Salvinia* sp. e da SOH, além dos gráficos obtidos a partir dos testes anteriores. O trabalho de Barthlott e colaboradores mostrou a eficiência da folha da *Salvinia* sp. em adsorver o filme de óleo, que ocorreu devido à estrutura capilar superficial da planta. (Barthlott *et al.*, 2020)

Figura 23: Adsorção de óleo pela folha da *Salvinia* sp. Fonte: Barthlott *et al.*, 2020.



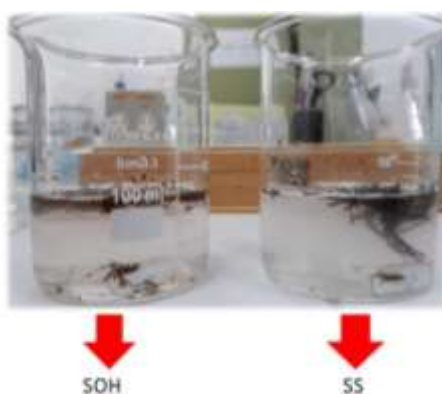
Essa alta eficiência também foi verificada neste trabalho com o uso desta macrófita na forma de biomassa seca (SS), e também da quimicamente modificada (SOH). A Figura 24 mostra a alta capacidade para a adsorção de óleo lubrificante com ambas as biomassas após 15 min em agitação.

Figura 24: Capacidade de adsorção da SS e SOH em óleo lubrificante. Condições experimentais: 50 mg de biomassa em 50 mL de emulsão oleosa salgada 2 g L^{-1} , tempo de contato 15 min a temperatura ambiente. (dp 1,77 a 2,09).



No mesmo experimento, foi possível observar o melhor desempenho da SOH comparada a SS. A Figura 25, em que a solução final da SS aparece mais turva, ajuda a ilustrar essa eficiência, já quantificada em testes anteriores.

Figura 25: Comparação da eficiência de adsorção da SOH e SS para emulsão oleosa.



4.4 CONSIDERAÇÕES

De acordo com os resultados do presente capítulo foi possível avaliar a capacidade de remoção dos óleos lubrificantes por adsorção das biomassas SS e SOH, na qual obtiveram capacidade máxima de adsorção de $930,59$ e $898,00 \text{ mg g}^{-1}$ em 15 minutos, respectivamente.

Os estudos de interação entre os compostos orgânicos e esses bioadsorventes foi realizado e foi possível verificar alta capacidade adsorptiva das biomassas com a variação da concentração dos óleos, rápida reposta de adsorção em 15 minutos, versatilidade de adsorção para diferentes pHs e temperaturas. A variação desses parâmetros evidencia a oleofilia dos bioadsorventes em questão.

A comparação das duas biomassas SS e SOH foi realizada para todos os parâmetros e foi possível considerar que embora a SS tenha apresentado nos testes de adsorção em batelada

maior capacidade adsorptiva comparada a SOH, a biomassa *in natura* mostrou instabilidade na capacidade de retenção dos óleos e maior liberação de interferentes para o meio aquoso.

O potencial de remoção de óleo usado de navio por colunas de adsorção de leito fixo foi verificado e as biomassas SS e SOH obtiveram capacidade máxima de adsorção de 2,99 e 3,49 g g⁻¹ respectivamente. Esses resultados afirmam o caráter de maior capacidade de retenção de óleo da SOH quando comparada a SS.

Por fim, os resultados obtidos apontam o potencial uso da SOH como biossorvente para tratamento de águas oleosas como potencial capacidade de reutilização da biomassa através de lavagens com solventes. No entanto estudos futuros se fazem necessários para averiguação do número de ciclos da biomassa e seu uso em escala piloto e industrial.

REFERÊNCIAS

- ACKACHA M. A, MEFTAH S. A. **Acacia tortilis seeds as a green chemistry adsorbent to clean up the water media from cadmium cations.** Int J Environ Sci, 2014.
- AKAR, T. *et al.*, **Biosorption of Basic Blue 7 by fungal cells immobilized on the green-type biomatrix of Phragmites australis spongy tissue.** International journal of phytoremediation, 2018.
- ALMEIDA, F. B. P. S. *et al.* **Oil produced water treatment using sugarcane solid residue as biosorbent.** Revista Mexicana de Ingeniería Química, 2018.
- ALMEIDA, F. T. R., **Uso de éster misto de bagaço de cana na remoção de Co²⁺ e Ni²⁺ de soluções aquosas em batelada e em coluna de leito fixo.** Tese, Universidade Federal de Ouro Preto, 2019.
- APHA American Public Health Association, **Standard Methods for examination of water and wastewater, 16th Edition**, eds. A. E. Greenberg, R. R. Trussell and L. S. Clesceri, pp. 498-499. APHA, Washington, DC, 1985.
- BEN J, S., & KALLEL, A. **Assessment of Performance of Posidona oceanica (L.) as Biosorbent for Crude Oil-Spill Cleanup in Seawater.** BioMed Research International, 2019.
- BOEHM, H. P. **Some aspects of the surface chemistry of carbon blacks and other carbons,** Carbon, p759-769, 1994.
- BOEHM, H. P. **Surface oxides on carbon and their analysis: a critical assessment,** Carbon 40, p145–149, 2002.
- BONI H. T. **Aplicação de biomassa na redução do teor de óleos e graxas presentes em efluentes aquosos,** Dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina, 2012
- CAMBUIM, K. B., **Carvão de endocarpo de coco da baía ativado quimicamente com H₃PO₄ e fisicamente com vapor d'água: produção, caracterização e aplicações.** Tese, Universidade Federal da Paraíba, 2009.
- CHERUKUPALLY, P., *et al.* **Acid–base polymeric foams for the adsorption of micro-oil droplets from industrial effluents.** Environmental Science & Technology, 2017.
- CONTRERAS, E. SEPÚLVEDA, L PALMA, C. **Valorization of agroindustrial wastes as biosorbent for the removal of textile dyes from aqueous solutions,** Int. J. Chem. Eng. 2012
- CURBELO, F. D. S. **Estudo da remoção de óleo em águas produzidas na indústria de petróleo, por adsorção em coluna utilizando a vermiculita expandida e hidrofobizada.** Dissertação, Universidade Federal do Rio Grande no Norte, 2002
- DAI, Y., ZHANG, N., XING, C., CUI, Q., & SUN, Q. **The adsorption, regeneration and engineering applications of biochar for removal organic pollutants: a review.** Chemosphere, 2019.
- DIRAKI, A. *et al.* **Removal of emulsified and dissolved diesel oil from high salinity wastewater by adsorption onto graphene oxide.** Journal of Environmental Chemical Engineering, v. 7, n. 3, p. 103106, 2019.
- DIRAKI, A. MACKAY, H. MCKAY, G. AHMED, A. **Removal of oil from oil–water emulsions using thermally reduced graphene and graphene nanoplatelets.** Chemical Engineering Research and Design, 2018
- DO, D. D. **Adsorption analysis: equilibria and Kinetics.** London: Imperial College Press, 1998.

- ELANCHEZHIAN, S. S. D, *et al.* **Effective adsorption of oil droplets from oil-in-water emulsion using metal ions encapsulated biopolymers: Role of metal ions and their mechanism in oil removal.** International journal of biological macromolecules, 2018.
- ENAIME, G. *et al.* **Preparation and characterization of activated carbons from olive wastes by physical and chemical activation: application to Indigo carmine adsorption.** J Mater Environ Sci, 2017.
- FATHY, M. *et al.* **Adsorption separation of condensate oil from produced water using ACTF prepared of oil palm leaves by batch and fixed bed techniques.** Egyptian journal of petroleum, v. 27, n. 3, p. 319-326, 2018.
- FATHY, M.; *et al.* **Adsorption Separation of Condensate Oil from Produced Water Using ACTF Prepared of Oil Palm Leaves by Batch and Fixed Bed Techniques.** Egypt. J. Pet. 2018.
- FRANCO, C. A., *et al.* **Adsorptive removal of oil spill from oil-in-fresh water emulsions by hydrophobic alumina nanoparticles functionalized with petroleum vacuum residue.** *Journal of Colloid and Interface Science*, 2014.
- HENDERSON, S. B., *et al.* **Potential impact of production chemicals on the toxicity of produced water discharges from North Sea oil platforms,** Marine pollution Bulletin, 1999.
- IUPAC - International union of pure and applied chemistry, **Reporting Physisorption data for g₂/solid systems with special reference to determination of surface area and porosity.** Pure. & Appl. Chem, 1995.
- JIS K 1474. JAPANESE INDUSTRIAL STANDARD: **Test methods for activated carbon.** Japanese Standards Association, Tokyo, 1992.
- JU, Y. H. *et al.*, **Analysis of soluble and insoluble fractions of alkali and subcritical water treated sugarcane bagasse.** Carbohydrate polymers, 83(2), 591-599. 2011
- JUANG, R, WU, F, TSENG, R. **Characterization and use of activated carbons prepared from bagasses for liquid-phase adsorption** *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2002.
- LEITE, N. S. *et al.*, **Hydrocarbon Removal of Aqueous Effluents Using *Casuarina Equisetifolia* Cones Activated Carbon.** Sci. Plena 2017.
- LI, Y.; *et al.* **A green adsorbent derived from banana peel for highly effective removal of heavy metal ions from water.** RSC Adv, 2016.
- LIU, C.; *et al.* **Chemical modification of ultrasound-pretreated sugarcane bagasse with maleic anhydride.** Industrial Crops and Products, v. 26, n. 2, p. 212-219, 2007.
- LIU, L.; *et al.* **Crude Oil Removal from Aqueous Solution Using Raw and Carbonized *Xanthoceras Sorbifolia* Shells.** Environ. Sci. Pollut. Res. 2018.
- LUZ, A. D.; *et al.* **Aplicação de coluna de adsorção em leito fixo para a remoção de compostos BTX multicomponentes presentes em efluentes petroquímicos.** Tese Universidade Federal de Santa Catarina, 2012
- MOKHTAR, N. E.A. *et al.* **Biosorption of azo-dye using marine macro-alga of *Euchema Spinosum*,** J. Environ. Chem. Eng, 2017.
- NASCIMENTO R. R; *et al.* **Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais.** Fortaleza: Imprensa Universitária, 2014.

- NGANG, H.P.; *et al.* **Adsorption-Desorption Study of Oil Emulsion towards Thermo-Responsive PVDF/SiO₂-PNIPAM Composite Membrane**, Journal of Environmental Chemical, 2017
- OKIEL, K.; EL-SAYED, M.; EL-KADY, M. Y. **Treatment of Oil–Water Emulsions by Adsorption onto Activated Carbon, Bentonite and Deposited Carbon**. Egypt. J. Pet. 2011.
- RAZAVI, Z, MIRGHAFARI, N. REZAEI, B. **Performance comparison of raw and thermal modified rice husk for decontamination of oil polluted water**, CLEAN–Soil, Air, Water, 2015.
- REGALBUTO, J. O., ROBLES, J. R. **The Engineering of Pt/Carbon Catalyst Preparation For application on Proton Exchange Fuel Cell Membrane**, Catalysis Laboratory, University of Illinois at Chicago, Progress Report, 2004
- RENGANATHAN, S, *et al.* **Equilibrium and Kinetic Studies on the Removal of Reactive Red 2 Dye from an Aqueous Solution Using a Positively Charged Functional Group of the *Nymphaea rubra* Biosorbent**. Clean, 2009.
- SAHMOUNE, M. N. **Evaluation of thermodynamic parameters for adsorption of heavy metals by green adsorbents** Environmental Chemistry Letters, 2019.
- SILVA, E. S. D. **Remoção de arsênio de solução aquosa por adsorção em sabugo de milho impregnado com hidróxidos de ferro**. Dissertação. Universidade Federal de Ouro Preto, 2020.
- SILVA, F., R., **Aplicação de tratamento organosolv ao bagaço de cana para utilização na descontaminação de águas contendo metais pesados**. Dissertação. Universitário de Volta Redonda, 2016.
- SILVERSTEIN, R. M., e Webster, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6th ed. Livros Técnicos e Científicos Editora SA. 1998
- SING, K. S. W. **Reporting physisorption data for gas/solid systems with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity**. Provisional international union of pure and applied chemistry, 1982.
- STAFUSSA, A. P. **Antocianinas do bagaço de uva: extração e biossorção em *Saccharomyces cerevisiae***, Dissertação, Universidade Federal do Paraná, 2014.
- SOARES, S. E. **Ácidos fenólicos como antioxidantes**. Revista de nutrição, 2002.
- SOUZA, C. D. R., & CARVALHO, S. F. **Avaliação da cinética de adsorção do Negro de Eriocromo T em carvão ativado produzido a partir do lodo de ETA**. Scientia Amazonia, v. 9, n.1, C1-C7, 2020
- SCHMIDTS, T.; *et al.*, **Development of multiple W/O/W emulsions as dermal carrier system for oligonucleotides: Effect of additives on emulsion stability**. International Journal of Pharmaceutics, v.398, p.107-113. 2010.
- SU, J, *et al.* **Synergistic effects of polyglycerol ester of polyricinoleic acid and sodium caseinate on the stabilisation of water–oil–water emulsions**. Food Hydrocolloids, 2006.
- WU C. H.; KUO C. Y.; GUAN S. S. **Adsorption of heavy metals from aqueous solutions by waste coffee residues: kinetics, equilibrium, and thermodynamics**. Desalin Water Treat, 2016.

YANG, H.; *et al.* **Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis.** Fuel, v. 86, n. 12-13, p. 1781-1788, 2007.

YU, H.; *et al.* **Separation of oil-water emulsion and adsorption of Cu (II) on a chitosan-cellulose acetate-TiO₂ based membrane.** Chemosphere, 2019.

ZAGO, J. F. **Influências das características físico-químicas de carvões ativados na adsorção de saxitoxinas,** tese, Universidade de Brasília, 2010.

5 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS NA BIODEGRADAÇÃO DE ÓLEO

5.1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos podem ser encontrados nos mais diversos ambientes da crosta planetária, como fora dela, sendo possível não só observar sua interação com diferentes formas de vida como também sua capacidade de adaptação e sobrevivência a ambientes hostis. Além disso, desempenham caráter essencial na manutenção de ecossistemas, como, por exemplo, por meio dos ciclos biogeoquímicos (Oliveira, 2009).

A biosfera é constituída de diversos compostos. Dentre eles, os mais abundantes são os hidrocarbonetos. É possível que muitas espécies microbianas tenham desenvolvido a capacidade de utilizar os hidrocarbonetos provenientes do petróleo e seus derivados como fonte de carbono e energia (Boopathy, 2000; Tonini *et al.*, 2010). A capacidade desses microrganismos de promover o rompimento das ligações entre as cadeias de hidrocarbonetos é conhecida como biodegradação, em que o microrganismo é capaz de decompor uma longa cadeia carbônica total ou parcialmente (Boopathy, 2000).

O procedimento de isolar e identificar microrganismos degradadores de hidrocarbonetos de petróleo, é encorajado pela distribuição antropogênica deste contaminante e seus efeitos, possivelmente, prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente. Estudos apontam que a microbiota residente em locais contaminados por hidrocarbonetos se deve a um processo de adaptação, no qual ocorre uma seleção das espécies, sobrevivendo aquelas mais resistentes ao contaminante. Dessa forma, os microrganismos tendem a se adaptar às limitações com o uso de seus próprios produtos genéticos. (Abbasian *et al.*, 2016; Maier; Gentry, 2015).

Nesse processo de adaptação, a comunidade microbiana degradadora dos hidrocarbonetos pode sofrer uma queda temporária no número total de indivíduos, seguida de um aumento repentino na massa celular. Esse perfil indica uma melhoria no potencial genético da microbiota, o que resulta em maior eficiência enzimática e aumento da biodegradação dos poluentes, já que as enzimas são as responsáveis por esse processo (Abbasian *et al.*, 2016; Maier; Gentry, 2015).

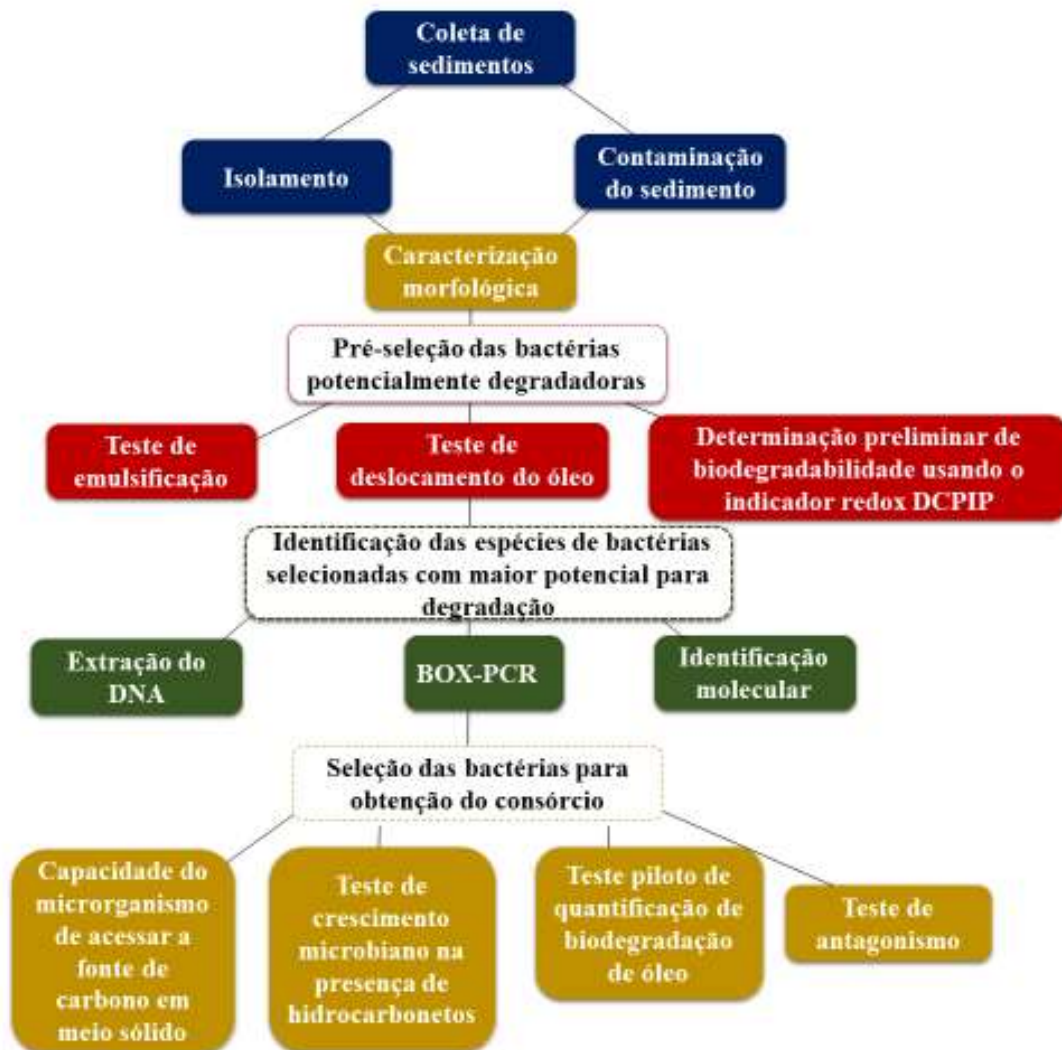
Neste capítulo foi feito o estudo de coleta, cultivo, identificação e seleção de microrganismos com potencial para biodegradar hidrocarbonetos derivados do petróleo, com ênfase ao óleo de motor de navio usado, visando atingir os seguintes objetivos específicos:

- d) Identificar e isolar bactérias coletadas em sedimento da Baía da Guanabara;
- e) Verificar a capacidade de biodegradação de óleo lubrificante usado de motor de navio;

5.2 METODOLOGIA

Abaixo segue o resumo esquemático da metodologia abordada neste capítulo, Figura 26.

Figura 26: Fluxograma referente à metodologia aplicada neste capítulo.



5.2.1 Área de amostragem e coleta

Foram realizadas três coletas ao longo da Baía de Guanabara, cujos pontos escolhidos se localizavam em áreas próximas aos locais de maior contaminação, provenientes de fontes de derivados do petróleo. Uma pá de metal auxiliou na coleta das amostras de sedimento, cuja camada superficial de cerca de 10 cm de profundidade foi retirada para remoção de microrganismos recentes (Rizzo *et al.*, 2014). Três amostragens foram realizadas no mesmo

ponto, com uma distância de até dois metros entre elas. Após a coleta, a amostra era confinada em recipiente plástico estéril e, por fim, armazenada em bolsa térmica para a manutenção de sua temperatura ambiente.

5.2.2 Isolamento das bactérias a partir do sedimento *in natura*

O isolamento dos microrganismos utilizou a técnica de diluição seriada, em que 10 g de cada sedimento foram transferidas para Erlenmeyers de 250 mL com 90 mL de solução salina 0,8% (m/v) cada. Em seguida, realizou-se a diluição seriada, que consistia em transferir 1 mL dessa suspensão para tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina. Então, uma alíquota de 1 mL foi retirada e transferida para outro tubo também com 9 mL de salina e, assim sucessivamente até a diluição na ordem de 10^{-4} . De cada tubo, foi retirada uma alíquota de 0,1 mL e plaqueada por espalhamento com auxílio da alça de Drygalski, em triplicata, em placa de Petri, contendo agar nutriente (extrato de carne 1 g L^{-1} , extrato de levedura 2 g L^{-1} , peptona 5 g L^{-1} , NaCl 5 g L^{-1} , agar bacteriológico 15 g L^{-1} e 150 mg L^{-1} de ciclohexamida em pH 6,8) como meio de cultura. A incubação foi efetuada em estufa de secagem e esterilização, Solab modelo SL-100, a 35°C por 48 horas. Após esse período, foi realizada a contagem de colônias de cada placa. A seguir, as bactérias foram isoladas pela técnica de esgotamento por estrias múltiplas, em placas de Petri com meio agar nutriente, e deixadas em incubação por 24h a 35°C . Repetiu-se esse procedimento até que as colônias estivessem livres de contaminação. Após a purificação, as bactérias obtidas foram conservadas em meio glicerol e mantidas congeladas a -4°C .

5.2.3 Isolamento das bactérias a partir do sedimento contaminado

Um ambiente contaminado foi simulado com o intuito de isolar bactérias resistentes à contaminação. Para tal, 250 μL de uma mistura de 1+1 de óleo usado de motor de navio e óleo de motor de barco foi adicionada a 25 g de sedimento em erlenmeyer de 125 mL. Esse sistema foi incubado por 15 dias a 35°C (Dantas, 2016). O mesmo procedimento foi realizado com óleo de motor de carro como agente contaminante. Após o período de incubação, o cultivo e isolamento das bactérias foi realizado de acordo com o descrito no item 2.2.

5.2.4 Caracterização morfológica das bactérias isoladas

Após o isolamento das bactérias do sedimento *in natura* e do sedimento contaminado, cada uma delas foi inoculada em placa de Petri com meio agar nutriente por 20h a 35°C para a observação das características macroscópicas das colônias formadas. Posteriormente, foi

aplicada a coloração de Gram para verificar o tipo de bactéria e as suas características estruturais microscópicas.

5.2.5 Pré-seleção das bactérias potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos.

Os testes que seguem foram utilizados para a seleção do consórcio bacteriano para compor o biorreator.

5.2.5.1 Teste de emulsificação

A capacidade de emulsificação das bactérias isoladas foi testada para verificar a produção de biossurfactantes. As células microbianas foram deixadas em agitação, 150 rpm, em caldo nutriente (peptona 10 g L⁻¹, extrato de levedura 5 g L⁻¹ e NaCl 1 g L⁻¹ em pH 7), por 48h, a 35°C. Após centrifugação, a 500 x g por 10 min, 2 mL do sobrenadante foram retirados, adicionados a 2 mL de óleo lubrificante e agitados por 2 min em vórtex. O sistema foi deixado em repouso por 6 horas para verificação da estabilidade da espuma formada (Cooper e Goldenberg; 1987). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

5.2.5.2 Teste de deslocamento do óleo

Para a realização do teste de deslocamento do óleo, as bactérias foram previamente inoculadas em glucose 5 g L⁻¹ por 24 h, a 35°C e 150 rpm. Um volume igual a 15 mL de água destilada foi colocado em placas de Petri com 5 cm de diâmetro. Para produzir uma camada apolar, 250 µL de óleo lubrificante foram acrescentados lentamente para a formação do filme de óleo. O óleo de motor de carro foi escolhido como lubrificante, por ser mais denso e produzir uma película mais estável. Em sequência, 10 µL do inóculo do microrganismo em glucose, foram adicionados sobre o filme formado. O resultado considerado positivo foi a formação de um halo, proveniente do espalhamento do óleo. Por outro lado, quando a gota apenas se dissolveu na água sem promover alteração na lâmina de óleo, o resultado foi negativo. A água destilada foi utilizada como controle negativo, enquanto que solução de Extran 5%, como controle positivo (Kreischer; Silva, 2017). Todos os testes foram feitos em triplicata.

5.2.5.3 Determinação preliminar de biodegradabilidade usando o indicador redox DCPIP

Células das bactérias isoladas foram inoculadas em erlenmeyers de 50 mL contendo 15 mL de meio mínimo acrescido de 1% (m/v) de glicose e 0,1% (m/v) de extrato de levedura, em agitação a 150 rpm, por 48 horas a 35°C (Peixoto e Vieira, 2005). A padronização da concentração dos microrganismos foi determinada pela escala de Mac Farland tubo de nº 3. Após a padronização, uma alíquota de 1 mL foi transferida para tubo eppendorf estéril e centrifugada por 5 min a 500 x g. O sobrenadante foi removido e 1 mL de salina 0,8% (m/v)

adicionado ao tubo, seguido de centrifugação por 5 min a 500 x g. O sobrenadante foi retirado e descartado, e, às células, foi adicionado 1 mL de meio mínimo.

Em placa de acrílico com 96 micropoços, previamente esterilizada com luz UV por 30 min, 20 µL de suspensão de microrganismo, 168 µL de meio mínimo, 12 µL de solução de sal de sódio 2,6 dicloroindofenol (DCPIP) 1 g L⁻¹, e, por fim, 2µL de contaminante (óleo de motor de carro, óleo de motor de barco, óleo usado de motor de navio e óleo diesel S500) foram adicionados em cada micropoço. As amostras foram incubadas por 24 h, a 35°C. Poços de controle negativo contendo a mistura descrita acima, sem a suspensão de microrganismo foram preparados para cada um dos contaminantes, que foram testados separadamente e em triplicata (Oliveira, 2009). A leitura do resultado foi realizada conforme a mudança de coloração de azul claro para incolor, de forma visual. De acordo com a metodologia, essa mudança significa que houve a oxidação do corante, indicando a degradação do contaminante.

Esse teste foi repetido para todas as bactérias, porém aumentando o tempo e o volume da reação, Figura 27. Em frascos de penicilina de 20 mL, o sistema foi constituído de 1,5 mL de meio Bushnell-Hass (K₂HPO₄ 1 g L⁻¹; KH₂PO₄ 1 g L⁻¹; NH₄NO₃ 1 g L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 200 mg L⁻¹; FeCl₃ 50 mg L⁻¹; CaCl₂.2 H₂O 20 mg L⁻¹ em pH 7), com 0,480 mL de inóculo e 20 uL de contaminante (óleo de motor de carro, óleo de motor de barco, óleo usado de motor de navio e óleo diesel S500), submetido à agitação de 150 rpm por 48 h, a 35°C. Também foram feitos controles negativos sem adição de inóculo. Após esse tempo, foram adicionados 1,5 µL de DCPIP para indicar a presença ou ausência de oxidação do meio, sendo considerado positivo os sistemas que permaneceram incolores após a adição do DCPIP (Hanson *et al.*, 1993). Este procedimento foi repetido com alteração no tempo de 48 h para 168 h a fim de verificar maiores modificações no sistema.

Figura 27: Início do teste de oxidação do corante 2,6 diclorofenol-indofenol para o processo de biodegradação em frascos de penicilina



5.2.6 Identificação das espécies de bactérias selecionadas com maior potencial para degradação

5.2.6.1 Extração do DNA

A extração do DNA foi desenvolvida a partir dos isolados crescidos em agar nutriente por 48h, a 35°C. Após esse período, a biomassa formada foi diluída em 400 uL de salina 0,5% (m/v). Na sequência, a extração do DNA foi realizada, seguindo o protocolo do kit comercial Zymo Research. A leitura em espectrofotômetro Uv-visível (Shimatzu BioSpec-nano), em comprimento de onda 260 nm, confirmou e quantificou o DNA extraído.

5.2.6.2 BOX-PCR

O BOX-PCR foi realizado utilizando o iniciador BOXA1R (5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3'). Em tubos microtubos de 1 mL, adicionou-se 10µL de tampão de PCR 5X da Promega®, com 5µL de MgCl₂ 3,75mM, com 5µL de dNTP 10 µM da Promega®, com 2 µL do primer A1R 10 µM, com 0,5 µL de *Taq* DNA polimerase, com 1 µL de DNA e 26,5 µL de água MilliQ estéril q.s.p. O ciclo aplicado foi, primeiro, 7 min a 95°C; em seguida, 1 min a 94°C, e depois, 1 min a 53°C e 8 min a 65°C. Esse segundo passo foi repetido na mesma ordem por 30 vezes e, por último, 16 min a 65°C e, a seguir, as amostras foram resfriadas a 4°C.

Esses produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 1,4% corado com corante Safer. As amostras de DNA (7 uL) foram misturadas com o corante para eletroforese (3 uL) e, assim, aplicadas no gel. No último poço, foram acrescentados 5 µL do marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Promega Ò). Então, o gel foi submerso em solução tampão TEB (Tris 10,7 g L⁻¹, EDTA 0,58 g L⁻¹ e ácido bórico 5,5 g L⁻¹), corrente elétrica de 90 V, por 240 min para verificar a amplificação por PCR. Em seguida, o gel foi observado e fotografado sob luz UV no sistema de análise de imagens IMAGO (B & L, Holanda). Para análise do perfil de bandas gerado, foi feito um dendograma com o programa BioNumerics.

5.2.6.3 Identificação molecular

Os microrganismos foram identificados molecularmente através do sequenciamento de parte do gene, que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal. Dessa forma, foram realizadas reações de PCR, utilizando-se os iniciadores universais pA (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' - forward) e pH (5' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3' - reverse) (Massol-Deya *et al.*, 1995). Em microtubos de 800uL, foram adicionados 5µL de tampão de PCR 5X da Promega®, 2,5 µL com 1,5 mM de MgCl₂ com 0,5 µL de dNTP 1 mM,

com 0,5 μL do prime pH 1 μM , com 0,5 μL do prime PA 1 μM , com 0,2 μL de *Taq* DNA polimerase 2,5 U com 1 μL de DNA da amostra na concentração entre 50 a 100 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ e 100 μL água Milli-Q. O ciclo aplicado foi, primeiro, 2 min a 94°C; segundo, 70s a 94°C, e depois 30 s a 48°C e 2 min e 10s a 72°C. Também aqui, esse segundo passo foi repetido na mesma ordem por 35 vezes e, por último, 2 min a 72°C, seguido de resfriamento das amostras a 4°C.

Os produtos de PCR foram purificados com o kit comercial “WizardTM Rapid PCR Purification System” (Promega ®) e sequenciados pela Plataforma de Sequenciamento de DNA - RPT01A – Fiocruz. O resultado da sequência do gene, que codifica o 16S rRNA, foi comparado com cepas de referência com nomes publicados validamente, usando banco de dados GenBank e a ferramenta BLAST-N (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para confirmar a identidade da cepa PVGOC-3. Em seguida, as sequências foram alinhadas no BioEdit Sequence Alignment Editor e importadas para a construção de uma árvore filogenética pelo método Neighbor-Joining, no programa MEGA X (Tamura *et al.*, 2013).

5.2.7 Capacidade do microrganismo para acessar a fonte de carbono em meio sólido

A capacidade do microrganismo para acessar a fonte de carbono em meio sólido foi avaliada usando, como fonte de carbono, o óleo de motor de navio e óleo de motor de barco (Arulazhagan; Vasudevan, 2011). As bactérias foram inoculadas pela técnica de espalhamento superficial em placa de Petri com meio BH, agar 15 g L^{-1} , em pH 7, suplementado com 0,02 % de óleo, em triplicata. Como controle negativo, os microrganismos foram inoculados em placas, contendo somente o meio BH e agar, em pH 7. Todas as placas foram incubadas a 35°C por 7 dias.

5.2.8 Teste de crescimento microbiano na presença de hidrocarbonetos

Para o preparo do inóculo, as bactérias a serem testadas foram previamente cultivadas em caldo nutriente por 48h, a 35°C. Em erlenmeyer de 125 mL, foram adicionados 25 mL de Meio BH e 250 μL de óleo usado de motor de navio, seguido de adição de 10 μL do inóculo e agitação de 150 rpm, a 35°C, por 7 dias, em triplicata. Ao final do período de incubação, uma alíquota de 2 mL foi retirada e submetida à leitura em espectrômetro (Biospectro sp-22 manual) a 600 nm para verificar o crescimento dos microrganismos (Das e Mukherjee, 2007).

5.2.9 Teste piloto de quantificação de biodegradação de óleo

As estirpes, previamente crescidas em caldo nutriente, foram inoculadas (480 μL de inóculo) em frascos de penicilina de 20 mL, contendo 1,5 mL de meio BH, e 20 μL de óleo de motor de navio, e mantidas em agitação de 150 rpm, a 35°C, por 7 dias, em triplicata. O controle

negativo foi feito sem adição de inóculo, em triplicata. Após esse período, em cada frasco, foram adicionados 5 mL de clorofórmio e deixados em agitação por 15 min. Em seguida, o sobrenadante foi retirado, a solução orgânica analisada no espectrofotômetro UV-Visível (UV-2600 SHIMADZU), e realizada a varredura de 200 a 800 nm. Por fim, a quantificação do óleo foi determinada pela absorvância indicada (Capítulo 1 item 2.7).

Os cálculos para a porcentagem de biodegradação do óleo foram feitos de acordo com a equação 15:

$$\% \text{ de biodegradação} = \left(\frac{C_{CN} - C_f}{C_{CN}} \right) \times 100\% \quad \text{Equação 15}$$

Onde, C_{CN} : Concentração inicial de óleo, realizado pelo controle negativo e C_f : concentração final de óleo.

A estatística dos resultados obtidos pelas cepas foi realizada pela análise de variâncias ANOVA, seguida do teste de médias Turkey, no Excel. A tabela com os resultados obtidos segue no APÊNDICE C.

5.2.10 Teste de antagonismo

Para verificar a existência de inibição de crescimento entre as colônias, em uma mesma placa de Petri, contendo agar nutriente, quatro estirpes em formato da letra “E” foram inoculadas, utilizando swabs, e mantidas a 35°C, por 24h. Os testes foram feitos em triplicata e com análise combinatória entre as cepas bacterianas (Williston, Zia-Walrath e Youmans, 1947).

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

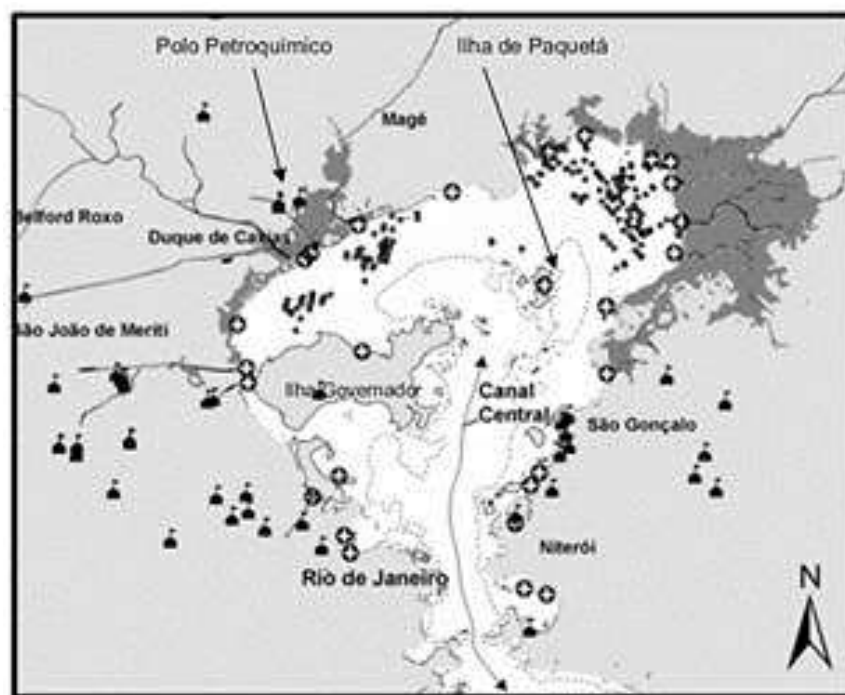
5.3.1 Coleta, contaminação do sedimento com óleo e isolamento de microrganismos

A baía de Guanabara tem grande importância econômica, social e ambiental, devido a sua localização central na região metropolitana do Rio de Janeiro. É ambiente eutrofizado, que abriga diversas espécies de peixes. Sujeita a forte urbanização e industrialização, apresenta um histórico de ambiente altamente degradado em função da poluição doméstica e industrial, responsáveis pela grande quantidade de matéria orgânica, nutrientes, hidrocarbonetos, entre outros contaminantes, que são descarregados diariamente na baía. Como resultados dessa poluição progressiva, elevados níveis de HPAs são registrados nas águas, sedimentos e em alguns invertebrados e vertebrados, presentes na Baía de Guanabara (Resende *et al.*, 2016; Barros *et al.*, 2018).

A bacia hidrográfica da baía de Guanabara abrange uma área de cerca de 4.000 Km², sendo o ponto central de uma complexa bacia de drenagem, onde desaguam cerca de 35 rios

principais. Sua bacia hidrográfica engloba 15 municípios com cerca de 14.000 indústrias, além de abranger o 2º maior parque industrial do país, que inclui uma das maiores refinarias. O despejo de esgotos, os derrames de óleo, intensa atividade de navegação, assoreamento e a presença de contaminantes químicos, como os HPAs, de materiais tóxicos, tais como metais, hidrocarbonetos, matéria orgânica e nutrientes de origem antrópica em suas águas têm contribuído para o aumento de sua poluição (Resende *et al.*, 2016; Barros *et al.*, 2018). Essas características sócio-físico-econômica da Baía de Guanabara podem ser observadas na Figura 28.

Figura 28: Características sócio-físico-econômica da Baía de Guanabara. (●) Currais pesqueiros, (▲) Indústrias, (⊕) Esgoto, (---) Hidrografia, (■) Manguezal. Fonte: Menicone, 2007.



A Baía de Guanabara, localizada na região metropolitana do Rio de Janeiro, apresenta grande importância econômica, social e ambiental para a região na qual está inserida (Barros *et al.*, 2017). Por estar localizada em uma região densamente urbanizada e industrial, a baía apresenta ambiente altamente eutrofizado, em função da poluição doméstica e industrial (Kjerfve *et al.*, 1997; Barros *et al.*, 2018).

O primeiro ponto de coleta foi identificado como EI (Figura 29), localizado a S 22°47'377 e W 43°11'322. O local encontrava-se bastante eutrofizado, com presença de matéria orgânica densa na superfície do sedimento. Esta área foi escolhida devido à

proximidade com navios desativados e a baixa maré, que permite a permanência de microrganismos no sedimento por maior período.

Figura 29: Primeiro ponto de coleta às margens da Baía de Guanabara, próximo a um estaleiro.



O sedimento superficial foi removido, cerca de 10 cm (Figura 30), para amostrar o sedimento com microrganismos persistentes (Rizzo *et al.*, 2014). Após a coleta, dezesseis colônias de aparência distinta foram isoladas deste ponto. Parte deste sedimento foi contaminada e, após período de 15 dias, foram isoladas dezenove colônias de aparência distinta.

Figura 30: Aparência do sedimento coletado no primeiro ponto de amostragem (EI)



O segundo ponto amostrado, Figura 31, foi na área próxima a um manguezal, localizado em S 22°47'377 e W 43°11'322. Os manguezais são ambientes favoráveis ao crescimento de microrganismos degradadores de derivados do petróleo, em especial os hidrocarbonetos. Isso se deve à lenta dinâmica dos manguezais, que recebe nutrientes vindo do mar em épocas de

cheia, para depois promover a manutenção e renovação da vida marinha nos períodos de estiagem (Oliveira, 2006).

Figura 31: Segundo ponto de amostragem, área de manguezal, às margens da Baía de Guanabara.



O sedimento foi amostrado e treze colônias de aparência distinta foram isoladas a partir deste ponto. Posteriormente, esse sedimento foi contaminado, e nove colônias de aparência distinta foram isoladas após um período de 15 dias.

O terceiro ponto posicionado abaixo de uma ponte de tráfego intenso, localizada em S 22°50'023 e W 43°14'465. A área de localização deste ponto abrange grande circulação de automóveis, que, em períodos chuvosos, contamina ainda mais o ambiente já eutrofizado com resíduos de combustíveis de lubrificantes.

Figura 32: Terceiro ponto de amostragem, área de tráfego intenso, constituída por sedimento arenoso.



Diferente dos demais, o terceiro ponto possui solo arenoso (Figura 32), o que pode constituir uma biota diferente dos anteriores, uma vez que este tipo de sedimento permite uma

maior aeração das camadas inferiores. A partir da amostra coletada, vinte e nove colônias de aparência distinta foram isoladas, enquanto que, na parte do sedimento contaminado, isolou-se dezoito colônias de aparência distinta. No total, cento e cinco microrganismos foram isolados, sendo cinquenta e oito nos sedimentos *in natura* e quarenta e sete naqueles contaminados pelos óleos lubrificantes de navio e carro.

O objetivo da contaminação com óleo lubrificante foi limitar os nutrientes disponíveis aos microrganismos ali presentes, a fim de simular ambientes contaminados, visto que esse é um problema comum em certos ambientes marinhos. De acordo com a literatura, os microrganismos utilizam seus próprios produtos genéticos para se adaptar à escassez de nutrientes do local, em que é possível notar uma queda abrupta do número de células, seguida de um aumento da massa celular. Durante o processo de adaptação, somente os microrganismos que possuem o gene responsável pela degradação de hidrocarbonetos conseguem manter sua atividade energética, adaptando sua fisiologia para um consumo mínimo de nutrientes e minerais. Então, o potencial genético da microbiota é melhorado, resultando em maior competência enzimática, responsável pelas vias de biodegradação dos poluentes, que utilizam esses compostos como fonte de carbono e energia (Abbasian *et al.*, 2016; Maier; Gentry, 2015).

A Baía de Guanabara é um ambiente de vasta riqueza ecológica, onde há uma diversidade microbiológica de grande potencial biotecnológico. Diversos estudos isolaram diferentes microrganismos desse local, como, por exemplo *Vibrio alginolyticus* (Lafisca *et al.*, 2008), *Raoutella ornithinolytica*, *Providencia rettgeri*, *Salmonella ssp.*, *Kluvera spp.* (Viana, 2011). As espécies *B. subtilis* (Krepsky, *et al.*, 2007) e *Bacillus sp.* (Souza-Maciel *et al.*, 2006) também foram isoladas de solos contaminados por hidrocarbonetos do petróleo na Baía de Guanabara, o que corrobora os resultados encontrados neste trabalho, em que vinte e duas bactérias identificadas geneticamente pertencem ao gênero *Bacillus*.

Assim como na coleta da *Salvinia sp*, a coleta realizada dos sedimentos foi cadastrada no SISGEN com número de cadastro AAB138D para microrganismos isolados.

5.3.2 Caracterização morfológica dos microrganismos

Os microrganismos foram identificados morfológicamente por meio da estrutura de suas colônias, características microscópicas e pela coloração de Gram após o isolamento e purificação. A Tabela (APÊNDICE E) apresenta a imagem macroscópica e microscópica de cada estirpe isolada. Todos os 105 microrganismos obtidos foram identificados como bactérias Gram positivas, em formato de bastonetes e formadoras de endósporos elípticos, e assim identificadas preliminarmente como bactérias do gênero *Bacillus* (Krepsky, *et al.*, 2007). Sendo

este gênero de bactérias comumente encontrado em sedimentos ambientais. A diferença entre essas bactérias se deve à formação de suas colônias, que possuíam organização distinta, e o tamanho dos bacilos.

A cada cepa foi designada um código alfanumérico de identificação, que foi utilizado até a identificação molecular de cada espécie.

5.3.3 Teste de emulsificação

Entre as cento e cinco bactérias isoladas, setenta e uma apresentaram resultado positivo para emulsificação, indicando formação do biossurfactante por apresentarem espuma permanente após seis horas. A ação espumante é uma das características dos biossurfactantes. Esses compostos auxiliam na promoção da biodegradação, pois reduzem as tensões interfacial e a superficial, causadas pelo contato de compostos polares com apolares, como também colaboram para redução da concentração crítica de micelas (Dadrasnia; Ismail, 2015). Na indústria do petróleo, os biossurfactantes podem ser aplicados em recuperação aprimorada de óleo, derramamentos de óleo, limpeza de navios contaminados com óleo, controle de viscosidade, emulsificação de óleo e remoção de óleo bruto do lodo (Montagnolli *et al.*, 2015).

