

SÉRIES EM BIOTECNOLOGIA

volume 3



BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS

Nei Pereira Jr.;
Edelvio de B. Gomes &
Adriana Ururahy Soriano

1ª edição
Rio de Janeiro, 2009



SÉRIES EM BIOTECNOLOGIA

volume 3

Biodegradação de Hidrocarbonetos

P 436 t

Pereira Jr., Nei (editor-autor)

Biodegradação de Hidrocarbonetos / Nei Pereira Jr., Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ; FAPERJ; CNPq; PETROBRAS 2009.

75 p.: il. – (Séries em Biotecnologia, v.3)

ISBN: 978-85-903967-5-8

Inclui bibliografia.

1. Biodegradação. 2. Hidrocarbonetos. 3. Biotratamento.

I. Pereira Jr., Nei. II. Gomes, Edelvio de Barros. III. Soriano, Adriana Ururahy.

III. Título. IV. Série.

CDD 660

ISBN 978-85-903967-5-8



BREVE NOTA BIOGRÁFICA DOS AUTORES

Nei Pereira Jr. é Professor Titular da Escola de Química da UFRJ; Engenheiro Químico (EQ/UFRJ, 1977); Mestre em Tecnologia de Processos Bioquímicos (EQ/UFRJ, 1982) e Doutor em Biotecnologia (*The Victoria University of Manchester*, UK, 1991). Ingressou como docente na Escola de Química da UFRJ em 1978, na qual atua no ensino de graduação e de pós-graduação, pesquisa e extensão na área de Engenharia Bioquímica. Coordena trabalhos de pesquisa acadêmica e tecnológica nos Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos e Bioprodutos do Departamento de Engenharia Bioquímica, em temáticas variadas, como a produção de biocombustíveis, enzimas, antibióticos, edulcorantes, ácidos orgânicos, biossurfactantes, incluindo também estudos voltados ao biotratamento de efluentes e resíduos recalcitrantes industriais. Possui diversas publicações em periódicos científicos de relevância internacional e nacional, bem como patentes. Já orientou 70 teses (44 de mestrado e 26 de doutorado) e, atualmente, orienta 8 estudantes de doutorado e 7 de mestrado no Programa de Pós-graduação da EQ/UFRJ. É o coordenador nacional da Rede Temática em Bioprodutos da PETROBRAS. Foi recentemente agraciado com os Prêmios: PETROBRAS Inventor 2005, 2006 e 2007; Tese Ouro (2006), concedido pela Escola de Química por ter atingido a orientação de 50 teses em seu Programa de Pós-graduação e Prêmio ABIQUIM Pesquisador de destaque 2006.

Edelvio de Barros Gomes é Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (2001); Mestre em Biotecnologia de Produtos Bioativos pela Universidade Federal de Pernambuco (2004); Doutor em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (2008), tendo realizado a sua tese na temática "Biotratamento de Resíduo Oleoso da Indústria do Petróleo por Batelada Sequencial e Avaliação da Ecotoxicidade". Atua nas áreas de Biotecnologia Ambiental (ênfase em Biotratamento de Resíduos do Setor Petrolífero e da Indústria de Papel-Celulose) e Ecotoxicologia.

Adriana Ururahy Soriano é graduada em Engenharia Química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (1993), Doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (1998). Coordenadora do Grupo de Resíduos e Áreas Impactadas da Gerência de Biotecnologia e Tratamentos Ambientais do Centro de Pesquisas Leopoldo A. Miguez de Melo (CENPES) da Petrobrás. Atua nas áreas de Biotratamento de Resíduos e Tecnologias de Remediação de Solos Contaminados por Petróleo, Derivados e Biocombustíveis.

APRESENTAÇÃO

Este terceiro volume de “**Séries em Biotecnologia**” tem por objetivo apresentar aos estudantes de graduação e às pessoas interessadas nos temas diversos da Biotecnologia Ambiental, os principais aspectos relacionados à biodegradação de compostos hidrocarbônicos.

A problemática da contaminação dos ambientes por hidrocarbonetos de petróleo é recorrente. Tentativas de redução ou minimização dos impactos causados pela presença destes compostos em solos, aquíferos, ambientes marinhos e no ar atmosférico, têm suscitado providências de caráter emergencial bem como medidas mitigadoras de médio e longo prazos. Neste contexto, os processos de natureza biológica (bioprocessos) surgem como tecnologia emergente e promissora, revelando-se como processos eco-compatíveis.

Entretanto, para a efetivação dos bioprocessos no tratamento de resíduos e contaminantes de natureza hidrocarbônica se fazem necessários: o entendimento dos mecanismos utilizados pelos microrganismos para a degradação dessas substâncias; o conhecimento dos principais aspectos físico-químicos influenciadores da ação microbiana e a investigação das características das substâncias que sejam preditoras de sua susceptibilidade à biodegradação.

Os Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos (LADEBIO) da Universidade Federal do Rio de Janeiro têm acumulado experiência ao longo dos últimos 14 anos na temática do biotratamento de resíduos hidrocarbônicos, focalizando seus estudos no tratamento *ex situ* de borras de refinarias e de resíduos de terminais de armazenamento e distribuição de combustíveis de petróleo. Concomitantemente, também têm sido desenvolvidas pesquisas no âmbito da produção de biossurfactantes e sua aplicação como coadjuvantes na biodegradação de óleos pesados.

Apresentamos neste volume de forma didática e sucinta, com base na nossa vivência e estudos, os principais aspectos químicos, físico-químicos, bioquímicos e ambientais relacionados à degradação biológica dos hidrocarbonetos de petróleo. Adicionalmente, discorreremos sobre a investigação dos riscos ambientais inerentes à presença dos resíduos oleosos da indústria do petróleo nos ambientes aquáticos, mediante a utilização de testes de ecotoxicidade.

Desta forma, nosso principal intento é despertar o interesse dos estudantes e do público em geral para o tema, mostrando as diretrizes para que possam realizar estudos mais aprofundados, se assim o desejarem. Boa leitura!