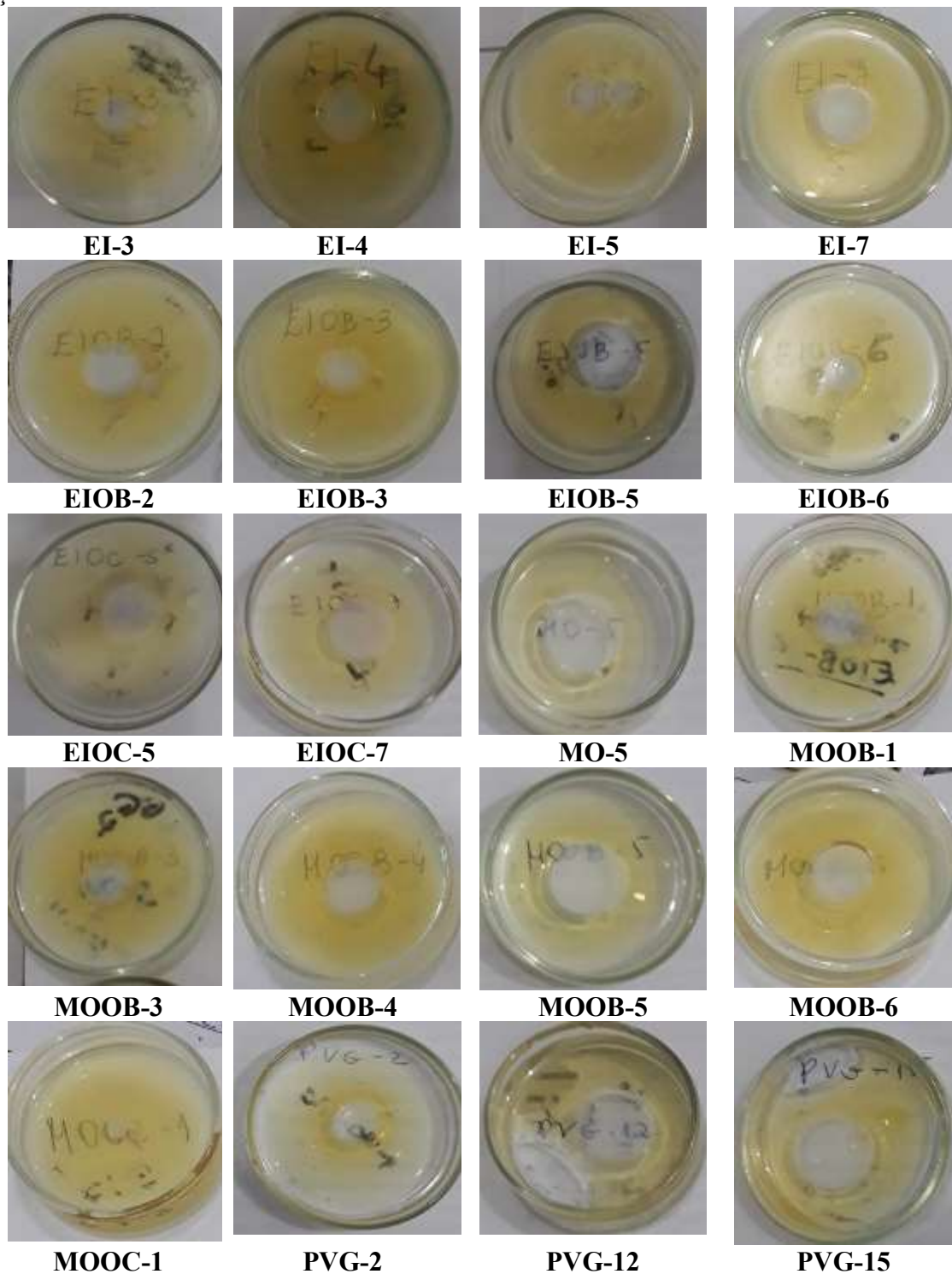
Os vários biossurfactantes microbianos possuem estruturas únicas e ilimitada variedade de aplicações em potencial, indo da biotecnologia à limpeza ambiental. Logo, podem ser mais apropriados do que os surfactantes químicos sintéticos e tradicionais. Suas propriedades os tornam adequados para inúmeros usos industriais, envolvendo detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade de formação de espuma, capacidade de umedecimento, solubilização e dispersão de fases (Mukherjee *et al.*, 2016). A produção e caracterização de biossurfactantes bem como seu potencial biotecnológico para biodegradação foram verificados para *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis* (Ayed *et al.*, 2015; De Oliveira *et al.*, 2017).

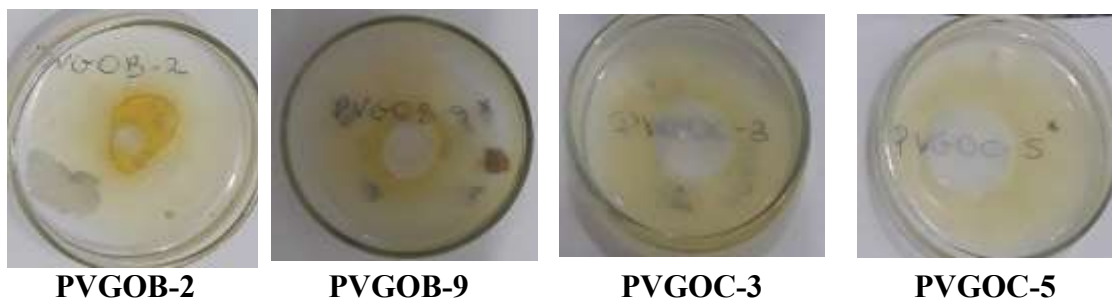
5.3.4 Teste de deslocamento do óleo

A capacidade de promover a dispersão da película de óleo sobre a água se manifestou em vinte e quatro das cento e cinco bactérias isoladas, como pode ser observado na Figura 33. Somente essas estirpes foram capazes de produzir algum composto com possível capacidade para reduzir a tensão superficial óleo/água. Estudos futuros sobre as características dos possíveis biossurfactantes produzidos e suas aplicações biotecnológicas são necessários. As espécies *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* também foram capazes de produzir o

deslocamento superficial do óleo sobre a água com a produção de biossurfactante (Alvarez *et. al.*, 2015).

Figura 33: Imagens dos resultados positivos para dispersão da película de óleo sob efeito da adição dos sobrenadantes dos meios de crescimento das bactérias com efeito tensoativo.





Bactérias produtoras de biossurfactantes podem ser encontradas em diversos ambientes. Entretanto, estudos mostram maior tendência para o desenvolvimento desses microrganismos em locais contaminados por hidrocarbonetos (Soltanighias *et al.*, 2019; Alvarez *et al.*, 2015). O interesse por bactérias produtoras de biossurfactantes ocorre por sua ampla aplicabilidade em diversos setores da indústria, pois a grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente podem ser sintetizados a partir de derivados de petróleo. Além disso, os biossurfactantes são mais eficazes do que os surfactantes químicos (Alvarez *et al.*, 2015; Alvarez *et al.*, 2018).

Os biossurfactantes, além do seu emprego no setor petrolífero, na descontaminação de áreas e recuperação microbiana aprimorada de óleo, também apresentam grande potencial nas indústrias farmacêutica e alimentícia. Outra característica de interesse desse composto é a produção de bioemulsificantes, muito importantes por sua alta atividade de emulsificação e capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial (Alvarez *et al.*, 2015). Esses bioemulsificantes já são utilizados em formulações de alimentos comerciais, sendo empregado como texturizadores, viscosificantes, emulsificantes e agentes redutores de sinérese. Entretanto, existe ainda um número limitado de estudos relacionados à caracterização de novos bioemulsificantes pela dificuldade em distingui-los dos biossurfactantes (Alvarez *et al.*, 2018).

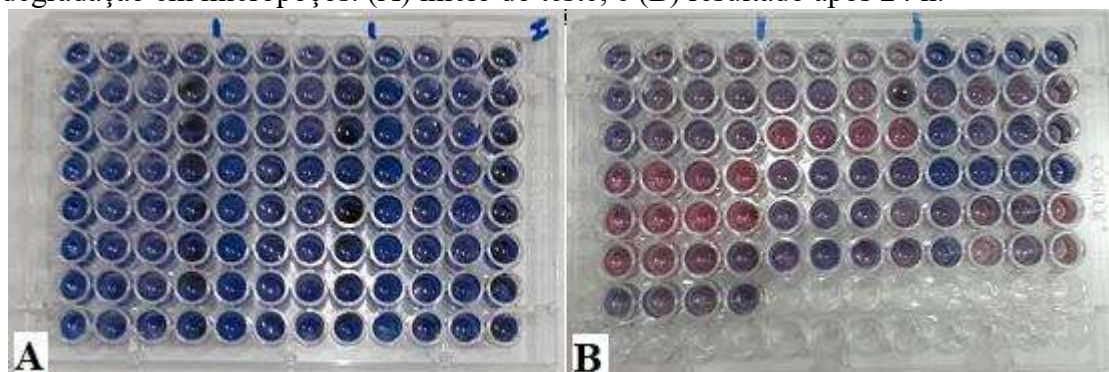
5.3.5 Determinação preliminar de biodegradabilidade usando o indicador redox DCPIP

O teste de biodegradabilidade com o uso do indicador redox DCPIP é simples e de baixo custo. Sua eficiência foi verificada por diversos autores, que destacaram o importante papel deste indicador na detecção de microrganismos, como as bactérias com potencial para degradar hidrocarbonetos (Montagnolli *et al.*, 2015; Habib *et al.*, 2017; Ime *et al.*, 2018; Peixoto *et al.*, 2018).

Esse teste verificou a existência de diferentes respostas de cada microrganismo para distintas cadeias de hidrocarbonetos. O experimento constatou a mudança de coloração após 24 horas, como observado na Figura 34, indicando a possibilidade de biodegradação de hidrocarbonetos para algumas bactérias. Apenas aquelas que tiveram a cor variando de rosa a

incolor foram consideradas como resultado positivo. Por outro lado, as de tonalidade lilás a azul claro foram consideradas resultados negativos. Entre as cento e cinco bactérias testadas, vinte e cinco apresentaram resultado positivo por oxidação do corante 2,6 diclorofenol-indofenol.

Figura 34: Teste oxidação do corante 2,6 diclorofenol-indofenol para início do processo de biodegradação em micropoços. (A) início do teste; e (B) resultado após 24 h.



No segundo teste realizado, houve aumento de tempo e volume de reação. Trinta e quatro bactérias apresentaram resultado positivo entre as cento e cinco investigadas. Nesse experimento, o corante foi totalmente oxidado, promovendo a mudança da coloração azul para incolor, como pode ser observado na Figura 35, que apresenta uma parte desses resultados positivos.

Figura 35: Resultado do teste de oxidação do corante 2,6 diclorofenol-indofenol para início do processo de biodegradação para diferentes estirpes após 168 h



Avaliação da biodegradação do petróleo para *Bacillus toyonensis* pelo uso do indicador redox DCPIP também foi bem-sucedida (Peixoto *et al.*, 2018), assim como para o *Bacillus subtilis* no estudo da degradação de petróleo, diesel e biodiesel (Cruz *et al.*, 2013) e da *Pseudomonas aeruginosa* para a degradação de óleo lubrificante automotivo usado (Lopes, 2014). Da mesma forma, a biodegradação para consórcio misto composto por *Phoma* sp, S36 *Phoma* sp, S24 *Rhizopusoryzae*, S46 *Fusarium* sp, S42 *Fusarium* sp, S32 *Fusarium* sp, S33 *Fusarium* sp e S51 *Fusarium* sp S31 *Phoma* sp e M87 *Microbacterium* sp (Lima, 2016) foi

exitosa. Esse mesmo teste de oxidação do corante foi utilizado para degradação de querosene nos fungos *Penicillium aurantiogriseum*, *P. corylophilum* e *P. griseofulvum* (Maciel *et al.*, 2013).

Ao comparar os resultados obtidos para o teste de micropoços e em frascos de 20mL foi observado um maior número de estirpes possivelmente degradadoras com o aumento do tempo de 24h para 168h. Entre as vinte e cinco estirpes que obtiveram resultado positivo em 24h no teste em micropoços, vinte e três apresentaram também resultado positivo para 168h. Esses resultados evidenciaram a influência do tempo sobre o processo de biodegradação do óleo. A biodegradação de pireno (10 mg L⁻¹) por *Mycobacterium gilvum* obteve 20% de biodegradação em 24h para 100% em 168h (Deng *et al.*, 2016).

5.3.6 Análise dos resultados para pré-seleção das bactérias potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos

Ao analisar os conjuntos de resultados, construiu-se a Tabela 15 para verificar quais estirpes apresentavam maior número de resultados positivos. A partir desta análise, vinte e duas bactérias, consideradas as mais promissoras à biodegradação de hidrocarbonetos, foram selecionadas para identificação da espécie por sequenciamento do fragmento de RNA 16 S.

Tabela 15: Conjunto dos resultados para pré-seleção das estirpes com maior potencial de degradação de hidrocarbonetos.

Estirpe	OM	2ºO	TE	DO	Estirpe	OM	2ºO	TE	DO	Estirpe	OM	2ºO	TE	DO
EI-1	n	p	p	n	MO-1	n	n	p	n	PVG-13	n	p	n	n
EI-2	n	n	p	n	MO-2	n	n	p	n	PVG-14	n	n	n	n
EI-3	p	n	n	p	MO-3	n	n	n	n	PVG-15	p	p	n	p
EI-4	p	p	p	p	MO-4	n	p	n	n	PVG-16	p	p	p	n
EI-5	p	p	p	p	MO-5	p	n	n	p	PVG-17	n	n	n	n
EI-6	p	p	p	n	MO-6	n	n	n	n	PVG-18	n	p	n	n
EI-7	p	p	p	p	MO-7	n	p	n	n	PVG-19	n	p	p	n
EI-8	p	p	p	n	MO-8	n	p	n	n	PVG-20	n	n	p	n
EI-9	n	n	n	n	MO-9	n	n	n	n	PVG-21	n	n	p	n
EI-10	n	n	p	n	MO-10	n	p	n	n	PVG-22	n	n	p	n
EI-11	n	n	p	n	MO-11	n	n	p	n	PVG-23	n	p	n	n
EI-12	n	p	p	n	MO-12	n	n	p	n	PVG-24	p	p	p	n
EI-13	p	p	p	n	MO-13	n	n	p	n	PVG-25	p	p	p	n
EI-14	n	n	p	n	MOOB-1	p	p	n	p	PVG-26	n	n	n	n
EI-15	n	n	p	n	MOOB-2	n	p	n	n	PVG-27	n	n	n	n
EI-16	n	n	p	n	MOOB-3	p	n	n	p	PVG-28	p	p	p	n

EIOB-1	n	n	p	n	MOOB-4	p	p	n	p	PVG-29	n	n	p	n
EIOB-2	n	n	p	p	MOOB-5	p	n	n	p	PVGOB-1	n	n	n	n
EIOB-3	n	n	p	p	MOOB-6	p	n	n	p	PVGOB-2	n	n	p	p
EIOB-4	n	n	p	n	MOOC-1	p	n	n	p	PVGOB-3	n	n	p	n
EIOB-5	n	n	n	p	MOOC-2	p	n	n	n	PVGOB-4	n	n	p	n
EIOB-6	n	n	p	p	MOOC-3	n	n	p	n	PVGOB-5	n	n	p	n
EIOB-7	n	n	n	n	MOOC-5	p	p	p	n	PVGOB-6	n	n	p	n
EIOB-8	n	n	p	n	PVG-1	n	n	n	n	PVGOB-7	n	n	p	n
EIOB-9	n	n	p	n	PVG-2	p	p	p	p	PVGOB-8	n	n	p	n
EIOB-10	n	n	p	n	PVG-3	n	p	p	n	PVGOB-9	n	n	p	p
EIOC-1	n	n	p	n	PVG-4	n	n	p	n	PVGOC-1	n	n	p	n
EIOC-2	n	n	p	n	PVG-5	n	n	n	n	PVGOC-2	n	n	p	n
EIOC-3	n	n	p	n	PVG-6	n	p	n	n	PVGOC-3	p	p	p	p
EIOC-4	n	n	n	n	PVG-7	n	n	p	n	PVGOC-4	n	n	p	n
EIOC-5	p	p	p	p	PVG-8	n	n	p	n	PVGOC-5	n	n	p	p
EIOC-6	n	n	n	n	PVG-9	n	n	p	n	PVGOC-6	n	n	p	n
EIOC-7	n	n	n	p	PVG-10	n	p	n	n	PVGOC-7	n	n	p	n
EIOC-8	n	n	p	n	PVG-11	n	p	n	n	PVGOC-8	n	n	p	n
EIOC-9	n	n	n	n	PVG-12	p	p	p	p	PVGOC-9	n	n	p	n

OM – Teste de oxidação em micropoços; 2ºO- Segundo teste de oxidação em frascos de penicilina sob agitação; TE- Teste de Emulsificação; DO- Deslocamento do óleo; p - Positivo; n- Negativo; - Bactérias selecionadas

O critério de seleção considerado foi o maior número de resultados positivos, sendo o segundo teste de oxidação do corante, em frascos de penicilina, o preferencial. Como todas as bactérias deste estudo pertenciam ao gênero *Bacillus*, fez-se necessário selecionar grande número de estirpes a fim de aumentar a chance de identificação de espécies distintas. Assim, aumentaria também a possibilidade de se obter um consórcio de bactérias com maior potencial para biodegradação em biorreator.

Entre as vinte e duas cepas bacterianas selecionadas, cinco vieram do sedimento contaminado, indicando que o processo de contaminação não foi efetivo na seleção de bactérias potencialmente degradadoras. Uma hipótese pode estar relacionada ao caráter das bactérias isoladas, o fato de todas serem *Bacillus* Gram positivos formadores de endósporos. Essas espécies caracterizam-se pela produção de endósporos, células resistentes formadas pela bactéria em condições ambientais extremas, como escassez de nutrientes, altas temperaturas ou baixas temperaturas e presença de substâncias tóxicas. Esses endósporos permanecem inativos

até que novamente o ambiente adquira condições adequadas para o desenvolvimento das células bacterianas (Priest, 1993).

Entre os três locais de amostragem na Baía de Guanabara, aquele que apresentou menor número de cepas bacterianas potencialmente degradadoras foi segundo, localizado próximo ao Manguezal, por não haver nenhuma fonte de contaminação evidente nas proximidades, diferentemente dos outros pontos. Tal fato está de acordo com a literatura, que afirma que os microrganismos de melhor capacidade degradadora são provenientes de ambientes contaminados (Pereira *et al.*, 2019; Nayarisseri *et al.*, 2019; Datta *et al.*, 2020).

5.3.7 Identificação das espécies de bactérias

5.3.7.1 Extração do DNA

A extração do DNA de cada cepa foi realizada e a quantificação por UV-visível refererene a cada microrganismo segue na Tabela 15, cujas variação da concentração de DNA variou de 37,4 ng μL^{-1} a 196,1 ng μL^{-1} .

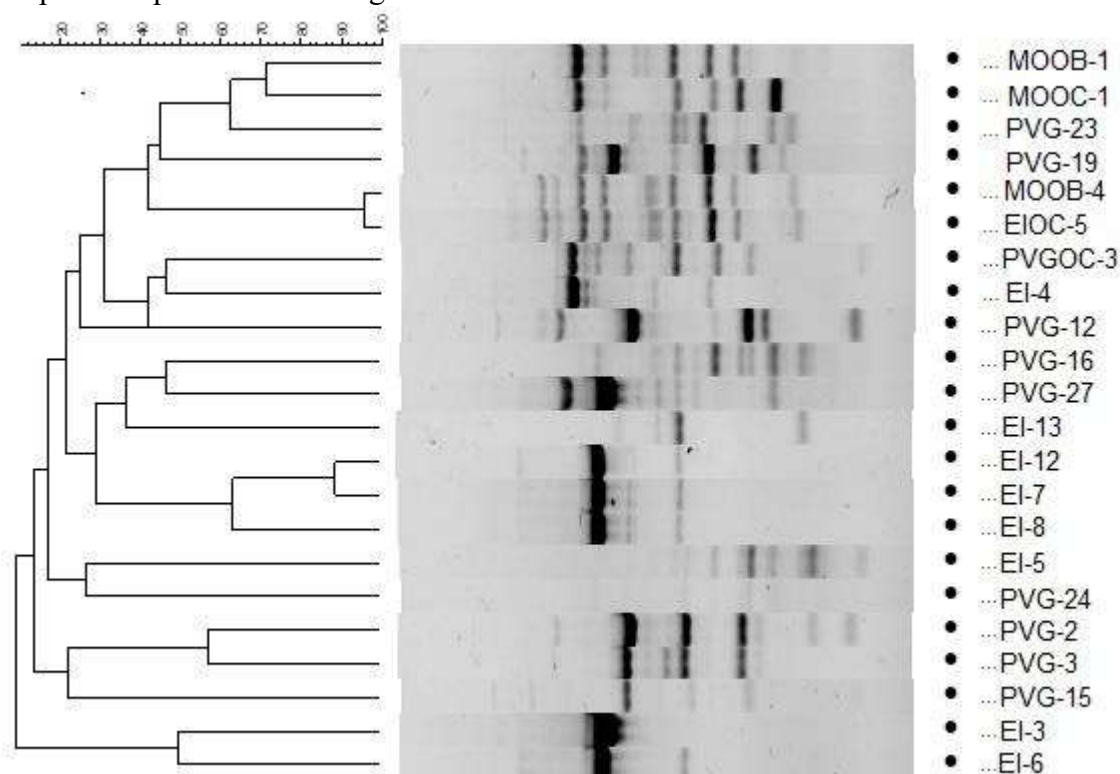
Tabela 15: Concentração de DNA por Uv-visível 260 nm das cepas de microrganismos

	EI-12	EI-13	EI-7	EIOC-5	EI-5	EI-6	PVG-2	PVG-3	PVG-12	MOOC-1	MOOB-4
Concetração (ng μL^{-1})	96,5	108,7	152,2	169,3	178,1	142,4	124,9	75,0	45,7	185,4	37,4
	EI-8	PVG-16	PVG-27	PVG-19	PVG-24	PVG-15	EI-3	EI-4	PVG-OC-3	PVG-23	MOOB-1
Concetração (ng μL^{-1})	102,8	115,7	196,1	63,2	158,6	99,9	166,8	159,2	124,7	44,8	190,5

5.3.7.2 BOX-PCR

As cepas foram agrupadas pelo método BOX-PCR, a fim de verificar similaridade do sequenciamento de parte do gene *rrs*, que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal. Como pode ser observado na Figura 36, o dendrograma obtido apontou que apenas as estirpes MOOB-4 e EIOC-5 apresentaram similaridade de 90%. Todavia, como a maioria alcançou uma equivalência menor do que 60%, a fragmentação dos pares de bases foi efetuada através da reação PA/PH para sequenciamento de parte do gene *rrs*, que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal, para identificação da espécie de cada estirpe.

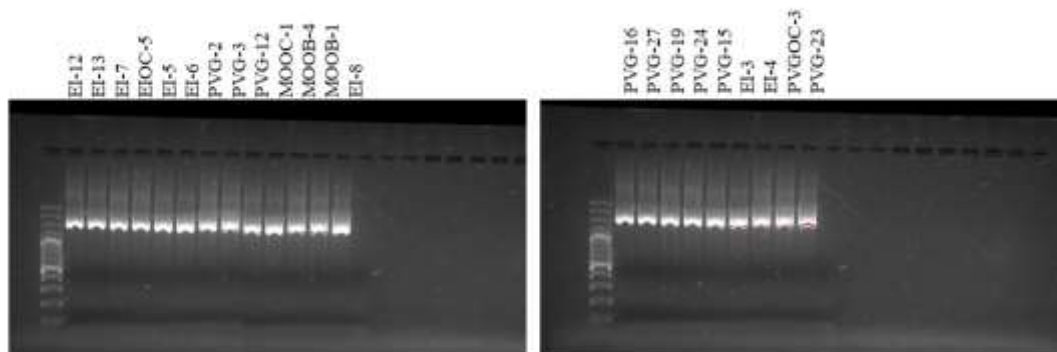
Figura 36: Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR gerados pela amplificação do DNA das diferentes estirpes isoladas com o iniciador BOXA1R. Esses géis foram utilizados como exemplos dos perfis de bandas gerados.



5.3.7.3 Identificação molecular

As cepas foram identificadas molecularmente através do sequenciamento de parte do gene, que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal, realizadas pelas reações de PCR. Para tal, foi verificado a amplificação do gene em gel de agarose na Figura 37, para certificação da reação de PCR foi completa.

Figura 37: Géis de agarose para certificação da amplificação dos genes 16S RNA pela reação de PCR



Conforme as árvores filogenéticas, APÊNDICE F, as sequências baseadas no gene 16S RNA, alinhadas com as bases de dados NCBI, apresentaram similaridade com o gênero *Bacillus*

para todas as estirpes. Esse resultado é compatível com as análises microscópicas, que mostraram espécies bacterianas em forma de bastonetes. Os resultados da identificação das vinte e duas cepas obtiveram dezessete espécies distintas, *B. acidicola*, *B. anthracis*, *B. cihuensis*, *B. coahuilensis*, *B. enclensis*, *B. funiculus*, *B. gaemokensis*, *B. galliciensis*, *B. halotolerans*, *B. luciferensis*, *B. luteolus*, *B. manliponensis*, *B. pseudomycoides*, *B. pumilus*, *B. siamensis*, *B. subtilis* e *B. tequilensis*. As cepas foram submetidas ao GenBank com os números de acesso referente a cada estirpe descritos na Tabela 17.

Tabela 17: Identificação das estirpes isoladas através do sequenciamento de parte do gene *rrs*, que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal.

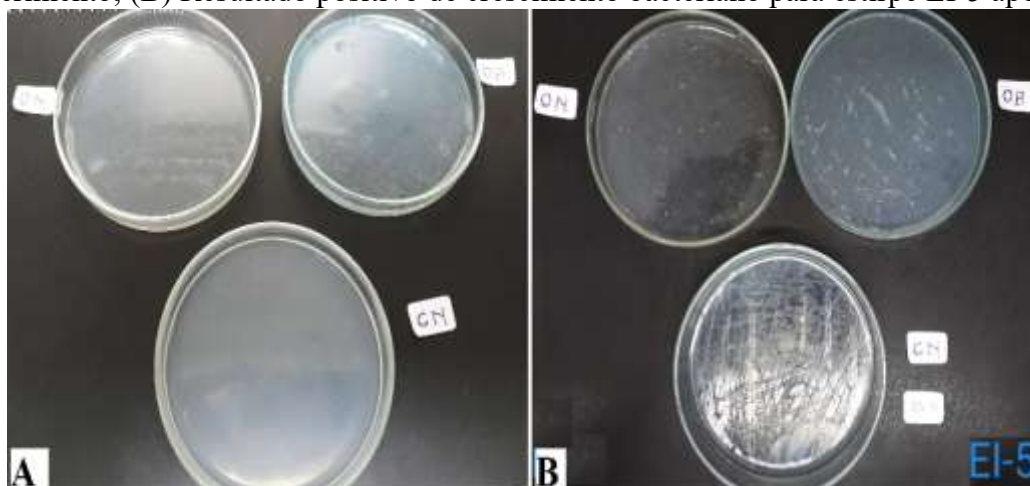
Estirpe	Primeiro <i>hit</i> cultivável	Identidade (%)	Nº de acesso (GenBank) do primeiro <i>hit</i> cultivável	Nº de depósito no GenBank
EI-12	<i>Bacillus acidicola</i>	92,45	NR_041942.1	MW519878
EI-13	<i>Bacillus anthracis</i>	100,00	NR_041248.1	MW519879
EI-7	<i>Bacillus pseudomycoides</i>	100,00	NR_113991.1	MW519876
EIOC-5	<i>Bacillus halotolerans</i>	97,78	NR_115282.1	MW519880
EI-5	<i>Bacillus luteolus</i>	93,71	NR_108638.1	MW519874
EI-6	<i>Bacillus gaemokensis</i>	98,52	NR_116644.1	MW519875
PVG-2	<i>Bacillus siamensis</i>	98,95	NR_117274.1	MW519884
PVG-3	<i>Bacillus tequilensis</i>	98,42	NR_104919.1	MW519885
PVG-12	<i>Bacillus subtilis</i>	95,67	NR_118383.1	MW519886
MOOC-1	<i>Bacillus siamensis</i>	100,00	NR_159148.1	MW519883
MOOB-4	<i>Bacillus enclensis</i>	95,82	NR_133700.1	MW519882
MOOB-1	<i>Bacillus tequilensis</i>	99,81	NR_104919.1	MW519881
EI-8	<i>Bacillus gaemokensis</i>	98,15	NR_116644.1	MW519877
PVG-16	<i>Bacillus coahuilensis</i>	94,75	NR_115933.1	MW519888
PVG-27	<i>Bacillus halotolerans</i>	93,95	NR_115282.1	MW519892
PVG-19	<i>Bacillus galliciensis</i>	96,59	NR_116886.1	MW519889
PVG-24	<i>Bacillus funiculus</i>	98,00	NR_148248.1	MW519891
PVG-15	<i>Bacillus anthracis</i>	100,00	NR_041248.1	MW519887
EI-3	<i>Bacillus pumilus</i>	99,21	NR_112637.1	MW519872
EI-4	<i>Bacillus manliponensis</i>	92,13	NR_125530.1	MW519873
PVGOC-3	<i>Bacillus cihuensis</i>	93,70	NR_148280.1	MT903350
PVG-23	<i>Bacillus luciferensis</i>	92,31	NR_025511.1	MW519890

5.3.8 Capacidade do microrganismo para acessar a fonte de carbono em meio sólido

Das vinte e duas cepas testadas, onze exibiram resultado positivo. Foram encontradas colônias nas placas com os óleos de barco e de navio, não apresentando crescimento aparente nas placas de controle negativo. A Figura 38 A mostra as placas no início do experimento,

enquanto que o resultado positivo relativo ao crescimento bacteriano da estirpe EI-5 após 48h pode ser visto na Figura 38 B. Os resultados referentes a cada cepa estão contidos na Tabela 17 à frente, junto a análise dos resultados no item 3.11.

Figura 38: Teste de crescimento bacteriano em meio sólido contaminado. (A) Placas no início do experimento; (B) Resultado positivo de crescimento bacteriano para estirpe EI-5 após 48h.



As cepas apresentaram crescimento, com formação de colônias visíveis, somente após 48 horas de incubação. Os microrganismos *Bacillus methylotrophicus* e *Pseudomonas sihuiensis* também alcançaram resultado positivo de crescimento em meio sólido, suplementado com 0,2% de petróleo Bazu como única fonte de carbono e energia (Pereira, 2018).

5.3.9 Teste de crescimento microbiano na presença de hidrocarbonetos

O teste de crescimento em meio BHI, suplementado com 1% de óleo usado de navio, utilizou as vinte e duas bactérias, com quantificação da porcentagem de crescimento após 48h. Das vinte e duas estirpes, treze apresentaram crescimento superior a 80% do número inicial de células. Esse teste é complementar ao anterior, apenas qualitativo, que verificava a capacidade do microrganismo para acessar a fonte de carbono em meio sólido. Este permite analisar as cepas com melhor taxa de crescimento (Tabela 18). Entretanto, é necessário verificar a existência de uma relação direta entre o crescimento e a degradação do óleo, única fonte de energia do sistema, visto que a presença de uma grande população de microrganismos heterotróficos totais não significa necessariamente uma correlação direta com a eficiência na biodegradação (Townsend *et al.*; 2007).

Tabela 18: Análise do crescimento das cepas bacterianas em meio aquoso com óleo lubrificante usado de motor de navio, como única fonte de energia, após 48h.

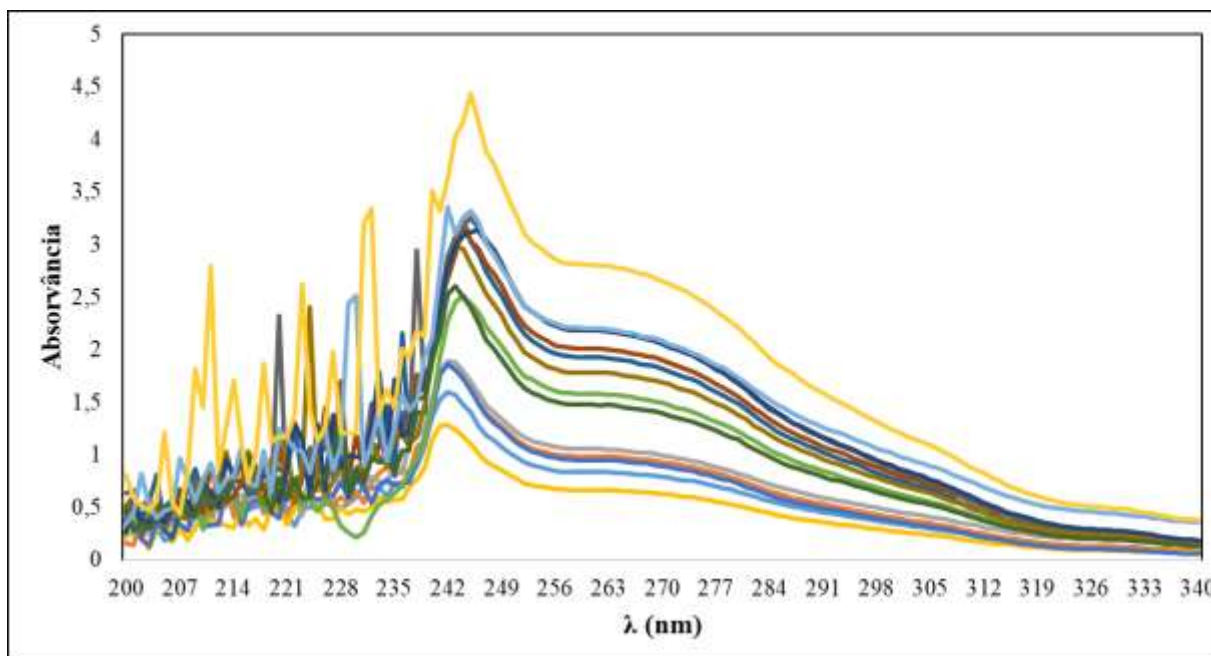
Estirpe	Crescimento Aquoso		Estirpe	Crescimento Aquoso	
	ABS	%		ABS	%
EI-12	0,217	117%	EI-8	0,133	33%
EI-13	0,202	102%	PVG-16	0,082	0%
EI-7	0,231	132%	PVG-27	0,199	99%
EIOC-5	0,149	50%	PVG-19	0,203	104%
EI-5	0,107	7%	PVG-24	0,101	1%
EI-6	0,131	31%	PVG-15	0,113	13%
PVG-2	0,214	115%	EI-3	0,091	0%
PVG-3	0,189	90%	EI-4	0,149	49%
PVG-12	0,251	152%	PVGOC-3	0,222	123%
MOOC-1	0,207	107%	PVG-23	0,183	83%
MOOB-4	0,274	174%	EI-8	0,133	33%
MOOB-1	0,206	106%	PVG-16	0,082	0%

5.3.10 Teste piloto para quantificação da biodegradação de óleo

As treze cepas com maior crescimento no teste de biodegradação em meio líquido foram submetidas ao ensaio para quantificação da biodegradação do óleo. Esse teste consistiu na varredura por espectrofotometria no UV-Visível, com o objetivo de analisar a mudança na curva do óleo e verificar a diminuição da concentração de óleo no sistema.

Na Figura 39, é possível verificar a diferença na concentração do óleo para cada amostra. Foi realizada a varredura de 200 a 800 nm, no entanto para fins de melhor visualização somente a região que apresentou os picos de absorvância foram apresentados na figura. Como esperado, o controle negativo apresentou maior concentração, uma vez que não foi inoculado com nenhum microrganismo. De acordo com as curvas obtidas, a mais baixa, que representa a menor concentração de óleo, foi a da linhagem PVGOC-3.

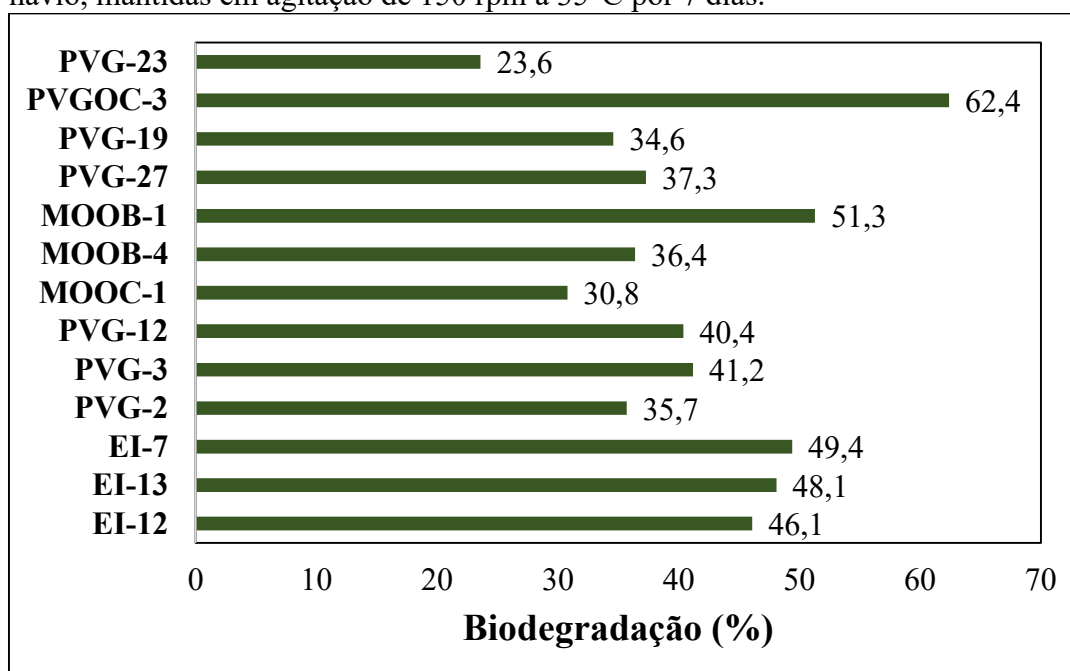
Figura 39: Varredura de 200 a 300 nm por espectrofotometria no UV-visível para quantificação de óleo de navio. (—) PVG-19, (—) EI-13, (—) MOOB-4, (—) PVG-12, (—) EI-7, (—) PVGOC-3, (—) PVG-2, (—) PVG-3, (—) PVG-23, (—) MOOC-1, (—) CN, (—) PVG-27, (—) EI-12 e (—) MOOB-1



Interessante notar a presença de diferentes picos no intervalo de 200 a 236 nm para algumas curvas. Uma hipótese é que essas alterações podem estar relacionadas aos diferentes metabolismos de cada estirpe, que podem promover diferentes intermediários no processo de degradação do óleo (Rocha, 2015).

A concentração inicial do óleo foi calculada em $4,535 \text{ g L}^{-1}$. A quantificação final do óleo, após o processo de biodegradação por sete dias, obteve os valores percentuais para remoção de óleo em cada cepa bacteriana. A concentração de óleo atingiu uma redução, que variou de 23,6 a 62,4% nas treze cepas. A cepa com melhor resultado foi a PVGOC-3 (*B. cihuenses*) em comparação às demais cepas bacterianas, conforme a Figura 40.

Figura 40: Resultado da degradação do óleo lubrificante usado de motor de navio após 7 dias. Condições experimentais: 1,5 mL de meio BH, 480 uL de inóculo e 20 uL de óleo de motor de navio, mantidas em agitação de 150 rpm a 35°C por 7 dias.



De acordo com a análise estatística aplicada ao resultado de quantificação do óleo para as treze cepas, houve diferença estatisticamente significativa de degradação do óleo entre cepas PVGOC-3, EI-12, EI-13, EI-7 e MOOB-1.

A Tabela 19 apresenta a comparação dos resultados deste estudo com a literatura. Os efeitos da biodegradação na estirpe PVGOC-3 são promissores, estão entre os melhores, pois revelou capacidade de biodegradação elevada, em faixa de tempo moderada. Foi possível degradar $2,756 \text{ g L}^{-1}$ de óleo usado de motor de navio em 7 dias, com uma taxa de degradação de $0,016 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Tabela 19: Comparação dos resultados deste estudo com a literatura.

Microrganismo	Degradação (%)	Tempo (dias)	Concentração inicial (g L^{-1})	Referência
<i>B. cihuenses</i>	62,40	168*	4,534	Este trabalho
<i>B. tequilensis</i>	51,35	168*	4,534	Este trabalho
<i>B. pseudomycooides</i>	49,43	168*	4,534	Este trabalho
<i>B. subtilis</i>	40,40	168*	4,534	Este trabalho
<i>Bacillus</i> sp.	100	78*	1,8	Ke <i>et al.</i> , 2018
<i>Bacillus cereus</i>	100	40*	0,5	Das <i>et al.</i> , 2015
<i>Bacillus cereus</i>	95	120*	2,5	Banerjee; Ghoshal, 2016

<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	50	18*	1	Ayed <i>et al.</i> , 2015
<i>Bacillus salmalaya</i>	72,6	24	20#	Dadrasnia; Ismail, 2015
<i>Bacillus cereus</i>	98	20	2,71	Bhurgri <i>et al.</i> , 2017
<i>Bacillus subtilis</i>	76	5	3	Wang <i>et al.</i> , 2019
<i>Bacillus sp</i>	70,3	7	10#	Lima <i>et al.</i> , 2020
<i>Bacillus subtilis</i>	100	10	1	Sakthipriya <i>et al.</i> , 2018

* horas; # mL L⁻¹

5.3.11 Análise dos resultados para seleção do consórcio

Com base nos testes de crescimento bacteriano em meio contaminado e de biodegradação, os melhores resultados são apresentados na Tabela 20. A partir da análise desse conjunto de dados, foi possível selecionar as melhores estirpes para compor o consórcio bacteriano. As quatro bactérias mais promissoras para a degradação do óleo usado de navio foram *B. pseudomycooides*; *B. subtilis*; *B. tequilensis* e *B. cihuensis*.

Tabela 20: Conjunto dos resultados da triagem para seleção de consórcio bacteriano de biodegradação de hidrocarbonetos.

Estirpe	Crescimento Meio Sólido	Crescimento Aquoso		Biodegradação Remoção óleo	Identificação da espécie
		ABS	Crescimento		
EI-12	Positivo	0,217	117%	46,07%	<i>B. acidicola</i>
EI-13	Positivo	0,202	102%	48,14%	<i>B. anthracis</i>
EI-7	Positivo	0,231	132%	49,43%	<i>B. pseudomycooides</i>
PVG-2	Negativo	0,214	115%	35,67%	<i>B. siamensis</i>
PVG-3	Negativo	0,189	90%	41,23%	<i>B. tequilensis</i>
PVG-12	Negativo	0,251	152%	40,40%	<i>B. subtilis</i>
MOOC-1	Negativo	0,207	107%	30,79%	<i>B. siamensis</i>
MOOB-4	Negativo	0,274	174%	36,36%	<i>B. enclensis</i>
MOOB-1	Positivo	0,206	106%	51,35%	<i>B. tequilensis</i>
PVG-27	Positivo	0,199	99%	37,29%	<i>B. halotolerans</i>
PVG-19	Negativo	0,203	104%	34,59%	<i>B. galliciensis</i>
PVGOC-3	Positivo	0,222	123%	62,40%	<i>B. cihuensis</i>
PVG-23	Negativo	0,183	83%	23,56%	<i>B. luciferensis</i>

O consórcio bacteriano desta pesquisa é composto pelas espécies *B. pseudomycooides*; *B. subtilis*; *B. tequilensis* e *B. cihuensis*. Contudo, não foram encontrados estudos de biodegradação de hidrocarbonetos para as espécies *B. pseudomycooides* e *B. cihuensis*. No caso da espécie *B. tequilensis*, foram descobertos trabalhos com degradação de n-alcenos (Gurav *et*

al., 2017), pesticida metrifonato (Tian *et al.*, 2016) e petróleo (Ozyurek, e Bilkay, 2017). A espécie *B. subtilis* foi a mais utilizada na biodegradação de hidrocarbonetos como petróleo (Das e Mukherjee, 2006; Darsa *et al.*, 2014; Montagnolli *et al.*, 2015; Oyetibo *et al.*, 2017; Sakthipriya *et al.*, 2016).

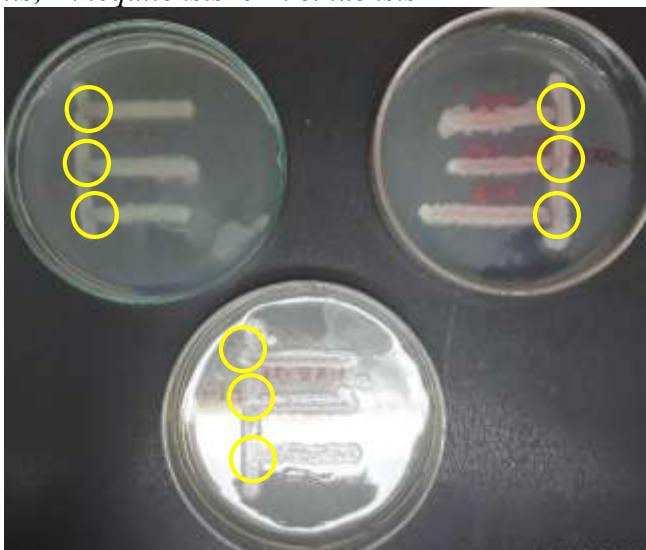
Neste trabalho, os resultados encontrados para produção de biossurfactantes com as espécies *B. pseudomycooides* (Li *et al.*, 2016); *B. subtilis* (Oliveira *et al.*, 2016; Sakthipriya *et al.*, 2016; Montagnolli *et al.*, 2015) e *B. tequilensis* (Nayarisseri *et al.*, 2019; Data *et al.*, 2020) foram ratificados em várias pesquisas.

5.3.12 Teste de antagonismo com as bactérias selecionadas para compor o consórcio bacteriano

O teste de antagonismo é um importante critério para averiguar se os microrganismos são hábeis para crescer concomitantemente, sem que haja produção de enzimas que inibam o crescimento de uma ou mais espécies (Almeida *et al.*, 2017). Assim, esse ensaio foi utilizado para verificar a existência de inibição no crescimento de alguma espécie selecionada para o consórcio, quando em conjunto com as demais.

Como pode ser observado na Figura 41, a inibição do crescimento nas linhas contínuas bem como nas conexões entre essas e cada linha horizontal não ocorreu, indicando que as espécies selecionadas para o consórcio podem crescer em conjunto sem que esse crescimento seja afetado. A possibilidade de utilizar consórcios microbianos em processos de biodegradação é muito interessante, uma vez que são descritos como sistemas mais vantajosos sobre aqueles constituídos por culturas únicas pela literatura. Possuem maior capacidade de tolerar estresse metabólico, também otimizam melhor as reações bioquímicas e tendem a diminuir a toxicidade intermediária (Bittihn *et al.*, 2018)

Figura 41: Teste de inibição do crescimento das quatro cepas selecionadas para consórcio: *B. pseudomycooides*; *B. subtilis*; *B. tequilensis* e *B. cihuensis*.



Na pesquisa sobre degradação do óleo diesel com uso de culturas isoladas e em consórcio, o teste de antagonismo também obteve resultado negativo para inibição das culturas de *Penicillium aurantiogriseum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycooides* e *Penicillium commune* (Maciel, 2013).

5.4 CONSIDERAÇÕES

De acordo como os resultados obtidos foi possível identificar e isolar bactérias coletadas em sedimento da Baía da Guanabara, na qual o total de 105 cepas foram cultivadas e identificadas como gênero *Bacillus*. Desse total 22 apresentaram potencial de degradação do óleo usado de navio.

A capacidade de biodegradação de óleo lubrificante usado de navio foi verificado, na qual as espécies *B. pseudomycooides*; *B. subtilis*; *B. tequilensis* e *B. cihuensis* obtiveram capacidade de degradação do óleo de 49,43%, 40,40%, 51,35% e 62,4%, respectivamente, em cinco dias com uma concentração de óleo de 4,534 g L⁻¹.