Os Autores

SUMÁRIO

1. Introdução	7
2. Origem e Composição Química do Petróleo	8
3. Características Físico-químicas Influentes na Contaminação Ambiental	9
4. Classificação dos Grupos de Hidrocarbonetos do Petróleo e Suas Interações com o Ambiente	10
4.1. Influência dos Hidrocarbonetos do petróleo nos Ambientes Aquáticos	13
4.2. Deslocamento dos Hidrocarbonetos do Petróleo no Solo	15
4.3. Hidrocarbonetos do Petróleo no Ar	15
5. Tecnologias de Remediação	17
5.1. Processos Bióticos de Remediação	17
5.2. Processos Abióticos de Remediação	20
6. Microbiologia Associada à Degradação de Hidrocarbonetos	23
6.1. Microrganismos Degradores de Hidrocarbonetos	23
6.2. Aspectos Bioquímicos da Biodegradação de Hidrocarbonetos	28
6.3. Fenômenos Interfaciais	48
7. Aspectos Físico-químicos e Ambientais da Biodegradação de Hidrocarbonetos	57
8. Estudos de Ecotoxicologia e Avaliação da Ecotoxicidade dos Hidrocarbonetos	59
8.1. Diferenças entre Ecotoxicologia e Toxicologia Ambiental	59
8.2. Algumas Definições em Ecotoxicologia	60
8.3. Organismos-teste	62
8.4. Ensaio de Ecotoxicidade Utilizando a Fração Solúvel em Água dos Hidrocarbonetos	64
8.5. Considerações Acerca dos Estudos de Ecotoxicologia	64
9. Considerações Finais	67
10. Referências Bibliográficas Recomendadas	68

BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS

***Nei Pereira Jr.; Edelvio de B. Gomes &
Adriana Ururahy Soriano***

1. Introdução

Nos últimos 30 anos as atenções da academia e dos gestores ligados ao setor petrolífero têm se voltado para a solução de problemas relacionados à presença dos hidrocarbonetos de petróleo no meio ambiente. Neste período, incidentes envolvendo liberação de grandes quantidades de petróleo ou derivados deram vazão a um sem-número de estudos de campo e em escala de bancada. No entanto, é sabido que as primeiras investigações de cunho científico de que se têm registro no âmbito da biodegradação de hidrocarbonetos remontam desde a década de 1940, com a clássica revisão de Zobel, datada de 1947 (ZOBEL *apud* URURAHY, 1998).

Em termos práticos, na ocorrência de um incidente como derramamento ou vazamento de óleo, as primeiras providências a serem tomadas são de natureza física (geralmente, remoção mecânica). Em seguida, podem ser utilizados produtos químicos (surfactantes químicos) para dispersão do óleo. Em tese, as técnicas biotecnológicas são utilizadas em um terceiro momento, para a biotransformação do material restante, podendo chegar à mineralização, fenômeno caracterizado pela conversão dos hidrocarbonetos em gás carbônico (CO₂) e água. Tais técnicas podem ser *in situ*, ocorrendo no local, a exemplo da atenuação natural, bioaumento e bioestimulação; e *ex situ*, onde o material é tratado fora do local. Nestes casos, podem ser utilizadas biopilhas e biorreatores.

O emprego das tecnologias de biorremediação e dos biotratamentos aos ambientes contaminados por petróleo e seus derivados fundamenta-se nas habilidades e potencialidades bioquímicas de uma grande quantidade de gêneros microbianos, que, atuando em conjunto podem transformar substâncias mais complexas e recalcitrantes em substâncias menos tóxicas e mais compatíveis do ponto de vista ambiental. Para tal, fatores como: características culturais dos microrganismos; aclimação; suplementação de nitrogênio e fósforo (relação C:N:P); tamanho de inóculo; disponibilidade de água; aeração; pH; temperatura; estrutura química dos compostos, entre outros, são fundamentais na efetividade do processo de biodegradação dos hidrocarbonetos. Assim, quando se tenciona a estimulação da degradação de hidrocarbonetos por microrganismos, devem-se levar em conta todos esses fatores, quer seja isoladamente, quer seja suas interfaces.

Antes, porém, de entendermos os mecanismos e os aspectos relacionados à biodegradação, é importante percebermos quais as características composicionais dos hidrocarbonetos que estão presentes no petróleo, como podem ser classificados estes compostos, que características físicas e químicas podem interferir no seu deslocamento nos diferentes ambientes e como estes compostos podem interagir com os diferentes ambientes.

2. Origem e Composição Química do Petróleo

O petróleo é constituído por uma mistura complexa de compostos orgânicos como olefinas, *n*-alcanos, parafinas ramificadas, parafinas cíclicas, compostos aromáticos, compostos oxigenados e compostos sulfurados. Contudo, os hidrocarbonetos são majoritários. A fração líquida total do petróleo é denominada de óleo cru, a qual é constituída de quatro classes principais de hidrocarbonetos: saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos (FLOODGATE, 1984; GLAZER & NIKAIDO, 1995). O Instituto Americano do Petróleo (API) classifica quimicamente os hidrocarbonetos do petróleo em dois grandes grupos: o grupo dos compostos saturados e o grupo dos compostos insaturados. Nesta classificação, os compostos aromáticos e os compostos olefinicos estão incluídos como compostos insaturados. Os compostos saturados são referidos também como alcanos ou parafinas, e entre eles encontram-se os alcanos de cadeia aberta ou *n*-alcanos; os alcanos de cadeia ramificada ou isoalcanos; e os alcanos cíclicos ou cicloalcanos (figura 1) (API, 2001).

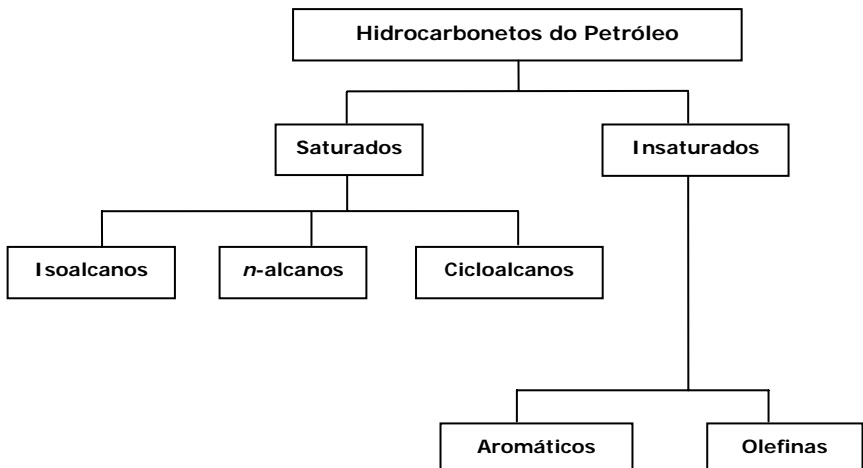


Figura 1: Classificação química dos hidrocarbonetos do petróleo.
(Fonte: API, 2001).

É importante observarmos que, não obstante sua origem biogênica, que remonta do período permiano a partir de organismos presentes em mares rasos (cerca de 280 a 245 milhões de anos), as características originais do petróleo foram modificadas ao longo dos séculos por processos geológicos e, mais recentemente nos últimos dois séculos, por ações antrópicas. Estas ações, embora ocorridas em um curto período de tempo (quando comparado ao período de formação do petróleo), têm sido responsáveis pela aceleração da formação de novos compostos que são lançados no ambiente e que, por sua vez, são mais recalcitrantes e tóxicos que os compostos de origem (ATLAS & BARTHA, 1972; ATLAS, 1995a; ATLAS, 1995b).