REFERÊNCIAS

- ABBASIAN, F., LOCKINGTON, R., MEGHARAJ, M., & NAIDU, R. **A review on the genetics of aliphatic and aromatic hydrocarbon degradation**. Applied biochemistry and biotechnology, *178*(2), 224-250, 2016.
- ALMEIDA, D. G.; *et al.* **Biodegradation of marine fuel MF-380 by microbial consortium isolated from seawater near the petrochemical Suape Port, Brazil**. International Biodeterioration & Biodegradation, v. 116, p. 73 - 82, 2017.
- APHA American Public Health Association, **Standard Methods for examination of water and wastewater**, 16th Edition, eds. A. E. Greenberg, R. R. Trussell and L. S. Clesceri, pp. 498-499. APHA, Washington, DC, 1985.
- ARULAZHAGAN, P. & VASUDEVAN, N. **Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halotolerant bacterial strain Ochrobactrum sp. VA1**. Marine Pollution Bulletin, v. 62, n. 2, p. 388 - 394, 2011.
- AYED, H. B., JEMIL, N., MAALEJ, H., BAYOUDH, A., HMIDET, N., & NASRI, M. **Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from Bacillus amyloliquefaciens An6**. International Biodeterioration & Biodegradation, *99*, 8-14, 2015.
- BANERJEE, A., & GHOSHAL, A. K. **Biodegradation of real petroleum wastewater by immobilized hyper phenol-tolerant strains of Bacillus cereus in a fluidized bed bioreactor**. 3 Biotech, *6*(2), 137, 2016.
- BARROS, I., FARIAS, C., HAMACHER, C., ARAÚJO, M., PAIXÃO, B., & SOUZA, L. **Hidrocarbonetos no Material Particulado em Suspensão da Baía de Guanabara: Avaliação do Estado de Contaminação**. Geochimica Brasiliensis, *31*(1), 28-36. (2018).
- BHURGRI, S., *et al.* **Isolation of Bacillus cereus from botanical soil and subsequent biodegradation of waste engine oil**. International Journal of Environmental Science and Technology, 2018.
- BITTIHN, P.; DIN, M. O.; TSIMRING, L. S.; HASTY, J. **Rational engineering of synthetic microbial systems: from single cells to consortia**. Current Opinion in Biotechnology, [S. l.], v.45, p. 92-99, 2018. Available at: Access in: 15 June 2019.
- BOOPATHY, R. **Factors limiting bioremediation technologies**. Bioresource Technology, *74*: 63-67, 2000.
- COOPER, D. G., & GOLDENBERG, B. G. **Surface-active agents from two Bacillus species**. Applied and environmental microbiology, *53*(2), 224-229, 1987.
- DADRASNIA, A., & ISMAIL, S., **Biosurfactant production by Bacillus salmalaya for lubricating oil solubilization and biodegradation**. International journal of environmental research and public health, *2015*.
- DANTAS, C. P., **Utilização de protótipo de biorreator de imersão temporária na biodegradação de petróleo em sedimento de manguezal**, Dissertação, Universidade Federal da Bahia, 2016.
- DARSA, K. V., THATHEYUS, A. J., & RAMYA, D. **Biodegradation of petroleum compound using the bacterium Bacillus subtilis**. Science International, *2*(1), 20-25, 2014.
- DAS, B., MANDAL, T. K., & PATRA, S. **A comprehensive study on Chlorella pyrenoidosa for phenol degradation and its potential applicability as biodiesel feedstock and animal feed**. Applied biochemistry and biotechnology, *176*(5), 1382-1401, 2015.
- DAS, K., & MUKHERJEE, A. K. **Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India**. Bioresource technology, *98*(7), 1339-1345, 2007

- DATTA, P., TIWARI, P., & PANDEY, L. M. *Oil washing proficiency of biosurfactant produced by isolated Bacillus tequilensis MK 729017 from Assam reservoir soil*. Journal of Petroleum Science and Engineering, 195, 107612, 2020.
- DE OLIVEIRA, D.W.F., et al. "Aquatic toxicity and biodegradability of a surfactant produced by *Bacillus subtilis* ICA56." Journal of Environmental Science and Health, Part A 52.2, 174-181, 2017.
- FELSENSTEIN, J. **Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap**. Evolution 39:783-791, 1985.
- GURAV, R., LYU, H., MA, J., TANG, J., LIU, Q., & ZHANG, H. **Degradation of n-alkanes and PAHs from the heavy crude oil using salt-tolerant bacterial consortia and analysis of their catabolic genes**. Environmental Science and Pollution Research, 24(12), 11392-11403, 2017.
- HABIB, S., JOHARI, W. L. W., SHUKOR, M. Y., & YASID, N. A. **Screening of hydrocarbon-degrading bacterial isolates using the redox application of 2, 6-DCPIP**. Bioremediation Science and Technology Research, 5(2), 13-16, 2017
- HANSON, K. G, DESAI, J. D., & DESAI, A. J. **A rapid and simple screening crude oil degrading technique for potential microorganisms**. Biotechnology Techniques, 7 (1), 745-748, 1993.
- HENDERSON, S. B.; *et al* **Potential impact of production chemicals on the toxicity of produced water discharges from North Sea oil platforms**, Marine pollution Bulletin, 1999.
- IME, J. I., ALPHONSUS, I. A., SATURDAY, A. P., GODWIN, B. M., UTIBE, E. C., & ANTHONY, U. E. **Screening for Hydrocarbon Degrading Bacteria Using Redox Indicator 2, 6-Dichlorophenol Indophenol**. Biomolecular Engineering, 3(2), 11-16, 2018.
- KE, Q., *et al*. **Sustainable biodegradation of phenol by immobilized Bacillus sp. SAS19 with porous carbonaceous gels as carriers**. Journal of environmental management, 222, 185-189, 2018.
- KJERFVE, B.; RIBEIRO, C.H.A.; DIAS, G.T.M.; FILIPPO, A.M.; QUARESMA, V.S. **Oceanographic characteristics of an impacted coastal bay: Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brazil**. Continental Shelf Research, v. 17, n. 13, p. 1609-1643. 1997.
- KREISCHER, A. C., & SILVA, L. P. **Bioprospecção de bactérias produtoras de biossurfactantes a partir de solo contaminado por agrotóxicos**. Revista Eletrônica Estácio Saúde, 6(1), 35-47, 2017.
- KREPSKY, N., DA SILVA, F.S.; FONTANA, L.F., CRAPEZ, M. A. C. **Alternative methodology for isolation of biosurfactant-producing bacteria**. Braz. J. Biol., 67(1): 117-124, 2007.
- KUMAR S., STECHER G., LI M., KNYAZ C., AND TAMURA K. **MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms**. Molecular Biology and Evolution 35:1547-1549, 2018.
- LAFISCA, A., PEREIRA, C. S., GIACCONE, V., & RODRIGUES, D. D. P. **Enzymatic characterization of Vibrio alginolyticus strains isolated from bivalves harvested at Venice Lagoon (Italy) and Guanabara Bay (Brazil)**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 50(4), 199-202, 2008.
- LIMA, J. M. S. **Avaliação do potencial de produção de biossurfactantes por microorganismos endofíticos e epifíticos de macrófitas aquáticas coletadas em afluentes do Rio Negro contaminados por petróleo**, Tese, Universidade Federal do Amazonas, 2016.
- LIMA, S. D., OLIVEIRA, A. F., GOLIN, R., LOPES, V. C. P., CAIXETA, D. S., LIMA, Z. M., & MORAIS, E. B. **Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from gas station leaking-contaminated groundwater in the Southern Amazon, Brazil**. Brazilian Journal of Biology, 2019.

- LIU, B., *et al.* ***Bacillus cihuensis* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of a plant in the Cihu area of Taiwan.** *Antonie van Leeuwenhoek*, 106(6), 1147-1155, 2014.
- MACIEL, C.; *et al.*, **Cinética de degradação de querosene de aviação por *Penicillium* sp. através da bioestimulação.** *R. bras. Bioci.*, Porto Alegre, 11, 1, 39-42, 2013.
- MACIEL, J. M., **Estudo comparativo da degradação de óleo diesel por culturas isoladas e em consórcio.** Dissertação Universidade Federal de Pernambuco, 2013.
- MACIEL-SOUZA, M. D. C., MACRAE, A., VOLPON, A. G. T., FERREIRA, P. S., & MENDONÇA-HAGLER, L. C. **Chemical and microbiological characterization of mangrove sediments after a large oil-spill in Guanabara Bay-RJ-Brazil.** *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(3), 262-266, 2006.
- MAIER, R. M., & Gentry, T. J., **Microorganisms and organic pollutants.** In *Environmental microbiology*, p. 377-413, 2015.
- MASSOL-DEYA, A. A., ODELSON, D. A., HICKEY, R. F., & TIEDJE, J. M. **Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16–23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA).** In *Molecular microbial ecology manual* p. 289-296. Springer, Dordrecht, 1995.
- MONTAGNOLLI, R. N., LOPES, P. R. M., & BIDOIA, E. D. **Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products.** *Environmental monitoring and assessment*, 187(1), 4116, 2015.
- MONTAGNOLLI, R. N., LOPES, P. R. M., & BIDOIA, E. D. **Screening the toxicity and biodegradability of petroleum hydrocarbons by a rapid colorimetric method.** *Archives of environmental contamination and toxicology*, 68(2), 342-353, 2015.
- MUKHERJEE, S., CHOWDHURI, U. R., & KUNDU, P. P. **Bio-degradation of polyethylene waste by simultaneous use of two bacteria: *Bacillus licheniformis* for production of biosurfactant and *Lysinibacillus fusiformis* for bio-degradation.** *Rsc Advances*, 6(4), 2982-2992, 2016.
- NAYARISSERI, A., SINGH, P., & SINGH, S. K. **Screening, isolation and characterization of biosurfactant-producing *Bacillus tequilensis* strain ANSKLAB04 from brackish river water.** *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(11), 7103-7112, 2019.
- NEI, M. AND KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics.** Oxford University Press, New York, 2000.
- OLIVEIRA, C. R. D. **Avaliação da biodegradação de Pireno pela microbiota nativa em sedimento do Manguezal do Itacorubi,** Florianópolis, SC, 2006.
- OLIVEIRA, N. C., **Seleção de Microrganismos endofíticos com potencialidade para biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo e/ou derivados.** Dissertação PPGMT- Universidade Federal de Goiás, 2009.
- OYETIBO, G. O., *et al.*, **Biodegradation of crude oil and phenanthrene by heavy metal resistant *Bacillus subtilis* isolated from a multi-polluted industrial wastewater creek.** *International Biodeterioration & Biodegradation*, 120, 143-151, 2017.
- OZYUREK, S. B., & BILKAY, I. S. **Determination of petroleum biodegradation by bacteria isolated from drilling fluid, waste mud pit and crude oil.** *Turkish Journal of Biochemistry*, 42(6), 609-616, 2017.
- PEIXOTO R. M., VIEIRA, J. D. G., **Determination of the degrading potencial of bacteria isoled from environment impacted by petroleum and derivates 2,6-dichloroindophenollindophenol (DCPIP) in:** First Braziliam Symposium on Petroleum Biotechnology Natal – RN, 2005 .
- PEIXOTO, F. B. S., *et al.*. **Assessment of petroleum biodegradation for *Bacillus toyonensis* by the using redox indicator 2, 6 dichlorophenol indophenol.** *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 40, e35640-e35640, 2018.

- PEREIRA, E., *et al.*, **Biodegradation of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater by autochthonous microorganisms**. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 145, 104789, 2019.
- PEREIRA, J. E. S., **Prospecção e caracterização de isolados microbianos para a biorremediação de ambientes marinhos contaminados por petróleo e misturas de óleo diesel/biodiesel**, Tese UFRGS, 2018.
- PRIEST, F. G. **Systematics and ecology of *Bacillus***. In: Sonenshein, A. L.; Hoch, J. A.; Losick, R. *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics*. Washington: ASM Press. 1020 p. 1993
- SAITOU, N. AND NEI, M. **The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees**. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425, 1987.
- SAKTHIPRIYA, N., DOBLE, M., & SANGWAI, J. S. **Efficacy of *Bacillus subtilis* for the biodegradation and viscosity reduction of waxy crude oil for enhanced oil recovery from mature reservoirs**. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 38(16), 2327-2335, 2016.
- SANTOS JUNIOR, A. A. D. **Determinação de parâmetros de óleos lubrificantes de motores de ciclo Otto e ciclo diesel através da espectroscopia no Infravermelho, métodos multivariados e cartas de controle**. Dissertação, Universidade de Brasília, 2011.
- SILVERSTEIN, R. M., E WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6th ed. Livros Técnicos e Científicos Editora SA. 1998
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI A., KUMAR S. **MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0**. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729, 2013.
- TIAN, J. *et al.* **Performance of trichlorfon degradation by a novel *Bacillus tequilensis* strain PA F-3 and its proposed biodegradation pathway**. *Biodegradation*, v. 27, n. 4, p. 265-276, 2016.
- TONINI, R. M. C. W., REZENDE, C. E. E GRATIVOL, A. D. **Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por Bactérias: revisão**, *Oecologia Australis* 14(4): 1025-1035, 2010
- TOWNSEND R. T., BONNER J. S., AUTENRIETH R. L. **Microbial dynamics during bioremediation of a crude oil-contaminated coastal wetland**. *Bioremediat J*. May. 2007
- TOWNSEND, S. A., EVRONY, G. D., GU, F. X., SCHULZ, M. P., BROWN JR, R. H., & LANGER, R. **Tetanus toxin C fragment-conjugated nanoparticles for targeted drug delivery to neurons**. *Biomaterials*, 28(34), 5176-5184, 2007.
- VIANA, M. O. **Bioprospecção de bactérias com potencial biotecnológico para biorremediação e monitoramento de praias impactadas da Baía de Guanabara/RJ**. Dissertação Escola Nacional de Saúde Pública- Fiocruz 2011.
- WANG, D., LIN, J., LIN, J., WANG, W., & LI, S. **Biodegradation of petroleum hydrocarbons by bacillus subtilis BL-27, a strain with weak hydrophobicity**. *Molecules*, 24(17), 3021, 2019.
- WILLISTON, E. H.; ZIA-WALRATH, P.; YOUMANS, G. P. **Plate methods for testing antibiotic activity of actinomycetes against virulent human type tubercle bacilli**. *Journal of Bacteriology*, v. 54, n. 5, p. 563, 1947.

6 BIOMASSA DE *SALVINIA* SP. COMO MATERIAL SUPORTE PARA CONSÓRCIO DE *BACILLUS* SP. PROMOVENDO A ADSORÇÃO E A BIODEGRADAÇÃO DE ÓLEO

6.1. INTRODUÇÃO

Reator é um sistema fechado com espaço físico e volume definido usado para tratamento de uma ampla variedade de compostos orgânicos e inorgânicos, por isso, apresenta diversas configurações (Von Sperling, 1996).

A principal vantagem do reator é justamente a otimização de espaço, tempo de trabalho e controle da qualidade do resíduo final, uma vez que alguns sistemas de tratamentos biológicos convencionais utilizam lagoas de estabilização, necessitando de espaço e clima apropriados (Cybis, 2001). Sendo assim, é uma alternativa de tratamento para pequenos negócios, loteamentos, comunidade e na descontaminação de ambientes (Paiva, 2017).

Outra vantagem do reator está na questão econômica, devido a seu baixo custo operacional, principalmente em comparação aos sistemas de tratamento convencionais, incluindo sua eficiência em atender aos padrões exigidos para emissão de efluentes (Cybis, 2001; Paiva, 2017).

Um sistema de reator em batelada consiste em cinco etapas distintas, o enchimento, a reação, a sedimentação, seguida pelo descarte e, por fim, caso necessário, a etapa de descanso (Betto *et al.*, 2013), tornando este método simples e eficaz. Entretanto, é necessário certo tempo para que aconteça a sedimentação da biomassa disponível, caso contrário ocorre perda significativa durante a etapa de descarga, o que traz certa limitação a esta técnica (Santos, 2007). Uma alternativa é a utilização de suportes para a imobilização da biomassa, que promove a fixação dos microrganismos ao meio de suporte sob a forma de biofilmes dentro do reator (Araújo, 2011).

A utilização desses meios de suportes, para a imobilização da biomassa microbiana no interior dos reatores, é capaz de aumentar a eficiência do reator em quase três vezes (Keenan e Sabelnikov, 2000). Entre outras vantagens estão a proteção contra fatores ambientais, maior disponibilidade de nutrientes, cooperação metabólica entre os microrganismos, aumento no tempo de retenção celular e da concentração de biomassa no reator, aumento das velocidades de conversão dos substratos e redução no volume dos reatores (Pontes, 2009; Paiva, 2017).

Neste trabalho, a opção pelo uso de biorreatores em batelada sequenciais, em escala de bancada, se deu pela facilidade de controle e manipulação dos processos, como também pelas vantagens anteriormente citadas para o uso deste modelo de reator em indústrias de grande e pequeno porte e biorremediação de ambientes. Esse biorreator foi montado para promover a degradação de óleo utilizando como material suporte a biomassa da *Salvinia* sp. com o consórcio de micro-organismos degradadores de óleo, visando atingir os seguintes objetivos específicos:

- f) Analisar a capacidade de imobilização de cepas bacterianas isoladas e consorciadas em biomassa produzida a partir da *Salvinia* sp. (com e sem tratamento químico) com potencial de biodegradação de óleo lubrificante usado;
- g) Investigar as condições limitantes na produção da biomassa de bactérias imobilizadas;
- h) Avaliar o potencial de biodegradação de óleo usado em embarcações em biorreator em batelada em escala de bancada com cepas bacterianas imobilizadas em biomassa da *Salvinia* sp.

6.2 METODOLOGIA

Os testes 2.1, 2.2 e 2.3 foram realizados para as quatro cepas do capítulo anterior de maneira individual, pois a execução de testes com elas consorciadas não seria possível verificar o comportamento de cada uma de forma individual. E para todos os testes que seguem, duplicatas de controles negativos (sistema isento de microrganismos), foram feitos e quantificados. Nos cálculos de biodegradação a concentração inicial considerada foi a encontrada nos controles negativos.

6.2.1 Imobilização de bactérias nos bio-sorventes

A imobilização foi feita de acordo com o método proposto por Lin *et al.*, (2014) adaptado. As células microbianas foram cultivadas em erlenmeyers de 125 mL, com volume de 50 mL de meio com os seguintes componentes: peptona 10 g L⁻¹; extrato de levedura 5 g L⁻¹ e NaCl 10 g L⁻¹ em pH 7,0, a 35 °C e rotação de 150 rpm. Após esse período, a biomassa bacteriana formada foi centrifugada a 503,10 g por 10 min para remoção do meio de cultivo. Em seguida, foi lavada com meio mineral por três vezes e novamente centrifugada a 503,10 g por 10 min. O meio mineral é composto por K₂HPO₄ 1 g L⁻¹; KH₂PO₄ 1,0 g L⁻¹; NH₄NO₃ 1,0 g L⁻¹; MgSO₄ 0,3 g L⁻¹; CaCl₂ 0,03 g L⁻¹ e 1% micronutriente, cuja solução foi composta por FeSO₄ 0,5 g L⁻¹; ZnSO₄ 0,2 g L⁻¹; MnSO₄ 0,02 g L⁻¹ e pH ajustado para 7,0. Após a lavagem, a biomassa formada foi transferida para erlenmeyers de 125 mL com 50 mL de meio mineral. Para a suspensão formada, foi realizada a contagem de células em câmara de Neubauer, com

coloração por azul de metileno. A seguir, a solução foi diluída até obtenção de uma concentração igual a 10^8 células microbianas por mL. Para a imobilização, 100 mg de biomassa foram deixadas com 50 mL da solução de microrganismos em agitação a 150 rpm por 36 horas ao abrigo da luz. Após esse período, o bioissorvente foi removido e lavado com meio mineral. A lavagem consistiu em misturar o bioissorvente com 50 mL de meio mineral em um erlenmeyer e agitar por 2 min a 150 rpm. Esse procedimento foi repetido três vezes. Em seguida, o bioissorvente foi transferido para placas de Petri para secar à temperatura ambiente por cerca de 24 horas, ou até completa secagem. Esse procedimento foi realizado em triplicata para as quatro espécies de bactérias com os dois bioissorventes separados.

A análise da incorporação foi executada por microscopia eletrônica de varredura, realizada em um metalizador da EMITECH, modelo JEOL JSM6390, e tensão de 20 KV. As amostras foram colocadas sobre a superfície do suporte de alumínio com fita de carbono dupla face e cobertas com uma fina camada de ouro no metalizador.

6.2.2 Tempo de crescimento bacteriano

O teste de tempo de crescimento bacteriano contribui para a otimização do processo de biodegradação, no qual é possível acompanhar o tempo de viabilidade das células microbianas ainda vivas, assim como os tempos de cada geração (Kereel *et al.*, 2017).

Os microrganismos crescidos em caldo nutriente, por 24h a 35°C, foram centrifugados e ressuspendidos em solução salina 0,8% (m/v) e padronizados para uma densidade ótica (DO) igual a 1,000 de absorvância em 600 nm em espectrofotômetro UV-Visível. Em erlenmeyers de 500 mL, 10 mL de inóculo padronizado foram inoculados em 89 mL do meio BH e 1 g de óleo usado de motor de navio, submetidos à rotação de 110 rpm e 35°C por 10 dias, todos em triplicata. A cada 24 h, foram retiradas alíquotas de 1 mL para a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) através da técnica de diluição seriada (Das; Mukherjee, 2007; Kereel *et al.*, 2017).

O volume total de alíquotas retiradas foi inferior a 20 % do volume total do sistema, que de acordo métodos de amostragem estatísticos, quando a variação do volume é inferior a $\pm 20\%$, o valor encontrado para diferença da concentração inicial e final no sistema não é estatisticamente significativo (Skoog, 2020)

O cálculo da taxa de crescimento (μ), de cada cepa foi calculado de acordo com a equação 16 para a fase estacionária específica de cada microrganismo (Schmidell *et al.*, 2001).

$$\ln N - \ln N_0 = \mu \times (t - t_0) \quad \text{Equação 16}$$

Onde, N: número de células de microrganismos no final da fase estacionária; N_0 : número de células de microrganismos no início do experimento; t: tempo final da fase estacionária (h); t_0 : tempo inicial (h).

O número de gerações (n) para cada estirpe foi calculado de acordo com a equação 17 (Schmidell *et al.*, 2001).

$$n = \frac{\ln N - \ln N_0}{\ln 2} \quad \text{Equação 17}$$

O tempo de geração (g) dado pela equação 18 (Schmidell *et al.*, 2001).

$$g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{Equação 18}$$

6.2.3 Teste de reinoculação

Os microrganismos cresceram separadamente em caldo nutriente, por 24h a 35°C, foram centrifugados, ressuspensos em solução salina 0,8% (m/v) e padronizados para uma DO igual a 1,000 de absorvância em 600 nm no espectrofotômetro UV-Visível. Em frascos de penicilina de 20 mL, o sistema foi constituído por 2,67 mL de meio BH, 300 µL de inóculo padronizado e 30 µL de óleo de motor de navio usado, e submetido a agitação de 150 rpm por 10 dias a 35 °C (Hanson *et al.*, 1993). A constituição do sistema para controles negativos foi mesma, porém sem adição do inóculo.

Para cada cepa foram efetuadas seis réplicas, sendo três utilizadas para quantificação de óleo por extração em clorofórmio e quantificação em UV-visível, descritas no Capítulo 3. Quanto às três réplicas restantes, alíquotas de 2 mL foram adicionadas aos frascos de penicilina de 20 mL, contendo 2 mL de meio BH e 40 µL de óleo. Esse sistema ficou em agitação (150 rpm) a 35°C por mais 10 dias. Em seguida, o óleo resultante foi extraído com clorofórmio e analisado por espectrofotometria no UV-Visível. Aqui também controles negativos, sem adição de inóculo, foram preparados em triplicata. A porcentagem de biodegradação do óleo foi calculada pela equação 15, Capítulo 3.

6.2.4 Comparação da eficiência de biodegradação das cepas individual X consórcio

O teste a seguir foi realizado para cada cepa em separado e para o consórcio contendo as 4 espécies de microrganismos, a fim de verificar a melhor eficiência do consórcio frente a cada espécie em separado.

Os microrganismos cresceram separadamente em caldo nutriente e foram padronizados como descrito anteriormente. Em frascos de penicilina de 20mL, o sistema composto por 3,6 mL de meio BH, 0,400 mL de inóculo padronizado e 40 uL de óleo de motor de navio usado, foi submetido a agitação de 150 rpm por 10 dias a 35 °C. Quanto ao consórcio, o sistema se

constituiu de 3,6 mL de meio BH, 0,100 mL de inóculo de cada espécie de microrganismo padronizado e 40 uL de óleo. Da mesma forma, os controles negativos foram preparados sem adição de inóculo (Hanson *et al.*, 1993). Após esse período, a quantificação de óleo restante foi desempenhada em espectrofotômetro UV-Visível. Também aqui, os cálculos para a porcentagem de biodegradação do óleo seguiram a equação 15, Capítulo 3.

6.2.5 Comparação da eficiência de biodegradação do consórcio de células livres X imobilizada

O teste foi realizado a fim de verificar se a eficiência de biodegradação do óleo para o consórcio microbiano imobilizado é de fato, como relata a literatura, mais eficiente quando comparado ao uso de células livres. Este teste foi feito com ambas as biomassas deste estudo a SS e SOH, para verificar se há diferença significativa na imobilização de microrganismo por ambas.

O crescimento e padronização dos microrganismos seguiram a metodologia já descrita no item 2.3. Assim, em frascos de penicilina de 20 mL, o sistema com células livres se constituiu de 3,6 mL de meio BH, 100 µL de inóculo de cada espécie de microrganismo padronizado e 40 µL de óleo. O mesmo sistema descrito foi utilizado as células imobilizadas, acrescido de 30 mg de biomassa, enquanto que não houve adição de inóculo no sistema dos controles negativos. Todos os testes foram praticados em triplicata e deixados em agitação de 150 rpm, a 35°C por 10 dias (Hanson *et al.*, 1993). Por fim, o espectrofotômetro UV-Visível quantificou o óleo restante. Aqui também, os cálculos para a porcentagem de biodegradação do óleo seguiu a equação 15, Capítulo 3.

6.2.6 Comparação da eficiência de biodegradação em água ultrapura X água marinha sintética

Esse teste teve por finalidade verificar se com adição de NaCl no sistema ocorre a inibição da biodegradação pelo consórcio microbiano, cujo interesse deste estudo é utilizar o biorreator para processos de fitorremediação de ambientes com presença de água salobra.

O crescimento e padronização dos microrganismos seguiram a metodologia descrita anteriormente (item 2.3). Em frascos de penicilina de 20mL, o sistema com água ultrapura foi constituído de 3,6 mL de meio BH, 100 µL de inóculo de cada espécie de microrganismo padronizado, 40 uL de óleo de navio e 40 mg de biomassa SOH. Para o sistema de água salobra, foi utilizado o mesmo sistema descrito acrescido de 20 mg de NaCl. Da mesma forma, os controles negativos seguiram sem adição de inóculo e deixados em agitação de 150 rpm, a 35°C

por 10 dias (Hanson *et al.*, 1993). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. Após esse período, os procedimentos de extração e quantificação do óleo foram executados.

6.2.7 Variação da concentração de óleo

A concentração de contaminantes é uma das variáveis que pode interferir no processo de biodegradação. Esse ensaio visou verificar o comportamento do consórcio em diferentes concentrações de óleo.

O crescimento e padronização dos microrganismos seguiram metodologia já descrita. Em erlenmeyers, adicionou-se 22,5 mL de meio BH, 0,625 mL de inóculo de cada espécie de microrganismo padronizado, 100 mg de biomassa SOH e óleo, cujas concentrações variaram entre 0,250, 0,125 e 0,025 mg. Para cada concentração de óleo, controles negativos foram preparados sem adição de inóculo, e deixados em agitação de 150 rpm, a 35°C por 10 dias (Hanson *et al.*, 1993). Todos os experimentos foram executados em triplicata. Por fim, o processo de extração e a quantificação do óleo por CG/FID foram realizados.

6.2.8 Tempo de crescimento do consórcio por bioestimulação

A bioestimulação é uma técnica que fornece energia ao sistema por meio da adição de nutrientes, promovendo assim a melhoria do processo de biodegradação. Por isso, o teste relativo ao tempo de crescimento tem a finalidade de observar como o aumento de microrganismos se processa após a adição do nutriente.

O teste de crescimento com adição de nutriente foi realizado como descrito anteriormente (item 2.3), em que seis réplicas foram efetuadas e, após o décimo dia, foi adicionado 1 mL de solução de peptona 10 g L⁻¹, previamente esterilizada em autoclave, em três das seis réplicas. Alíquotas de 1 mL foram retiradas nos tempos 24, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 408, 432, 456 e 480 horas. Para cada alíquota retirada, foi realizada a técnica de diluição seriada para contagem de UFC.

6.2.9 Teste de eficiência com bioestimulação

O crescimento e padronização dos microrganismos foram realizados de acordo com o item 2.3. Seis réplicas do sistema constituído de 22,5 mL de meio BH, 625 µL de inóculo de cada espécie de microrganismo padronizado, 100 mg de biomassa SS e 250 µg de óleo de navio foram adicionados. Os controles negativos sem adição de inóculo e os demais sistemas foram submetidos a agitação de 150 rpm, a 35°C por 10 dias (Hanson *et al.*, 1993). Após esse período, o processo de extração e quantificação do óleo foi realizado nas três réplicas. Quanto às outras três, 250 µL de solução de peptona (10 g L⁻¹ previamente esterilizada em autoclave) foram

adicionados e deixados por mais 10 dias em agitação a 150 rpm e 35°C. Por fim, estas réplicas foram submetidas ao processo de extração e quantificação do óleo usado de navio por CG/FID.

6.2.10 Análise físico-química do óleo bruto

6.2.10.1 Caracterização do óleo usado de navio por Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção foram obtidos na região do infravermelho, entre 400 e 4000 cm^{-1} , com a utilização do equipamento Infrared Spectrophotometer, RAffimty-1, Shimadzu.

6.2.10.2. Caracterização do óleo usado de navio por CG/FID

O laboratório Merieux NutriScienses efetuou a determinação dos hidrocarbonetos totais de petróleo por GC/FID nas amostras de óleo de acordo com o método EPA 8015 C 2007, Preparo EPA 3550C 2007.

6.2.11 Teste com biorreator em escala de bancada

Para a realização desse teste, foi montado um sistema constituído por frascos de vidro e tampas plásticas com capacidade de 1,3 L. A esse conjunto, foram adicionados 900 mL de meio BH, pH 7, 10 g de óleo usado de navio, 1 g de biomassa SS e 50 mL de cada inóculo devidamente crescido e padronizado. No total, quatro réplicas denominadas de A,B, C e D mais um controle negativo (CN) foram montados. Esse sistema ficou em repouso, ao abrigo da luz, temperatura controlada a 35°C e oxigenação constante de 2 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, por meio de bomba submersa, com filtros na entrada e saída para esterilização do ar, como pode ser observado na Figura 42.

Figura 42: Composição do sistema de biorreatores em escala de bancada.



A análise do óleo das réplicas A no 5º dia, B no 10º dia, C no 15º dia e, por fim, as réplicas D e CN no 20º dia avaliou o processo de degradação.

Fatores físico-químicos do meio como pH (pH-metro Digimed DM 22), temperatura e oxigênio dissolvido (OD), medidor portátil Orion STARA3265 com precisão de $\pm 2\%$, foram analisados para cada reator retirado. O monitoramento microbiológico consistiu na contagem de bactéria no sobrenadante, pelo método de diluição seriada até diluição 10^{-8} , e os resultados expressos em unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

Na análise do óleo, um balão de separação recebeu o conteúdo de cada biorreator de forma fracionada, para extração com clorofórmio. A remoção dos resíduos de compostos orgânicos ocorreu após a lavagem do biorreator com o solvente. A solução então foi separada em duas alíquotas, e uma porção enviada, ao Laboratório Merieux, para análise de Hidrocarbonetos Totais do Petróleo (tradução de *Total Petroleum Hydrocarbons* – **TPH**), por cromatografia gasosa de acordo com o método EPA 8015 D. A outra fração restante foi analisada no espectrofotômetro UV-Visível para quantificação do óleo.

6.2.11.1 Cálculos de eficiência do biorreator

A taxa de degradação média (r) foi calculada pela equação 19 (Schmidell *et al.*, 2001):

$$r = \frac{C_0 - C_t}{C_0 \times \Delta t} \quad \text{Equação 19}$$

Onde, C_0 : Concentração inicial de óleo, em g; C_t : Concentração do óleo no tempo t , em g; t : tempo em dias.

A média de remoção do óleo pelo biorreator (d) foi dada pela equação 20 (Schmidell *et al.*, 2001):

$$d = \left[\frac{C_0 - C_f}{C_f} \right] \times 100 \quad \text{Equação 20}$$

Onde, C_0 : Concentração inicial de óleo, em g; C_f : Concentração final de óleo, em g.

As médias de remoção foram calculadas para cada biorreator e, em seguida, construído o gráfico com esses resultados ao longo do tempo.

6.2.12 Análise toxicológica dos efluentes

O mesmo procedimento utilizado com os testes de biodegradação para o óleo com o consórcio foi realizado nos testes que seguem. Em erlenmeyes, 2,5 mL de cada inóculo, previamente crescido e padronizado foram adicionados em 90 mL de meio BH e 50 mg de biomassa SS, e deixados com agitação por 20 dias, em 150 rpm e 35°C, todos em triplicata.

Após esse período, as amostras foram filtradas em papel filtro qualitativo, acondicionadas em frascos de vidro e congeladas.

Testes de fitotoxicidade também foram realizados para o efluente após o tratamento de adsorção em coluna de leito fixo com a biomassa SOH referente ao teste realizado no capítulo 2 (Item 2.11).

6.2.12.1 Ensaio de fitotoxicidade com *Lactuca Sativa*

O uso de sementes de alface (*Lactuca Sativa*), de acordo com a metodologia ASTM D 1193-02 (2003), ajudou na avaliação do efeito tóxico dos efluentes. Um total de dez sementes foram distribuídas em placas de Petri, forradas com papel de filtro duplo e umedecidos com 5 mL de efluente, após processo de biodegradação, nas seguintes concentrações 3,125%, 6,25%, 12,50%, 25%, 50% e 100% (v/v). As amostras de efluentes após o tratamento em coluna experimentaram a mesma diluição. Um terceiro grupo, denominado de controle positivo, compreendeu as seguintes soluções de ácido bórico 640, 320, 160, 80 e 40 mg L⁻¹. Por fim, como grupo de controle negativo, placas foram umedecidas com água de destilada. O experimento teve a duração de cinco dias em temperatura ambiente. Após esse período, as sementes foram consideradas germinadas quando a radícula emergiu (Andrade *et al.*, 2010).

6.2.12.2 Teste de fitotoxicidade com *Phaseolus vulgaris*

Da mesma forma, as sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), previamente desinfetadas com hipoclorito de sódio e água destilada, foram utilizadas para avaliação do efeito tóxico dos efluentes. Seguindo o mesmo procedimento do teste anterior, dez sementes foram distribuídas igualmente em placas de Petri forradas com papel de filtro umedecidos com o efluente após processo de biodegradação nas mesmas concentrações e diluição das amostras de efluentes após o tratamento em coluna. Água de destilada serviu para umedecer as placas do grupo controle. A execução desse teste ocorreu em temperatura ambiente por sete dias. Após esse período, os percentuais de germinação, crescimento da raiz e índice de germinação foram avaliados (Tiquia *et al.*, 1996).

Os percentuais de germinação das sementes foram dados pela equação (21) abaixo:

$$\% \mathbf{G} = \frac{x_S}{x_{GC}} \times 100 \quad \text{Equação 21}$$

Onde, x_S : Média de sementes germinadas; x_{GC} : Média de sementes germinadas no grupo controle.

A porcentagem de crescimento das raízes das sementes foi alcançada pela equação 22:

$$\% \mathbf{CR} = \frac{x_{RS}}{x_{RGC}} \times 100 \quad \text{Equação 22}$$

Onde, %_{RS}: Média do crescimento das raízes das sementes; %_{RGC}: Média do crescimento das raízes no controle.

O índice de germinação das sementes foi atingido por meio da equação 23:

$$IG = \frac{\%G \times \%CR}{100\%} \quad \text{Equação 23}$$

Onde, % G: percentual de germinação da semente; % CR: porcentagem de crescimento da raiz da semente.

6.2.12.3 Ensaio de letalidade com *Artemia Salina* Leach L.

Os cistos de *Artemia salina* (100 mg) foram colocados para eclodir em 1L de água destilada com 40g de NaCl em pH 9. Para eclosão dos ovos, uma bomba ajudou na aeração do sistema, mantido em temperatura ambiente e sob luz de 60 W por um período de 48h. (Meyer; 1982). Após a eclosão, dez náuplios foram transferidos para tubos de ensaio, contendo 5 mL de solução cada, com auxílio de uma micropipeta. Em seguida à biodegradação com o consórcio microbiano, as amostras de efluente foram adicionadas aos tubos contendo os náuplios nas diluições 3,125%, 6,25%, 12,50%, 25%, 50% e 100% (v/v). As mesmas diluições foram aplicadas às amostras de efluentes após o tratamento em coluna. Tubos com apenas os náuplios e água salgada foram utilizados como controle positivo.

6.2.12.4 Teste de toxicidade aguda com *Vibrio fisheri*

Após processo de biodegradação e tratamento em coluna, as amostras dos efluentes foram enviadas para análise no Laboratório Merieux para análise da toxicidade aguda com *Vibrio fisheri* de acordo com o método ABNT NBR 15411-3 (2012).

6.2.13 Testes estatísticos

A análise estatística foi aplicada com os mesmos parâmetros utilizados no capítulo 1, em que as tabelas com os valores encontrados estão em APÊNDICE D e a interpretação dos resultados estão no final de cada resultado.

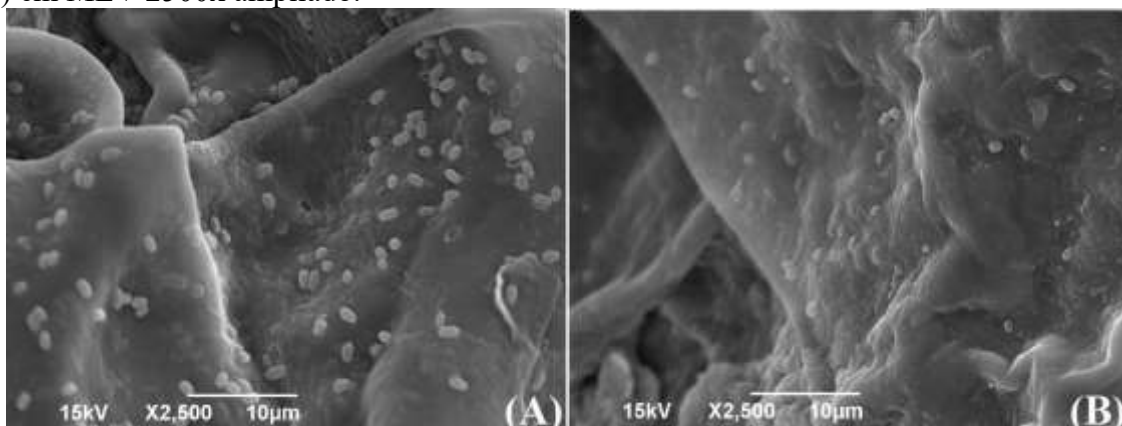
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Imobilização de bactérias nos bioSORVENTES

De acordo com as micrografias referentes às biomassas SOH e SS (Figura 43 A e B, respectivamente), os *Bacillus* que compõem o consórcio microbiano aderiram à superfície de ambas as biomassas vegetais do estudo. Aparentemente, a SOH manteve aderidas as bactérias a sua superfície, de modo que as estruturas dos bacilos ficassem melhor preservadas em comparação à SS. As quatro espécies deste estudo foram capazes de se aderirem a superfície das biomassas e as micrografias referentes a cada espécie, estão em anexo.

O teste de imobilização foi realizado com as quatro espécies em separado para certificação de que todas elas são capazes de aderir a superfície das biomassas, pois o teste com as espécies consorciadas não é possível verificar a aderência das espécies de forma discriminada.

Figura 43: Análise da incorporação de *Bacillus subtilis* na biomassa vegetal da SOH (A) e SS (B) em MEV 2500x ampliado.



De acordo com a literatura, estruturas fibrosas, como as deste estudo, apresentam boa capacidade de incorporação de microrganismos como *Acinetobacter venetianus* (Lin *et al.*, 2015), *Bacillus pumilus* (Liu *et al.*, 2015), *Bacillus badius* (Khatoon e Ray, 2018), *Candida tropicalis* (Basak *et al.*, 2014) imobilizados em bagaço de cana e o *Paracoccus* sp. imobilizado em carvão ativado a base de bambu (Lin *et al.*, 2010).

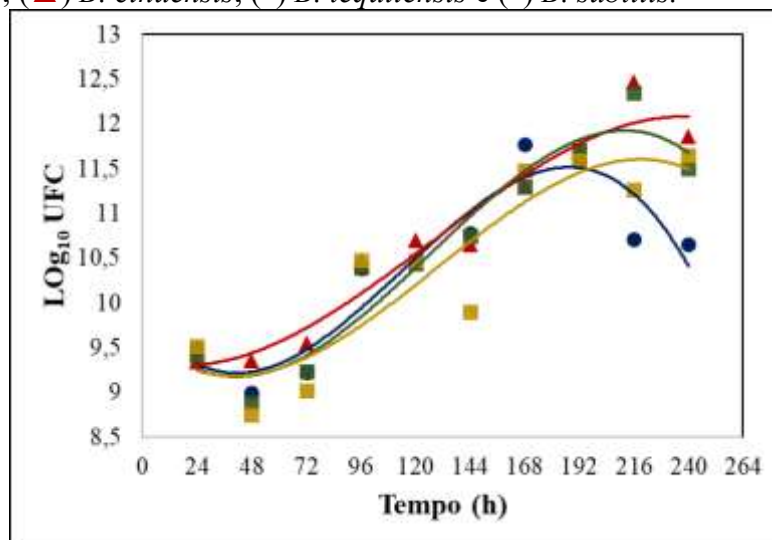
Estes resultados mostram a capacidade das biomassas SS e SOH de reterem os microrganismos deste estudo em suas superfícies, o que somada ao potencial de adsorção do óleo apresentam grande possibilidade de servirem como suporte para o biorreator. Assim, objetivo deste teste foi averiguar a habilidade da SS e SOH em reter os microrganismos em suas estruturas. Para os testes que seguem, esta metodologia de incorporação não foi aplicada, devido ao seu caráter qualitativo, não sendo possível quantificar o número de células de microrganismos por massa de bioissorvente com precisão. Dessa forma, não foi viável a comparação entre os diferentes parâmetros testados.

6.3.2 Tempo de crescimento bacteriano

Como pode ser observado na Figura 44, as quatro bactérias apresentaram fase de latência (lag) até 72h. A partir de então, inicia a fase exponencial até 168h, seguida da fase estacionária em tempos distintos para cada estirpe. As espécies *B. pseudomycooides* e *B. subtilis* obtiveram o fim da fase estacionária em 192h, seguido da fase de morte até 240h. No entanto, *B. tequilensis*

e *B. cihuensis* atingiram o fim da fase estacionária em 216h, aumentaram em quase cinco vezes aquele das espécies *pseudomycoide* e *subtilis*, e também com a fase de morte em até 240h.

Figura 44: Curva de crescimento individual das quatro espécies. Condições experimentais: 100 mL de meio BH e óleo usado de navio 1%, 150 rpm a 35°C. (dp 0,92 a 2,34). (●) *B. pseudomycoides*, (▲) *B. cihuensis*, (■) *B. tequilensis* e (■) *B. subtilis*.



A presença ou ausência da fase lag é um importante indício de como as vias metabólicas são induzidas após exposição dos microrganismos a diferentes fontes de energia. A existência da fase lag indica que a via metabólica precisa ser ativada, que há necessidade de enzimas específicas, revelando que o processo de biodegradação não será imediato (Oliveira, 2017).

Em estudo sobre crescimento microbiano para meios com BTEX, foi observada ausência de fase lag nas concentrações inferiores a 50 mg L⁻¹ e maior tempo de fase lag para concentrações mais elevadas, assim como aumento da biomassa celular. O estudo sugere ainda a conveniência de um tempo adicional para a produção de enzimas para a oxidação de uma grande quantidade do composto (Deng *et al.*, 2017). Esse mesmo comportamento, de fase estacionária no sétimo dia, foi observado para as espécies *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. e *Sphingomonas* sp, em meio com biodiesel e diesel, sendo todas essas espécies isoladas de solo contaminado por hidrocarbonetos (Schultz, 2010).

O crescimento das espécies de *B. methylotrophicus* e *P. sihuiensis* em meio BH com petróleo Bazu 2% apresentou pico de crescimento em 10 dias, com presença de células viáveis no meio em até 46 dias (Pereira, 2018). Tais resultados mostram a variabilidade de crescimento de espécies de microrganismos. Entretanto, é importante destacar que, segundo a literatura, cada microrganismo possui genes específicos de degradação para cada tipo de grupamentos de

hidrocarbonetos, sendo necessário avaliar não só a taxa de crescimento como também percentual de degradação (Maciel, 2013, Pereira, 2018).

As taxas específicas de crescimento (μ), número de gerações (n) e tempo de geração (g) foram calculados para cada gênero, como mostra a Tabela 21. As taxas de crescimento alcançadas para as bactérias foram reduzidas, devido à pouca disponibilidade de acesso às fontes de carbono ofertadas pelo meio. Vale destacar a quantidade de gerações obtidas para cada gênero. O *B. cihuensis* foi aquele com maior número de gerações produzidas, enquanto que o *B. tequilensis* teve o menor número de gerações. Esse dado aponta diferenças entre as vias metabólicas dos microrganismos, indicando que possivelmente o *B. cihuensis* possui via metabólica mais rápidas para acessar os hidrocarbonetos do óleo.

Tabela 21: Taxas específicas de crescimento microbiano, número de gerações e tempo de cada geração.

Gênero	<i>B. pseudomycoides</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. tequilensis</i>	<i>B. cihuensis</i>
μ (h^{-1})	0,095	0,074	0,062	0,081
n	3,298	2,561	2,138	5,615
g (h)	10,1	13,0	15,6	11,9

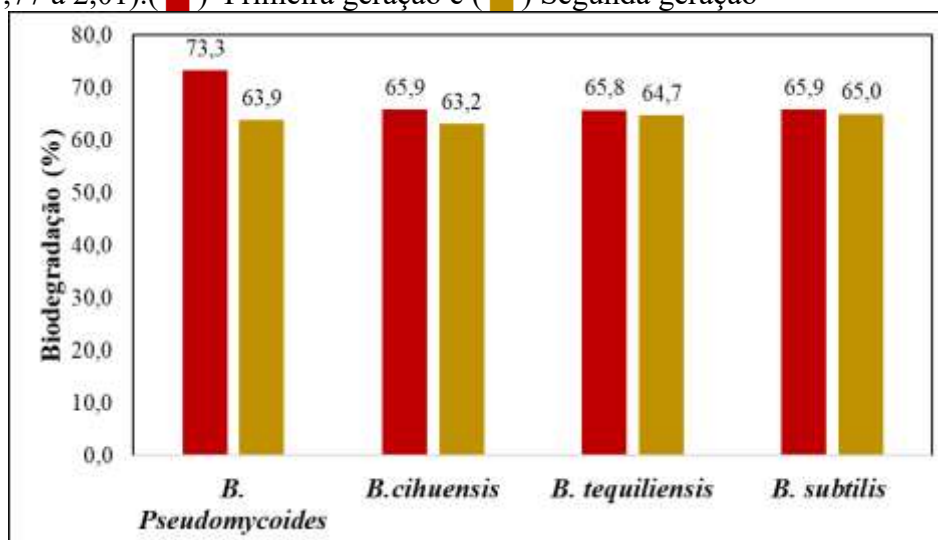
A biodegradação do BTEX com os microrganismos *Burkholderia cepacia* e *Enterobacter* sp apresentaram de taxas de crescimento iguais a 0,3 e 0,5 d^{-1} , respectivamente, para uma concentração inicial de BTEX de 10 $mg L^{-1}$ (Oliveira, 2017). Esses resultados, com as unidades convertidas, são compatíveis com aqueles alcançados para as quatro espécies deste trabalho.