3. Características Físico-químicas Influentes na Contaminação Ambiental

A natureza química da fonte hidrocarbônica poluente e as peculiaridades do ambiente em que ela se encontra, são responsáveis pela extensão e velocidade da contaminação, pela dispersão do poluente, e consequentemente, pelos danos causados aos ecossistemas. Assim, ambientes diferentes, respondem de forma diferente a um mesmo contaminante, da mesma forma que um mesmo ambiente pode reagir de formas diferentes a diferentes contaminantes.

Sabe-se que o deslocamento de uma mistura hidrocarbônica em um determinado ambiente constitui em um parâmetro importante quando se deseja avaliar os riscos ambientais. É este deslocamento que irá resultar na exposição em menor ou maior grau dos seres humanos ou do ambiente às substâncias químicas danosas. Algumas características físico-químicas dos hidrocarbonetos têm efeito direto sobre seu deslocamento. As mais influentes são:

- a) Solubilidade em água: Esta propriedade é talvez o mais importante fator determinante do transporte de hidrocarbonetos nas águas residuárias e nas águas superficiais;
- b) Volatilidade: A volatilidade dos hidrocarbonetos é determinante da movimentação dessas substâncias através do ar atmosférico e de outros gases;
- c) Densidade: A densidade de um hidrocarboneto ou de uma mistura de hidrocarbonetos é empregada para calcular as quantidades em massa dessas substâncias presentes na mistura, podendo ser expressa em densidade API, a qual representa a medida da massa específica média da mistura ou massa específica de um dado hidrocarboneto isoladamente. A densidade do hidrocarboneto ou da mistura hidrocarbônica em API é inversamente proporcional à massa específica a 60°F (15°C) e é expressa por um dígito variando de 9 a 50, tendo como unidade o grau API (°API). No Brasil, a unidade utilizada para representar a densidade ou massa específica dos hidrocarbonetos de petróleo é o quilograma por metro cúbico (kg/m^3) ou o grama por centímetro cúbico (g/cm^3) (ANP, 2000). Como ponto de referência, a água possui densidade 10° API;
- d) Viscosidade: Este parâmetro representa a medida da resistência interna de um fluido ao seu escoamento. Materiais altamente viscosos (com viscosidade maior que a da água) não escoam facilmente sob força da gravidade, ao contrário da água, que tendo menor viscosidade escoam mais facilmente. A viscosidade de um fluido tende a decrescer com o aumento da temperatura;
- e) Ponto de orvalho: Representa a temperatura abaixo da qual um determinado óleo não escoam de modo bem definido. O ponto de orvalho para muitos óleos ocorre a partir da precipitação de parafinas, onde uma espessa massa interligante é formada. Óleos isentos de parafinas, por exemplo, possuem ponto de orvalho que dependem apenas da viscosidade, tendendo a se solidificarem, formando um material vítreo, na medida em que a temperatura diminui e a viscosidade aumenta. Ao contrário, muitos óleos crus com altas concentrações de parafinas, podem apresentar-se como sólidos já a temperaturas em torno dos 32°C (API, 2001; PLICE, 1948; WSPA, 1993).

A movimentação de uma mistura hidrocarbônica líquida no ambiente, logo dependerá da interação entre estes cinco principais parâmetros supracitados. A liberação de hidrocarbonetos líquidos na superfície de um solo insaturado pode

resultar na migração vertical atingindo prontamente o lençol freático. Este movimento vertical será influenciado pela densidade, viscosidade e pelo ponto de orvalho da mistura hidrocarbônica. Por exemplo, um determinado óleo com elevado de ponto de orvalho, pode apresentar-se muito viscoso para mover-se verticalmente no solo em um ambiente de clima frio, mesmo que sua baixa densidade sugira que esta movimentação seja viável. Se na mistura hidrocarbônica existem voláteis, os compostos hidrocarbônicos individuais podem ser liberados no espaço entre os poros do solo. Se essa liberação ocorre numa magnitude suficientemente grande, os hidrocarbonetos líquidos podem atingir rapidamente a lâmina capilar sobre o lençol freático e se espalhar horizontalmente. A extensão desse espalhamento é inicialmente controlada pela saturação e permeabilidade relativa na sub-superfície.

Entre outras interações, há de se considerar a solubilidade das substâncias que chegam ao lençol freático. Também fica claro que, essas relações não estão totalmente estabelecidas e que muitas propriedades apresentam comportamentos diferentes do esperado, sendo necessário estudo detalhado de cada caso (API, 2000a; API, 2000b; API, 2001).

4. Classificação dos Grupos de Hidrocarbonetos do Petróleo e Suas Interações com o Ambiente

Como consequência direta da composição química, diferentes grupos de hidrocarbonetos de petróleo apresentam diferenças quanto à disposição nos ambientes. Desta forma, frações distintas do petróleo, como óleos crus, produtos refinados, condensados e resíduos oleosos, apresentam maneiras singulares de se movimentarem nos ambientes, como descritas a seguir:

Óleos Crus: Em 1993, a *Western States Petroleum Association* dos Estados Unidos (WSPA) em estudo comparativo, relacionou as características físico-químicas de diferentes óleos crus, gasolinas e óleos dieséis, às suas características ambientais (WSPA, 1993). Constatando que alguns óleos crus, inclusive, são menos densos que a água (densidade em torno de $0,85\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ e $0,98\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$). Devido à grande variabilidade entre os óleos crus de diferentes origens, a densidade pode assumir valores com diferenças significativas. Valores típicos de densidade variam entre 10 e 45° API. Os óleos apresentam-se em geral como líquidos viscosos a temperaturas e pressões de superfície com ponto de orvalho tipicamente alto a temperaturas mais baixas. A temperatura e o ponto de orvalho são extremamente importantes devido à sua implicação direta na fluidez, que impedirá a percolação rápida através do solo em países de clima temperado em determinadas épocas do ano.

Produtos Refinados: Os produtos refinados derivados dos óleos crus possuem densidade geralmente menor que $1,0\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ e valores de densidade API entre 15 e 62°. As solubilidades desses produtos em água tendem a aumentar em proporcionalidade direta com o aumento da densidade API, obedecendo à seguinte graduação: gasolina > querosene > diesel nº2 > óleo combustível nº2 > óleo combustível nº6. A viscosidade dos produtos refinados aumenta em função da massa molecular e do ponto de ebulição, aumentando da gasolina (menor viscosidade e ponto de ebulição) para o óleo lubrificante (maior viscosidade e ponto de ebulição). O ponto de orvalho dos refinados depende da fração

parafínica do óleo cru, embora geralmente o ponto de orvalho aumente junto com o aumento da viscosidade.

A Tabela 1 mostra algumas frações de produtos refinados e suas respectivas temperaturas de ebulição e faixas de números de átomos de carbonos presentes.