6.3.3 Teste de reinoculação

O teste de reinoculação teve por finalidade verificar a capacidade de os componentes do óleo induzir as vias metabólicas do microrganismo (Nam e Alexander, 2001; Oliveira, 2017). Como pode ser observado na Figura 45, não houve diferença com significância estatística entre a biodegradação do óleo após a reinoculação para as quatro espécies de *Bacillus* estudadas. A *B. pseudomycoides* apresentou o maior valor comparado às demais espécies deste estudo, com 73,1% de biodegradação do óleo para a primeira geração e 64,4% na segunda geração. A outra espécie, *B. cihuensis*, obteve 66,2% na primeira e 63,2% na segunda geração. Igualmente, a *B. tequilensis* alcançou 66,1% e 65,3% de biodegradação para primeira e segunda gerações, respectivamente, enquanto que a *B. subtilis* também atingiu resultados semelhantes, com 66,5% e 65,4% de biodegradação do óleo usado de navio. De acordo com a análise estatística, os

valores de biodegradação para a primeira e segunda gerações de microrganismos não são diferentes.

Figura 45: Comparação da biodegradação entre primeira e segunda geração de estirpes. Condições experimentais: 4 mL de meio BH e óleo usado de navio 1%, 150 rpm a 35°C por 10 dias (dp 1,77 a 2,01). (■) Primeira geração e (■) Segunda geração



De acordo com a literatura, o processo de reinoculação pode não ser significativo para algumas cepas, como na biodegradação do BTEX por *Enterobacter* sp e *Burkholderia cepacia* (Oliveira, 2017). Da mesma maneira que a diferença somente pode ser percebida após um período de degradação mais prolongado, como na biodegradação de DDT (1,2,3,4,10,10-hexacloro-1,4,4a, 5,8,8a-hexahidro-exo-1,4, -endo-5,8-dimetanonaftaleno) em solo por uma bactéria em formato de bacilo Gram negativo, em que o processo de biodegradação teve duração de 180 dias (Nam e Alexander, 2001).

Os valores da biodegradação após reinoculação levaram a uma hipótese. Mesmo que a reinoculação não tenha obtido diferença significativa na ativação de genes específicos de degradação do óleo, através de seu resultado é possível observar a capacidade das espécies em degradar o óleo, uma vez que não houve variação da degradação final da primeira inoculação para a segunda. Dessa maneira na primeira inoculação a biomassa poderia possuir uma reserva energética do meio ao qual foi retirada, pois o meio de cultura inicial era rico em nutriente para favorecer seu crescimento. Essa energia poderia ser suficiente para que a biomassa iniciasse a degradação do óleo. Enquanto na segunda inoculação, essa possível reserva energética não existiria e, assim, a biodegradação seria menor ou até mesmo não ocorreria. Fato esse que não foi verificado, pois houve degradação do óleo proporcional à primeira geração. E com isso

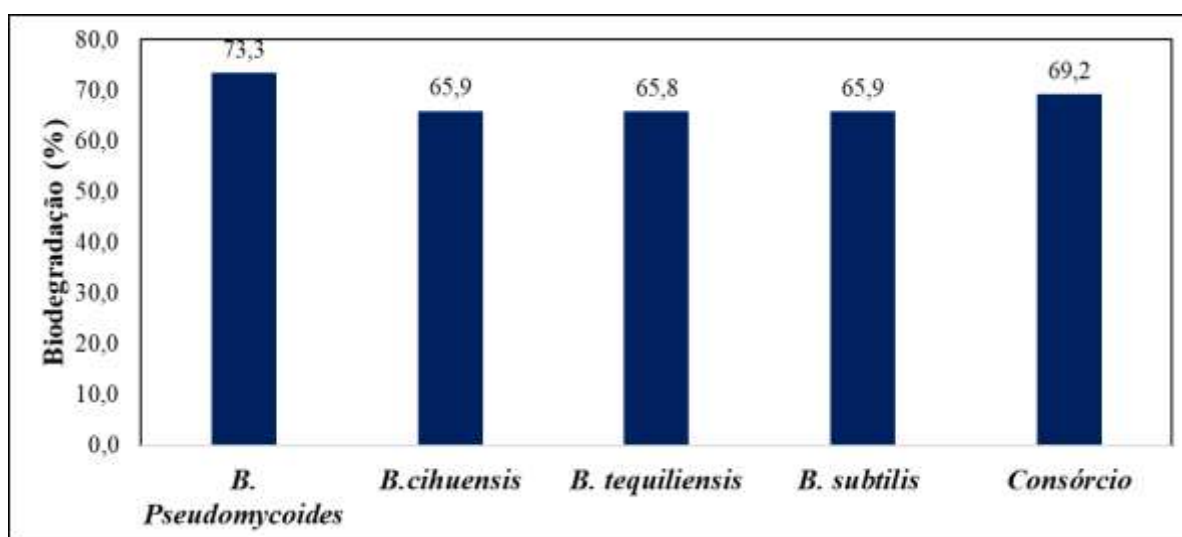
indicar que é possível reaproveitar a biomassa destes microrganismos para novos ciclos de degradação.

6.3.4 Comparação da eficiência de biodegradação das cepas individuais X consórcio

Para entender o potencial de degradação, os experimentos sobre biodegradação de microrganismos devem ser feitos de forma individual e consorciada para estimar os efeitos de interação dos compostos. Assim, é possível observar se os compostos exercem papel sinérgico ou antagônico durante a degradação (Oliveira, 2017).

Em geral, a comparação do desempenho de biodegradação do óleo usado de navio (Figura 46), entre as espécies de forma individual e as quatro consorciadas se mostrou similar. Apenas a espécie *B. pseudomycooides* obteve maior atividade comparada às demais, 73,3% de biodegradação do óleo. As demais espécies atingiram desempenho próximo a 66% de biodegradação e o consórcio com 69,2% de biodegradação do óleo. Esse valor obtido pelo consórcio é muito próximo da média das espécies em separado, o que indica que as mesmas não sofrem inibição de crescimento quando consorciadas durante o processo de degradação.

Figura 46: Comparação da biodegradação entre as espécies em separado e consórcio. Condições experimentais: 4 mL de meio BH e óleo usado de navio 1%, 150 rpm a 35°C por 10 dias (dp 0,97 a 1,99).



De acordo com a análise estatística, os valores encontrados na biodegradação do consórcio não foram maiores do que os resultados individuais.

No trabalho de Maciel (2013), a eficiência do consórcio também foi comparada com a resposta dos microrganismos na biodegradação de forma individual. Assim, foi possível observar que as espécies *Bacillus sp*, *Penicillium commune* e levedura (L24) apresentaram

maior potencialidade em degradar o óleo diesel separadamente. Em contrapartida, o elevado potencial de biodegradação do consórcio composto por *Pseudomonas* sp, *Yarroia* sp, *Acinetobacter* sp, *Cyrenebacterium* sp e *Sphingomonas* sp em microcosmos aeróbios com 45mg L⁻¹ de BTEX foi totalmente degradado em 20 horas (Jo *et al.*, 2008).

Embora não seja possível afirmar que houve proto-cooperação, os experimentos com o consórcio se mantiveram, visto que a literatura sugere que os microrganismos associados podem promover maior versatilidade das quebras de hidrocarbonetos, provenientes da ampla gama de complexas cadeias de hidrocarbonetos como as do óleo usado de navio utilizado neste estudo (Santisti *et al.*, 2015; Gurav *et al.*, 2017; Tian *et al.*, 2018).

6.3.5 Comparação da eficiência de biodegradação do consórcio de células livres X imobilizada

Na análise comparativa de biodegradação entre os microrganismos em forma livre e imobilizados nas biomassas SS e SOH, o *B. pseudomycooides* foi o que apresentou melhor resultado de biodegradação para células livres, com 73,3%, e 69,4% para células imobilizadas em biomassa SS e 68,5% para SOH. Em contrapartida, o *B. cihuenses* apresentou melhor resultado para imobilização com SS com 69,4% e 65,9% para forma livre e 65,3% para imobilização com SOH. *B. tequilensis* não obteve diferença para as biomassas imobilizadas SS e SOH com 71,4% e 71,3% para as biomassas SS e SOH respectivamente e 65,8% para a forma de células livres. *B. subtilis* alcançou melhor resultado para a imobilização com SS com 74,0%, e resultados próximos para imobilização com SOH e sem imobilização como 69,5% e 65,9% respectivamente. Finalmente, o consórcio que obteve valores similares de biodegradação para células livres e imobilizadas com SS e SOH, com 69,2%, 71,2% e 70,6%, respectivamente, como descrito na Tabela 22.

Tabela 22 Valores de biodegradação das cepas bacterianas em forma de células livres e imobilizadas.

	Biodegradação (%)		
	Livre	Imobilizada SS	Imobilizada SOH
<i>B. pseudomycooides</i>	73,3	69,4	68,5
<i>B. cihuenses</i>	65,9	69,6	65,3
<i>B. tequilensis</i>	65,8	71,4	71,3
<i>B. subtilis</i>	65,9	74,0	69,5
Consórcio	69,2	71,2	70,6

dp 0,36 a 1,01.

Como pode ser observado os resultados da tabela os valores de biodegradação de células livres e imobilizadas são próximos. Embora os de biodegradação com biomassa imobilizada

sejam em média maiores, de acordo com a análise estatística aplicada ao nível de significância de 5% não há evidências de que os valores de biodegradação de células livres e imobilizadas são diferentes. No entanto baseado no fato dos valores serem maiores ou iguais optou-se por continuar os experimentos com biomassa microbiana imobilizada pautados em dados da literatura dos benefícios do uso de microrganismos imobilizados.

No estudo de biodegradação de n-hexadecano com o *B. Pumillus* obteve valores de degradação iguais a 98,4% e 90,8% para as células livres e imobilizadas, respectivamente (Costa, 2006). Por outro lado, a biodegradação de ftalato por *Bacillus sp* mostrou que células imobilizadas em alginato degradaram 10 e 15 mM de ftalato, de uma carga inicial de ftalato de 10 e 20 mM, respectivamente. Os dados obtidos a partir de células imobilizadas com poliuretano revelaram que 10 e 20 mM de ftalato foram completamente degradados após 36 e 60 h de incubação, respectivamente. Entretanto, as células livres degradaram o ftalato 10 mM completamente após 72 h de incubação, a partir de 10 mM iniciais de ftalato (Patil *et al.*, 2006). De acordo com este estudo, o material utilizado como suporte interfere no processo de degradação. Desta forma, foi realizada a comparação da biodegradação do óleo, utilizando as duas biomassas SS e SOH como suporte, a fim de verificar as eficiências das mesmas.

Como os resultados foram semelhantes foi realizada análise estatística de médias populacionais de amostras independentes pelo teste *t student* para os valores médios de biodegradação de imobilização com a SS e SOH. De acordo com a análise ao nível de significância de 5% há evidências de que os valores de biodegradação para a utilização das biomassas SS é maior que a da SOH. Por isso para os testes que seguem a SS foi utilizada como suporte dos microrganismos

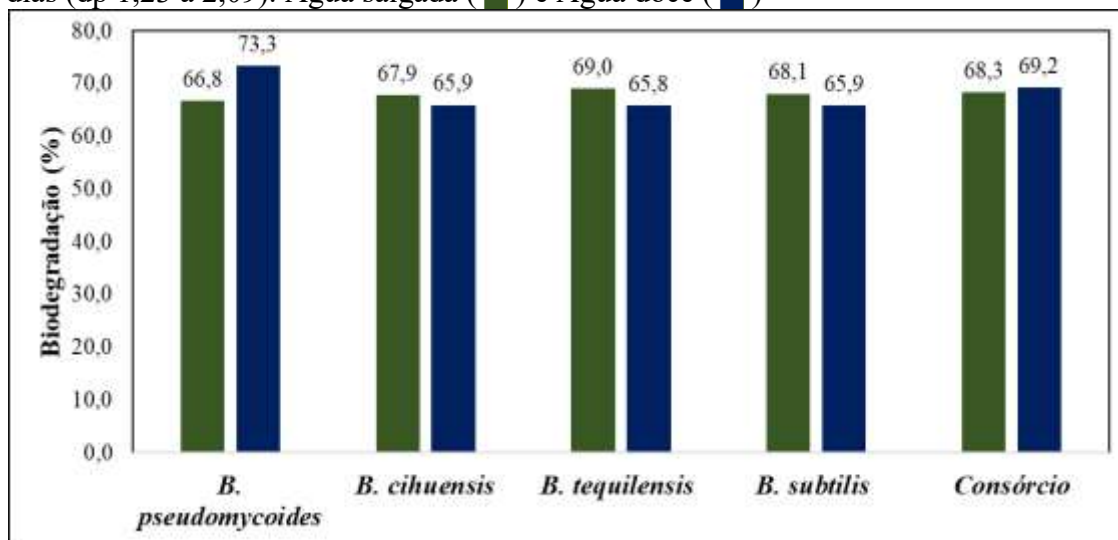
Essa diferença pode estar relacionada com a estrutura superficial das biomassas (Capítulo 2), em que a SS apresentou poros maiores, podendo facilitar o acoplamento das células dos microrganismos em sua superfície.

6.3.6 Comparação da eficiência de biodegradação em água ultrapura X água marinha sintética

A biodegradação entre as quatro espécies e o consórcio microbiano permite verificar a possibilidade do uso do biorreator no tratamento de efluentes industriais, bem como recuperação de áreas degradadas, em especial, derramamentos de óleo em águas salobras. Como pode ser observado na Figura 47, a espécie *B. pseudomyoides* apresentou 72,3% de biodegradação na água doce e 66,8% em água salobra. As demais espécies obtiveram resultados menores, porém similares em ambos os meios. A espécie *B. cihuenses* alcançou 65,7% em água

doce e 67,9% na água salgada e a *B. tequilensis*, 65,9% e 69,0% para água doce e salgada respectivamente. Outrossim, a *B. subtilis* e o consórcio microbiano atingiram 65,6% e 69,0% na água doce e 68,1% e 68,3% na água salgada, nessa ordem.

Figura 47: Comparação da biodegradação entre os meio com água doce e água salgada (5g L^{-1}). Condições experimentais: 4 mL de meio BH e óleo usado de navio 1%, 150 rpm a 35°C por 10 dias (dp 1,23 a 2,09). Água salgada (■) e Água doce (■)



A análise estatística mostrou que os valores encontrados para biodegradação em água doce e salgada não são diferentes. Esses resultados indicam a possibilidade de utilizar o biorreator com os dois tipos de meio.

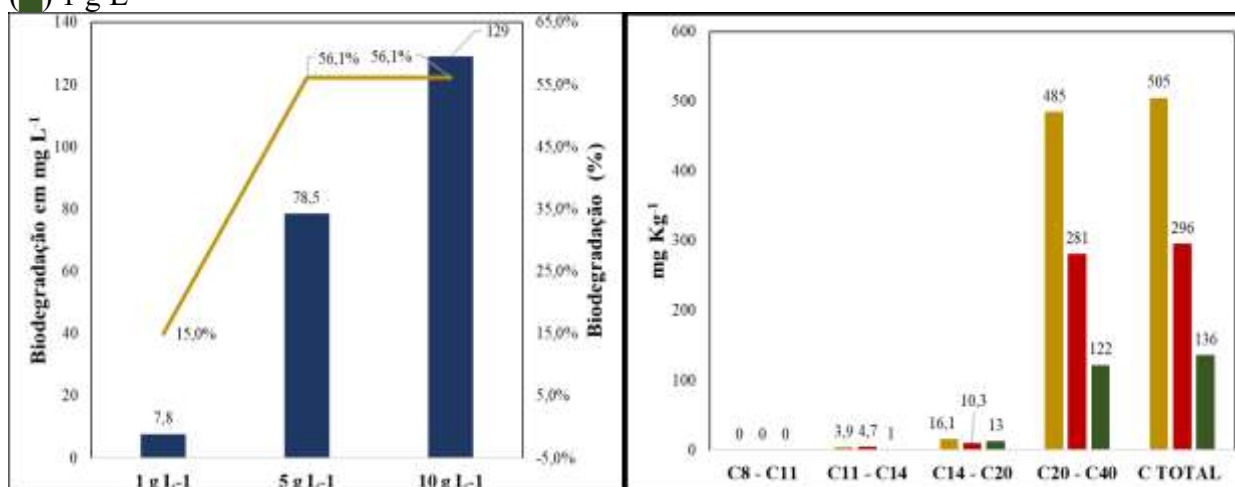
No estudo de biodegradação de petróleo cru em água do mar sintética revelou que a *B. liqueniforme* foi capaz de biodegradar 58,5% de petróleo em concentração inicial de 3500 ppm e concentração de $2,5\text{ g L}^{-1}$ de NaCl e pH 8,5 em 14 dias (Khanpour-Alikelayeh *et al.*, 2020). Ensaio de biodegradação, usando as fontes de hidrocarbonetos alifáticos e policíclicos aromáticos (PAHs), mostraram que ambas as bactérias *B. methylotrophicus* e *Pseudomonas shuiensis* foram capazes de biodegradar: (i) até 92,1% e 42,4% do contaminante alifático de cadeia média (C8 a C19) e longa (C20 a C33), respectivamente; (ii) 31,1% de isoprenóide (pristano) e (iii) 46% de antraceno, 33,9% de fenantreno e 35,3% de pireno, após 46 dias de incubação em água do mar (Pereira *et al.*, 2019). Esses estudos mostraram que é possível a biodegradação em meio salino com certa eficiência.

6.3.7 Variação da concentração de óleo

Nos testes que seguem somente as cepas consorciadas foram testadas, devido ao conjunto de resultados anteriores que permitiu o embasamento empírico para utilização do consórcio.

A variação da concentração inicial de óleo permitiu observar a diferença na resposta do consórcio em degradar o óleo usado de navio. De acordo com a Figura 48A, a concentração de 1 g L^{-1} obteve o menor desempenho de degradação quanto à quantidade de óleo degradado (7,8 mg), assim como em porcentagem, 15,0% do total. Com as duas outras concentrações testadas, a degradação e porcentagem do total foram bem maiores. Em 5 g L^{-1} , a degradação foi de 78,5 mg e porcentagem 56,1% do total, enquanto que a degradação foi igual a 129,0 mg e a porcentagem em 56,1% na concentração de 10 g L^{-1} . É possível observar pela Figura 49B, que a biodegradação pelo consórcio não é proporcional à concentração inicial de óleo, devido aos valores iguais para porcentagem de degradação encontrados nas concentrações mais elevadas. Entretanto, houve o incremento da taxa de degradação com o aumento da concentração de óleo no meio. Portanto, não existe inibição da biodegradação pelo consórcio com elevação da concentração.

Figura 48: Comparação da biodegradação em diferentes concentrações de óleo (1 , 5 e 10 g L^{-1}). Condições experimentais: 4 mL de meio BH e óleo usado de navio, 150 rpm a 35°C por 10 dias (dp $2,03$ a $2,77$). (A) Descrição da biodegradação (mg) X concentração inicial (g L^{-1}); (B) Análise em CG/FID de C8-11, C11-14, C14-20, C20-40 e TPH total. (■) 10 g L^{-1} , (■) 5 g L^{-1} , (■) 1 g L^{-1}



Estudos de degradação de Tricoforn por *B. tequilensis* encontrou resultado contrário, com inibição da degradação nas concentrações mais altas. Assim, houve degradação de 71,1, 42,3 e 38,4% em 200, 400 e 500 mg L^{-1} de tricloform, respectivamente (Tian *et al.*, 2016). Em contrapartida, a biodegradação de diesel, por consórcio microbiano isolado de área contaminada descobriu uma taxa de crescimento de biomassa proporcional ao aumento da concentração de diesel (1-10%) para as espécies *Bacillus* sp. e *Bacillus subtilis* (Maciel, 2013). Portanto, a biodegradação, além de depender do tipo de contaminante, também necessita da concentração inicial dele.

6.3.8 Tempo de crescimento do consórcio por bioestimulação

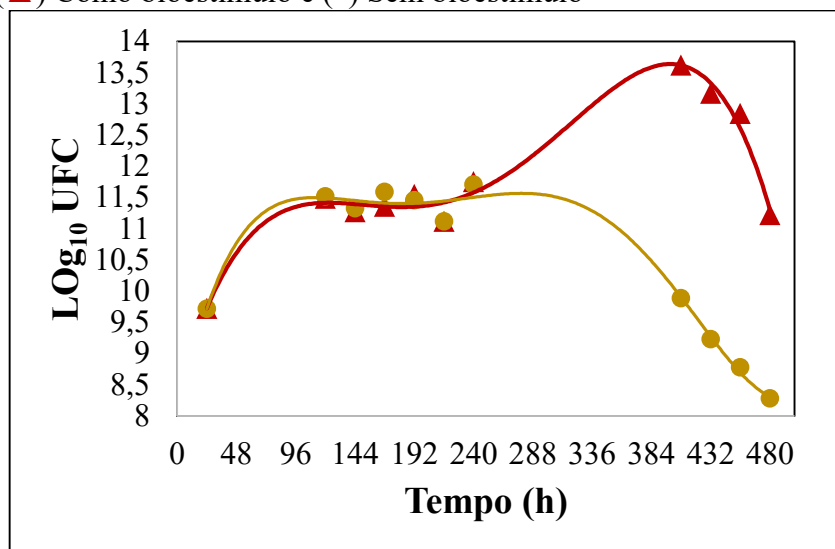
Uma das técnicas empregadas para aumentar a eficiência de biodegradação por microrganismos é a bioestimulação, cujos parâmetros como temperatura, umidade, fluxo de oxigênio, pH e os nutrientes (fósforo e nitrogênio) podem ser manipulados para tal finalidade (Rocha, 2015).

O crescimento de microrganismos ajudou a verificar o comportamento do consórcio com e sem a adição de nutrientes. Com base no teste de crescimento anterior e na finalidade da técnica de bioestímulo, a adição de nutriente somente foi realizada após o ciclo de crescimento do consórcio no décimo dia. De acordo com o experimento executado previamente, foi o tempo em que as células microbianas tiveram seu decréscimo no limite, não sendo possível aumento significativo da taxa de biodegradação.

Uma quantidade mínima de peptona (1% do volume total) foi adicionada de modo a iniciar um novo ciclo de crescimento. A peptona, preparada a partir de hidrólise enzimática de proteína animal, contém polipeptídios e aminoácidos e fornece uma valiosa fonte de nitrogênio para o crescimento de microrganismos (Rocha, 2015). O nitrogênio é um dos nutrientes mais utilizados para bioestimular o crescimento de microrganismos com a finalidade de acelerar o processo de biodegradação de hidrocarbonetos (Lahel *et al.*, 2016).

A Figura 49 exibe a curva de crescimento do consórcio bacteriano sem e com adição de nutrientes. Após a adição de peptona no 10º dia, observou-se a fase de morte no 17º dia, o que evidencia um aumento do crescimento de células devido à adição de peptona. Todavia, o crescimento do consórcio sem a adição do nutriente nesse mesmo período apresentou a fase de morte em igual intervalo de tempo que o consórcio com bioestímulo. Logo, as células mesmo sem adição de nutrientes permaneceram ativas (na fase estacionária) entre o 10º e 17º dia. Conseqüentemente, a adição de nutrientes pode não ser eficaz no aumento da taxa de biodegradação do óleo. De acordo com a análise estatística, a média de crescimento de colônias bacterianas com adição de nutrientes foi maior do que sem adição de nutrientes.

Figura 49: Curva de crescimento do consórcio bacteriano sem e com adição de nutrientes. Condições experimentais: 100 mL de meio BH e óleo usado de navio 1%, 150 rpm a 35°C (dp 3,89 a 6,01). (▲) Como bioestímulo e (■) Sem bioestímulo



As taxas específicas de crescimento, número de gerações e tempo de geração calculados para o consórcio sem e com adição de nutrientes podem ser vistos na Tabela 23. As taxas de crescimento do consórcio, como já observado anteriormente no crescimento das espécies individualmente, também foram baixas e não apresentaram diferença com a incorporação de nutrientes. Como esperado, o uso do bioestímulo aumentou em quase duas vezes o número de gerações. No entanto, o valor do tempo de cada geração foi muito próximo para ambos os testes, o que revela que a peptona não promoveu a longevidade dos microrganismos. Tiveram apenas seu desenvolvimento acelerado, devido à maior disponibilidade de energia no meio.

Tabela 23: Taxas específicas de crescimento microbiano, número de gerações e tempo de cada geração para o consórcio com e sem adição de nutrientes

	<i>Sem bioestímulo</i>	<i>Com bioestímulo</i>
μ (h ⁻¹)	0,021	0,023
n	6,611	12,955
g (h)	45,4	41,2

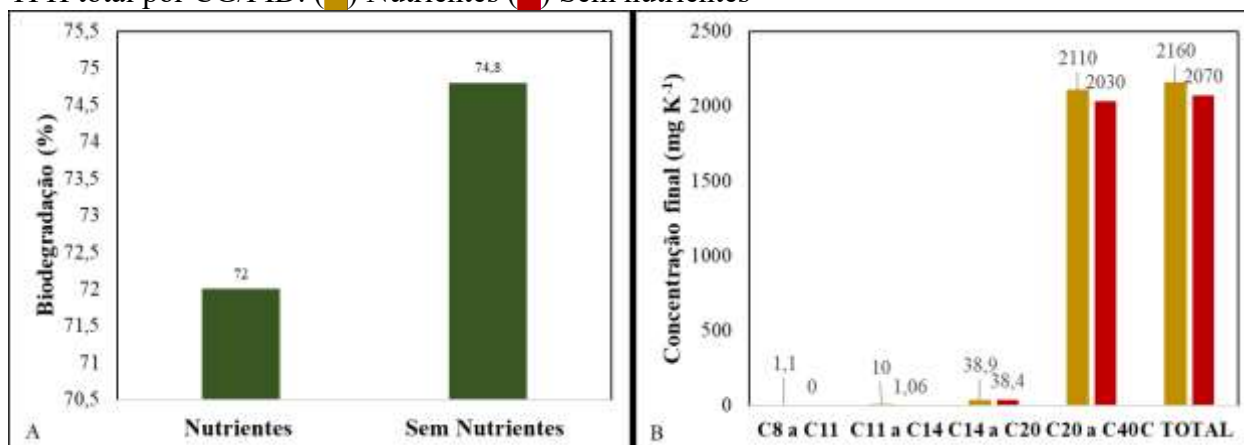
A avaliação da biodegradação do diesel por consórcio bacteriano, sob diferentes concentrações de nitrogênio, constatou que não houve mudança de biodegradação significativa para concentrações mais altas de nutrientes. A biodegradação de diesel, em 20 dias, foi de 36,20% e 35,10% para maior e menor concentração de N, respectivamente (Della-Flora, 2018).

6.3.9 Teste de eficiência com bioestimulação

O teste de comparação de biodegradação com adição de nutrientes, não atingiu diferença significativa na biodegradação do óleo com o processo de bioestímulo. A biodegradação do

óleo com adição de nutrientes alcançou 72,0% e 74,8%, sem os nutrientes, Figura 50A. Resultado semelhante foi encontrado por cromatografia em TPH, como observado na Figura 50B. Estatisticamente ao nível de significância de 5% não há evidências de que os valores de biodegradação com adição de nutrientes e sem adição de nutrientes são diferentes.

Figura 50: Comparação de biodegradação sem e com adição de nutrientes. Condições experimentais: 4 mL de meio BH e óleo usado de navio 1%, 150 rpm a 35°C por 20 dias (dp 0,16 a 0,18). (A) % de biodegradação; (B) Determinação de C8-11, C11-14, C14-20, C20-40 e TPH total por CG/FID. (■) Nutrientes (■) Sem nutrientes



De acordo com a literatura, a adição de nutrientes pode promover aumento da biomassa, facilitando a biodegradação do óleo (Oliveira, 2019). Alguns estudos obtiveram resultados positivos para biodegradação de hidrocarbonetos com a técnica de bioestímulo, como a biodegradação de hidrocarbonetos totais de petróleo por biorreator (Oliveira, 2019). Da mesma forma, o trabalho com a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo pela atuação de fungos endofíticos isolados da *Eichhornia crassipes* corroborou esses achados (Rocha, 2015).

A biodegradação é uma técnica muito eficiente. Entretanto, seus resultados variam de acordo com o microrganismo em questão e o tipo de contaminante. Existem casos em que o uso de nutrientes, como o nitrogênio, é necessário para a melhor eficiência da biodegradação. No entanto, a adição de nutrientes aumenta os custos do processo (Suja *et al.*, 2014). Por consequência, é necessário avaliar a relação custo X benefício no uso desses compostos. Como a técnica de bioestímulo não foi significativa neste estudo, os nutrientes não foram adicionados nos demais testes

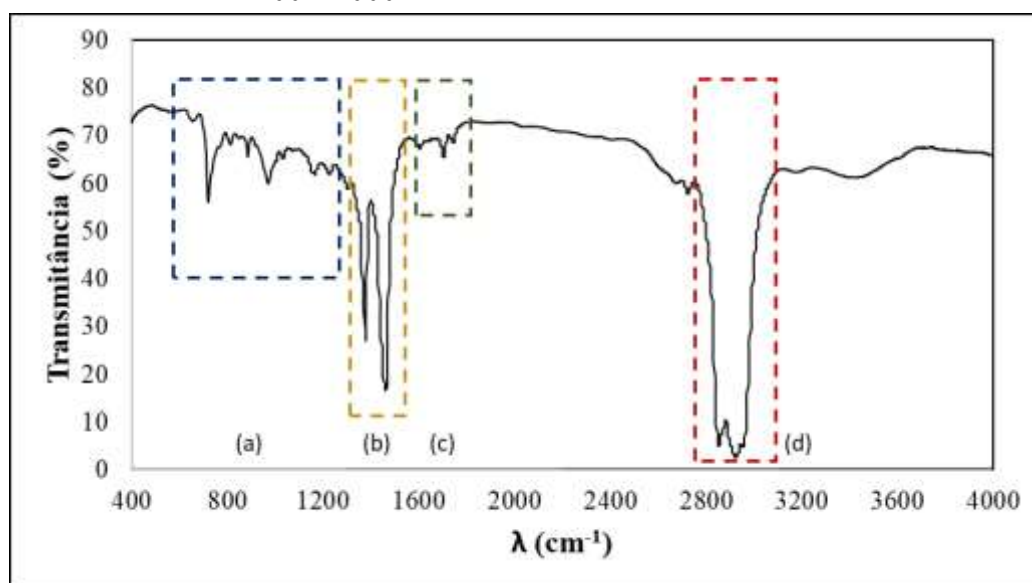
6.3.10 Análise físico-química do óleo bruto

6.3.10.1 Caracterização do óleo usado de navio por Espectroscopia no Infravermelho (IV)

O objetivo da espectroscopia no IV foi analisar qualitativamente a composição química do óleo. A Figura 51 mostra um espectro típico de óleo lubrificante com quatro regiões

características desse tipo de substância (Santos Junior, 2011). A região (a) marcada como região do espectro tida como a “impressão digital” do material, que, neste caso, se refere à deformação axial de ligação C-O de ésteres. A região (b) com duas bandas intensas características de vibrações de deformação angular de ligações C-H em metilas e metilenos. A região (c) com bandas de baixa intensidade características de vibração de deformação axial de ligação C=O de grupos carbonila presentes em ésteres alifáticos. Por fim, a região (d) com bandas intensas típicas de deformação axial de ligações C-H de grupamentos metila e metileno (Silverstein e Webster, 1998).

Figura 51: Espectroscopia no Infravermelho. Espectro do óleo de motor de navio usado. Comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1}



De acordo com o espectro obtido, em especial na região da impressão digital, é possível identificar alguns grupos constituintes do óleo lubrificante (Santos Junior, 2011), como resumido na Tabela 24.

Tabela 24: Identificação de grupos químicos constituintes do óleo de motor de navio usado, suas respectivas bandas e especificações para óleos lubrificantes.

Grupo	Especificações	Bandas referentes
Alquil ditiofosfato de zinco	Aditivos do tipo antidesgaste e antioxidante	665 e 975 cm^{-1}
Hidrocarbonetos	Constituintes típicos dos óleos lubrificantes	772, 815, 887, 1660, 2854, 2924 e 2954 cm^{-1}
Succinimida	Aditivo do tipo dispersante	1230 e 1705 cm^{-1}
Polimetacrilato	Componente típico dos aditivos de abaixamento do ponto de fluidez e de modificadores de viscosidade	1154, 1169 e 1745 cm^{-1}

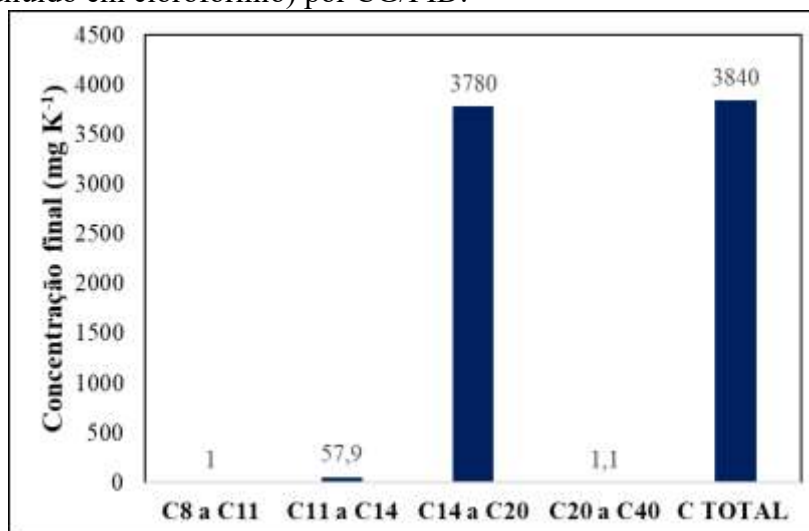
Fonte: Santos Junior (2011)

De acordo com a literatura, o óleo lubrificante para motor de navio usado é formado por moléculas inalteradas do óleo básico, produtos de degradação do óleo básico, contaminantes inorgânicos, água proveniente da câmara de combustão, hidrocarbonetos leves (combustível não queimado), partículas de carbono produzidas pelo craqueamento dos combustíveis e do próprio lubrificante. Além desses componentes, ainda geram compostos tais como dioxinas, ácidos orgânicos, cetonas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, oriundos da fórmula original e/ou absorvidos do próprio motor (Teramae *et al.*, 2012).

6.3.10.2 Caracterização do óleo usado de navio por cromatografia gasosa (CG)

De acordo com a análise de TPH por CG para as faixas de gasolina (C8-11), querosene (C11-14), diesel (C14-20) e óleo lubrificante (C20-40), é possível observar que, mesmo após longo período de uso no motor do navio, o óleo deste estudo apresentou maior porcentagem de TPH na faixa específica de óleo lubrificante (98,0%) e alguns traços de diesel (2,0%) (Figura 52).

Figura 52: Análise de C8-11, C11-14, C14-20, C20-40 e TPH total no óleo usado de motor de navio (4g L^{-1} diluído em clorofórmio) por CG/FID.



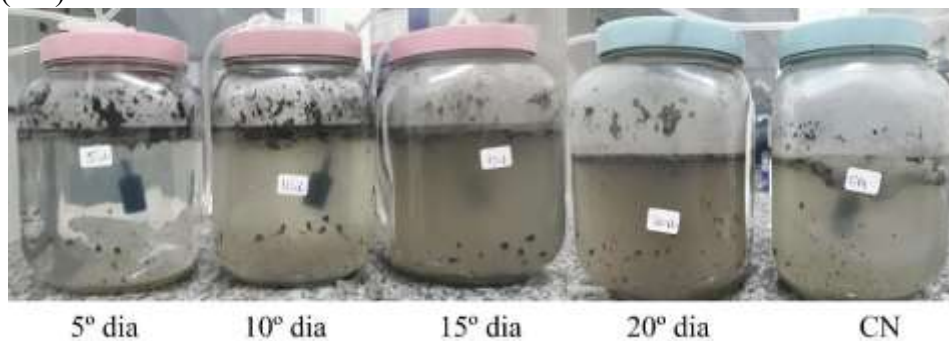
Pela caracterização do óleo usado de navio por espectroscopia no IV e de TPH por CG, foi possível verificar que o óleo utilizado no estudo tem a composição típica de óleo lubrificante, com os principais grupos funcionais, como já discutido, e faixa de cadeia de hidrocarbonetos entre 20 e 40 carbonos.

6.3.11 Teste com biorreator em escala de bancada

A Figura 53 mostra uma mudança visual no sistema no decorrer dos 20 dias. Além do aumento na turbidez do meio ao longo do tempo, foi possível observar diminuição do filme de óleo, em especial, nas imagens referentes ao 15º e 20º dias. Da mesma forma, a diferença de

aparência entre os reatores e o controle negativo, que manteve a borra de óleo intacta durante os 20 dias, pode ser observada na Figura 54.

Figura 53: Imagem dos reatores retirados para análise em ordem cronológica e o controle negativo (CN).



Os hidrocarbonetos presentes no petróleo e seus derivados são compostos por basicamente quatro grupos, como os alifáticos, os aromáticos, as resinas e os asfaltenos. A biodegradação desses hidrocarbonetos ocorre majoritariamente pela ação dos microrganismos, que, quando manipulados, efetivamente podem promover a degradação em um curto espaço de tempo, de dias a horas. Em geral, os primeiros grupamentos a serem degradados ou consumidos são os n-alcenos e os menores compostos de dez a 22 carbonos, seguidos dos hidrocarbonetos de peso moderado de 19 a 40 carbonos em suas cadeias. Na sequência, estão aqueles de cadeia ramificada ou cíclica, que levam mais tempo para serem degradados (Della-Flora, 2018, Birch *et al.*, 2017).

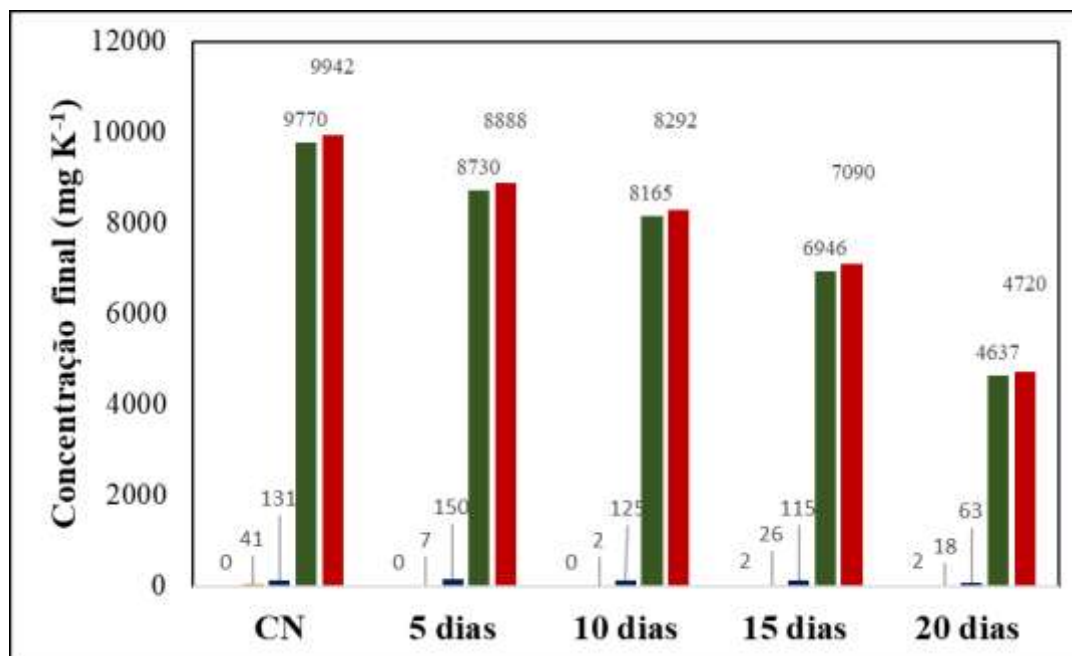
Uma das propostas do biorreator deste estudo, além da simplicidade para aumento do custo-benefício do tratamento, é a adesão bacteriana, que consiste na colonização em superfícies. De acordo com a literatura, existe uma influência positiva na atividade de microrganismos quando comparada aos mesmos de forma isolada. A essa adesão foi atribuída a definição de biofilme. No entanto, para que seja formado um biofilme é necessário um número mínimo de células aderidas por cm^2 (106). Caso contrário, ocorre apenas a adesão bacteriana (Silva, 2011).

Cerca de 99% das populações de bactérias são capazes de formar biofilmes, destacando-se as *Pseudomonas* sp, *Enterobacter* sp, *Flavobacterium* sp, *Alcaligenes* sp, *Staphylococcus* sp e *Bacillus* sp. Esses biofilmes podem ser formados em uma grande variedade de superfícies (Gomes, 2011).

A Figura 54 mostra a concentração de TPH para cada biorreator. É possível verificar a diminuição da concentração das cadeias carbônicas referentes ao óleo lubrificante (C20-40)

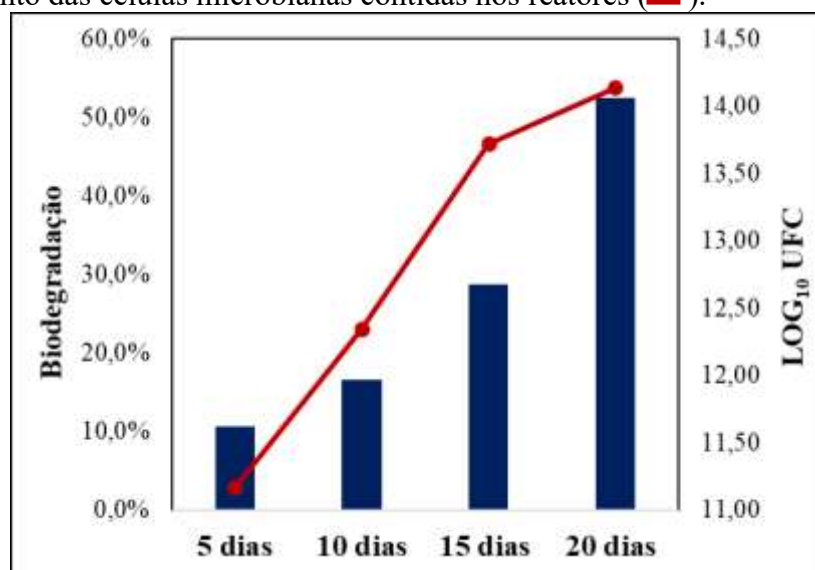
para cada biorreator. É possível observar o processo crescente de biodegradação ao longo do tempo, mesmo se tratando de amostras individuais referente a cada biorreator.

Figura 54: Concentrações residuais de C8-11, C11-14, C14-20, C20-40 e TPH total para cada biorreator por CG/FID. (■) C8-11, (■) C11-14, (■) C14-20, (■) C20-40 e (■) TPH TOTAL (C8-40)



A Figura 55 contribui para melhor compreensão do processo de biodegradação ao longo do tempo. Conforme verificado anteriormente, observou-se um aumento progressivo da biodegradação do óleo, como também a multiplicação das células da biomassa do consórcio ao longo do tempo. Mesmo após o 20º dia, o consórcio ainda se mostrava em expansão, possivelmente a caminho da fase estacionária. O pequeno declínio na taxa de crescimento da população microbiana, observado a partir do 15º dia, pode estar relacionado ao aparecimento de moléculas biotransformadas nas fases anteriores, resultantes do metabolismo das bactérias, possivelmente com acentuada toxicidade (Melo, 2004). Entretanto, com esse resultado, é possível inferir a possibilidade de extensão do prazo de utilização do biorreator a fim de aumentar a taxa de biodegradação do óleo.

Figura 55: Porcentagem de biodegradação do óleo pelos reatores ao longo do tempo (■) e curva de crescimento das células microbianas contidas nos reatores (—).



A taxa específica de crescimento, número de gerações e tempo de geração também foram calculadas para o biorreator, como no experimento anterior sobre crescimento. Os resultados encontrados para essas variáveis foram $0,019 \text{ h}^{-1}$, 9,875 e 50,7h, respectivamente. A comparação dessas respostas com aquelas obtidas no crescimento de células livres em erlenmeyers possibilitou verificar que a taxa específica de crescimento se manteve, enquanto que o número de gerações e o tempo de geração foram maiores no biorreator. Assim, pode-se inferir que o biorreator beneficiou o crescimento microbiano ao sistema, controlando o processo de biodegradação. Segundo a literatura, essa é uma das vantagens do uso de sistemas com biorreatores, visto que assumem as configurações desejadas. Assim, permitem um maior controle das condições otimizadas, mais favoráveis ao bioprocessamento (Silva, 2012).

Os parâmetros físico-químicos de cada reator foram mensurados e seguem na Tabela 24. Não foi observado diferença expressiva para OD e temperatura, enquanto o pH obteve leve queda de 6,97 para 6,52. Esta redução no valor de pH indica o aumento de cargas positivas com o processo de biodegradação do óleo.

Tabela 25: Parâmetros físico-químicos: Oxigênio Dissolvido (OD), pH e temperatura referente a cada biorreator.

Tempo	OD (mg L ⁻¹)	pH	Temperatura (°C)
5° dia	1,77 ±0,02	6,98 ±0,01	35,1 ±0,1
10° dia	2,05 ±0,02	6,95 ±0,01	34,7 ±0,1
15° dia	1,98 ±0,02	6,73 ±0,01	35,3 ±0,1
20° dia	1,97 ±0,02	6,52 ±0,01	34,8 ±0,1

6.3.11.1 Cálculos de eficiência do biorreator

Os cálculos de eficiência do biorreator encontram-se na Tabela 26, juntamente com os resultados publicados de degradação de óleos derivados do petróleo por diferentes biorreatores encontrados na literatura. O biorreator deste estudo obteve média de remoção de 52,5% e taxa de degradação de $0,027\text{d}^{-1}$ e, de acordo com os trabalhos referidos, encontra-se entre os melhores resultados. Dessa forma o biorreator desenvolvido por este estudo apresenta potencial para aplicação da degradação de óleo usado de motor de navio.

Tabela 26: Biodegradação de derivados do petróleo por diferentes biorreatores encontrados na literatura.

Tipo de biorreator	Microrganismos	Contaminante	Tempo	Média de remoção	Taxa de degradação	Referência
Escala de laboratório, em batelada e com inóculo em leito fixo (<i>Salvinia</i> sp.).	<i>B. pseudomycooides</i> , <i>B. cihuales</i> <i>B. tequilensis</i> e <i>B. subtilis</i>	1% de óleo usado de motor de navio	20 dias	52,5% (TPH)	$0,027\text{d}^{-1}$	Este trabalho
Bancada, modelo BioFlo 110	<i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Rhizopus arrhizus</i> e <i>Aspergillus niger</i>	10% de óleo diesel	15 dias	96,1%	$0,064\text{d}^{-1}$	Cruz, 2017
Imersão temporária	Consórcio fúngico imobilizado em fibra de coco	3% do óleo da bacia do Recôncavo	90 dias	78,5% (TPH)	$0,009\text{d}^{-1}$	Lima, 2014
Fluxo contínuo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	Solo contaminado 2% petróleo	60 dias	81,9% (TPH)	$0,014\text{d}^{-1}$	Safdari <i>et al.</i> , 2018
De rolos defletores em pequena escala (2,2 L)	Cultura microbiana (Não identificada)	5% Diesel	121 dias	36%	$0,003\text{d}^{-1}$	Nikakhtari <i>et al.</i> , 2010
Híbrido de manta de lodo / biofilme	<i>Staphylococcus warneri</i> e <i>Bacillus cereus</i>	950mg L^{-1} petróleo	24h	99% (TPH)	$0,990\text{d}^{-1}$	Moussavi e Ghorbanian, 2015
Bancada, modelo BioFlo 110	<i>Bacillus</i> sp. <i>B. amyloquefacientes</i>	1% combustível marinho	24 dias	93,5%	$0,039\text{d}^{-1}$	Almeida <i>et al.</i> , 2017

6.3.12 Análise toxicológica dos efluentes

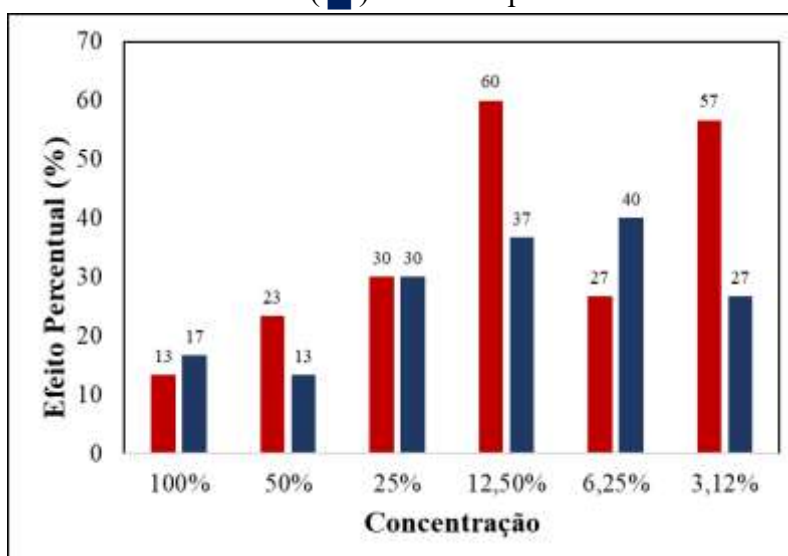
6.3.12.1 Ensaio de fitotoxicidade com *Lactuca Sativa*

O teste de fitotoxicidade com as sementes de alface aponta uma toxicidade maior dos efluentes deste estudo em relação à literatura, em que produtos da biodegradação de petróleo e

seus derivados apresentaram índice de germinação médio de 90% (Banks e Schultz, 2005; Baoune *et al.*, 2019). No presente trabalho, o valor máximo de germinação foi de 60,0% para resíduo do biorreator em concentração de 12,5%, o que pode estar relacionado à semente utilizada, cuja taxa de germinação foi também de 65% para o controle positivo. O teste foi realizado por duas vezes, e as mesmas taxas médias de germinação foram obtidas em ambas. O efluente, após o tratamento em coluna (Capítulo 1), apresentou maior fitotoxicidade com as sementes de alface na germinação máxima de 40,0% para a concentração de 6,25%, como observado na Figura 56.

Ao nível de significância de 1%, não há evidências de que os valores das medianas das taxas de germinação de *L. sativa* para o resíduo do biorreator são diferentes da taxa de germinação das sementes para o resíduo do efluente após tratamento em coluna.

Figura 56: Efeito percentual da germinação de sementes de alface por concentração de efluentes. (■) Resíduo do biorreator e (■) Efluente após tratamento em coluna



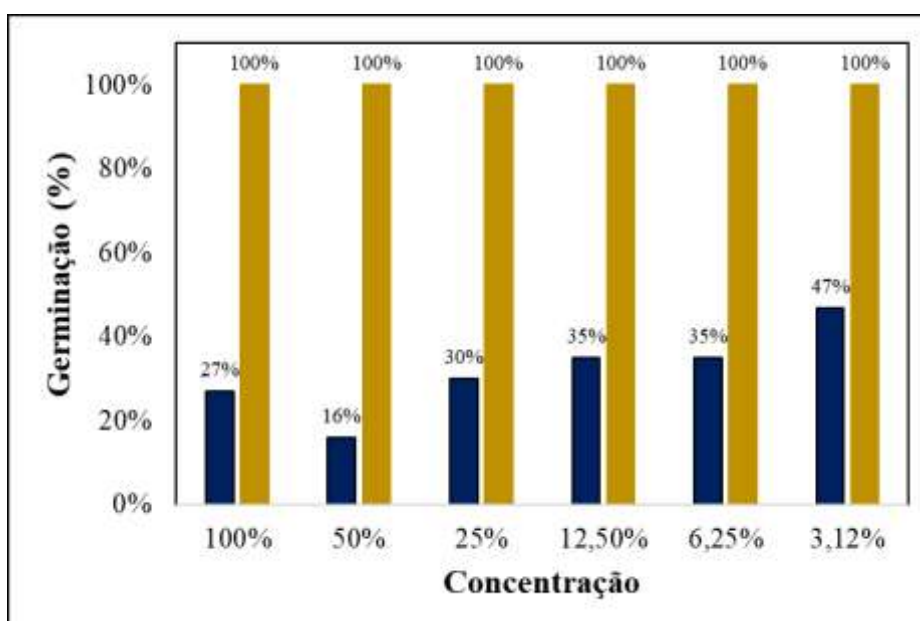
O efeito percentual observado na germinação da *L. sativa* com o efluente de biorreator, tratado após 7 dias de biodegradação de diesel, foi de 41% (Silva *et al.*, 2015). Por outro lado, o teste de toxicidade, realizado após 84 dias de remediação de solo contaminado com 15% de óleo lubrificante usado, revelou 80% de germinação (Abioye *et al.*, 2012). Todavia, outro experimento em solo contaminado com diesel e enriquecido com *B. subtilis*, encontrou baixa inibição da raiz de *L. sativa*. A porcentagem de inibição da raiz e hipocótilo em solo contaminado com petróleo, petróleo enriquecido com inóculo, e o diesel permaneceu acima de 55% (Cruz *et al.*, 2014).

6.3.12.2 Fitotoxicidade com *Phaseolus vulgaris* L.

O teste de fitotoxicidade com as sementes de feijão indicou maior toxicidade do resíduo do biorreator na comparação com o efluente após o tratamento em coluna, cuja germinação em todas as concentrações foi de 100%, como mostra a Figura 57.

Os percentuais de germinação da *Phaseolus vulgaris* para resíduo do efluente após tratamento em coluna foram estatisticamente mais elevados do que aqueles encontrados no resíduo do biorreator.

Figura 57: Índice de germinação para sementes de feijão de acordo com a variação da concentração de efluentes. (■) Efluente após tratamento em coluna e (■) Resíduo do biorreator



Na literatura, os produtos da biodegradação de petróleo e derivados apresentaram índice de germinação médio de 90-100% (Cruz, 2017; Marchut-Mikołajczyk, *et al.*, 2021), enquanto que, no presente estudo, o valor máximo de germinação foi em 55,0% para o resíduo do biorreator tratado em concentração de 3,12%.

Na tabela 27, são apresentados os percentuais de germinação e crescimento da raiz para ambos os efluentes, assim como o índice de germinação. Como já observado anteriormente, o efluente tratado em coluna de adsorção apresentou os melhores resultados.

Tabela 27: Porcentagem de germinação (%G), crescimento da raiz (%CR) e índice de germinação (IG) para a semente de feijão.

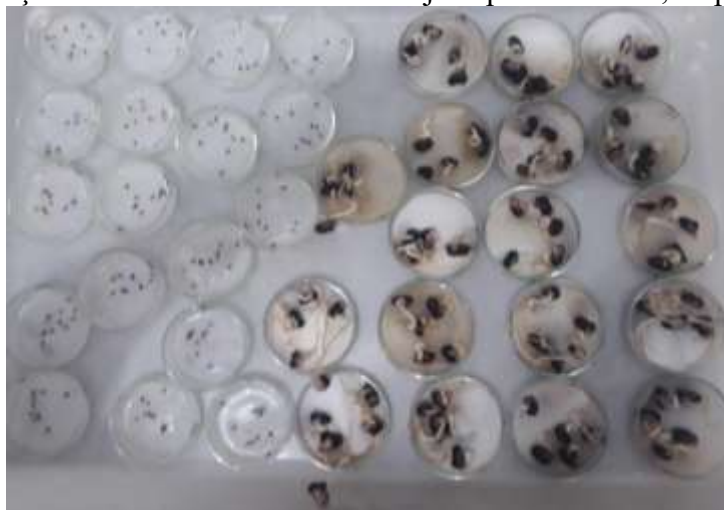
Amostras	%G	%CR	IG
Efluente após tratamento em coluna	121,1	157	1,88
Resíduo do biorreator	72,5	108	0,78

Um estudo de fitotoxicidade realizado em sementes de feijão com efluente de biorreator, tratado após 7 dias de biodegradação de diesel, encontrou 38% de índice de germinação, 54% de germinação e 70% de crescimento da raiz (Silva *et al.*, 2015).

A análise citotóxica do tratamento biológico de óleo diesel por consórcio fúngico para diferentes ensaios descobriu uma variação de 57,7 a 100% na germinação, crescimento da raiz de 15 a 43% e índice de germinação entre 12 e 33% (Cruz, 2017).

As sementes de alface e feijão, Figura 58, apresentaram respostas distintas para o mesmo efluente. A primeira apresentou baixa taxa de germinação, enquanto que a segunda obteve 100% de germinação, independentemente da concentração do efluente. Uma hipótese pode ser a diferença entre as estruturas das sementes. A semente de alface possui característica mais delicada em sua estrutura celular, enquanto que a semente de feijão, mais robusta, pode ser mais resistente a diferentes substâncias.

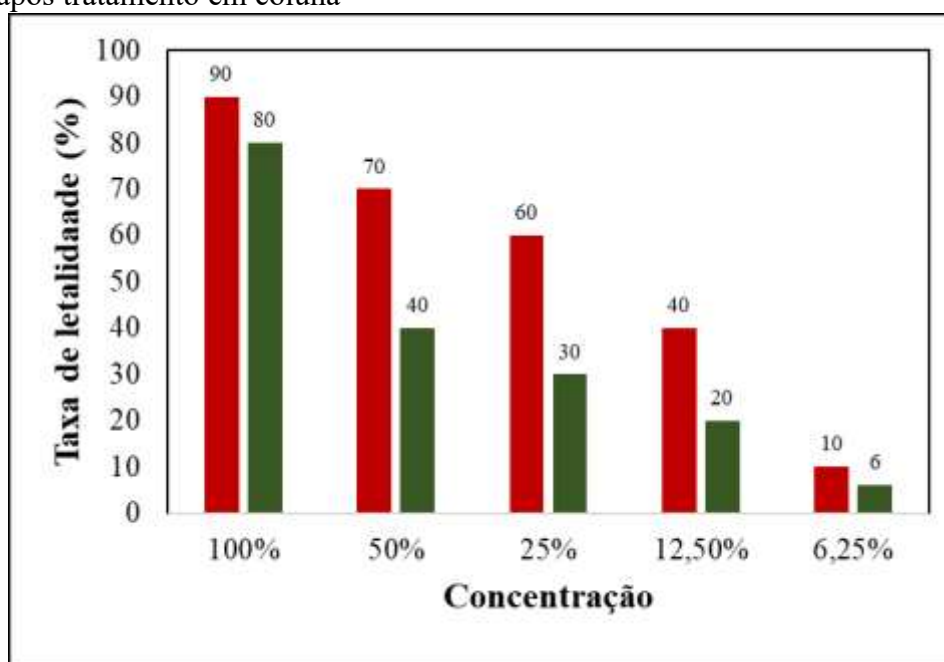
Figura 58: Germinação das sementes de alface e feijão após 5 e 7 dias, respectivamente.



6.3.12.3 Ensaio de letalidade com *Artemia Salina* Leach

O teste de letalidade com *A. Salina*, Figura 59, para o resíduo após o processo de biodegradação e o efluente após tratamento em coluna, obtiveram resultados distintos. O resíduo do biorreator obteve maior taxa de letalidade em relação ao da coluna. A taxa de letalidade da *A. Salina* foi estatisticamente maior no resíduo da biodegradação do que a taxa média de letalidade da *A. Salina* no resíduo da coluna. Essas diferenças podem ser explicadas pela forma de obtenção das amostras aquosas. No que diz respeito à amostra gerada pelo processo de biodegradação, os hidrocarbonetos presentes no óleo estavam mais dissolvidos sob diferentes formas na solução aquosa, o que teoricamente tende a deixar o meio mais tóxico. Em contrapartida, a outra amostra, obtida a partir da coluna de adsorção, tende a ser menos tóxica, uma vez que passou pelo processo de tratamento de adsorção.

Figura 59: Porcentagem média de mortalidade de *A. salina* em função de diferentes concentrações de efluente tratado e efluente não tratado. (■) Resíduo do biorreator e (■) Efluente após tratamento em coluna



Esses resultados deste trabalho são equivalentes ao encontrado na literatura para toxicidade de efluentes contendo hidrocarbonetos, em que as taxas de letalidade com *Artemia Salina* foram um pouco mais baixas. O estudo da degradação de petróleo e diesel, com consórcio constituído por *Aspergillus sclerotiorum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Bacillus sp.* e *Cryptococcus laurentii*, se destacou com 54% e 40% de letalidade de *Artemia sp.* no óleo diesel e petróleo, respectivamente, após incubação por 21 dias (Duarte, 2016). Também a pesquisa sobre degradação de solo contaminado por petróleo com consórcio composto por *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus*, *Geomyces pannorum* e *Geomyces sp* apresentou taxa de letalidade da *Artemia Salina* de 50% para uma diluição de 12,5% (Madella *et. al.* 2017).

6.3.12.4 Teste de toxicidade aguda com *Vibrio fisheri*

Toxicidade é o grau em que um composto específico ou uma mistura é capaz de causar danos ou morte em organismos vivos (Cruz, 2017). Os efeitos tóxicos dos efluentes deste estudo na bactéria marinha *Vibrio fischeri* foram avaliados através da determinação da porcentagem de inibição da emissão de luz luminescente pelas bactérias em diferentes concentrações. Os resultados são mostrados na Tabela 28, que apresenta os valores EC₂₀ e EC₅₀ após 15 min de exposição. Como pode ser observado, ambos os efluentes apresentaram toxicidade aguda para a bactéria. O resíduo do biorreator apresentou maior efeito tóxico quando comparado com o efluente tratado pela coluna de adsorção. Assim como no teste anterior, os efluentes precisaram

ser diluídos a uma concentração de 12,5% (v/v) para não apresentar efeito tóxico a ambos os organismos marinhos, a *Artemia Salina* e o *Vibrio fischeri*.

Tabela 28: Resultados da toxicidade aguda no *Vibrio fischeri*, após 15 minutos de exposição ao efluente tratado em coluna e resíduo do biorreator.

Resultados		
	Efluente após tratamento em coluna	Resíduo do biorreator
CE₂₀	19,61%	13,67%
CE₅₀	69,43%	35,34%
UT	1,44	2,83
FT	8	8

CE₅₀: Concentração efetiva da amostra, que causa 50% de inibição na luminescência do organismo-teste;

CE₂₀: Concentração efetiva da amostra, que causa 20% de inibição na luminescência do organismo-teste;

UT: Unidade tóxica (100.CE₅₀⁻¹);

FT: Diluição mínima da amostra em que não se observa efeito significativo de luminescência no organismo-teste.

De acordo com os esses resultados, é possível inferir que a degradação do óleo de motor de navio usado pelo consórcio bacteriano gerou compostos intermediários mais tóxicos do que sua estrutura original. O mesmo resultado também foi verificado no estudo de biodegradação de diesel em 21 dias pelo consórcio *A. sclerotiorum*, *C. cladosporioides*, *Bacillus sp.* e *C. laurentii* (Duarte, 2016).

O conjunto de resultados toxicológicos para as sementes e organismos marinhos mostrou a existência de elevado grau de toxicidade para o efluente da coluna de adsorção (Capítulo 2), mesmo após tratamento. Entretanto, cabe destacar que o mesmo é proveniente de uma concentração inicial de 12 g L⁻¹, tendo alcançado, após passar pelo tratamento na coluna, uma concentração final de aproximadamente 600 mg L⁻¹, ou seja, foram removidos 95% do óleo presente no efluente. A Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011, estabelece o limite de 20 mg L⁻¹ para efluente oleoso (Brasil, 2011). Dessa forma, o efluente precisa passar novamente pela coluna de adsorção para atingir os padrões necessários para descarte.

De acordo com as análises toxicológicas para o resíduo do biorreator em todos os testes, foi observado maior grau de toxicidade do mesmo em relação ao efluente após tratamento na coluna, o que revela que os compostos intermediários, como dito anteriormente, são mais tóxicos do que o óleo em seu estado inicial. No que se refere ao seu descarte, uma opção seria promover o tratamento do mesmo com a coluna de adsorção.

6.4 CONSIDERAÇÕES

De acordo com os resultados obtidos neste capítulo foi possível verificar a capacidade de imobilização de cepas bacterianas isoladas e consorciadas nas biomassas SS e SOH. Bem

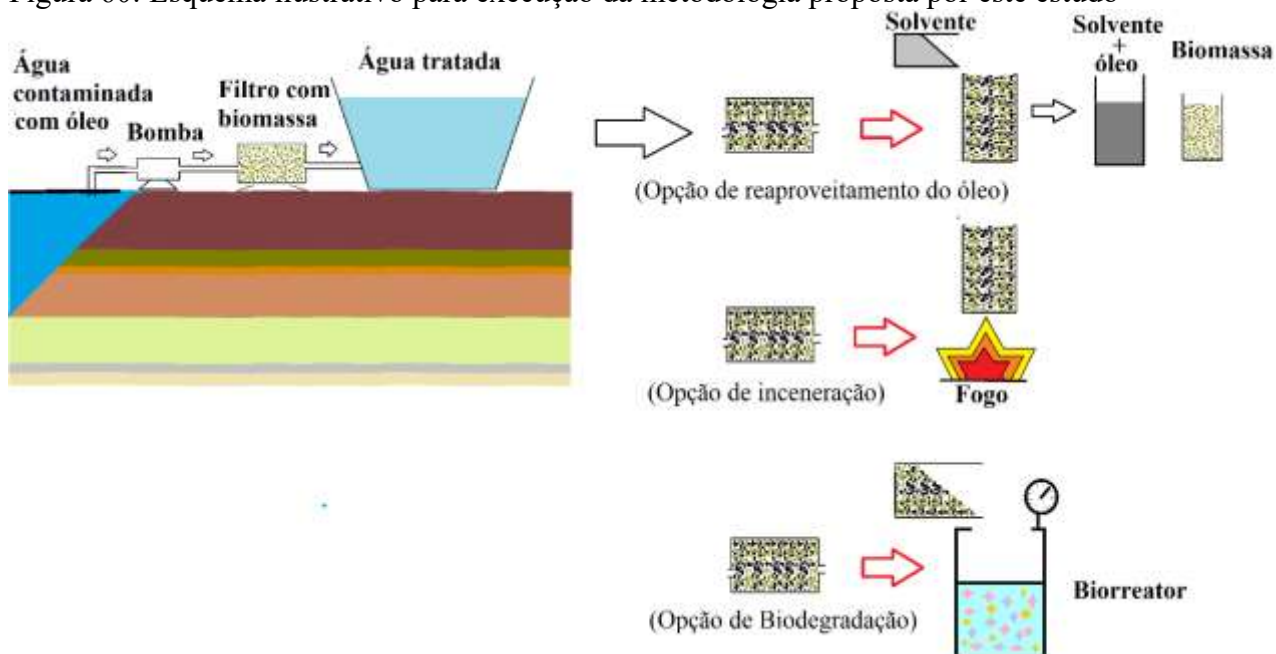
como verificar as condições limitantes na produção da biomassa de bactérias imobilizadas através dos testes de crescimento, aplicação de bioestímulo e variação da concentração de óleo obtendo diferentes resposta de biodegrdação.

Também foi possível avaliar o potencial de biodegradação de óleo usado de navio em biorreator em batelada em escala de bacada com cepas bacterianas imobilizadas em biomassa da *Salvinia* sp. Na qual foi obtida uma capacidade de biodegrdação de 52,9% e taxa de degradação de $0,027 \text{ d}^{-1}$

Como foi possível observar ao longo deste capítulo, é plausível otimizar a eficiência da biodegradação com a manipulação de alguns parâmetros, como a imobilização das bactérias, o aumento da concentração de contaminantes e aumento do tempo. Outros parâmetros como reinoculação e bioestímulo não apresentaram melhora significativa no processo de biodegradação.

Os resultados obtidos dessas manipulações permitiram a construção de um biorreator com potencial na aplicação na biodegradação de derivados do petróleo, como o óleo de navio usado. A aplicação do biorreator é o estágio final do processo de tratamento de águas contaminadas sugerido por este trabalho, como pode ser observado no esquema ilustrativo representado na Figura 60. O filtro com a biomassa representa o produto final a partir dos estudos de adsorção obtidos no capítulo 1. Conforme os resultados, é possível propor três destinos ao óleo removido do ambiente: reaproveitamento através do uso de solventes após a filtração, incineração ou a biodegradação em biorreator.

Figura 60: Esquema ilustrativo para execução da metodologia proposta por este estudo



São necessários estudos futuros de otimização do biorreator em escala de banca e posteriormente em escala piloto, a fim de verificar a adsorção em coluna de leito fixo, assim como o uso da mesma em áreas com derramamento. Estudos de aplicação biotecnológica podem ser realizados para apurar possíveis produtos obtidos a partir da biodegradação do óleo pelo consórcio microbiano, como também a otimização do biorreator e produção em escala piloto.

7 CONCLUSÃO

O objetivo deste trabalho de desenvolver um método para tratamento de águas contaminadas por compostos orgânicos derivados do petróleo, com o uso da adsorção e da biotecnologia, foi alcançado. Na qual os objetivos específicos também foram obtidos, como descrito ao final de cada capítulo. Dessa forma, foi possível verificar que o uso do consórcio de bactérias constituído pelas espécies *B. pseudomycoides*, *B. subtilis*, *B. tequilensis* e *B. cihuensis* imobilizado em biomassa de *Salvina* sp. foi capaz de degradar óleo lubrificante usado do navio.

Os resultados alcançados apontam para a possibilidade, através de estudos futuros, de que a metodologia desenvolvida venha a ser uma tecnologia sustentável e economicamente viável.

Este trabalho buscou pautado, ainda que indiretamente, no complexo econômico-industrial da saúde ao também relacionar a dimensão econômica da saúde, revela seu caráter sistêmico, apresentando potencial para a superação da dicotomia observada entre a lógica econômica e a sanitária.

REFERÊNCIAS

- American Public Health Association. (APHA), **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Washington, DC, 2012.
- ARAUJO, J. C. **Biofilmes anaeróbios: desenvolvimento e caracterização filogenética usando hibridação in situ com sondas fluorescentes**. Tese, Universidade de São Paulo, 2001.
- BASAK, B., BHUNIA, B., & DEY, A. **Studies on the potential use of sugarcane bagasse as carrier matrix for immobilization of *Candida tropicalis* PHB5 for phenol biodegradation**. International Biodeterioration & Biodegradation, 93, 107-117, 2014.
- BETTO, T. L.; HEMKEMEIER, M.; KOETZ, P. R. **Remoção de demanda bioquímica de oxigênio total Kjeldahl de efluente de indústria de vegetais congelados por Reator em Batelada Sequencial**. Engenharia Sanitária e Ambiental, vol.18, nº 03, Rio de Janeiro, 2013.
- COLLINS, A. R.; MA, A. G.; DUTHIE, S. J. **The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells**. Mutation Research, v. 336, n. 1, p. 69-77, jan. 1995.
- COSTA, S. P. **Biodegradabilidade de n-hexadecano por bactérias livres e imobilizadas em quitosana**. Dissertação, Universidade Federal de Pernambuco, 2006.
- CRUZ, G. G., **Tratamento Biológico de Óleo Diesel por Consórcio Fúngico**, Tese Universidade Federal de Pernambuco, 2017
- CYBIS, L. F.; HORAN, N. **Uso do ph, Redox e od para o controle de nitrificação e desnitrificação em reatores sequenciais em batelada (rsb): resumo**. Anais: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 18, Salvador. Resumos dos trabalhos técnicos. Rio de Janeiro, 1995
- DELLA-FLORA, I. K. **Avaliação da biodegradação de diesel por consórcio bacteriano sob diferentes concentrações de nitrogênio, fósforo e potássio em meio mineral líquido**. Trabalho de conclusão de Curso, Universidade Federal Fronteira Sul, 2018
- DENG, Y., *et al.* **Biodegradation of aromatic BTEX by a haloduric microbial consortium enriched with a sediment from the Bohai Sea, China**. Applied Biochemistry and Biotechnology 183.3: p893-90, 2017
- DUARTE, L. A. **Detoxificação de Petróleo e Óleo Diesel por Consórcios Microbianos de Origem Marinha**. Dissertação, Universidade Estadual Paulista, 2016.
- EYAMBE, G. S. *et al.* **A non-invasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies**. Laboratory Animals, v. 25, n. 1, p. 61-67, jan. 1991.
- KEENAN, D. SABELNIKON, A. **Biological augmentation eliminates grease and oil in baker wastewater**. Water Environmental Research, vol.72, p.141-146, 2000.
- KHANPOUR-ALIKELAYEH, E. *et al.* **Investigation of *Bacillus licheniformis* in the biodegradation of Iranian heavy crude oil: A two-stage sequential approach containing factor-screening and optimization**. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 205, p. 111103, 2020.
- KHATOON, H., & RAI, J.P.N. **Sugarcane Bagasse as Immobilizer Support for *Bacillus badius* ABP6 and its Use in Atrazine Biodegradation**. Environment and Ecology, 36 (2), 446-456, 2018.
- KUREEL, M. K., *et al.* **Biodegradation and kinetic study of benzene in bioreactor packed with PUF and alginate beads and immobilized with *Bacillus* sp. M3**. Bioresource technology 242, 92-100, 2017.
- LAHEL, A., *et al.* **Effect of process parameters on the bioremediation of diesel contaminated soil by mixed microbial consortia**. International Biodeterioration & Biodegradation, v. 113, p. 375-385, 2016.

- LIMA, D. F. **Avaliação de Processos Geoquímicos e da Eficiência de Consórcios Fúngicos em Testes de Simulação da Biorremediação em Sedimentos de Manguezal Contaminados com Óleo**, Tese, Universidade Federal da Bahia, 2014
- LIN, J, *et al.* **Biodegradation of tetradecane using *Acinetobacter venetianus* immobilized on bagasse**. Biochemical Engineering Journal 100: 76-8, 2015.
- LIN, Q., DONGHUI, W., & JIANLONG, W. **Biodegradation of pyridine by *Paracoccus* sp. KT-5 immobilized on bamboo-based activated carbon**. Bioresource technology, 101(14), 5229-5234, 2010.
- LIU, J., CHEN, S., DING, J., XIAO, Y., HAN, H., & ZHONG, G. **Sugarcane bagasse as a support for immobilization of *Bacillus pumilus* HZ-2 and its use in the bioremediation of soils contaminated with mesotrione**. Applied microbiology and biotechnology, 99 (24), 10839-10851, 2015.
- MACIEL, J. M, **Estudo Comparativo da Degradação de Óleo Diesel por Culturas Isoladas e em Consórcio**, Dissertação, Universidade Federal de Pernambuco, 2013
- MADDELA, N. R., SCALVENZI, L., & VENKATESWARLU, K. **Microbial degradation of total petroleum hydrocarbons in crude oil: a field-scale study at the low-land rainforest of Ecuador**. Environmental technology, 38(20), 2543-2550, 2017
- MARCHUT-MIKOŁAJCZYK, O., DROŹDŹYŃSKI, P., POLEWCZYK, A., SMULEK, W., & ANTCZAK, T. **Biosurfactant from endophytic *Bacillus pumilus* 2A: physicochemical characterization, production and optimization and potential for plant growth promotion**. Microbial Cell Factories, 20(1), 1-11. 2021
- MELO, J. M. **Avaliação do impacto do aumento das concentrações celulares na biodegradação de resíduos oleosos de petróleo**. Dissertação. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.
- MEYER, B.N., *et al.* **Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents**. Planta Medica, v. 45, n. 5, p.31-34, 1982.
- NIKAKHTARI, H., SONG, W., KUMAR, P., NEMAT, M., & HILL, G. A. **Scale up of diesel oil biodegradation in a baffled roller bioreactor**. Chemosphere, 79(10), 1010-1016, 2010.
- OLIVEIRA, L **Avaliação da capacidade de biodegradação tolueno, benzeno, etilbenzeno e isômeros de xileno por bactérias isoladas de área contaminada**, Tese, Universidade de São Paulo, 2017
- Organisation for Economic Co-Operation and Development. **ISO 11268-1: Soil quality - Effects of pollutants on earthworms - Part. 1: Determination of acute toxicity to *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei***. Washington, 2012.
- Organisation for Economic Co-Operation and Development. **ISO 11268-2: Soil quality - Effects of Pollutants on Earthworms - Part 2: Determination of Effects on Reproduction of *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei***. Washington, 2012.
- Organisation for Economic Co-Operation and Development. **Test n° 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests**. Washington, DC.: OECD Publishing, 1984.
- Organisation for Economic Co-Operation and Development. **Test n° 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay**. Washington, DC.: OECD Publishing, 2016.
- PAIVA, D. C. A. C. **Efeito da concentração de fósforo na degradação aeróbia do glifosato em reator de leito fixo**. Dissertação, Universidade Federal de Goiás, 2017.
- PATIL, N. K., VEERANAGOUDA, Y., VIJAYKUMAR, M. H., NAYAK, S. A., & KAREGOUDAR, T. B. **Enhanced and potential degradation of o-phthalate by *Bacillus* sp. immobilized cells in alginate and polyurethane**. International biodeterioration & biodegradation, 57(2), 82-87, 2006.
- PEREIRA, E., *et al.* **Biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos e policíclicos aromáticos em água do mar por microrganismos autóctones**. International Biodeterioration & Biodegradation, 145, 104789, 2019.

- PEREIRA, J. E. S., **Prospecção e caracterização para a biorremediação de ambientes marinhos contaminados por petróleo e misturas de óleo diesel/biodiesel**. Tese Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2018.
- PONTES, A. F. V. **Avaliação de desempenho de reator anaeróbio-aeróbio com recirculação da fase líquida no tratamento de água residuária proveniente de abatedouro de aves**. Dissertação, Universidade de São Paulo, 2009
- SAFDARI, M. S. *et al.*, **Development of bioreactors for comparative study of natural attenuation, biostimulation, and bioaugmentation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil**. Journal of hazardous materials, 342, 270-278, 2018.
- SANTOS JUNIOR, A. A. D. **Determinação de parâmetros de óleos lubrificantes de motores de ciclo Otto e ciclo diesel através da espectroscopia no Infravermelho, métodos multivariados e cartas de controle**. Dissertação, Universidade de Brasília, 2011.
- SANTOS, A. V.; CYBIS, L. F.; GEHLING, G. R. **Dimensionamento do volume do reator seqüencial em batelada (RSB) com enchimento estático**. Engenharia Sanitária e Ambiental. vol. 12, n° 04, Rio de Janeiro, 2007.
- SCHMIDELL, W, *et al.*, **biotecnologia industrial** vol 2 Ed. Edgard Bucher 2 Ed. 2001
- SCHULTZ, F. M. **Avaliação de microrganismos com potencial de degradação de diesel e biodiesel**. Dissertação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.
- SKOOG, D. A. **Fundamentos de química analítica**. Vol. 2. Reverté, 2020.
- SILVA, D. S. P. **Degradação de óleo diesel por consórcio microbiano misto isolado de ambiente poluído por atividade petrolífera**. Dissertação, Universidade Federal de Pernambuco, 2012.
- SILVA, F. G., **Avaliação da microbiota e formação de biofilme em superfícies de tanques abastecidos com combustíveis de origem fóssil e biocombustíveis**, Dissertação, Universidade Federal da Grande Dourados, 2011
- STEIN, E. A.; WOJDANI, A.; COOPER, E. L. **Agglutinins in the earthworm *Lumbricus terrestris*: naturally occurring and induced**. Developmental and Comparative Immunology, v. 6, n. 3, p. 407–421, 1982.
- SUJA, F., *et al.* **Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations**. International Biodeterioration & Biodegradation, v. 90, p. 115-122, 2014.
- TIQUIA, S. M., TAM, N. F. Y., & HODGKISS, I. J. **Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter**. Environmental pollution, 93(3), 249-256, 1996.
- VON SPERLING, M. **Princípios básicos de tratamento de esgotos: princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais/Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, vol. 02, 246p, 1996.
- XU, S. *et al.* **Leaching behaviour of bisphenol A from municipal solid waste under landfill environment**. Environmental Technology, v. 32, n. 11, p. 1269–1277, ago. 2011.

APÊNDICE A-Lista de Reagente utilizados

NaOH- em lentilhas P.A. 99,5% Neon Comercial Ltda
H₂SO₄- 98% ACS Dinâmica Química Contemporânea Ltda
HCl- 37% P.A./ ACS Dinâmica Química Contemporânea Ltda
Na₂CO₃- P.A./ ACS Dinâmica Química Contemporânea Ltda
NaHCO₃- P.A. Vetec Química Fina Ltda
HNO₃- PA 65% Química Moderna
NaCl- P.A. 99,5% Sigma-Aldrich Ltda.
KH₂PO₄- P.A. 98 – 100,5% Vetec Química Fina Ltda.
K₂HPO₄- P.A. 99% J.T. Backer Ltda
NH₄NO₃- PA ACS 95% Êxodo Química Fina Ltda.
MgSO₄.7H₂O- P.A. 98 – 102% Dinâmica Química Contemporânea Ltda.
FeCl₃- P.A. 98% Sigma-Aldrich Ltda.
CaCl₂.2H₂O- P.A. 99% Química Moderna
Agar bacteriológico- KASVI Laboratórios Conda SA
Extrato de levedura- KASVI Laboratórios Conda SA
Peptona- Synth Ltda.
Extrato de carne- Synth Ltda.
Glicose- P.A. Neon Comercial Ltda.
Ciclohexamide- 94% Sigma-Aldrich Ltda.
2,6-Dicloroindofenol- P.A. Merck SA
Etanol- PA 99,5% Dinâmica Química Contemporânea Ltda.
Cetona- 99,5% Dinâmica Química Contemporânea Ltda.
Violeta cristal- Merck SA
Fucsina- Synth Ltda.
Lugol- Dinâmica Química Contemporânea Ltda.
Sementes de alface Simpson (*Lactuca sativa*) Isla
Artemia ovos de alta eclosão Maramar Pet
Clorofórmio - Synth Ltda.

APÊNDICE B – Análise de dados estatísticos do capítulo 1

Testes estatísticos de Normalidade Shapiro-Wilk e homogeneidade pelo Teste de Levene

Isoterma Navio emulsão salgada			Isoterma Navio emulsão água ultrapura			Isoterma Carro emulsão água ultrapura		
Shapiro-Wilk Test			Shapiro-Wilk Test			Shapiro-Wilk Test		
	SS	SO		SS	SO		SS	SO
W-stat	0,871736	0,861815	W-stat	0,903165	0,915752	W-stat	0,912315462	0,962496718
p-value	0,128326	0,100337	p-value	0,23726	0,322885	p-value	0,259722685	0,802406795
alpha	0,05	0,05	alpha	0,05	0,05	alpha	0,05	0,05
normal	yes	yes	normal	yes	yes	normal	yes	yes
Outliers	None	None	Outliers	None	None	Outliers	None	None
Levene's Tests			Levene's Tests			Levene's Tests		
	p-value			p-value			p-value	
means	0,898937		means	0,898937		means	0,557064267	
medians	0,895251		medians	0,895251		medians	0,597676518	
trimmed	0,898937		trimmed	0,898937		trimmed	0,557064267	
Shapiro-Wilk Test			Shapiro-Wilk Test			Shapiro-Wilk Test		
	SS	SO		SS	SO		SS	SO
W-stat	0,960287343	0,857457084	W-stat	0,836585	0,884998	W-stat	0,836585384	0,962982559
p-value	0,789144139	0,07121124	p-value	0,069465	0,210083	p-value	0,069465203	0,837985378
alpha	0,05	0,05	alpha	0,05	0,05	alpha	0,05	0,05
normal	yes	yes	normal	yes	yes	normal	yes	yes
Outliers	None	None	Outliers	None	None	Outliers	None	None
Levene's Tests			Levene's Tests			Levene's Tests		
	p-value			p-value			p-value	
means	0,688164636		means	0,030487		means	0,224817772	
medians	0,840788478		medians	0,067721		medians	0,53333062	
trimmed	0,688164636		trimmed	0,030487		trimmed	0,224817772	

Temperatura 35 C SS e SO Navio			Temperatura 15 C SS e SO Carro			Temperatura 15 C SS e SO Navio		
Shapiro-Wilk Test			Shapiro-Wilk Test			Shapiro-Wilk Test		
	SS	SO		SS	SO		SS	SO
W-stat	0,955993073	0,958676575	W-stat	0,844582	0,890139	W-stat	0,836585384	0,962982559
p-value	0,771185117	0,797402573	p-value	0,064929	0,200183	p-value	0,069465203	0,837985378
alpha	0,05	0,05	alpha	0,05	0,05	alpha	0,05	0,05
normal	yes	yes	normal	yes	yes	normal	yes	yes
Outliers	None	None	Outliers	None	None	Outliers	None	None
Levene's Tests			Levene's Tests			Levene's Tests		
type	p-value		type	p-value		type	p-value	
means	0,152981425		means	0,117452		means	0,224817772	
medians	0,175523559		medians	0,310898		medians	0,53333062	
trimmed	0,152981425		trimmed	0,117452		trimmed	0,224817772	

Temperatura 25 C SS e SO Carro			Temperatura 35 C SS e SO Carro			pH das Biomassas		
Shapiro-Wilk Test			Shapiro-Wilk Test			Shapiro-Wilk Test		
	SS	SO		SS	SO		SS	SO
W-stat	0,937588685	0,972596856	W-stat	0,873856	0,938502	W-stat	0,990825688	0,998847926
p-value	0,556757722	0,915980426	p-value	0,135185	0,566219	p-value	0,816786789	0,935161685
alpha	0,05	0,05	alpha	0,05	0,05	alpha	0,05	0,05
normal	yes	yes	normal	yes	yes	normal	yes	yes
Outliers	None	None	Outliers	None	None	Outliers	None	None
Levene's Tests			Levene's Tests			Levene's Tests		
type	p-value		type	p-value		type	p-value	
means	0,155703408		means	0,804594		means	0,657994735	
medians	0,227575694		medians	0,681552		medians	0,66122522	
trimmed	0,155703408		trimmed	0,804594		trimmed	0,657994735	

Teste t-student pareado para comparação de médias de populações dependentes

Isoterma Navio Doce				Isoterma Navio Salgado			
$H_a: \mu_{ss} > \mu_{so}$		$H_a: \mu_{ss} - \mu_{so} > 0$		$H_a: \mu_{ss} > \mu_{so}$		$H_a: \mu_{ss} - \mu_{so} > 0$	
$H_0: \mu_{ss} \leq \mu_{so}$		$H_0: \mu_{ss} - \mu_{so} \leq 0$		$H_0: \mu_{ss} \leq \mu_{so}$		$H_0: \mu_{ss} - \mu_{so} \leq 0$	
n=10		GL=9	$\alpha = 5\%$	n=10		GL=9	$\alpha = 5\%$
μ_{ss}	μ_{so}	$d_i = (\mu_{ss} - \mu_{so})$	d_i^2	μ_{ss}	μ_{so}	$d_i = (\mu_{ss} - \mu_{so})$	d_i^2
70,19	34,65	35,54	1262,97	60,47	59,7	0,77	0,59
137,59	65,06	72,53	5260,84	232,41	228,8	3,61	13,03
238,38	150,56	87,82	7711,77	280,64	254,5	26,14	683,39

333,19	231,04	102,14	10432,92	765,39	720,54	44,85	2011,52
418,18	318,97	99,2	9841,3	409,25	360,65	48,6	2361,96
92,63	403,96	-311,33	96927,41	747,05	732,95	14,1	198,81
120,31	80,66	39,65	1571,73	71,22	61,83	9,39	88,11
447,17	112,6	334,56	111932,62	91,1	90,73	0,37	0,14
618,5	435,28	183,22	33568,96	930,59	898,31	32,28	1042
		$\Sigma di = 891,41$	$\Sigma d^2 = 340054,20$			$\Sigma di = 180,10$	$\Sigma d^2 = 6399,54$
		$d = 89,14$				$d = 18,01$	
$s_d = 170,16$		$t_{obs} = 1,66$	$t_{tab} = 1,8331$	$s_d = 18,73$		$t_{obs} = 3,04$	$t_{tab} = 1,8331$

Ao nível de significância de 5% há evidências de que o a adsorção de SS é maior que SOH para isoterma com o óleo de navio salgado.

Ao nível de significância de 5% não há evidências de que o a adsorção de SS é maior que SOH para isoterma com o óleo de navio doce.