Condensados: Embora não exista muita informação disponível sobre as propriedades físico-químicas dos condensados, estas misturas hidrocarbônicas em geral apresentam densidade API maior que 45°. Esta informação sugere que estes produtos não são viscosos à temperatura ambiente, e que são relativamente voláteis e solúveis em água. Ao mesmo tempo, dados composicionais, em um levantamento realizado com quatro condensados, revelaram a presença de alcanos de alta massa molecular (HAWTHORNE *et al.*, 1998). A presença desses alcanos tende a aumentar a densidade e a viscosidade, e diminuir a solubilidade e a volatilidade da mistura hidrocarbônica.

Tabela 1: Faixas de temperaturas de ebulição e átomos de carbono de acordo com a fração destilada (Fonte: API, 2001).

FRAÇÃO (PRODUTO DESTILADO)	FAIXA DE EBULIÇÃO (°C)	ÁTOMOS DE CARBONO
Gasolina	30-200	5 -10
Nafta	100-200	8-12
Querosene	150-250	11-13
Óleo diesel	160-400	13-17
Óleos pesados	315-540	19-25
Lubrificantes	425-540	20-45

Resíduos de Exploração e Produção (E&P), de Refino e de Produtos Refinados: Devido à natureza composicional diversificada dos resíduos oleosos, torna-se praticamente impossível uma avaliação de suas propriedades físico-químicas puras, como é observado para os óleos crus e para os produtos refinados.

Resíduos de E&P possuem características semelhantes as do óleo cru, contendo, porém, expressivas concentrações de sal originário da água de formação associada ao petróleo. Os resíduos de refino também apresentam características semelhantes as do óleo cru, contudo, apresentam em geral, menor salinidade e maior teor de metais. A maioria desses resíduos consiste de uma matriz sólida ou líquida contendo hidrocarbonetos originados de óleo cru ou de gás natural (Figura 2 e Tabela 2).

Nestes casos, o objeto de investigação passa a ser a tendência que esses hidrocarbonetos têm de serem liberados a partir dessa matriz complexa para o ambiente, através das águas residuárias ou dos gases do solo. As propriedades físicas de importância, relacionadas às substâncias químicas presentes nos resíduos são: a) sorção/dessorção; b) solubilidade; c) volatilidade; d) saturação do solo. Além destas propriedades, deve-se observar também, aquelas inerentes à matriz do resíduo, como alguns sólidos específicos, por exemplo, que podem estabelecer maior força de ligação com determinados compostos de que com outros (AMELLAL, 2001; WSPA, 1993).



Figura 2: Aspecto de amostra de borra oleosa de refino.
(Fonte: URURAHY, 1998).

Tabela 2: Tipos de borra e suas respectivas composições em percentual de água, óleo e sólidos (adaptado de URURAHY, 1998).

Tipo de Borra	Composição (% p/p)		
	Óleo	Água	Sólidos
Borra de fundo de tanque			
• Pequeno porte	30 – 60	40 – 70	-
• Grande porte	40 - 60	40 - 60	-
Borra de dessalgadora			
• Pequeno porte	5	85	10
• Grande porte	30 – 40	30 – 40	20 – 40
Borra de SAO			
• Pequeno porte	10 – 20	50 – 80	10 – 30
• Grande porte	10 – 40	60 – 90	5 – 20
Lodos de tratamento			
• Filtração	10	70	20
• Centrifugação	8 – 10	80 – 90	10 – 12
• Biológico	0,1 – 0,5	80 – 90	10 – 12
<i>Slops</i> e derramamentos			
Derramamentos líquidos	30 – 40	-	60 – 70
Derramamentos asfálticos	100	-	-
Graxas, resinas e parafinas	100	-	-
Borras com chumbo	-	1-10	90

Com relação aos Resíduos de Produtos Refinados, verifica-se que suas propriedades físicas estão diretamente relacionadas as do produto original (como o Diesel e a gasolina), e por isso são mais leves, mais solúveis em água e menos recalcitrantes. Assim, resíduos de óleo diesel ou gasolina, terão propriedades semelhantes as da gasolina ou do óleo diesel que os originou (Figura 3 e Tabela

3). Estes resíduos são denominados genericamente de “borras de claros”. Como consequência, o deslocamento dos hidrocarbonetos presentes nesses resíduos estará susceptível aos mesmos princípios que determinam o deslocamento dos produtos refinados ou mesmo dos óleos crus.



Figura 3: Amostra de resíduo de fundo de tanque de óleo diesel.
(Fonte: GOMES, 2008).

Tabela 3: Propriedades físico-químicas de amostra de resíduo de fundo de tanque de óleo diesel. Fonte: GOMES (2008).

Propriedade	Unidades	Valores observados	Valores típicos (óleo diesel)	Método
Densidade	Kg/m ³	854,20	820,0 – 880,0	ASTM D1298
Ponto de fulgor	°C	90,00	60 (mínimo)	ASTM D93
Viscosidade a 40°C	cSt	4,33	1,6 – 6,0	ASTM D445
Cor ASTM	Adimensional	4,00	3,0 (máximo)	ASTM D1500
Aspecto visual	Não possui	Material sólido em suspensão	Claro, límpido e isento de material sólido em suspensão	-

4.1. Influência dos Hidrocarbonetos do Petróleo nos Ambientes Aquáticos

Devido ao espalhamento lateral do óleo, à dificuldade de sua contenção na superfície da água e aos danos causados à biota marinha, maior atenção é dada aos derrames ocorridos em ambientes aquáticos. Nestes ambientes, o petróleo provoca a morte de peixes, aves marinhas e outras formas

de vida. O óleo derramado pode permanecer por mais ou menos tempo em uma determinada área, dependendo da corrente marinha, da sua composição e de uma série de fatores, tais como: Fatores físicos - sendo um dos mais importantes a turbulência da água; Fatores químicos – especial atenção é dada ao fenômeno da fotodecomposição, e fatores biológicos, sobretudo a biodegradação.

Esse conjunto de fatores e condições determinará o percurso do petróleo e seus derivados no mar, bem como seu grau de ecotoxicidade e seu tempo de persistência no ambiente marinho (ATLAS, 1984).

As águas dos mares e oceanos são constituídas de uma mistura complexa de sais cuja concentração varia de acordo com a estação do ano e a região geográfica. Esta variação associada à degradação química e física do petróleo contribui para a formação de centenas de compostos complexos, com graus específicos de toxicidade e recalcitrância.

Descargas de óleo no mar, apesar de serem quase sempre em maior quantidade do que em terra, são mais susceptíveis à biodegradação. Devido ao menor tempo de residência das águas dos mares, o óleo nessas áreas tem mais facilidade de ser biodegradado do que em áreas próximas a estuários, onde o tempo de residência das águas é bem maior, causando maiores danos à biota local. O aporte de minerais e de oxigênio, que são fatores de elevada importância na biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo, estão diretamente relacionados ao tempo de residência da água (ATLAS, 1984).