Isoterma Carro Doce				Isoterma Carro Salgado			
$H_a : \mu_{ss} > \mu_{so}$		$H_a : \mu_{ss} - \mu_{so} > 0$		$H_a : \mu_{ss} > \mu_{so}$		$H_a : \mu_{ss} - \mu_{so} > 0$	
$H_0 : \mu_{ss} \leq \mu_{so}$		$H_0 : \mu_{ss} - \mu_{so} \leq 0$		$H_0 : \mu_{ss} \leq \mu_{so}$		$H_0 : \mu_{ss} - \mu_{so} \leq 0$	
n=11		GL=10	$\alpha = 5\%$	n=10		GL=9	$\alpha = 5\%$
μ_{ss}	μ_{so}	$di = (\mu_{ss} - \mu_{so})$	di^2	μ_{ss}	μ_{so}	$di = (\mu_{ss} - \mu_{so})$	di^2
34,26	56,02	-21,76	473,67	152,79	158,23	-5,44	29,59
66,27	91,87	-25,60	655,16	236,06	230,53	5,53	30,62
120,13	138,47	-18,34	336,45	54,48	118,46	-63,98	4093,44
92,62	186,91	-94,29	8891,52	109,76	164,50	-54,74	2995,92
295,78	227,87	67,91	4611,36	18,05	310,64	-292,59	85609,88
399,81	308,54	91,27	8331,06	162,45	574,86	-412,41	170084,76
511,18	303,38	207,80	43180,84	299,34	265,44	33,90	1149,10
279,60	426,99	-147,39	21724,11	457,44	119,98	337,47	113882,63
295,78	308,54	-12,76	162,79	250,89	229,92	20,97	439,74
409,75	430,15	-20,40	416,13	240,96	482,58	-241,62	58377,81
511,18	525,92	-14,74	217,18				
		$\Sigma di = 11,70$	$\Sigma d^2 = 89000,27$			$\Sigma di = -672,91$	$\Sigma d^2 = 436693,48$
		$d = 1,06$				$d = -67,29$	
$s_d = 4,44$		$t_{obs} = 8,73$	$t_{tab} = 1,8125$	$s_d = 208,54$		$t_{obs} = -1,02$	$t_{tab} = 1,8331$

Ao nível de significância de 5% há evidências de que o a adsorção de SS é maior que SOH para isoterma com o óleo de carro doce

Ao nível de significância de 5% não há evidências de que o a adsorção de SS é maior que SOH para isoterma com o óleo de carro salgado

Cinética 15 °C Navio				Cinética 25 °C Navio			
$H_a : \mu_{ss} > \mu_{so}$		$H_a : \mu_{ss} - \mu_{so} > 0$		$H_a : \mu_{ss} > \mu_{so}$		$H_a : \mu_{ss} - \mu_{so} > 0$	
$H_0 : \mu_{ss} \leq \mu_{so}$		$H_0 : \mu_{ss} - \mu_{so} \leq 0$		$H_0 : \mu_{ss} \leq \mu_{so}$		$H_0 : \mu_{ss} - \mu_{so} \leq 0$	
n=8		GL=7	$\alpha = 5\%$	n=8		GL=7	$\alpha = 5\%$
μ_{ss}	μ_{so}	$di = (\mu_{ss} - \mu_{so})$	di^2	μ_{ss}	μ_{so}	$di = (\mu_{ss} - \mu_{so})$	di^2
158,51	145,87	12,64	159,73	151,13	188,52	-37,39	1397,91
132,70	181,15	-48,45	2347,13	172,20	334,92	-162,72	26477,60
140,08	240,66	-100,58	10116,46	446,56	299,64	146,92	21585,90
152,71	236,44	-83,73	7010,61	324,39	200,63	123,75	15314,31
299,11	331,76	-32,65	1065,97	202,74	172,20	30,54	932,86
274,89	263,30	11,59	134,22	410,75	307,01	103,74	10762,03
173,25	203,79	-30,54	932,86	327,55	280,15	47,39	2246,19
258,56	238,02	20,54	421,78	182,20	179,04	3,16	9,98
		$\Sigma di = -251,19$	$\Sigma d^2 = 22188,76$			$\Sigma di = 255,40$	$\Sigma d^2 = 78726,78$
		$d = -31,40$				$d = 31,92$	

$s_d = 45,20$	$t_{obs} = 1,89$	$t_{tab} = 1,8946$	$s_d = 100,41$	$t_{obs} = 0,899$	$t_{tab} = 1,8946$
---------------	------------------	--------------------	----------------	-------------------	--------------------

Ao nível de significância de 5% não há evidências de que o a adsorção de SS é maior que SOH para a temperatura de 15°C para o óleo de navio

Ao nível de significância de 5% não há evidências de que o a adsorção de SS é maior que SOH para a temperatura de 25°C para o óleo de navio

Cinética 35 °C Navio				Cinética 15 °C Carro			
$H_a: \mu_{ss} > \mu_{so}$		$H_a: \mu_{ss} - \mu_{so} > 0$		$H_a: \mu_{ss} > \mu_{so}$		$H_a: \mu_{ss} - \mu_{so} > 0$	
$H_0: \mu_{ss} \leq \mu_{so}$		$H_0: \mu_{ss} - \mu_{so} \leq 0$		$H_0: \mu_{ss} \leq \mu_{so}$		$H_0: \mu_{ss} - \mu_{so} \leq 0$	
n=8		GL=7	$\alpha = 5\%$	n=9		GL=8	$\alpha = 5\%$
μ_{ss}	μ_{so}	$d_i = (\mu_{ss} - \mu_{so})$	d_i^2	μ_{ss}	μ_{so}	$d_i = (\mu_{ss} - \mu_{so})$	d_i^2
58,98	37,92	21,06	443,69	25,49	33,28	-7,79	60,63
56,87	31,60	25,28	638,92	121,25	51,63	69,62	4846,62
58,98	37,92	21,06	443,69	138,22	62,94	75,27	5665,93
40,02	62,14	-22,12	489,17	38,29	-15,94	54,23	2940,84
13,69	8,43	5,27	27,73	178,26	86,67	91,59	8388,29
92,68	79,52	13,17	173,32	175,76	83,99	91,77	8422,28
68,46	112,17	-43,71	1910,37	193,37	93,07	100,30	10060,37
80,04	93,73	-13,69	187,46	201,99	107,35	94,65	8958,00
				208,39	104,57	103,82	10779,42
		$\Sigma d_i = 6,32$	$\Sigma d_i^2 = 4314,35$			$\Sigma d_i = 673,46$	$\Sigma d_i^2 = 60122,39$
		$d = 0,79$				$d = 74,83$	
$s_d = 24,81$		$t_{obs} = 0,09$	$t_{tab} = 1,8946$	$s_d = 34,87$		$t_{obs} = 6,44$	$t_{tab} = 1,8595$

Ao nível de significância de 5% não há evidências de que o a adsorção de SS é maior que SOH para a temperatura de 35°C para o óleo de navio

Ao nível de significância de 5% há evidências de que o a adsorção de SS é maior que SOH para a temperatura de 15°C para o óleo de carro

Cinética 25 °C Carro				Cinética 35 °C Carro			
$H_a: \mu_{ss} > \mu_{so}$		$H_a: \mu_{ss} - \mu_{so} > 0$		$H_a: \mu_{ss} > \mu_{so}$		$H_a: \mu_{ss} - \mu_{so} > 0$	
$H_0: \mu_{ss} \leq \mu_{so}$		$H_0: \mu_{ss} - \mu_{so} \leq 0$		$H_0: \mu_{ss} \leq \mu_{so}$		$H_0: \mu_{ss} - \mu_{so} \leq 0$	
n=9		GL=8	$\alpha = 5\%$	n=9		GL=8	$\alpha = 5\%$
μ_{ss}	μ_{so}	$d_i = (\mu_{ss} - \mu_{so})$	d_i^2	μ_{ss}	μ_{so}	$d_i = (\mu_{ss} - \mu_{so})$	d_i^2
110,03	48,48	61,55	3788,75	84,36	8,81	75,55	5707,88
123,11	61,09	62,02	3846,02	145,91	42,27	103,64	10740,96
148,88	84,17	64,70	4186,69	154,99	80,56	74,44	5541,03
158,52	70,92	87,60	7674,02	137,47	79,81	57,66	3324,61
151,47	87,97	63,50	4032,19	159,07	81,39	77,68	6034,59
152,03	98,91	53,12	2821,43	164,64	104,94	59,70	3563,95
134,79	120,60	14,18	201,16	110,59	106,14	4,45	19,80
122,46	123,20	-0,74	0,55	76,38	122,73	-46,35	2148,32
166,489	146,095	20,394	415,915236	140,44	136,45	3,99	15,89
		$\Sigma d_i = 426,33$	$\Sigma d_i^2 = 26966,72$			$\Sigma d_i = 410,75$	$\Sigma d_i^2 = 37097,02$
		$d = 47,37$				$d = 45,64$	
$s_d = 29,09$		$t_{obs} = 4,88$	$t_{tab} = 1,8595$	$s_d = 47,89$		$t_{obs} = 2,86$	$t_{tab} = 1,8595$

Ao nível de significância de 5% há evidências de que o a adsorção de SS é maior que SOH para a temperatura de 25°C para o óleo de carro

Ao nível de significância de 5% há evidências de que o a adsorção de SS é maior que SOH para a temperatura de 35°C para o óleo de carro

Diferença significativa entre 15°C e 25°C em óleo de Carro para SS

$H_a: \mu_{SS15^\circ C} \neq \mu_{SS25^\circ C}$	$H_a: \mu_{SS15^\circ C} - \mu_{SS25^\circ C} \neq 0$
$H_0: \mu_{SS15^\circ C} = \mu_{SS25^\circ C}$	$H_0: \mu_{SS15^\circ C} - \mu_{SS25^\circ C} = 0$

Diferença significativa entre 15°C e 25°C em óleo de Carro para SO

$H_a: \mu_{SO15^\circ C} \neq \mu_{SO25^\circ C}$	$H_a: \mu_{SO15^\circ C} - \mu_{SO25^\circ C} \neq 0$
$H_0: \mu_{SO15^\circ C} = \mu_{SO25^\circ C}$	$H_0: \mu_{SO15^\circ C} - \mu_{SO25^\circ C} = 0$

n=9		GL=8	$\alpha = 5\%$
$\mu_{SS15^{\circ}C}$	$\mu_{SS25^{\circ}C}$	$d_i = (\mu_{SS15^{\circ}C} - \mu_{SS25^{\circ}C})$	d_i^2
25,49	110,03	-84,54	7147,42
121,25	123,11	-1,85	3,44
138,21	148,88	-10,66	113,64
38,28	158,52	-120,23	14455,71
178,26	151,47	26,79	717,72
175,76	152,03	23,73	563,17
193,3722	134,7858	58,5864	3432,366265
201,9933	122,4567	79,5366	6326,07074
208,3896	166,4892	41,9004	1755,64352
		$\Sigma d_i = 13,26$	$\Sigma d_i^2 = 34515,18$
		$d = 1,47$	
$s_d = 65,66$		$t_{obs} = 0,067$	$t_{tab} = \pm 2,3060$

Ao nível de significância de 5% não há evidências de há diferença de adsorção de óleo de carro com a variação de temperatura de 15 para 25°C para a SS

Ao nível de significância de 5% há evidências de há diferença de adsorção de óleo de carro com a variação de temperatura de 15 para 25°C para a SOH

n=9		GL=8	$\alpha = 5\%$
$\mu_{SO15^{\circ}C}$	$\mu_{SO25^{\circ}C}$	$d_i = (\mu_{SO15^{\circ}C} - \mu_{SO25^{\circ}C})$	d_i^2
33,28	48,48	-15,20	231,12
51,63	61,09	-9,45	89,40
62,94	84,17	-21,23	450,64
-15,94	70,91	-86,86	7544,64
86,67	87,97	-1,30	1,68
83,99	98,92	-14,92	222,75
93,07	120,60	-27,50	758,00
107,35	123,20	-15,85	251,28
104,57	146,09	-41,53	1724,71
		$\Sigma d_i = -233,88$	$\Sigma d_i^2 = 11274,23$
		$d = -25,99$	
$s_d = 25,49$		$t_{obs} = -3,06$	$t_{tab} = \pm 2,3060$

Diferença significativa entre 25°C e 35°C em óleo de Carro para SS

$H_a: \mu_{SS25^{\circ}C} \neq \mu_{SS35^{\circ}C}$		$H_a: \mu_{SS25^{\circ}C} - \mu_{SS35^{\circ}C} \neq 0$	
$H_0: \mu_{SS25^{\circ}C} = \mu_{SS35^{\circ}C}$		$H_0: \mu_{SS25^{\circ}C} - \mu_{SS35^{\circ}C} = 0$	
n=9		GL=8	$\alpha = 5\%$
$\mu_{SS25^{\circ}C}$	$\mu_{SS35^{\circ}C}$	$d_i = (\mu_{SS25^{\circ}C} - \mu_{SS35^{\circ}C})$	d_i^2
110,03	84,36	25,68	659,35
123,11	145,91	-22,80	520,03
148,88	154,99	-6,12	37,43
158,52	137,47	21,04	442,80
151,47	159,07	-7,60	57,78
152,02	164,63	-12,61	158,94
134,79	110,59	24,19	585,38
122,46	76,38	46,07	2122,62
166,49	140,44	26,05	678,53
		$\Sigma d_i = 93,90$	$\Sigma d_i^2 = 5262,88$
		$d = 10,43$	
$s_d = 23,14$		$t_{obs} = 1,35$	$t_{tab} = \pm 2,3060$

Diferença significativa entre 25°C e 35°C em óleo de Carro para SO

$H_a: \mu_{SO25^{\circ}C} \neq \mu_{SO35^{\circ}C}$		$H_a: \mu_{SO25^{\circ}C} - \mu_{SO35^{\circ}C} \neq 0$	
$H_0: \mu_{SO25^{\circ}C} = \mu_{SO35^{\circ}C}$		$H_0: \mu_{SO25^{\circ}C} - \mu_{SO35^{\circ}C} = 0$	
n=9		GL=8	$\alpha = 5\%$
$\mu_{SO25^{\circ}C}$	$\mu_{SO35^{\circ}C}$	$d_i = (\mu_{SO25^{\circ}C} - \mu_{SO35^{\circ}C})$	d_i^2
48,48	8,81	39,68	1574,15
61,09	42,27	18,82	354,12
84,17	80,56	3,61	13,07
70,91	79,81	-8,90	79,19
87,9723	81,39	6,58	43,32
98,91	104,93	-6,02	36,31
120,60	106,14	14,46	209,12
123,20	122,73	0,46	0,21
146,09	136,45	9,64	92,94
		$\Sigma d_i = -78,33$	$\Sigma d_i^2 = 2402,45$
		$d = 8,70$	
$s_d = 14,66$		$t_{obs} = 1,78$	$t_{tab} = \pm 2,3060$

Ao nível de significância de 5% não há evidências de há diferença de adsorção de óleo de carro com a variação de temperatura de 25 para 35°C para a SS

Ao nível de significância de 5% não há evidências de há diferença de adsorção de óleo de carro com a variação de temperatura de 25 para 35°C para a SOH

Diferença significativa entre 15°C e 25°C em óleo de Navio para SS

$H_a: \mu_{SS15^{\circ}C} \neq \mu_{SS25^{\circ}C}$		$H_a: \mu_{SS15^{\circ}C} - \mu_{SS25^{\circ}C} \neq 0$	
$H_0: \mu_{SS15^{\circ}C} = \mu_{SS25^{\circ}C}$		$H_0: \mu_{SS15^{\circ}C} - \mu_{SS25^{\circ}C} = 0$	
n=8		GL=7	$\alpha = 5\%$
$\mu_{SS15^{\circ}C}$	$\mu_{SS25^{\circ}C}$	$d_i = (\mu_{SS15^{\circ}C} - \mu_{SS25^{\circ}C})$	d_i^2
158,51	151,13	7,37	54,35
132,70	172,20	-39,50	1559,86
140,08	446,56	-306,48	93930,73

Diferença significativa entre 15°C e 25°C em óleo de Navio para SO

$H_a: \mu_{SO15^{\circ}C} \neq \mu_{SO25^{\circ}C}$		$H_a: \mu_{SO15^{\circ}C} - \mu_{SO25^{\circ}C} \neq 0$	
$H_0: \mu_{SO15^{\circ}C} = \mu_{SO25^{\circ}C}$		$H_0: \mu_{SO15^{\circ}C} - \mu_{SO25^{\circ}C} = 0$	
n=8		GL=7	$\alpha = 5\%$
$\mu_{SO15^{\circ}C}$	$\mu_{SO25^{\circ}C}$	$d_i = (\mu_{SO15^{\circ}C} - \mu_{SO25^{\circ}C})$	d_i^2
145,87	188,52	-42,65	1819,41
181,15	334,92	-153,77	23644,35
240,66	299,64	-58,98	3478,55

152,71	324,39	-171,67	29471,14
299,11	202,74	96,37	9286,75
274,89	410,75	-135,86	18458,70
173,25	327,55	-154,29	23806,58
258,56	182,20	76,36	5830,39
		$\Sigma di = -627,71$	$\Sigma d^2 = 182398,49$
		$d = -78,46$	
$s_d = 137,92$		$t_{obs} = -1,61$	$t_{tab} = \pm 2,3646$

236,44	200,63	35,81	1282,27
331,76	172,20	159,56	25459,33
263,30	307,01	-43,71	1910,37
203,79	280,15	-76,36	5830,39
238,02	179,04	58,98	3478,55
		$\Sigma di = -121,12$	$\Sigma d^2 = 66903,22$
		$d = -15,14$	
$s_d = 96,42$		$t_{obs} = -0,44$	$t_{tab} = \pm 2,3646$

Ao nível de significância de 5% não há evidências de há diferença de adsorção de óleo de navio com a variação de temperatura de 15 para 25°C para a SS

Ao nível de significância de 5% não há evidências de há diferença de adsorção de óleo de navio com a variação de temperatura de 15 para 25°C para a SOH

Diferença significativa entre 25°C e 35°C em óleo de Navio para SS			
$H_a: \mu_{SS25^\circ C} \neq \mu_{SS35^\circ C}$		$H_a: \mu_{SS25^\circ C} - \mu_{SS35^\circ C} \neq 0$	
$H_0: \mu_{SS25^\circ C} = \mu_{SS35^\circ C}$		$H_0: \mu_{SS25^\circ C} - \mu_{SS35^\circ C} = 0$	
n=8		GL=7	$\alpha = 5\%$
$\mu_{SS25^\circ C}$	$\mu_{SS35^\circ C}$	$di = (\mu_{SS25^\circ C} - \mu_{SS35^\circ C})$	di^2
151,13	58,98	92,16	8492,54
172,20	56,87	115,33	13299,95
446,56	58,98	387,58	150216,40
324,39	40,02	284,36	80862,88
202,74	13,69	189,05	35739,68
410,75	92,68	318,07	101166,23
327,55	68,46	259,09	67126,18
182,20	80,04	102,16	10436,75
		$\Sigma di = 1747,78$	$\Sigma d^2 = 467340,61$
		$d = 218,47$	
$s_d = 110,52$		$t_{obs} = 5,59$	$t_{tab} = \pm 2,3646$

Diferença significativa entre 25°C e 35°C em óleo de Navio para SO			
$H_a: \mu_{SO25^\circ C} \neq \mu_{SO35^\circ C}$		$H_a: \mu_{SO25^\circ C} - \mu_{SO35^\circ C} \neq 0$	
$H_0: \mu_{SO25^\circ C} = \mu_{SO35^\circ C}$		$H_0: \mu_{SO25^\circ C} - \mu_{SO35^\circ C} = 0$	
n=8		GL=7	$\alpha = 5\%$
$\mu_{SO25^\circ C}$	$\mu_{SO35^\circ C}$	$di = (\mu_{SO25^\circ C} - \mu_{SO35^\circ C})$	di^2
188,52	37,92	150,61	22682,65
334,92	31,60	303,32	92003,99
299,64	37,92	261,72	68497,46
200,63	62,14	138,50	19181,09
172,20	8,43	163,77	26821,46
307,01	79,52	227,49	51752,25
280,15	112,17	167,99	28219,09
179,04	93,73	85,31	7277,66
		$\Sigma di = 1498,70$	$\Sigma d^2 = 316435,66$
		$d = 187,34$	
$s_d = 14,66$		$t_{obs} = 7,42$	$t_{tab} = \pm 2,3646$

Ao nível de significância de 5% há evidências de há diferença de adsorção de óleo de navio com a variação de temperatura de 25 para 35°C para a SS

Ao nível de significância de 5% há evidências de há diferença de adsorção de óleo de navio com a variação de temperatura de 25 para 35°C para a SOH

pH			
$H_a: \mu_{SS} \neq \mu_{SO}$		$H_a: \mu_{SS} - \mu_{SO} \neq 0$	
$H_0: \mu_{SS} = \mu_{SO}$		$H_0: \mu_{SS} - \mu_{SO} = 0$	
n=3		GL=2	$\alpha = 5\%$
μ_{SS}	μ_{SO}	$di = (\mu_{SS} - \mu_{SO})$	di^2
5,17	7,07	-1,90	3,61
5,32	7,34	-2,02	4,0804
5,53	7,58	-2,05	4,2025
		$\Sigma di = -5,97$	$\Sigma d^2 = 11,8929$
		$d = -2,98$	
$s_d =$		$t_{obs} = -65,14$	$t_{tab} = \pm 4,3060$

Ao nível de significância de 5% há evidências de que de que os valores de pH da SS e da SOH são diferentes.

Teste Man-Whitney para amostras independentes

Mann-Whitney Test for Two Independent Samples			Mann-Whitney Test for Two Independent Samples			Mann-Whitney Test for Two Independent Samples		
Variação temperatura óleo de carro			Variação pH óleo de carro			Variação pH óleo de navio		
	SS 15	SS25		ss	so		ss	so
count	9	9	count	4	4	count	4	4
median	175,7592	148,8762	median	0,125	0,13	median	0,12	0,13
rank sum	95	76	rank sum	18	18	rank sum	16,5	19,5
U	31	50	U	8	8	U	9,5	6,5
	one tail	two tail		one tail	two tail		one tail	two tail
U	31		U	8		U	6,5	
mean	40,5		mean	8		mean	8	
std dev	11,32475165	ties	std dev	3,251373	ties	std dev	3,401680257	ties
z-score	0,794719414	yates	z-score	0,153781	yates	z-score	0,293972368	yates
effect r	0,187317162		effect r	0,05437		effect r	0,103934927	
p-norm	0,213388368	0,426776737	p-norm	0,438891	0,877782	p-norm	0,384389509	0,768779018
p-exact	0,218140683	0,436281366	p-exact	0,442857	0,885714	p-exact	0,342857143	0,685714286
p-simul	N/A	N/A	p-simul	N/A	N/A	p-simul	N/A	N/A

Ao nível de significância de 1% não há evidências de que de que os valores de temperatura de 15 para 25C da SS são diferentes

Ao nível de significância de 1% não há evidências de que de que os valores adsorção de óleo de carro para a variação de pH da SS e SOH são diferentes

Ao nível de significância de 1% não há evidências de que de que os valores adsorção de óleo de Navio para a variação de pH da SS e SOH são diferentes

Mann-Whitney Test for Two Independent Samples			Mann-Whitney Test for Two Independent Samples		
PCZ			Adsorção Coluna em leito fixo		
	SS	SO		SS	SO
count	9	9	count	11	11
median	7,02	6,17	median	82,572	55
rank sum	87	84	rank sum	133,5	119,5
U	39	42	U	53,5	67,5
	one tail	two tail		one tail	two tail
U	39		U	53,5	
mean	40,5		mean	60,5	
std dev	11,32475165	ties	std dev	15,22451	ties
z-score	0,088302157	yates	z-score	0,426943	yates
effect r	0,020813018		effect r	0,091025	
p-norm	0,464818262	0,929636525	p-norm	0,33471	0,669421
p-exact	0,465713698	0,931427396	p-exact	0,326092	0,652185
p-simul	N/A	N/A	p-simul	N/A	N/A

Ao nível de significância de 1%, não há evidências de que o a adsorção em coluna de leito fixo pela SS é maior que a adsorção de óleo pela SOH

Ao nível de significância de 1% não há evidências de que de que os valores de pH referentes ao PCZ da SS e da SOH são diferentes.

APÊNDICE C – Análise de dados estatísticos do capítulo 2

Análise estatística por análise de variâncias ANOVA seguido do teste de médias Turkey.

						SOMA	Média	Diferença de médias	PVGOC -3
EI-13	2,24	2,04	2,04	6,33	2,11	EI-13	0,4277		
MOOB-4	2,67	2,58	2,58	7,83	2,61	MOOB-4	0,9290		
PVG-12	2,38	2,38	2,38	7,13	2,38	PVG-12	0,6960		
EI-7	1,71	2,46	2,46	6,64	2,21	EI-7	0,5323		
PVGOC-3	1,18	1,93	1,93	5,04	1,68	PVG-2	0,9663		
PVG-2	2,67	2,64	2,64	7,94	2,65	PVG-3	0,6623		
PVG-3	2,67	2,18	2,18	7,03	2,34	PVG-23	1,6317		
PVG-23	2,67	3,64	3,64	9,94	3,31	MOOC-1	1,1730		
MOOC-1	2,85	2,85	2,85	8,56	2,85	PVG-19	0,9143		
PVG-19	3,01	2,39	2,39	7,79	2,60	PVG-27	0,9183		
PVG-27	2,55	2,62	2,62	7,80	2,60	EI-12	0,5450		
EI-12	2,23	2,23	2,23	6,68	2,23	MOOB-1	0,1950		
MOOB-1	2,41	1,61	1,61	5,63	1,88				

ANOVA						TURKEY	
TRATAMENT	GL	SOMA DE QUADRADO	QUADRODO MÉDIO	F	p	Q TAB	
O	12	6,488796	0,540733	6,2265	4,95E-05		3,51
RESÍDUO	26	2,257921	0,086843			QMRES REPETIÇÃO	0,0868
TOTAL	38	8,746717				S	3
						DMS	0,5972

APÊNDICE D – Análise de dados estatísticos do capítulo 3

Testes estatísticos de Normalidade Shapiro-Wilk e homogeneidade pelo Teste de Levene

Bioestímulo			Livre X Imobilizada			Toxicidade Artemia		
Shapiro-Wilk Test			Shapiro-Wilk Test			Shapiro-Wilk Test		
	sem bioestím	com bioestím		livre	imobilizada		biorreator	coluna
W-stat	0,945741	0,778062	W-stat	0,887626212	0,871485909	W-stat	0,9810812	0,928746
p-value	0,551001	0,063136	p-value	0,345307681	0,272492725	p-value	0,9403202	0,587847
alpha	0,05	0,05	alpha	0,05	0,05	alpha	0,05	0,05
normal	yes	yes	normal	yes	yes	normal	yes	yes
Outliers	None	None	Outliers	None	None	Outliers	None	None
Levene's Tests			Levene's Tests			Levene's Tests		
type	p-value		type	p-value		type	p-value	
means	0,712164		means	0,407527827		means	0,7569788	
medians	0,984312		medians	0,468336045		medians	0,8001139	
trimmed	0,712164		trimmed	0,407527827		trimmed	0,7569788	

Consórcio X individual			Imobilizada SS X SO			Toxicidade Alface		
Shapiro-Wilk Test			Shapiro-Wilk Test			Shapiro-Wilk Test		
	consorcio	individual		ss	so		biorreator	coluna
W-stat	0,953519	0,823548	W-stat	0,87178089	0,910558547	W-stat	0,8763963	0,94102
p-value	0,73815	0,151594	p-value	0,273709988	0,470954214	p-value	0,2529132	0,667426
alpha	0,05	0,05	alpha	0,05	0,05	alpha	0,05	0,05
normal	yes	yes	normal	yes	yes	normal	yes	yes
Outliers	None	None	Outliers	None	None	Outliers	None	None
Levene's Tests			Levene's Tests			Levene's Tests		
type	p-value		type	p-value		type	p-value	
means	0,894223		means	0,700724689		means	0,1044571	
medians	0,953302		medians	0,800591707		medians	0,3718426	
trimmed	0,894223		trimmed	0,700724689		trimmed	0,1044571	

Teste t-student pareado para comparação de médias de populações dependentes

Biodegradação em água doce x salgada				Biodegradação células livres x imobilizadas			
H _a : $\mu_{\text{salgada}} \neq \mu_{\text{doce}}$		H _a : $\mu_{\text{salgada}} - \mu_{\text{doce}} \neq 0$		H _a : $\mu_{\text{imobili}} < \mu_{\text{livre}}$		H _a : $\mu_{\text{imobili}} - \mu_{\text{livre}} < 0$	
H ₀ : $\mu_{\text{salgada}} = \mu_{\text{doce}}$		H ₀ : $\mu_{\text{salgada}} - \mu_{\text{doce}} = 0$		H ₀ : $\mu_{\text{imobili}} \geq \mu_{\text{livre}}$		H ₀ : $\mu_{\text{imobili}} - \mu_{\text{livre}} \geq 0$	
n=5		GL=4	$\alpha = 5\%$	n=4		GL=3	$\alpha = 5\%$
μ_{salgada}	μ_{doce}	$d_i = (\mu_{\text{sal}} - \mu_{\text{do}})$	d_i^2	μ_{imobili}	μ_{livre}	$d_i = (\mu_{\text{imob}} - \mu_{\text{livre}})$	d_i^2
66,80	73,32	-6,52	42,56	1579,46	1357,72	221,75	49171,74
67,88	65,92	1,96	3,83	1657,12	1734,36	-77,24	5966,23
69,00	65,77	3,23	10,45	1458,92	1741,84	-282,92	80042,60
68,07	65,88	2,19	4,81	1424,05	1736,40	-312,36	97566,42
68,26	69,23	-0,97	0,93				
		$\Sigma d_i = -0,11$	$\Sigma d_i^2 = 62,58$			$\Sigma d_i = -450,77$	$\Sigma d_i^2 = 232746,99$
		$d = -0,0269$				$d = 150,26$	
$s_d = 3,955$		$t_{\text{obs}} = -0,015$	$t_{\text{tab}} = \pm 3,182$	$s_d = 246,27$		$t_{\text{obs}} = -1,2202$	$t_{\text{tab}} = \pm 3,182$

Ao nível de significância de 5% não há evidências de que os valores de biodegradação para água salgada e água doce são diferentes.

Ao nível de significância de 5% não há evidências de que os valores de biodegradação de células livres e imobilizadas são diferentes

Biodegradação imobilizadas ss x so				Biodegradação individuais x consórcio			
H _a : $\mu_{\text{ss}} \neq \mu_{\text{so}}$		H _a : $\mu_{\text{ss}} - \mu_{\text{so}} \neq 0$		H _a : $\mu_{\text{indivi}} < \mu_{\text{conso}}$		H _a : $\mu_{\text{indivi}} - \mu_{\text{conso}} < 0$	
H ₀ : $\mu_{\text{ss}} = \mu_{\text{so}}$		H ₀ : $\mu_{\text{ss}} - \mu_{\text{so}} = 0$		H ₀ : $\mu_{\text{indivi}} \geq \mu_{\text{conso}}$		H ₀ : $\mu_{\text{indivi}} - \mu_{\text{conso}} \geq 0$	
n=5		GL=4	$\alpha = 5\%$	n=4		GL=3	$\alpha = 5\%$
μ_{ss}	μ_{so}	$d_i = (\mu_{\text{ss}} - \mu_{\text{so}})$	d_i^2	μ_{indivi}	μ_{conso}	$d_i = (\mu_{\text{indivi}} - \mu_{\text{conso}})$	d_i^2
1557,21	1601,72	-44,51	1981,52	1565,82	1642,58	-76,76	5891,63
1548,23	1766,01	-217,78	47427,38	1615,01	1631,65	-16,64	276,88

1456,45	1461,40	-4,95	24,46	1464,00	1465,17	-1,17	1,38
1298,79	1549,30	-250,51	62757,20	1494,13	1594,61	-100,48	10095,39
1464,00	1494,13	-30,14	908,12				
		$\Sigma di = -547,89$	$\Sigma d^2 = 113098,69$			$\Sigma di = -195,05$	$\Sigma d^2 = 16265,27$
		$d = 182,63$				$d = 65,01$	
$s_d = 112,62$		$t_{obs} = -3,243$	$t_{tab} = \pm 3,182$	$s_d = 47,45$		$t_{obs} = -2,7403$	$t_{tab} = \pm 3,182$

Ao nível de significância de 5% há evidências de que de que os valores de biodegradação para o a utilização das biomassas SS é maior que a da SOH

Ao nível de significância de 5% não há evidências de que de que os valores de biodegradação do consórcio é maior que os resultados individuais

Doce x salobra			
$H_a : \mu_D < \mu_S$		$H_a : \mu_D - \mu_S < 0$	
$H_0 : \mu_D \geq \mu_S$		$H_0 : \mu_D - \mu_S \geq 0$	
n=4		GL=3	$\alpha = 5\%$
μ_D	μ_S	$di = (\mu_D - \mu_S)$	di^2
66,80	73,32	-6,52	42,56
67,88	65,92	1,96	3,83
69,00	65,77	3,23	10,45
68,07	65,88	2,19	4,81
		$\Sigma di = -0,11$	$\Sigma d^2 = 62,583$
		$d = -0,026$	
$s_d = 3,95$		$t_{obs} = -0,015$	$t_{tab} = \pm 3,1824$

Com bioestímulo x sem bioestímulo			
$H_a : \mu_C \neq \mu_S$		$H_a : \mu_C - \mu_S \neq 0$	
$H_0 : \mu_C = \mu_S$		$H_0 : \mu_C - \mu_S = 0$	
n=3		GL=2	$\alpha = 5\%$
μ_{SS}	μ_{SO}	$di = (\mu_{SS} - \mu_{SO})$	di^2
978,064	843,335	134,73	18151,90344
1101,65	1275,886	-174,236	30358,1837
1400,485	1259,678	140,807	19826,61125
		$\Sigma di = 101,30$	$\Sigma d^2 = 68336,6$
		$d = 50,65$	
$s_d = 180,$		$t_{obs} = 0,4869$	$t_{tab} = \pm 3,1824$

Ao nível de significância de 5% não há evidências de que de que os valores de biodegradação para água salgada e água doce são diferentes

Ao nível de significância de 5% não há evidências de que de que os valores de biodegradação com com adição de nutrientes e sem adição de nutrientes são diferentes

Fitotoxicidade alface			
$H_a : \mu_C > \mu_B$		$H_a : \mu_C - \mu_B > 0$	
$H_0 : \mu_C \leq \mu_B$		$H_0 : \mu_C - \mu_B \leq 0$	
n=6		GL=5	$\alpha = 5\%$
μ_C	μ_B	$di = (\mu_C - \mu_B)$	di^2
13,33	16,67	-3,33	11,11
23,33	13,33	10,00	100,00
30,00	30,00	0,00	0,00
60,00	36,67	23,33	544,44
26,67	40,00	-13,33	177,78
56,67	26,67	30	900
		$\Sigma di = 46,67$	$\Sigma d^2 = 1733,3$
		$d = 9,333$	
$s_d = 16,55$		$t_{obs} = 1,380$	$t_{tab} = \pm 2,57$

Letalidade <i>A. salina</i>			
$H_a : \mu_C > \mu_B$		$H_a : \mu_C - \mu_B > 0$	
$H_0 : \mu_C \leq \mu_B$		$H_0 : \mu_C - \mu_B \leq 0$	
n=5		GL=4	$\alpha = 5\%$
μ_C	μ_B	$di = (\mu_C - \mu_B)$	di^2
90	80	10	100
70	40	30	900
60	30	30	900
40	20	20	400
10	6	4	16
		$\Sigma di = 94,00$	$\Sigma d^2 = 2316$
		$d = 23,5$	
$t_{obs} = 4,486$	$s_d = 11,71$		$t_{tab} = \pm 2,57$

Ao nível de significância de 5% não há evidências de que de que os valores médios das taxas de germinação de *L. sativa* para o resíduo do biorreator são maiores que os valores médios da taxa de germinação das sementes para o resíduo do efluente após tratamento em coluna.

Ao nível de significância de 5% há evidências de que a taxa de letalidade da *A. Salina* é maior para o resíduo da coluna do que a taxa média de letalidade da *A. Salina* para o resíduo da coluna.

Curva de crescimento com adição de nutrientes x sem adição de nutrientes			
		$H_a : \mu_{com} - \mu_{sem} > 0$	
		$H_0: \mu_{com} - \mu_{sem} \leq 0$	
n=11		GL=10	$\alpha = 5\%$
μ_{com}	M_{sem}	$d_i = (\mu_{com} - \mu_{sem})$	d_i^2
5,27E+09	5,20E+09	6,67E+07	4,44E+15
3,07E+11	3,30E+11	-2,33E+10	5,44E+20
1,87E+11	2,13E+11	-2,67E+10	7,11E+20
2,27E+11	3,87E+11	-1,60E+11	2,56E+22
3,53E+11	2,87E+11	6,67E+10	4,44E+21
1,30E+11	1,30E+11	0,00E+00	0,00E+00
5,67E+11	5,08E+11	5,83E+10	3,40E+21
4,18E+13	7,67E+09	4,18E+13	1,75E+27
1,47E+13	1,70E+09	1,47E+13	2,15E+26
7,00E+12	6,00E+08	7,00E+12	4,90E+25
		$\Sigma d_i = 6,36E+13$	$\Sigma d_i^2 = 2,01E+27$
		$d = 5,78E+12$	
$s_d = 5,02E+10$		$t_{obs} = 4200,50$	$t_{tab} = \pm 1,8125$

Ao nível de significância de 5% há evidências de o crescimento de colônias bacterianas com adição de nutrientes é maior que sem a adição de nutrientes.

Teste Man-Whitney para amostras independentes

Mann-Whitney Test for Two Independent Samples			Mann-Whitney Test for Two Independent Samples			Mann-Whitney Test for Two Independent Samples		
Teste de reinoculação			Biodegradação água ultrapura x			Toxicidade Feijão		
	primeira	segunda		Doce	Salgada		coluna	biorreator
count	4	4	count	4	4	count	6	6
median	1814,911	1735,384	median	1519,194565	1735,383667	median	100	36,665
rank sum	26	10	rank sum	14	22	rank sum	57	21
U	0	16	U	12	4	U	0	36
	one tail	two tail		one tail	two tail		one tail	two tail
U	0		U	4		U	0	
mean	8		mean	8		mean	18	
std dev	3,464102	ties	std dev	3,464101615	ties	std dev	5,8387421	ties
z-score	2,165064	yates	z-score	1,010362971	yates	z-score	2,9972209	yates
effect r	0,765466		effect r	0,357217254		effect r	0,8652232	
p-norm	0,015191	0,030383	p-norm	0,156160711	0,312321422	p-norm	0,0013623	0,002725
p-exact	0,014286	0,028571	p-exact	0,171428571	0,342857143	p-exact	0,0010823	0,002165
p-simul	N/A	N/A	p-simul	N/A	N/A	p-simul	N/A	N/A

Ao nível de significância de 1% há evidências de que de que os percentuais de germinação da *Phaseolus vulgaris* para resíduo do efluente após tratamento em coluna são maiores do que os percentuais de germinação para o resíduo do biorreator.

Ao nível de significância de 1% não há evidências de que de que os valores de biodegradação da primeira geração e da segunda geração de microrganismos são diferentes

Ao nível de significância de 1% não há evidências de que de que os valores de biodegradação do consórcio é maior que os resultados individuais

APÊNDICE E- Imagens macroscópicas e microscópicas das bactérias isoladas

Culturas crescidas em agar nutriente e identificação morfológica po colocação de Gram



EI-1



EI-2



EI-3



EI-4



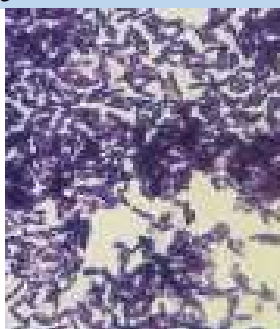
EI-5



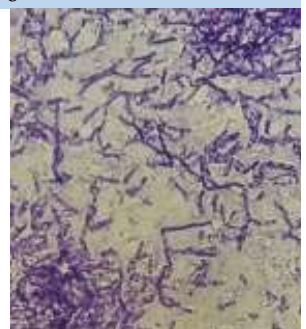
EI-6

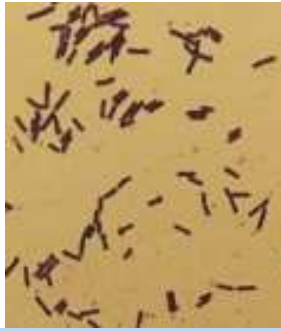


EI-7



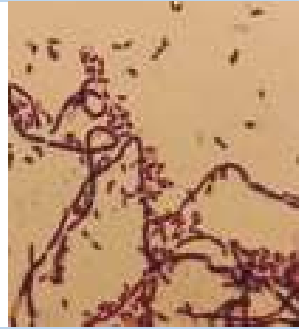
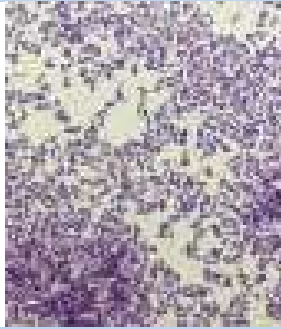
EI-8





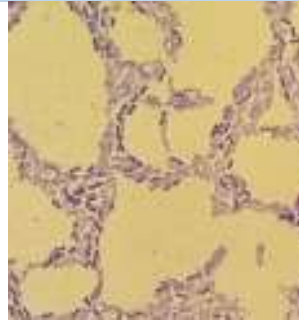
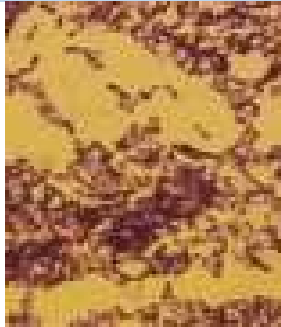
EI-9

EI-10



EI-11

EI-12



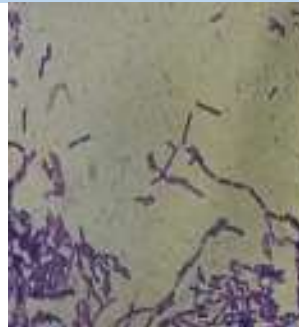
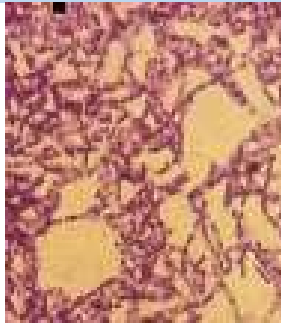
EI-13

EI-14



EI-15

EI-16



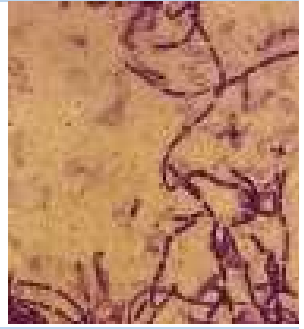
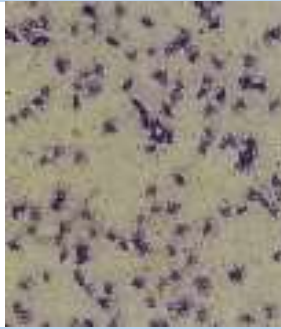
MO-1