Grande parte das descargas de petróleo e de seus derivados se dá por lavagens de tanques de navios em alto mar. Após a descarga do produto, os tanques são cheios com a água do mar (água de lastro), para que seja mantida a estabilidade do navio. Antes de fazer uma nova carga com produto, essa água é descartada no mar, e com ela são descartadas algumas dezenas de milhares de litros de petroderivados. Outra forma, bem mais drástica, se dá pelo vazamento de produto por naufrágios decorrentes de rupturas na estrutura do navio. Em regiões próximas a terminais portuários há grande susceptibilidade a esses derrames.

O petróleo é encontrado no ambiente marinho em quatro estados: filme, solução, emulsão e em grumos. Muitos tipos de óleos são espalhados rapidamente e reduzidos a uma camada muito fina. A espessura dessa camada em uma área de águas paradas depende da taxa de evaporação, da tensão superficial do óleo e da água do mar neste local. O acúmulo de hidrocarbonetos nesta camada afeta diretamente a vida marinha que se encontra imediatamente abaixo dela. Os grumos são encontrados em tamanhos variados, sendo depositados no fundo do mar devido ao seu peso, e essas partículas se acumulam e se complexam, formando uma camada de material altamente recalcitrante sobre o sedimento (MARTY & SALIOT, 1976).

Nos rios e lagos, o petróleo e seus derivados podem persistir por mais tempo, dependendo da natureza do óleo e da sua composição, além do tempo de residência da água, que nesses casos é bem maior que nos mares e oceanos. Por exemplo, os óleos leves, que são ricos em material tóxico constituído por aromáticos voláteis, permanecem menos tempo que os óleos pesados e os combustíveis marítimos. Os óleos crus, por sua vez, são menos susceptível à biodegradação do que os seus derivados (ATLAS & BARTHA, 1972).

4.2. Deslocamento dos Hidrocarbonetos do Petróleo no Solo

Sabe-se que no solo, o óleo além de sofrer processo de fotodecomposição, percola e pode atingir o lençol freático. Em ambientes terrestres, a distribuição dos derivados líquidos de petróleo é pontual, com espalhamento lateral pouco extenso e de fácil controle. A área atingida no solo é bem pequena quando comparada à área de mesma quantidade de poluente derramado no mar ou mesmo em lagoas.

Os principais problemas da contaminação em solo estão relacionados ao espalhamento vertical (percolação), devido ao constante risco de atingir o lençol freático (CORSEUIL *et al* 1997). A natureza físico-química do solo e o tamanho de suas partículas influenciam diretamente na percolação e na degradação do poluente. Frações de argila e silte-argila, por exemplo, são mais susceptíveis à formação de complexos com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos que as frações de areia. Tal fenômeno se deve não somente à granulometria, mas também à presença de filossilicatos que são capazes de formar complexos com substâncias cíclicas de baixa massa molecular e alquil-substituídas (AMELLAL *et al.*, 2001; NOCENTINI *et al.*, 2000; IJAH, 1998; IJAH & ANTAI, 2003). Desta forma, filossilicatos tendem a retardar a migração de poluentes orgânicos aumentando, por sua vez, a sua retenção na matriz porosa.

Também o teor de matéria orgânica afeta o comportamento de hidrocarbonetos no solo, uma vez que apresentam elevada afinidade com estes contaminantes.

O grau de saturação do meio é outro fator importante para o processo de migração e biodegradação de petróleo e derivados no solo, já que parte do contaminante se particiona no mesmo e a biodegradação ocorre preferencialmente em presença de água embora o oxigênio (fundamental à degradação aeróbia) apresenta baixa solubilidade em água.

4.3. Hidrocarbonetos do Petróleo no Ar

No ar, os hidrocarbonetos de petróleo podem ser encontrados como pequenas partículas dispersas, ou como componentes de material particulado complexo. Sua concentração é variável, porém, em áreas próximas a fontes fixas de contaminação tende a ser maior.

Em especial, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) têm sido bastante estudados quanto à sua dispersão e ocorrência (Figura 4a e b). Um dos mais importantes fatores de risco que deve ser levado em conta quando se pensa em contaminação do ar é a exposição aos carcinogênicos carreados pelo ar, como os HPA, que geralmente ocorrem próximo aos pontos de emissão como automóveis, indústria de refino, transporte de petróleo e derivados, sobretudo de querosene de aviação (KANIKKANAN, 2004).

O nível de exposição aos HPA de fontes biogênicas é baixo quando comparado com outras fontes, como tabaco, por exemplo. A meia vida dos HPA espalhados pelo ar é da ordem de dias, mas pode ser maior quando são associados ao material particulado do ar. O material particulado poluente do ar é formado por uma mistura complexa e heterogênea de compostos (metais, sais, material

carbônico, compostos orgânicos voláteis, HPA) e componentes biológicos (bactérias, endotoxinas, fungos) que podem ser acoplados ao centro hidrocarbônico, que serve como um núcleo de condensação (BILLET *et al.*, 2008).

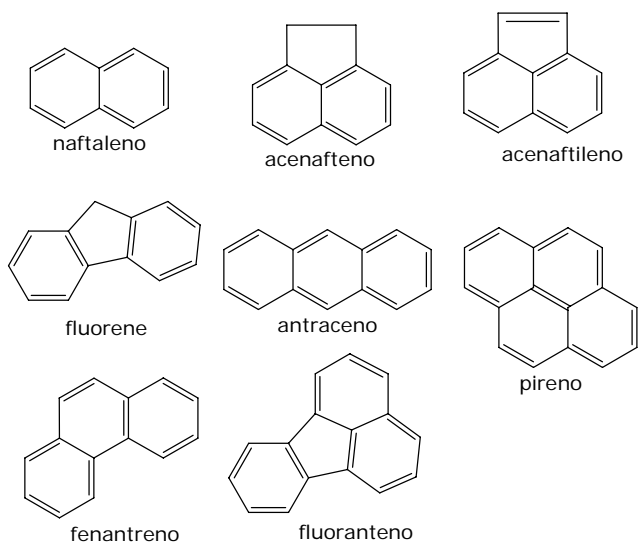


Figura 4a: Alguns hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

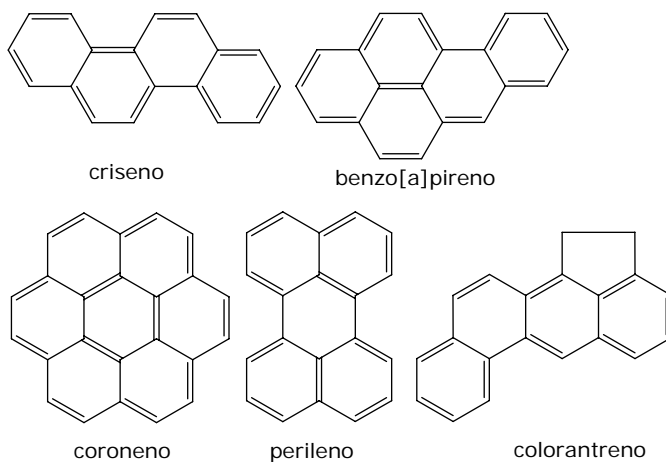


Figura 4b: Alguns hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

Os HPA associados a materiais particulados são mais danosos aos seres humanos do que as frações isoladas desses hidrocarbonetos. Isto se deve ao fato de que os HPA de alta massa molecular são predominantes na fase particulada.

Outra fonte importante de contaminação do ar atmosférico nas metrópoles é o gás liquefeito de petróleo (GLP), que consiste em uma mistura em proporções variáveis de propano e butano.

5. Tecnologias de Remediação

Uma grande variedade de tecnologias utilizadas na remediação de ambientes impactados por petróleo e seus derivados é conhecida. Diante de um incidente envolvendo a liberação de grandes quantidades de petróleo ou produtos derivados, as medidas tomadas inicialmente são de natureza física, através de remoção mecânica do óleo. Em seguida, podem ser utilizadas substâncias químicas capazes de dispersar o contaminante, os surfactantes químicos. Em última instância, lança-se mão das medidas de remediação, dentre as quais se destacam as técnicas biotecnológicas.

5.1. Processos Bióticos de Remediação

A **biorremediação** é um conjunto de **técnicas biotecnológicas** em que se utilizam microrganismos ou produtos e processos microbianos para a redução de impactos causados ao meio ambiente por contaminantes (ATLAS, 1995a).

Quanto ao local onde ocorre, o processo de biorremediação pode ser classificado como:

Biorremediação *in situ*: é o tipo de biorremediação que ocorre no local onde houve o derrame ou contato massivo com o contaminante, e os microrganismos presentes no sítio conduzem o processo de biodegradação. Pode ocorrer com a adição de nutrientes para aumentar a taxa de biodegradação, sendo esse procedimento chamado de **bioestimulação**, ou com a adição de microrganismos exógenos ao ambiente, procedimento conhecido como **bioaumentamento** (Figura 5).



Figura 5: Bioaumentamento.

Como exemplos de tecnologias de biorremediação *in situ*, destacamos a tecnologia de atenuação natural monitorada.

Biorremediação *ex situ*: modalidade de biorremediação que envolve a remoção do material contaminado para outra área na qual este é tratado.

Dentre as tecnologias de biorremediação *ex situ*, citam-se:

- ***Landfarming***

Alguns autores se referem a essa tecnologia de tratamento biológico de resíduos como uma tecnologia de biorremediação mista, a qual é aplicada sobre o solo, reduzindo a concentração de constituintes de petróleo presentes neste, através de processo de biorremediação. Esta tecnologia envolve o espalhamento da camada superficial do solo contaminado escavado (não mais que 1,5 metros) promovendo a atividade microbiana aeróbia, podendo ser auxiliada pela bioestimulação, com adição de minerais e água (figura 6).

Espécies bacterianas comprovadamente degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo podem ser adicionadas ao processo para aumentar a taxa de degradação. A magnificação da atividade microbiana aumenta a degradação dos compostos adsorvidos. O solo deve ser bem misturado para aumentar o contato entre os compostos orgânicos e os microrganismos e fornecer o oxigênio necessário à degradação biológica aeróbica. Dependendo da taxa de degradação, os solos com histórico de contaminação com compostos hidrocarbônicos, e que estão sendo biotratados também podem ser reaplicados ao sítio contaminado a intervalos regulares ajudando a amplificar a atividade biológica.

A tecnologia *landfarming* é praticada há cerca de 100 anos, e na indústria do petróleo, há cerca de 30 anos. Os hidrocarbonetos mais voláteis e frações de óleos de menor massa molecular tendem a evaporar durante o processo de revolvimento do solo, enquanto que a redução dos compostos mais pesados se dá essencialmente por atividade microbiana aeróbia (HARMSEM, 1991; RAAG, 2000).

- **Compostagem ou Biopilha**

Também chamadas células de compostagem e pilha de biorremediação. Este tratamento consiste no envolvimento do solo contaminado com petróleo em montes ou pilhas, e a estimulação da atividade aeróbia microbiana com a adição de minerais e água. Temperatura e pH podem também ser controlados para magnificar a biodegradação. As áreas tratadas são providas de cobertura impermeável (geralmente) para reduzir as perdas por lixiviação para as áreas de solo não contaminado. Há duas configurações possíveis: estática e dinâmica. No primeiro caso a aeração é promovida por sistema de distribuição de ar ou vácuo, e no segundo caso por revolvimento periódico. Estas pilhas que têm um sistema de ventilação por onde o ar passa, podem situar-se a seis metros e devem ser cobertas para prevenir encharcamentos e evaporação. Se existirem compostos voláteis, o ar deve ser tratado. Podem receber materiais estruturantes como serragem, palha etc. As biopilhas são similares ao *landfarming*, sendo que, neste último, o solo é aerado através de pás e escavadeiras (Figura 6).



Figura 6: Revolvimento do solo durante aplicação de tecnologia *landfarming*.
(Fonte: Desler Ingeniería y Servicios Ambientales. Acesso 11-01-2009.
www.desleronline.com).

▪ **Biorreatores**

O emprego de biorreatores ocorre principalmente quando se necessita tratar resíduos oleosos líquidos provenientes de tanques de armazenamento de combustíveis, ou quando se deseja tratar lodos e borras de produção e refino de petróleo (Figuras 7 e 8). Para estas finalidades, diferentes modos de operação de biorreatores têm sido estudados, tanto em escala de bancada como em escala piloto. Sistemas operados por batelada simples, bateladas seqüenciais, bateladas alimentadas, processos contínuos e biorreatores em série, são exemplos dos mais amplamente estudados. Os modos operacionais influenciam sobremaneira na eficiência do processo de degradação do poluente. Considerações importantes devem ser feitas quando da escolha do modo de operação. A natureza do resíduo poluente também deve ser levada em consideração. Por exemplo, um sistema utilizado para tratar um poluente que seja tóxico a baixas concentrações pode atingir baixas taxas de degradação se o processo for conduzido por batelada simples. Já o modo de operação por batelada seqüencial, preconiza alimentação do biorreator com quantidade fixa de material, e logo após um dado período de tempo (período de reação) ocorre a descarga do material tratado e a adição de uma nova carga na mesma quantidade inicial, propiciando uma exposição gradativa da microbiota ao resíduo e possibilitando a ocorrência de aclimação. Esse modo parece ser mais interessante, sobretudo quando se deseja avaliar a biodegradação do resíduo a cada período de reação e quando se quer investigar a influência da microbiota aclimatada nas mudanças nessas taxas ao longo da batelada.