MO-2



MO-3

MO-4



MO-5

MO-6



MO-7

MO-8



MO-9

MO-10

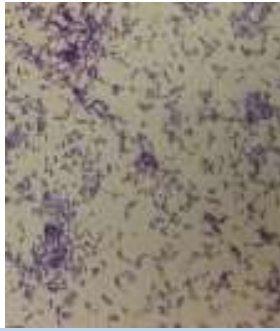


MO-11

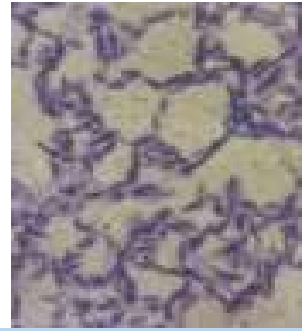
MO-12



MO-13



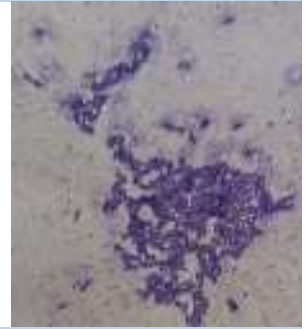
PVG-1



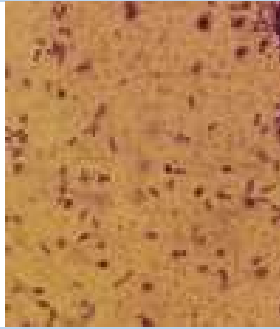
PVG-2



PVG-3



PVG-4



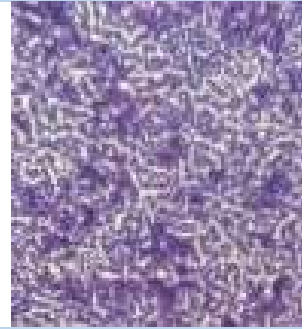
PVG-5



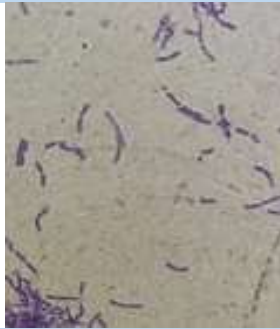
PVG-6



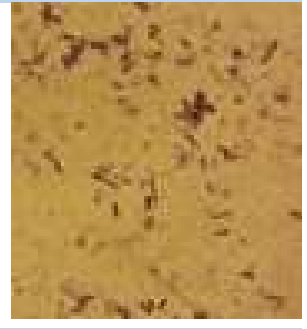
PVG-10



PVG-11



PVG-12

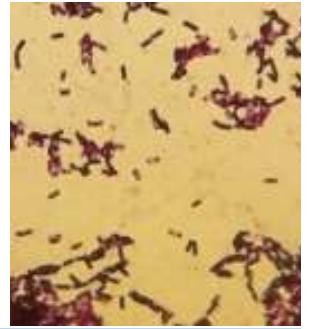




PVG-13



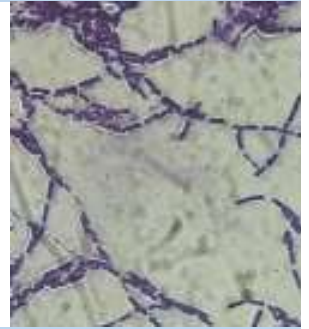
PVG-14



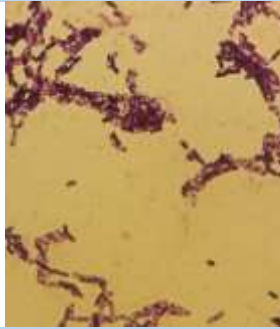
PVG-15



PVG-16



PGV-17



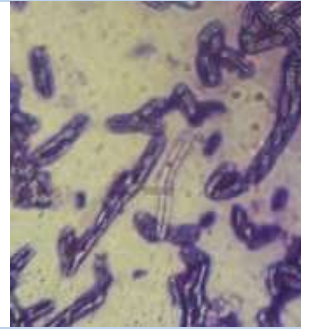
PVG-18



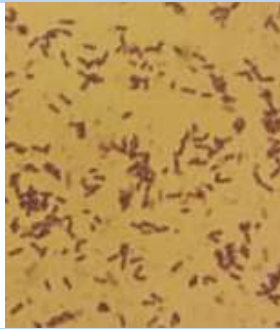
PVG-19



PVG-20



PVG-21



PVG-22





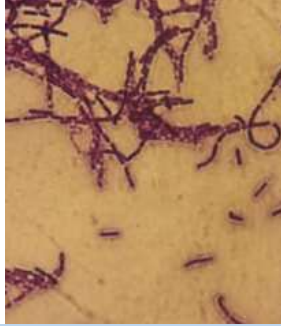
PVG-23



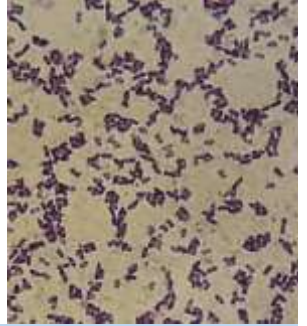
PVG-24



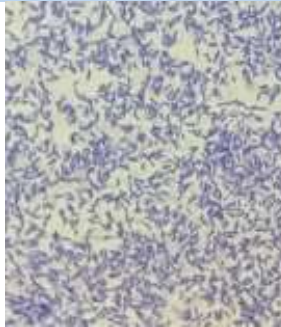
PVG-25



PVG-26



PVG-27



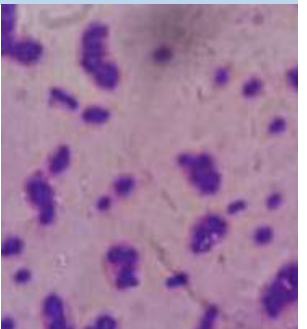
PVG-28



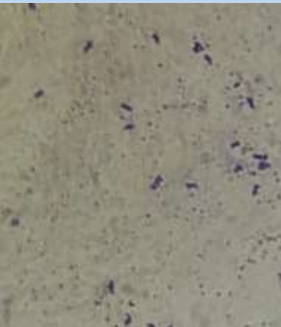
PVG-29



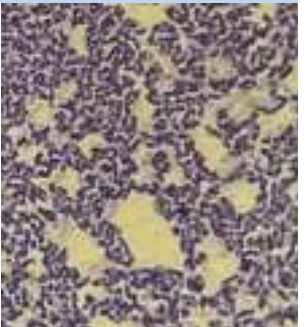
EIOB-1



EIOB-2

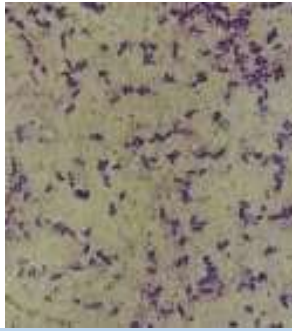


EIOB-3





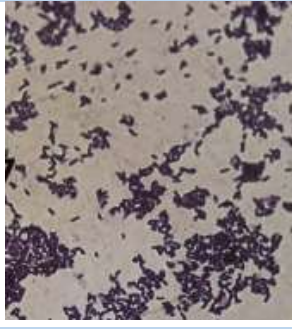
EIOB-4



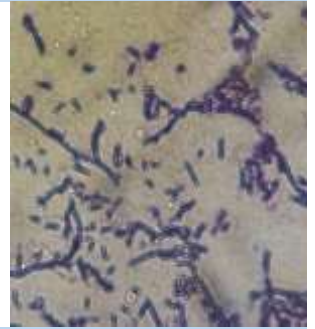
EIOB-5



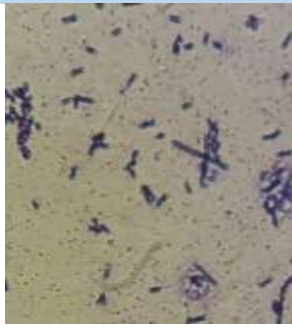
EIOB-7



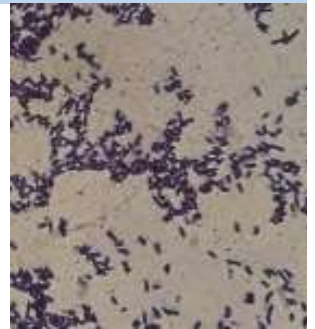
EIOB-8



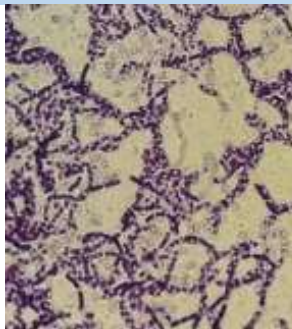
EIOB-9



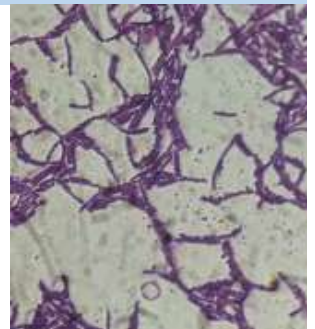
EIOB-10



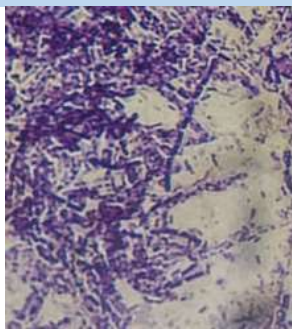
EIOC-1



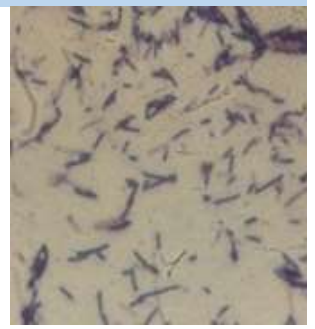
EIOC-2



EIOC-3

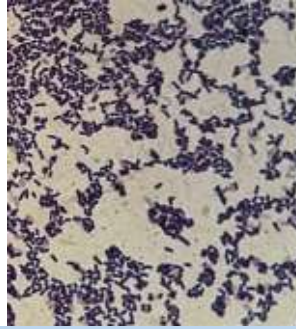


EIOC-4

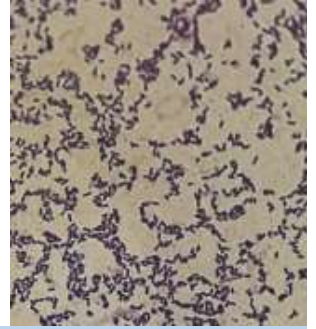




EIOC-5



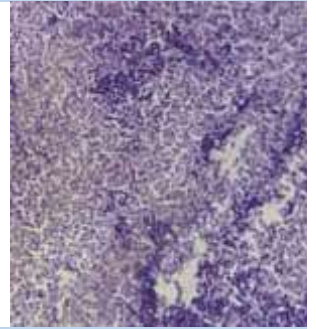
EIOC-6



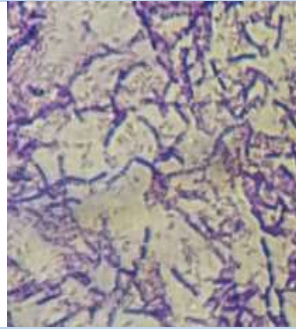
EIOC-7



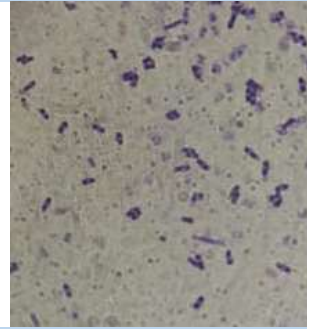
EIOC-8



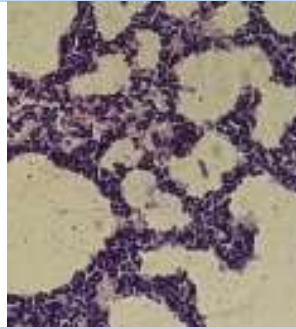
EIOC-9



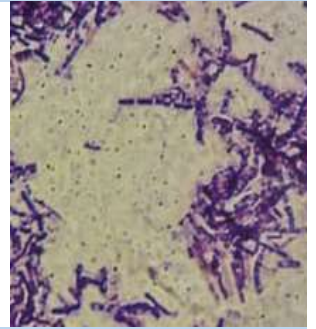
MOOB-1



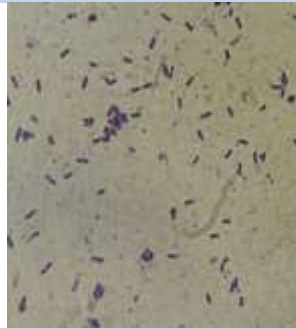
MOOB-2



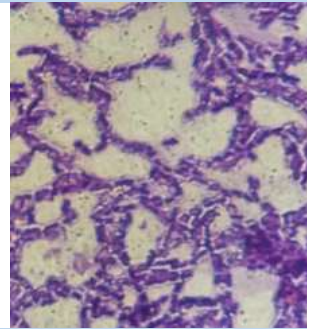
MOOB-3



MOOB-4



MOOB-5

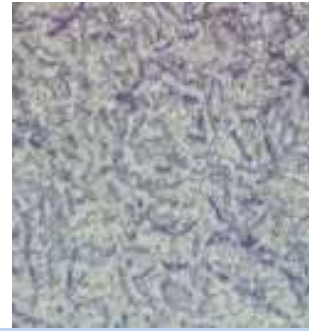




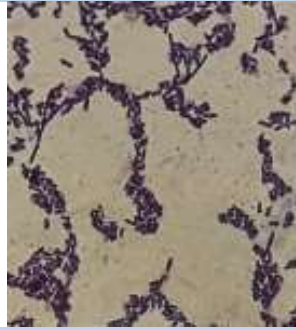
MOOB-6



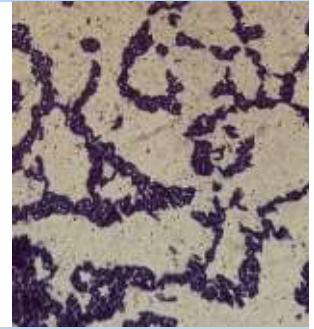
MOOC-1



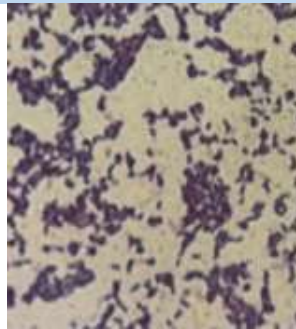
MOOC-2



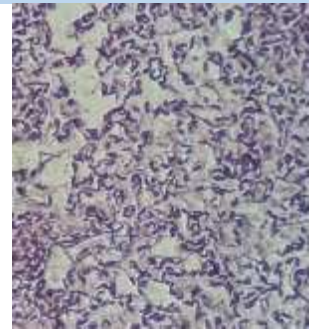
MOOC-3



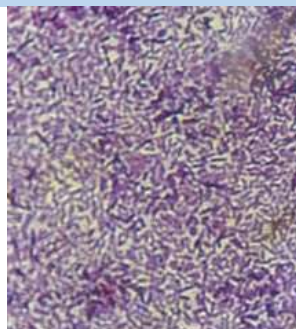
MOOC-4



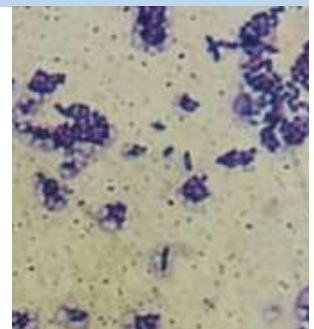
MOOC-5



PVGOB-1



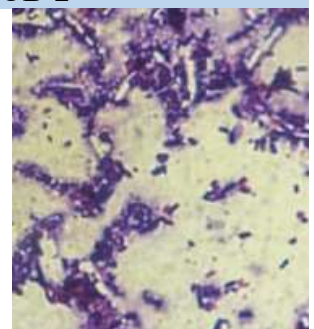
PVGOB-2



PVGOB-3

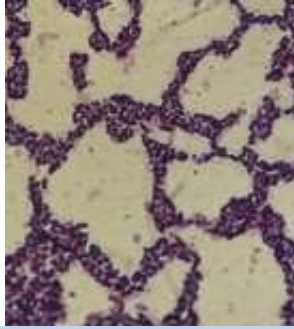


PVGOB-4





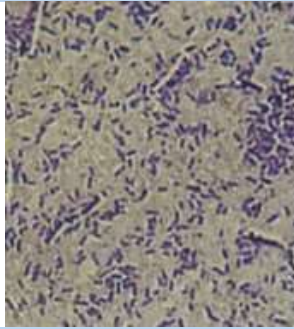
PVGOB-5



PVGOB-6



PVGOB-7



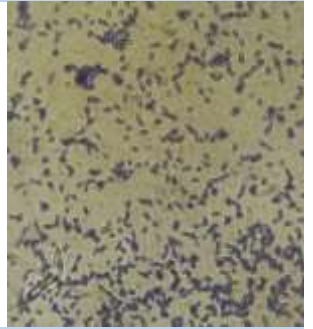
PVGOB-8



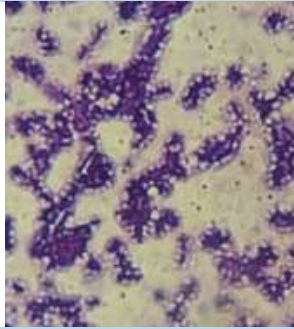
PVGOB-9



PVGOC-1



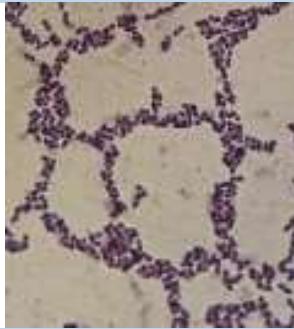
PVGOC-2



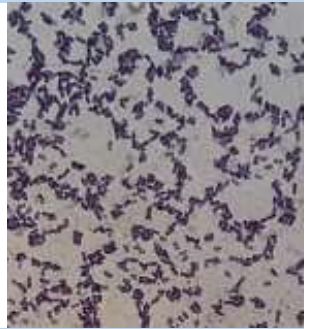
PVGOC-3



PVGOC-4

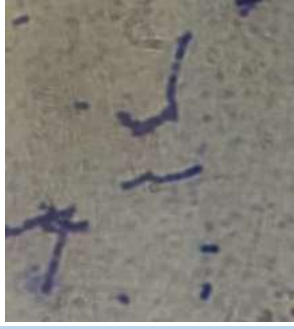


PVGOC-5

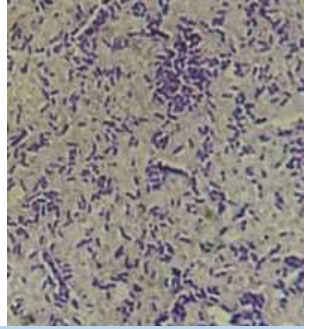




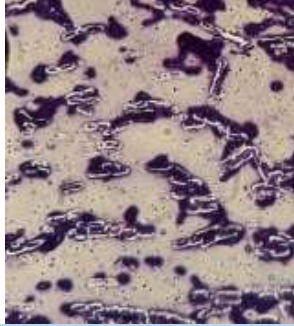
PVGOC-6



PVGOC-7



PVGOC-8



PVGOC-9



APÊNDICE F-Árvores filogenéticas das bactérias identificadas

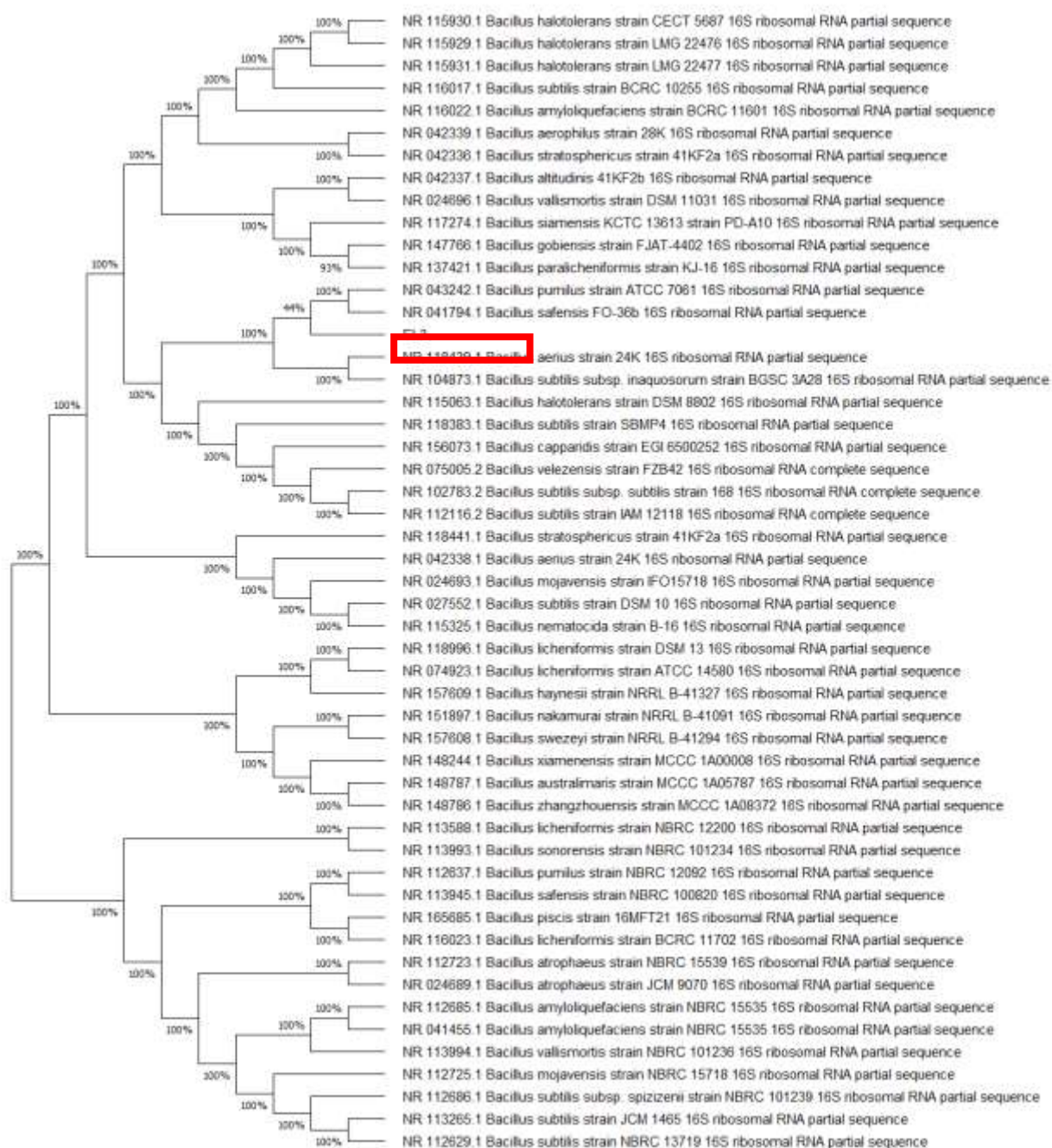


Figura 1: Árvore filogenética de seqüências do gene 16S rRNA (aproximadamente 1000 bp) mostrando a relação entre a cepa EI-3 e as cepas tipo de diferentes espécies de *Ensifer*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. As análises de bootstrap foram realizadas com 1000 repetições. O número de acesso do GenBank de cada espécie está entre parênteses.

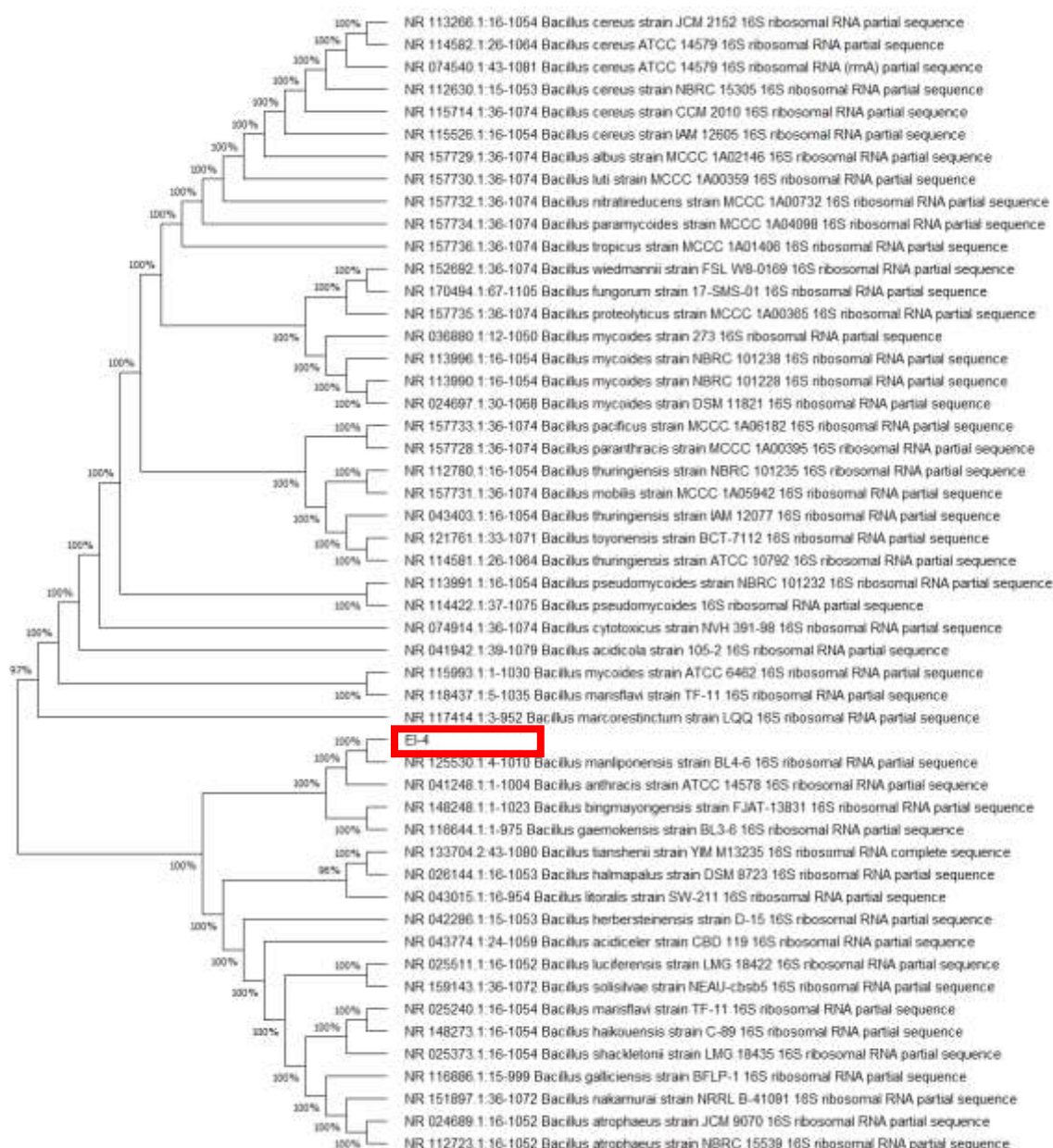


Figura 2: Árvore filogenética de seqüências do gene 16S rRNA (aproximadamente 1000 bp) mostrando a relação entre a cepa EI-4 e as cepas tipo de diferentes espécies de *Ensifer*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. As análises de bootstrap foram realizadas com 1000 repetições. O número de acesso do GenBank de cada espécie está entre parênteses.

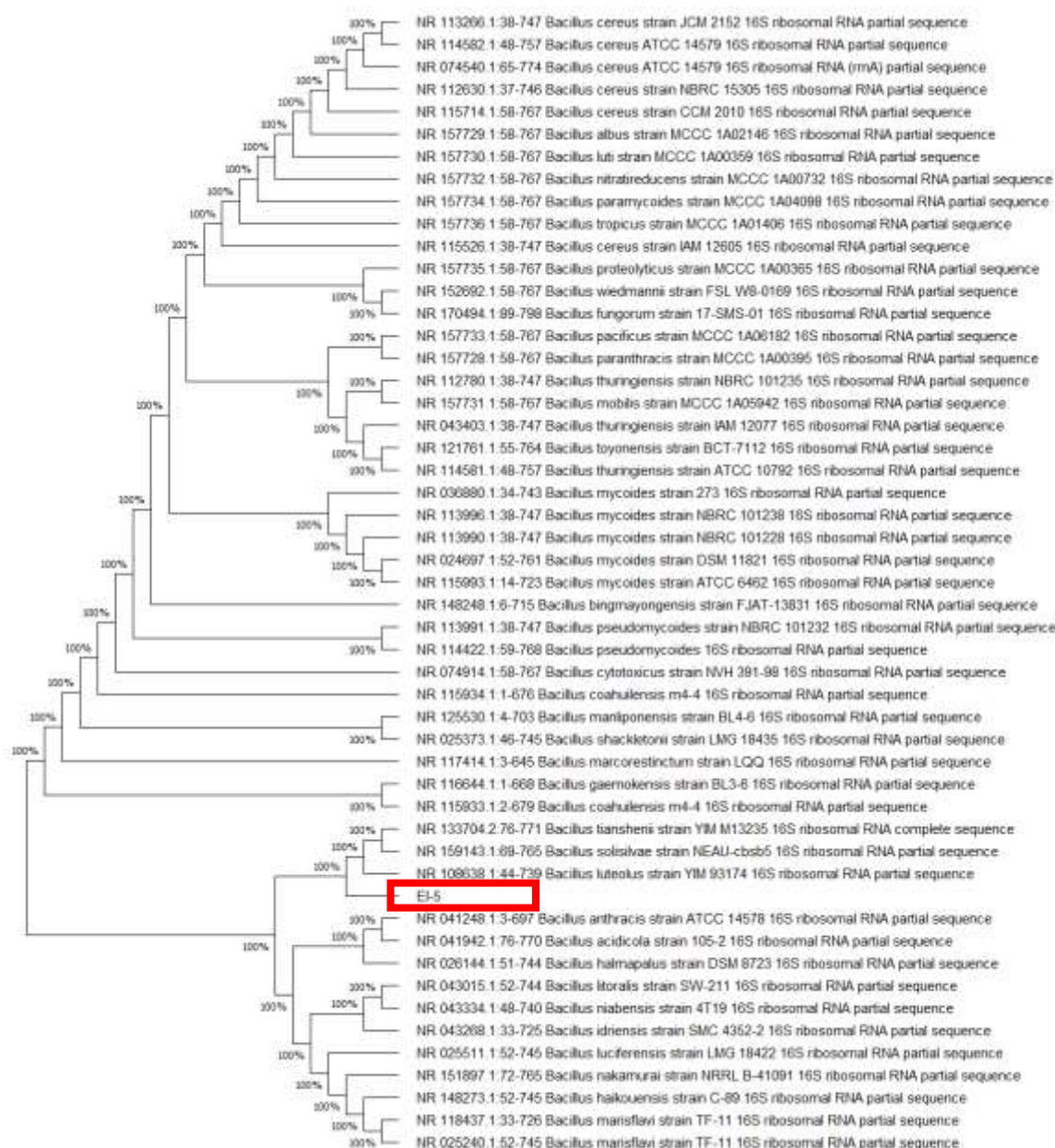


Figura 3: Árvore filogenética de sequências do gene 16S rRNA (aproximadamente 1000 bp) mostrando a relação entre a cepa EI-5 e as cepas tipo de diferentes espécies de *Ensifer*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. As análises de bootstrap foram realizadas com 1000 repetições. O número de acesso do GenBank de cada espécie está entre parênteses.

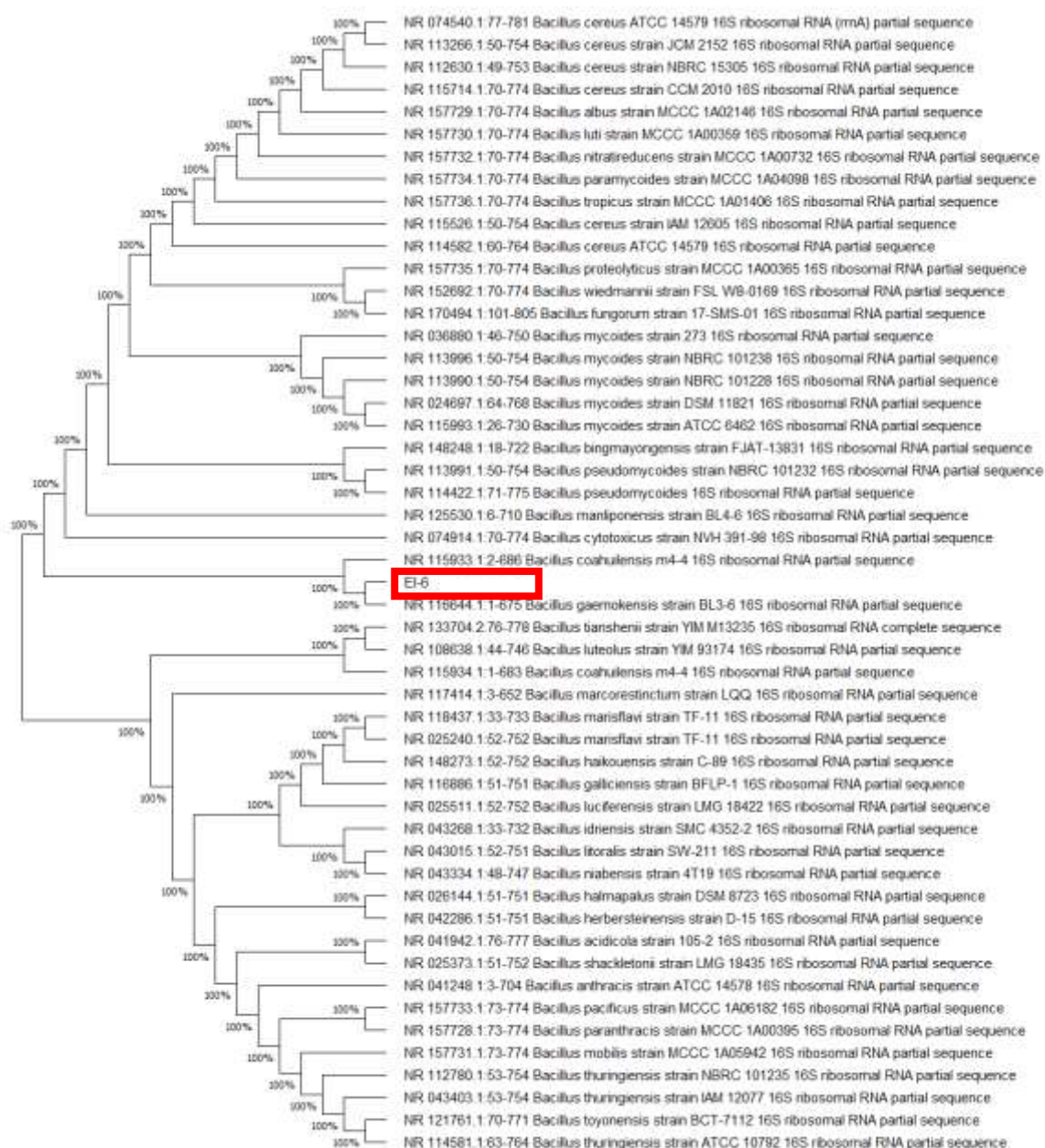


Figura 4: Árvore filogenética de seqüências do gene 16S rRNA (aproximadamente 1000 bp) mostrando a relação entre a cepa EI-6 e as cepas tipo de diferentes espécies de *Ensifer*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. As análises de bootstrap foram realizadas com 1000 repetições. O número de acesso do GenBank de cada espécie está entre parênteses.

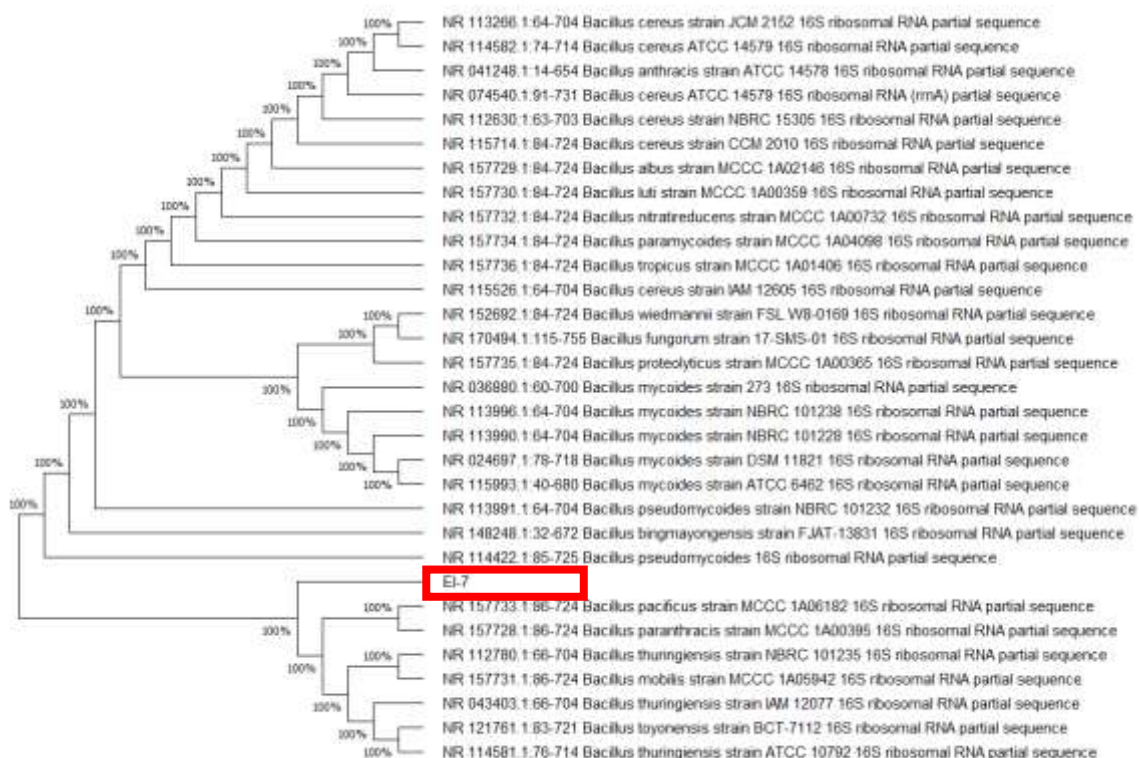


Figura 5: : Árvore filogenética de seqüências do gene 16S rRNA (aproximadamente 1000 bp) mostrando a relação entre a cepa EI-7 e as cepas tipo de diferentes espécies de *Ensifer*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. As análises de bootstrap foram realizadas com 1000 repetições. O número de acesso do GenBank de cada espécie está entre parênteses.

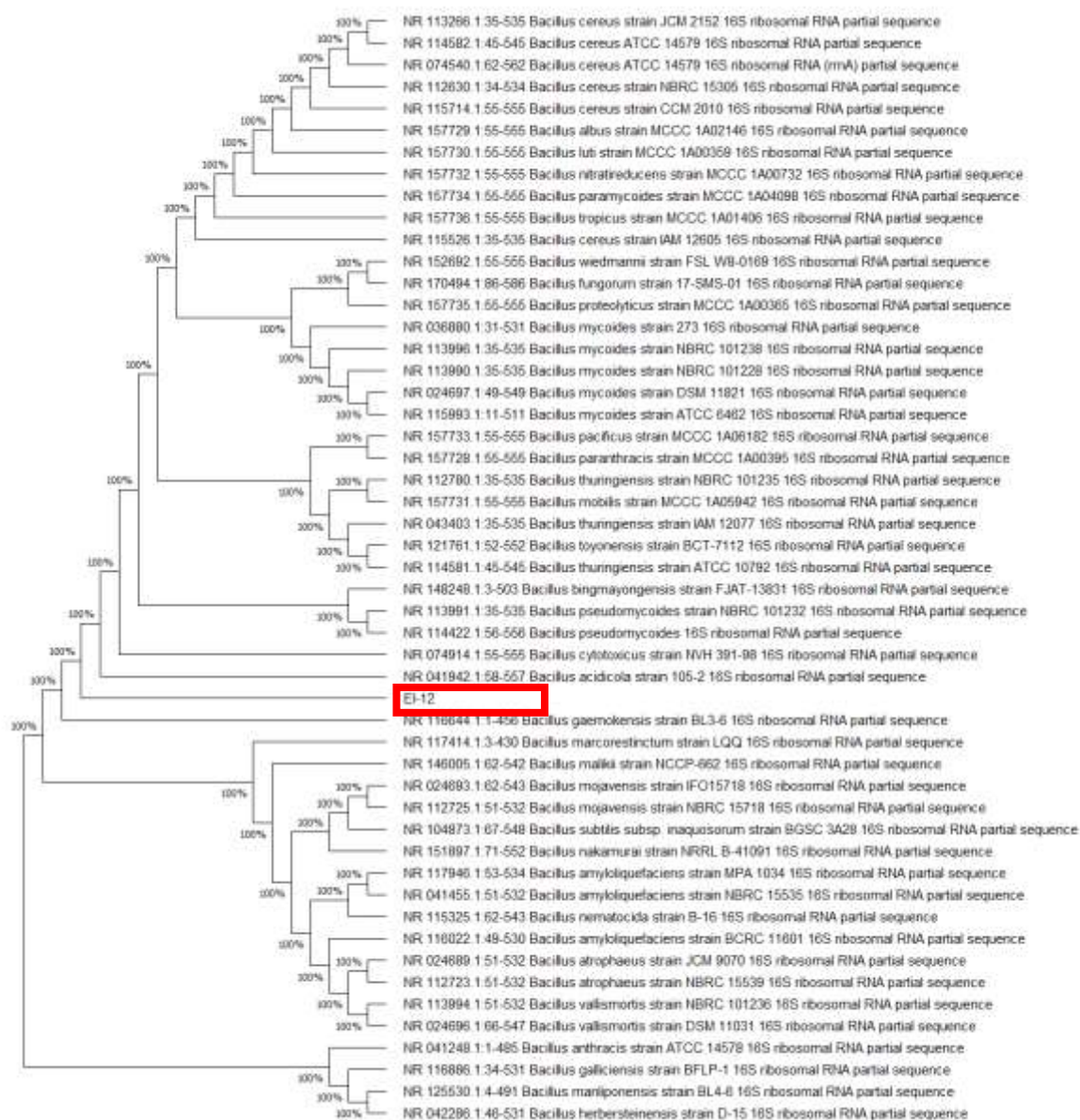


Figura 6: Árvore filogenética de sequências do gene 16S rRNA (aproximadamente 1000 bp) mostrando a relação entre a cepa EI-12 e as cepas tipo de diferentes espécies de *Ensifer*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. As análises de bootstrap foram realizadas com 1000 repetições. O número de acesso do GenBank de cada espécie está entre parênteses.



Figura 7: Árvore filogenética de sequências do gene 16S rRNA (aproximadamente 1000 bp) mostrando a relação entre a cepa EI-13 e as cepas tipo de diferentes espécies de *Ensifer*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. As análises de bootstrap foram realizadas com 1000 repetições. O número de acesso do GenBank de cada espécie está entre parênteses.

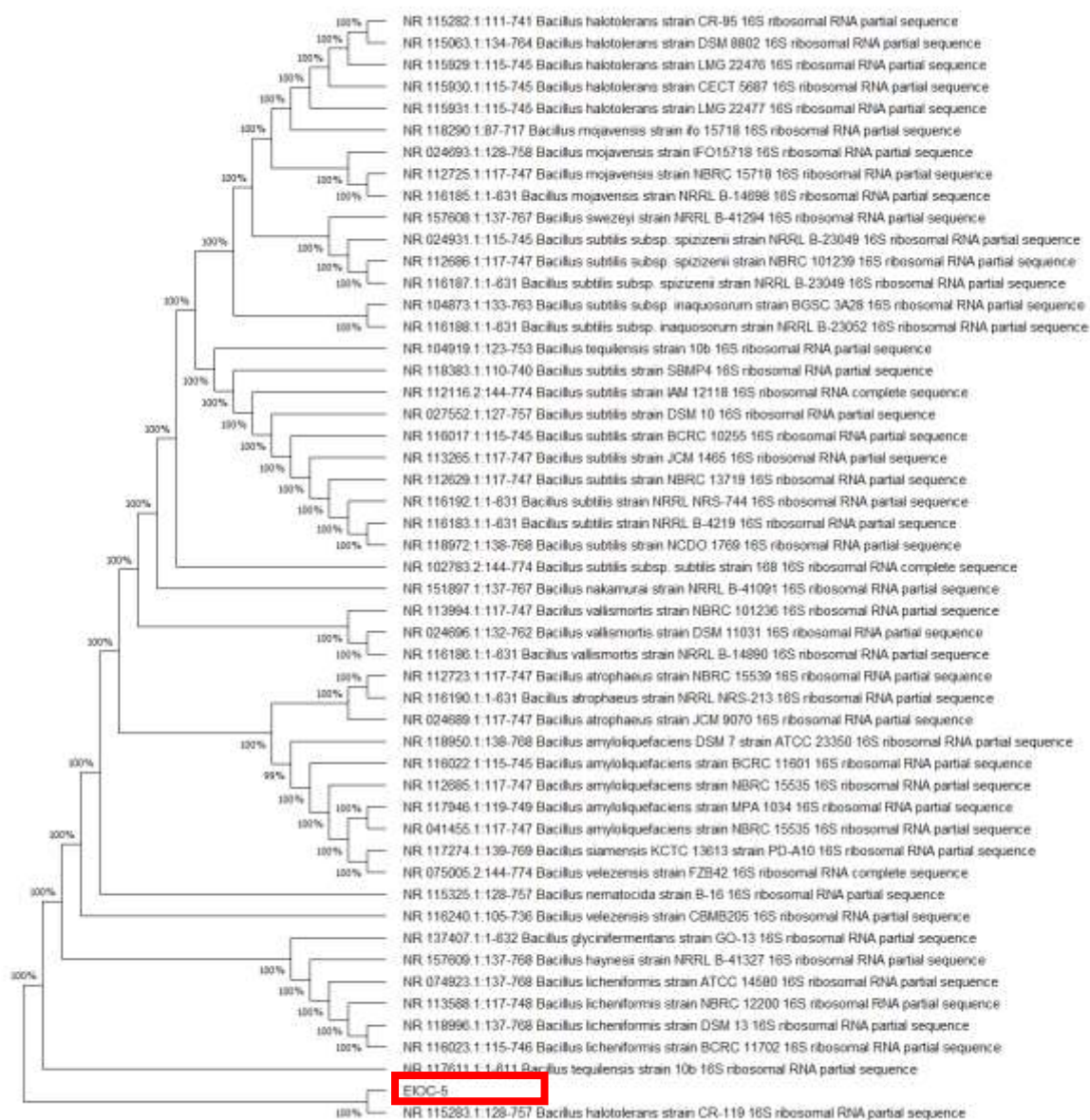


Figura 8: Árvore filogenética de seqüências do gene 16S rRNA (aproximadamente 1000 bp) mostrando a relação entre a cepa EIOC-6 e as cepas tipo de diferentes espécies de *Ensifer*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. As análises de bootstrap foram realizadas com 1000 repetições. O número de acesso do GenBank de cada espécie está entre parênteses.

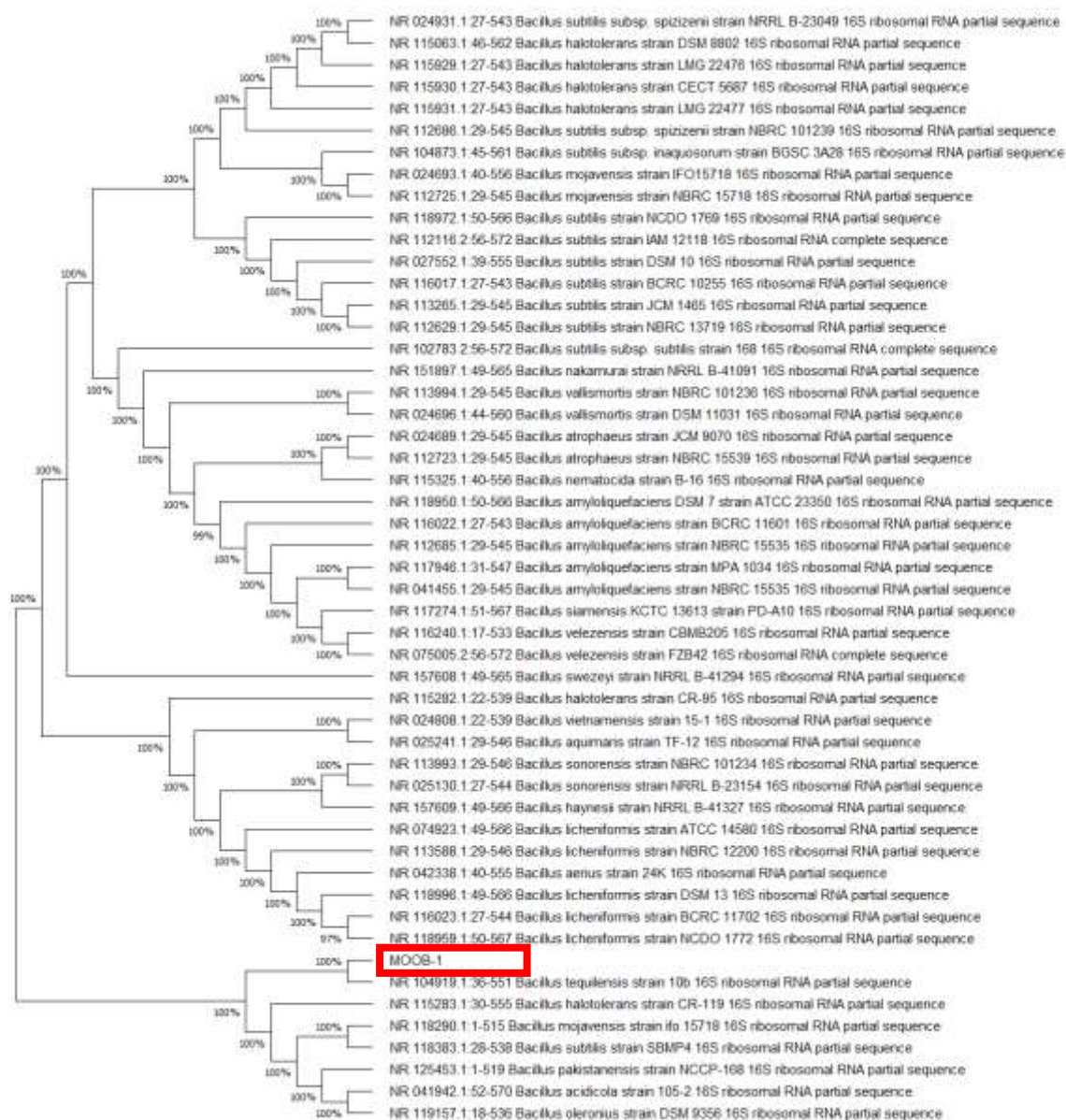


Figura 9: Árvore filogenética de sequências do gene 16S rRNA (aproximadamente 1000 bp) mostrando a relação entre a cepa MOOB-1 e as cepas tipo de diferentes espécies de *Ensifer*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. As análises de bootstrap foram realizadas com 1000 repetições. O número de acesso do GenBank de cada espécie está entre parênteses.

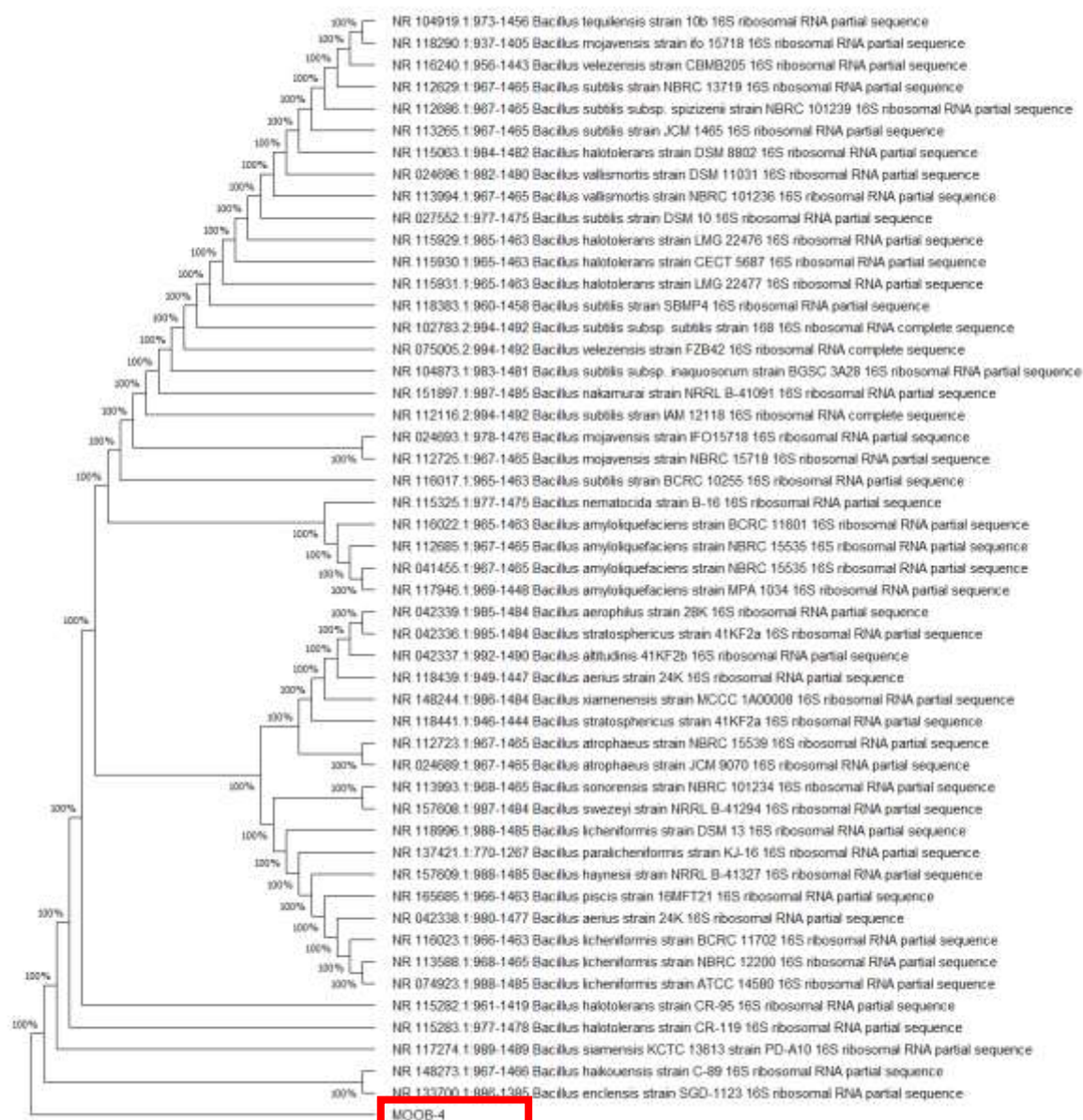


Figura 10: Árvore filogenética de seqüências do gene 16S rRNA (aproximadamente 1000 bp) mostrando a relação entre a cepa MOOB-4 e as cepas tipo de diferentes espécies de *Ensifer*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. As análises de bootstrap foram realizadas com 1000 repetições. O número de acesso do GenBank de cada espécie está entre parênteses.

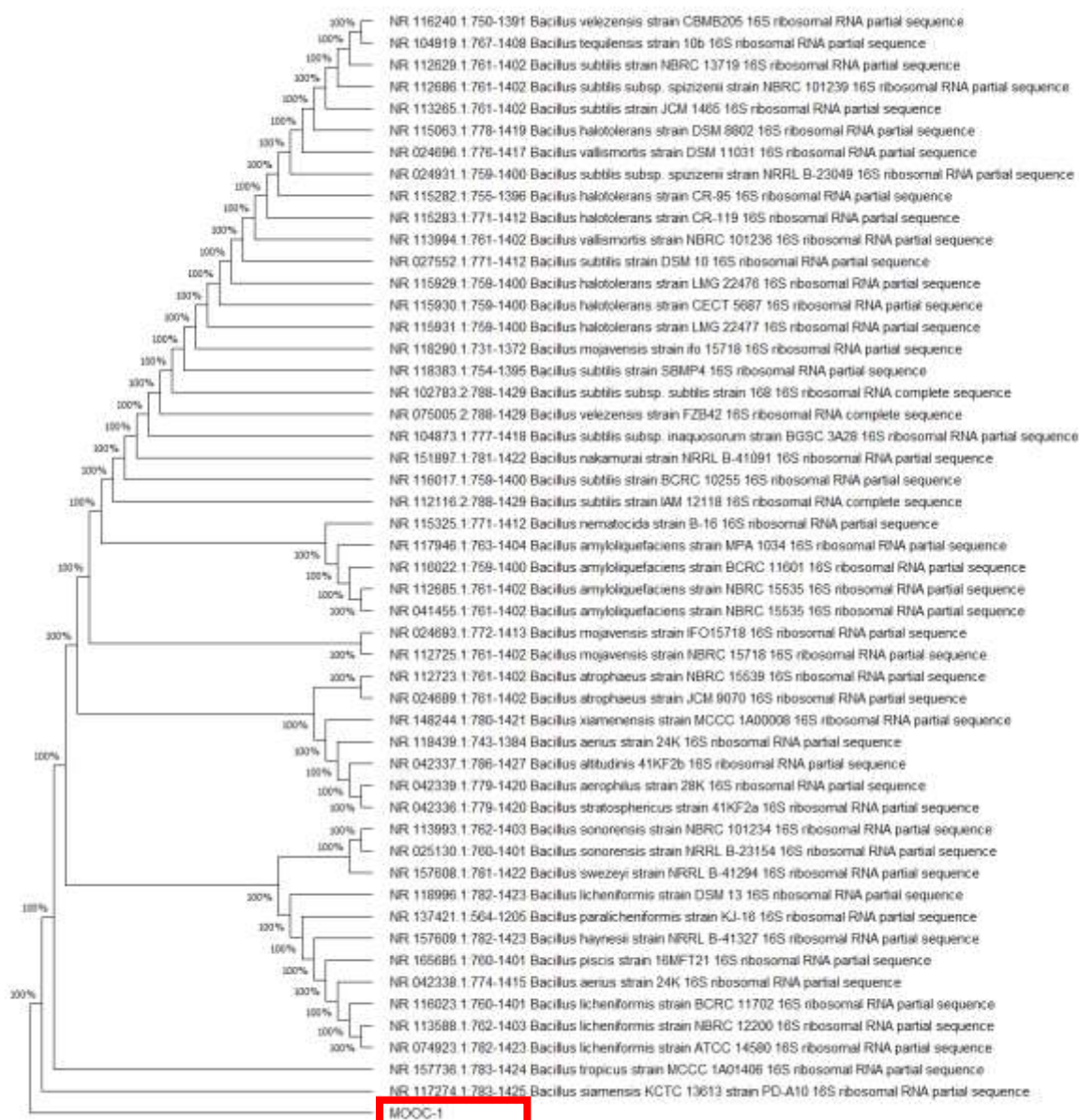


Figura 11: Árvore filogenética de seqüências do gene 16S rRNA (aproximadamente 1000 bp) mostrando a relação entre a cepa MOOC-1 e as cepas tipo de diferentes espécies de *Ensifer*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. As análises de bootstrap foram realizadas com 1000 repetições. O número de acesso do GenBank de cada espécie está entre parênteses.

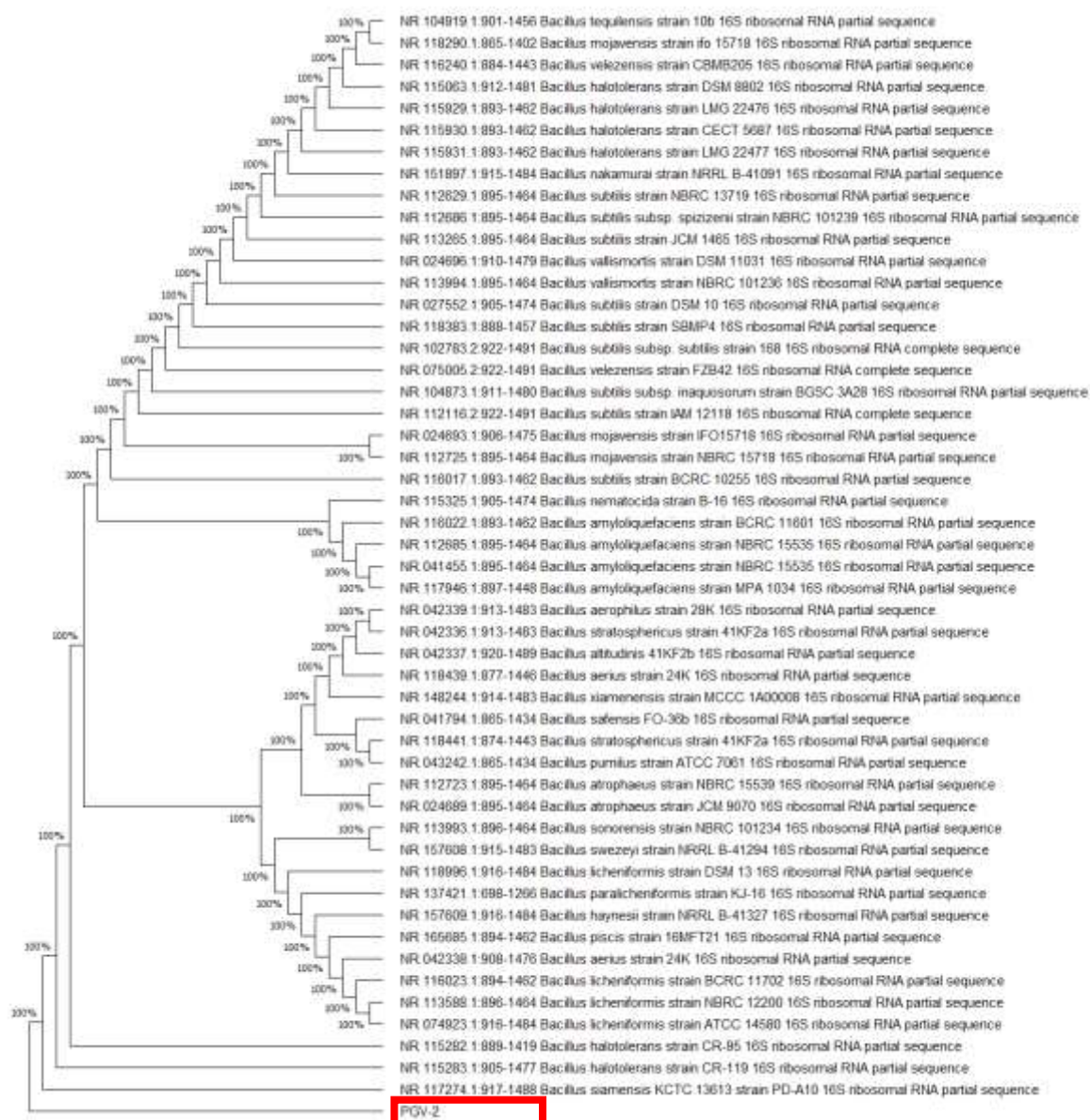


Figura 12: : Árvore filogenética de sequências do gene 16S rRNA (aproximadamente 1000 bp) mostrando a relação entre a cepa PVG-2 e as cepas tipo de diferentes espécies de *Ensifer*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. As análises de bootstrap foram realizadas com 1000 repetições. O número de acesso do GenBank de cada espécie está entre parênteses.

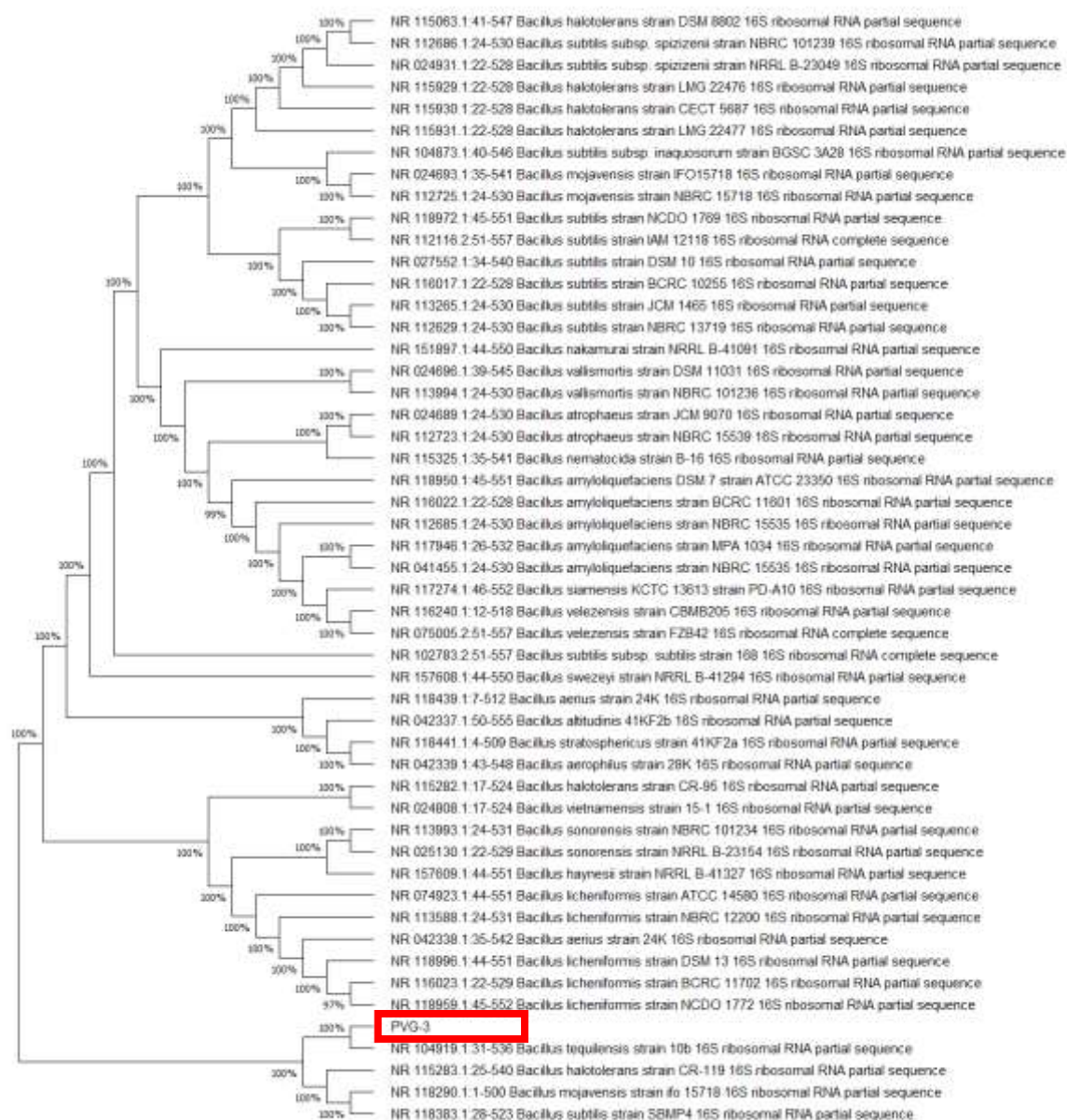


Figura 13: Árvore filogenética de seqüências do gene 16S rRNA (aproximadamente 1000 bp) mostrando a relação entre a cepa PVG-3 e as cepas tipo de diferentes espécies de *Ensifer*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. As análises de bootstrap foram realizadas com 1000 repetições. O número de acesso do GenBank de cada espécie está entre parênteses.

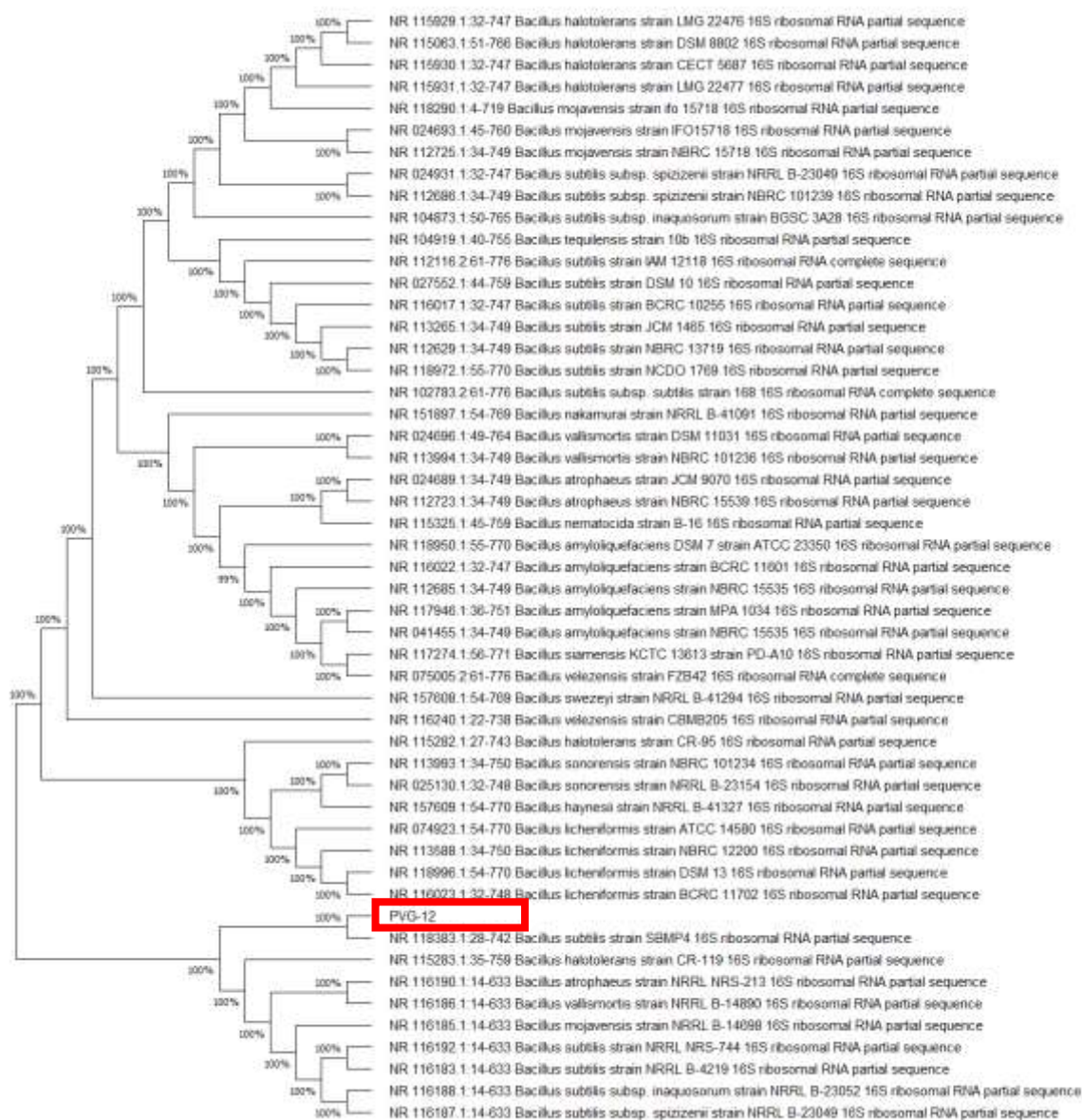


Figura 14: Árvore filogenética de seqüências do gene 16S rRNA (aproximadamente 1000 bp) mostrando a relação entre a cepa PVG-12 e as cepas tipo de diferentes espécies de *Ensifer*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. As análises de bootstrap foram realizadas com 1000 repetições. O número de acesso do GenBank de cada espécie está entre parênteses.

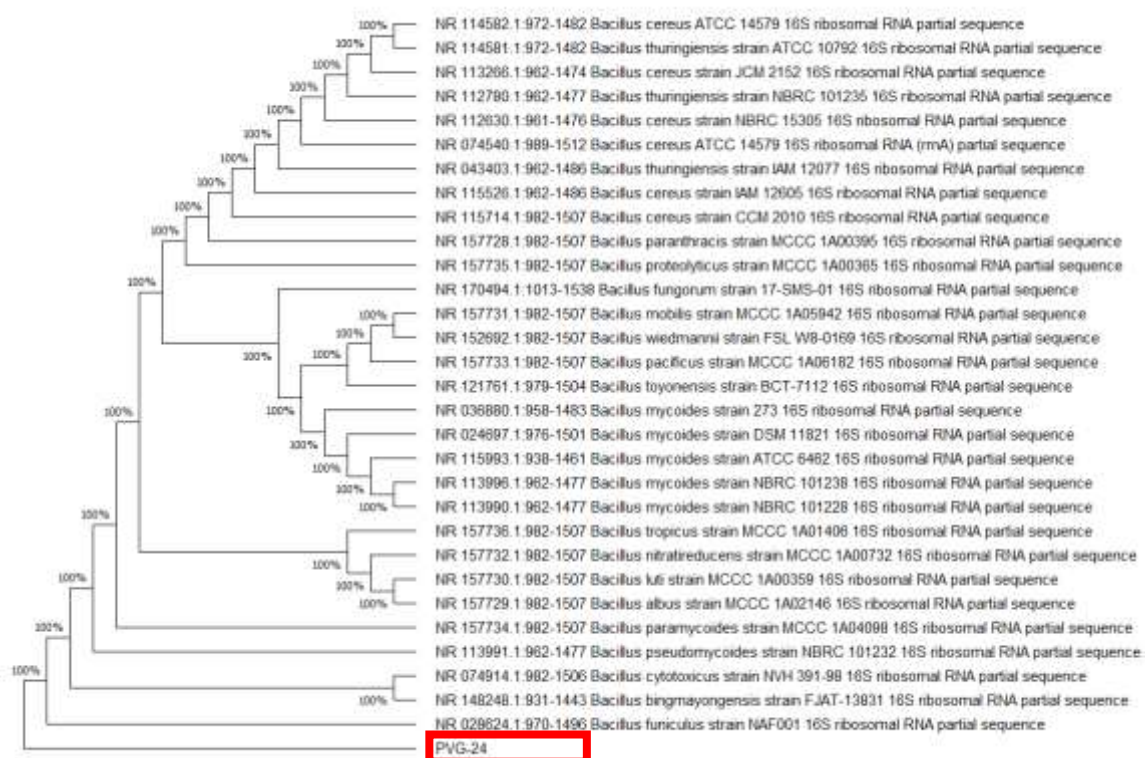


Figura 15: Árvore filogenética de seqüências do gene 16S rRNA (aproximadamente 1000 bp) mostrando a relação entre a cepa PVG-24 e as cepas tipo de diferentes espécies de *Ensifer*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. As análises de bootstrap foram realizadas com 1000 repetições. O número de acesso do GenBank de cada espécie está entre parênteses.

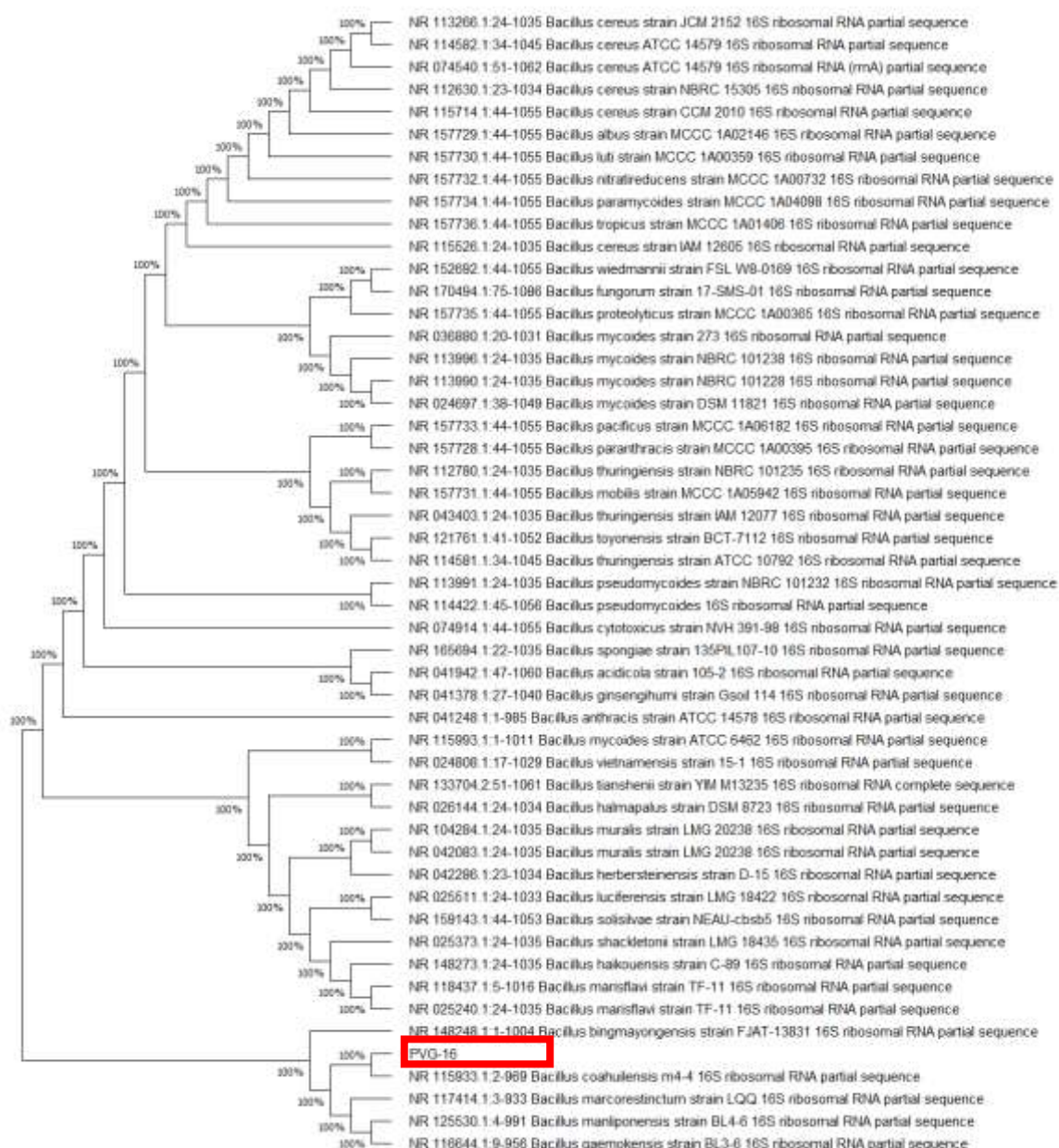


Figura 16: Árvore filogenética de seqüências do gene 16S rRNA (aproximadamente 1000 bp) mostrando a relação entre a cepa PVG-16 e as cepas tipo de diferentes espécies de *Ensifer*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. As análises de bootstrap foram realizadas com 1000 repetições. O número de acesso do GenBank de cada espécie está entre parênteses.

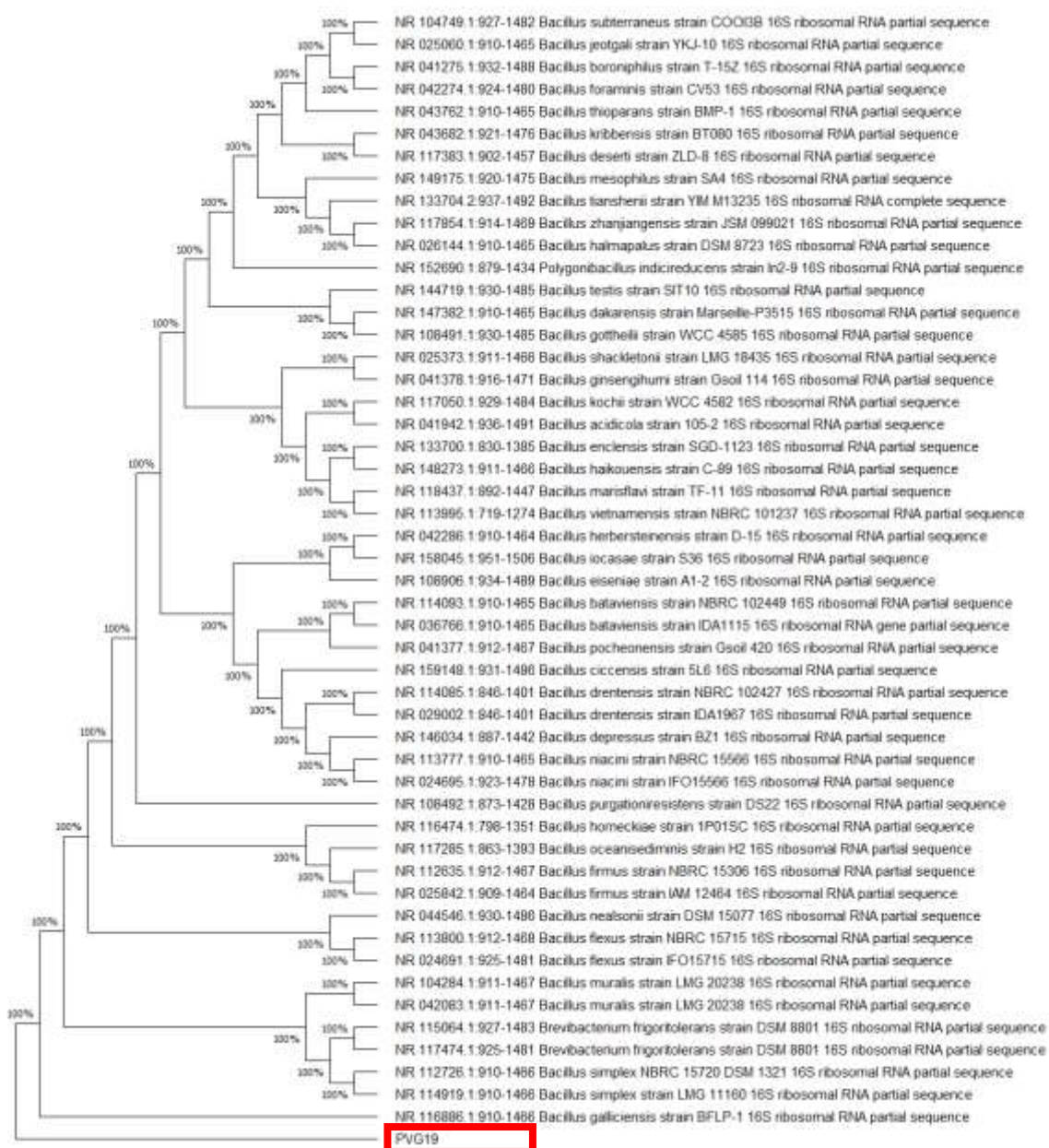


Figura 17: Árvore filogenética de seqüências do gene 16S rRNA (aproximadamente 1000 bp) mostrando a relação entre a cepa PVG-19 e as cepas tipo de diferentes espécies de *Ensifer*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. As análises de bootstrap foram realizadas com 1000 repetições. O número de acesso do GenBank de cada espécie está entre parênteses.

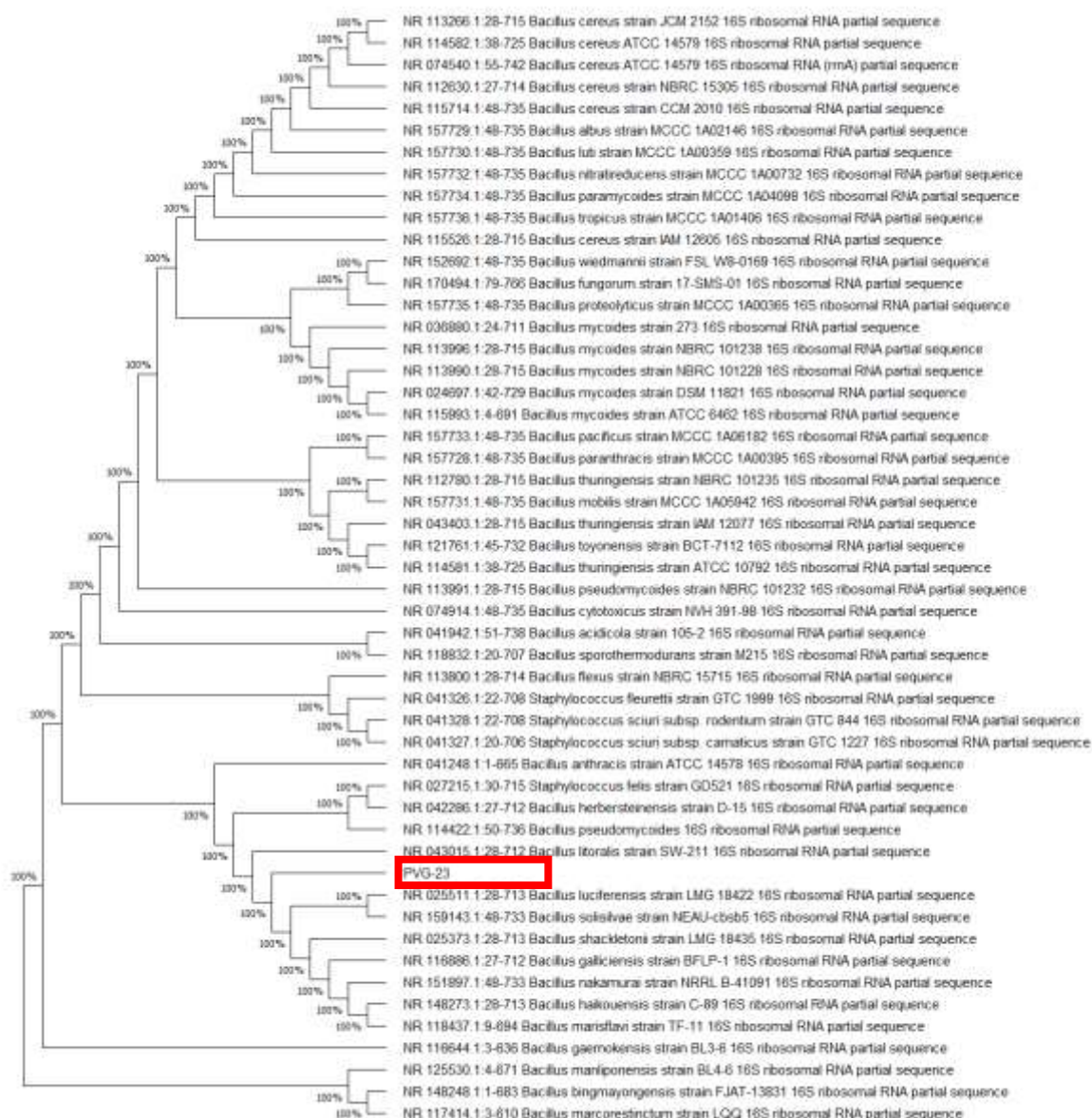


Figura 18: Árvore filogenética de sequências do gene 16S rRNA (aproximadamente 1000 bp) mostrando a relação entre a cepa PVG-23 e as cepas tipo de diferentes espécies de *Ensifer*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. As análises de bootstrap foram realizadas com 1000 repetições. O número de acesso do GenBank de cada espécie está entre parênteses.

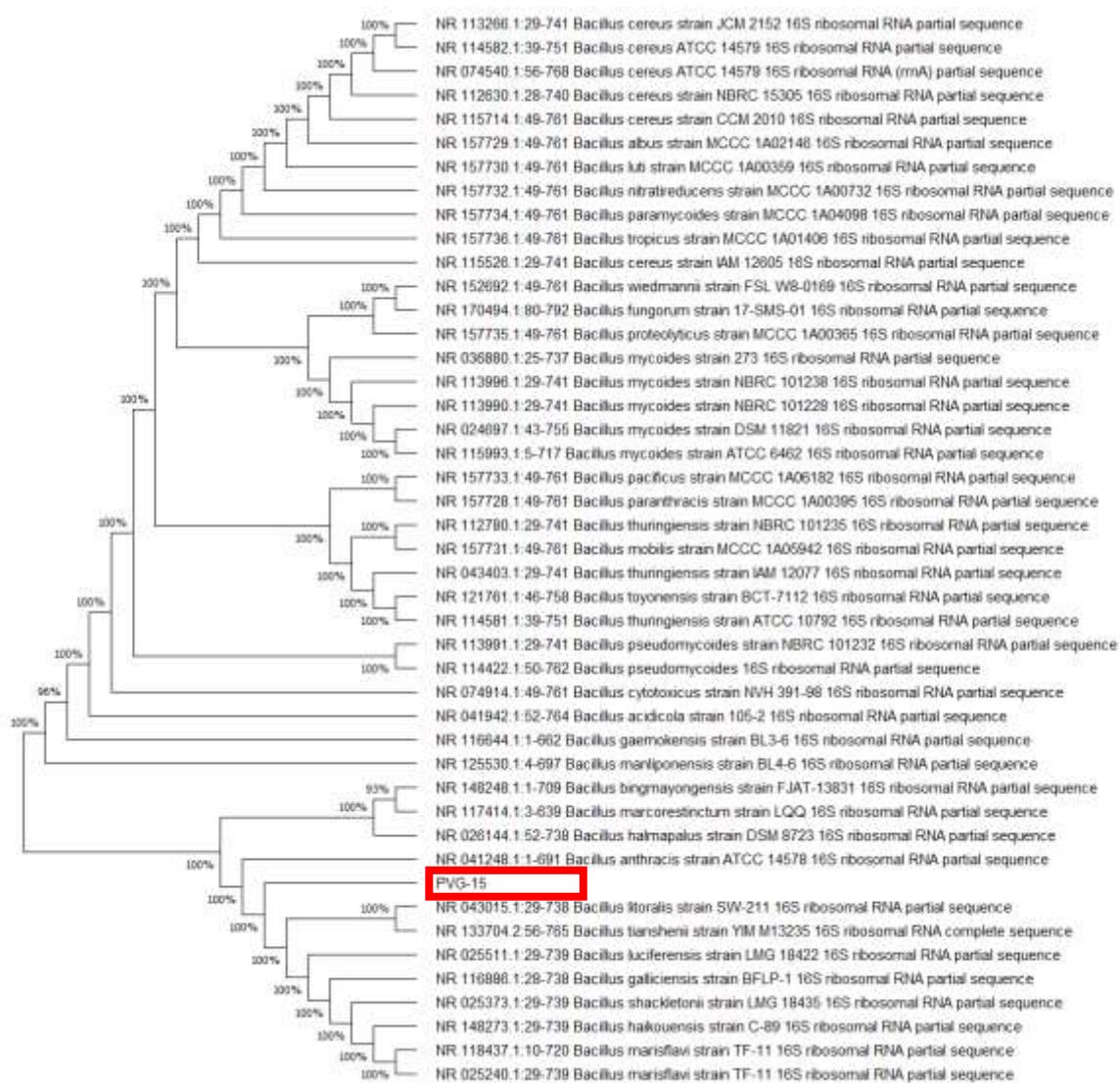


Figura 19: Árvore filogenética de seqüências do gene 16S rRNA (aproximadamente 1000 bp) mostrando a relação entre a cepa PVG-15 e as cepas tipo de diferentes espécies de *Ensifer*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. As análises de bootstrap foram realizadas com 1000 repetições. O número de acesso do GenBank de cada espécie está entre parênteses.

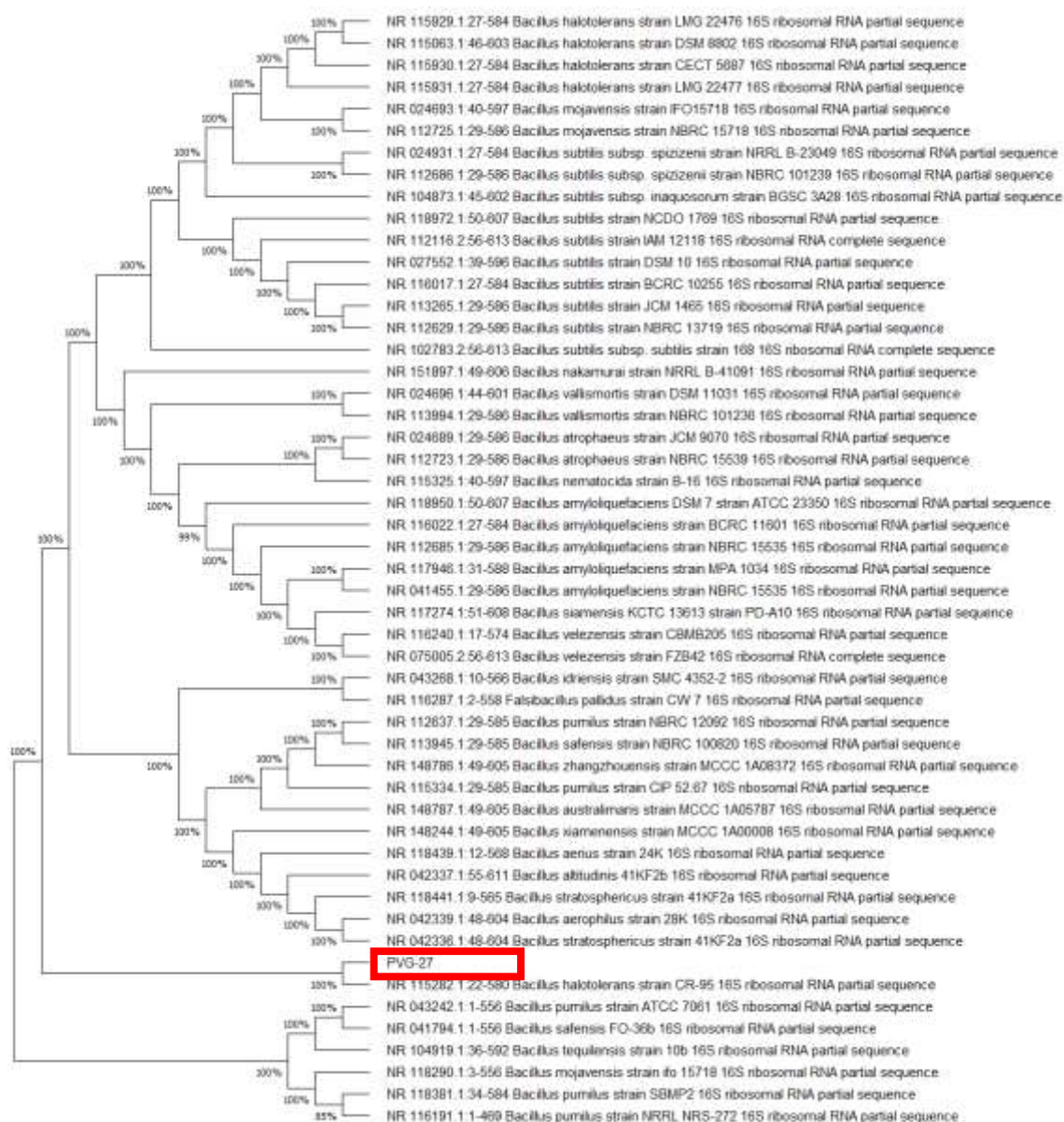


Figura 20: Árvore filogenética de seqüências do gene 16S rRNA (aproximadamente 1000 bp) mostrando a relação entre a cepa PVG-27 e as cepas tipo de diferentes espécies de *Ensifer*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. As análises de bootstrap foram realizadas com 1000 repetições. O número de acesso do GenBank de cada espécie está entre parênteses.

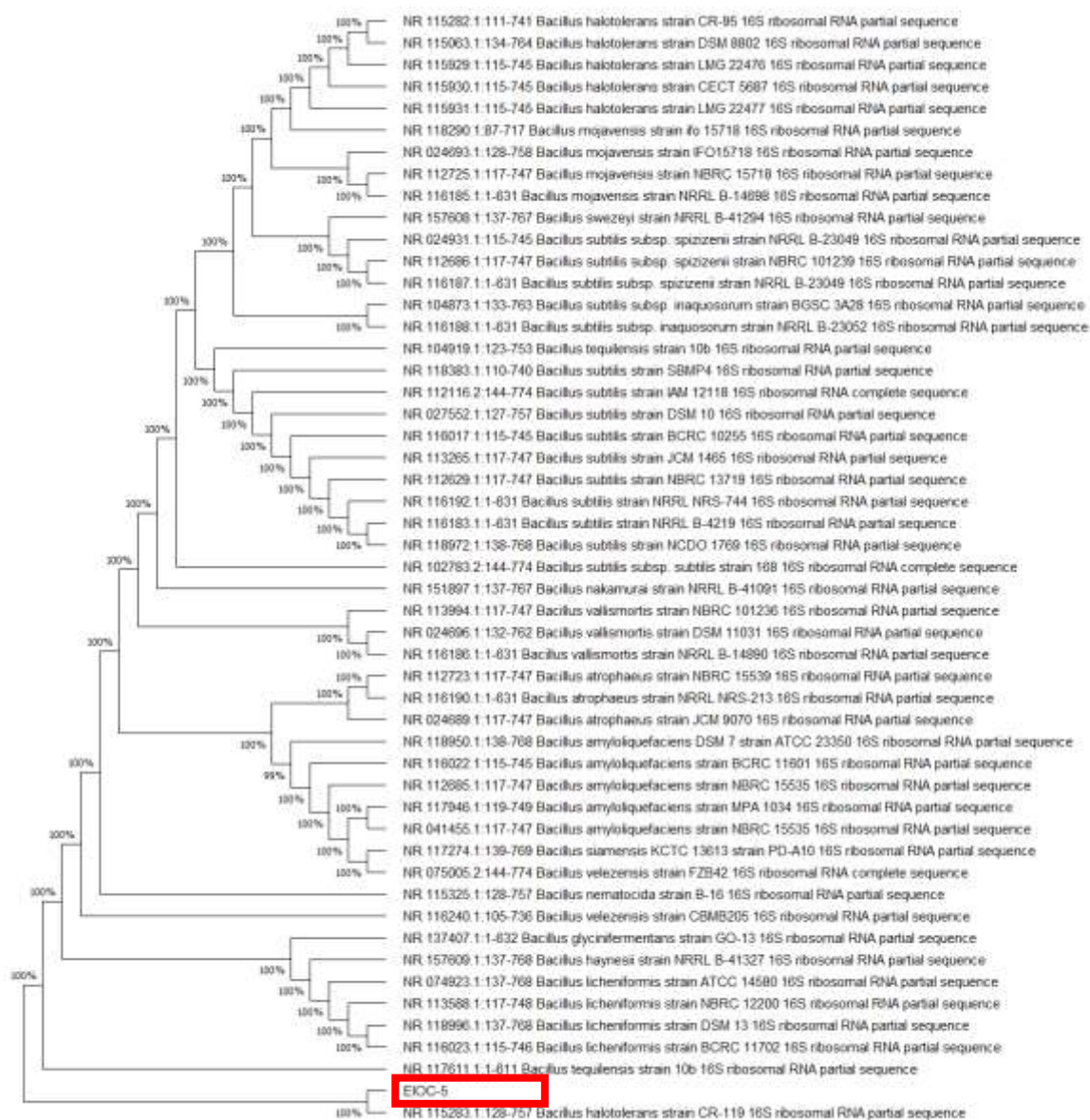


Figura 21: Árvore filogenética de seqüências do gene 16S rRNA (aproximadamente 1000 bp) mostrando a relação entre a cepa EIOC-5 e as cepas tipo de diferentes espécies de *Ensifer*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. As análises de bootstrap foram realizadas com 1000 repetições. O número de acesso do GenBank de cada espécie está entre parênteses.

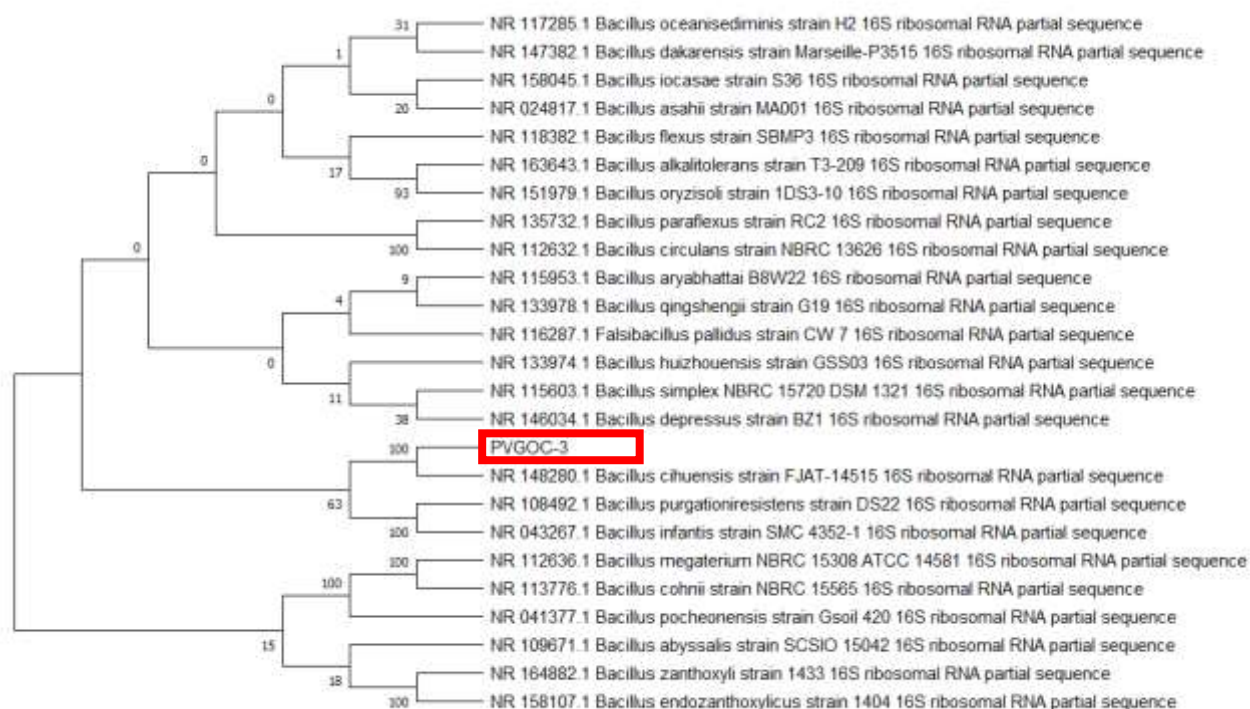


Figura 22 Figura 23: Árvore filogenética de seqüências do gene 16S rRNA (aproximadamente 1000 bp) mostrando a relação entre a cepa PVGOC-3 e as cepas tipo de diferentes espécies de *Ensifer*. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. As análises de bootstrap foram realizadas com 1000 repetições. O número de acesso do GenBank de cada espécie está entre parênteses.