Entre os modos de operação por batelada seqüencial e o modo contínuo, as vantagens e desvantagens associadas relacionam-se principalmente à capacidade de remoção da carga orgânica e aos requerimentos operacionais. Embora o modo de operação por batelada seqüencial em muitos casos seja mais efetivo do ponto de vista das altas taxas de biodegradação atingidas, demanda maior complexidade operacional, ao contrário do modo contínuo, que prevê a alimentação constante do biorreator.



Figura 7: Modelo de biorreator utilizado para tratamento de borras de refinaria (Fonte: URURAHY, 1998).



Figura 8: Aspecto de residuo oleoso após 120 horas tratado em biorreator operado por batelada seqüencial (Fonte: GOMES, 2008).

5.2. Processos Abióticos de Remediação

Os processos abióticos de descontaminação de áreas poluídas são definidos como aqueles que envolvem métodos químicos ou físicos de remoção de poluentes. Os métodos químicos mais comuns são: a neutralização, a precipitação, oxidação, aplicação de surfactantes e a extração por solventes (KOVALICK, 1991; PIÑA *et al.*, 2002; YERUSHALMI *et al.*, 2003). Há de se ressaltar ainda a remoção por separadores de água e óleo, que é um método mecânico simples baseado na diferença de densidade entre a água e a fase oleosa apolar.

Alguns processos abióticos ocorrem naturalmente, não dependendo de aplicação de métodos físicos ou químicos, como é o caso da evaporação. A fotoxidação ou fotodecomposição é outra forma natural de atenuação do poluente, que é observável em locais contaminados, sendo esse processo um dos mais importantes na transformação do petróleo nos ambientes aquáticos (PATEL *et al.*, 1979; FERNANDES, 1994).

Em muitos casos é comum utilizar tecnologias de biorremediação concomitantemente com outras tecnologias de remediação. É preciso conhecer a natureza química bem como as características físico-químicas do contaminante e as características do ambiente contaminado. Assim, cada ambiente contaminado requer uma combinação de procedimentos que permitam a otimização do processo de remediação.

Destacamos aqui algumas dessas tecnologias em que se pode lançar mão dos princípios físicos, químicos e biológicos concomitantemente:

- **Lavagem de solo**

Baseia-se na utilização de líquidos (em geral água, ocasionalmente combinada com solventes) e processos mecânicos para a lavagem de solos. Os solventes são selecionados de acordo com sua habilidade de solubilizar contaminantes específicos e de acordo com seus efeitos à saúde e ao meio ambiente. Este processo separa a fração mais fina do solo (silte-argila) da porção de maior granulometria. Uma vez que os contaminantes orgânicos tendem a ligar-se às frações mais finas, a separação destas frações reduz significativamente a contaminação do solo. A menor fração de solo que contém a maioria de partículas silte e argila pode ser tratada separadamente por diferentes métodos como incineração ou biorremediação, ou ainda descartada de acordo com a legislação vigente. Cabe ressaltar que, a afirmação de que a menor fração do solo é constituída em sua maioria de partículas silte-argila, não será verdadeira para solos tropicais, aplicando-se a solos de países de clima temperado. Esta tecnologia pode ser combinada com outras. Os grupos de contaminantes-alvos, inclui compostos orgânicos semi-voláteis, petróleo e resíduos de combustíveis, metais pesados, bifenilas policloradas, HPA e pesticidas.

- **Extração de vapores do solo**

Também conhecida como extração a vácuo, tem sido bastante aceita e reconhecida por apresentar boa relação custo-benefício na remediação de solos insaturados contaminados com compostos orgânicos semi-voláteis e voláteis. Envolve a instalação de poços horizontais e/ou verticais na área da contaminação do solo. São utilizados sopradores de ar para auxiliar no processo. O vácuo é aplicado através dos poços no local próximo à fonte de contaminação a fim de evaporar o constituinte volátil o qual é retirado por um poço de extração adjacente. Os vapores extraídos são tratados (em geral por adsorção com carbono) antes de serem liberados na atmosfera (USEPA, 1995a). O aumento do fluxo de ar através da superfície promovido por esse sistema também estimula a biodegradação dos contaminantes, em especial aqueles que são menos voláteis (USEPA, 1996; 1998). Outra utilização deste processo é no tratamento de águas residuárias, através de bombeamento de água e espargimento simultâneo de ar (Figura 9).

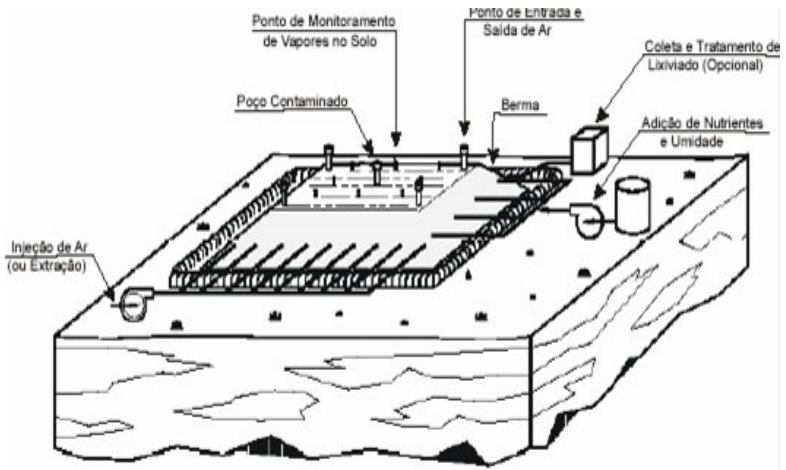


Figura 9: Ilustração de um sistema de extração de vapores do solo.

▪ Dessorção Térmica

É uma tecnologia de tratamento de resíduos inovadora na qual o solo contaminado é escavado, peneirado, e aquecido para liberar o petróleo de seus interstícios (USEPA, 1995b). As temperaturas de aquecimento do solo variam numa faixa de 100 a 600°C, para que aqueles contaminantes que possuem ponto de ebulição nesta faixa vaporizem e se separem. Os contaminantes vaporizados são então coletados e tratados por outros métodos. Há uma ligeira confusão conceitual que se faz em relação à dessorção térmica e a incineração: dessorção térmica não objetiva destruir os compostos orgânicos, mas sim transformá-los em uma forma mais tratável, enquanto que a incineração objetiva destruir o contaminante. O real processo de dessorção térmica envolve o aquecimento do solo em uma câmara onde os contaminantes orgânicos e alguns metais são vaporizados. A partir daí, um gás ou um sistema de vácuo transporta o material vaporizado para tratamento fora do sítio contaminado. Se ocorrer a oxidação no lugar da vaporização, o processo se transforma em incineração. Com base na temperatura da câmara de vaporização, o processo pode ser classificado como: dessorção térmica de baixa temperatura ou dessorção térmica de alta temperatura.

Apesar da grande quantidade de tecnologias conhecidas atualmente, se faz necessário o conhecimento do maior número de variáveis possíveis em relação ao sítio contaminado e ao poluente, para que uma técnica seja escolhida com segurança e precisão. Somente desta forma é possível chegar ao maior nível de eficiência (REDDY *et al.*, 1999; KHAN *et al.*, 2004).

Portanto, mesmo dispondo-se de muitas tecnologias, a escolha da mais adequada dependerá pelo menos de cinco fatores fundamentais:

- i. Características do sítio contaminado;
- ii. Requerimentos regulatórios legais;
- iii. Custos;
- iv. Tempo total do processo;
- v. Riscos ambientais envolvidos e as metas de remediação de acordo com tais riscos.

6. Microbiologia Associada à Degradação de Hidrocarbonetos

Para melhor compreensão e utilização dos processos microbianos na degradação de poluentes orgânicos, se faz necessário conhecer não só os microrganismos envolvidos, mas também os mecanismos por eles utilizados bem como os fenômenos físicos, químicos e bioquímicos relacionados. Como em qualquer processo em que se empregam microrganismos é fundamental a otimização dos parâmetros relacionados aos nutrientes, fornecimento de oxigênio, pH entre outros. Particularmente, a biodegradação de compostos orgânicos envolve a biodisponibilidade e a toxicidade destes substratos. Analisaremos aqui, os principais tópicos relacionados à microbiologia associada à degradação de hidrocarbonetos:

- A) Microrganismos degradadores de hidrocarbonetos;
- B) Aspectos bioquímicos da biodegradação;
- C) Fenômenos interfaciais.

6.1. Microrganismos Degradadores de Hidrocarbonetos

Uma grande diversidade microbiana está associada à degradação de hidrocarbonetos do petróleo, principalmente espécies bacterianas e fúngicas, sobre as quais existe uma extensa lista de trabalhos e revisões bibliográficas. As contribuições relativas de bactérias e fungos para mineralização de hidrocarbonetos têm sido relatadas desde a década de 1940, com a clássica revisão de Zobel, em 1947 (Zobel *apud* URURAHY, 1998) que investigou mais de 100 espécies as quais são representativas de 30 gêneros, que tem habilidade de degradar hidrocarbonetos. Muitos outros trabalhos e revisões sobre microrganismos degradadores de hidrocarbonetos do petróleo foram produzidos ao longo das décadas subseqüentes (ZAJIC & SUPPLISSON, 1972; SONG *et al.*, 1986; FEDORAK *et al.*, 1984; OKPOKWASILI & AMANCHUKWU, 1988; ROSENBERG, 1991). Song *et al.* (1986), por exemplo, observaram que em solo arenoso sem histórico de contaminação, 82% de *n*-hexadecano foi mineralizado por bactérias, enquanto que fungos mineralizaram 13% desse hidrocarboneto. De forma similar, em outros trabalhos, bactérias foram evidenciadas como mais eficientes degradadoras do que fungos leveduriformes. Complementarmente, poucos trabalhos reportam que espécies de leveduras sejam melhores degradadoras que espécies bacterianas (WALKER *et al.*, 1978; ROSENBERG, 1991; IJAH, 1998).

Atlas (1981), em uma revisão, faz um relato de inúmeras experiências que apresentam gêneros e espécies microbianas isoladas de ambientes contaminados por óleo cru. Grande parte destes trabalhos reflete preocupações com derramamentos de óleo. Como marco, o acidente ocorrido com o petroleiro

Torrey Canyon em 1967 impulsionou a produção de inúmeras pesquisas e isolamentos de microrganismos. Acidentes ocorridos com outros petroleiros como: Exxon Valdez, Amoco Cadiz, IXTOC I e Maersk Navigator, também serviram de base para comparações e estudos de caso (ATLAS, 1981b; ATLAS, 1995a; ATLAS, 1995b; GUPTA *et al*, 1996).

Desta forma, uma grande variedade de gêneros de microrganismos degradadores isolados de ambientes aquáticos ou mesmo de solos e sedimentos em regiões costeiras, passa a ser conhecida. Bartha & Atlas (1977) isolaram de ambientes aquáticos, 22 gêneros de bactérias, 14 de fungos e 1 de alga. Entre outros, foram isolados os gêneros: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Candida*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces*. Com base nos trabalhos de Englert & Kenzie (1993) e Atlas (1984), podemos listar os principais gêneros de bactérias e fungos encontrados associados à degradação de hidrocarbonetos de petróleo (Tabela 4).

Nas últimas três décadas, porém, a utilização de técnicas moleculares, a exemplo daquelas baseadas no emprego do DNA ribossomal (rDNA), deu uma nova dimensão aos estudos de ecologia microbiana e, conseqüentemente, ao conhecimento da microbiota associada à degradação de hidrocarbonetos. A partir daí, os microbiologistas verificaram que as populações microbianas naturais são, de fato, muito maiores e muito mais diversas do que se imaginava antes, quando as informações baseavam-se em técnicas dependentes do cultivo. Esta nova dimensão é extensiva aos microrganismos envolvidos na degradação de poluentes orgânicos, uma vez que o ambiente natural dá suporte a uma grande variedade de microrganismos com potencialidades degradadoras, que ainda não foram identificados, e que por sua vez, desempenham um papel fundamental na biorremediação (WATANABE, 2001; WATANABE, 2002). De tal modo, as informações moleculares passaram a ser utilizadas no desenvolvimento de estratégias que visam à magnificação da biorremediação (especialmente na bioaumentação), à avaliação das conseqüências da presença do poluente sobre as populações naturais (avaliação dos riscos à microbiota nativa) e à avaliação da dinâmica das populações presentes no processo (LI *et al*, 2008).

Estudos clássicos de biodegradação de poluentes orgânicos principiam pelo isolamento de um ou mais microrganismos capazes de degradar um determinado poluente-alvo. Como nem todas as espécies microbianas são de fato cultiváveis, estes isolados representam uma fração muito pequena das populações totais. Estima-se que apenas 1 a 10% dos microrganismos podem ser isolados por técnicas clássicas (ROSADO, 1997; WATANABE, 2001). Por outro lado, ferramentas moleculares como a Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturantes (DGGE) (Figuras 9 e 10) e a Eletroforese em Gel com Gradiente de Temperatura (TGGE), têm sido cada vez mais aplicadas na determinação direta da diversidade genética de populações microbianas presentes em ambientes contaminados. Estas metodologias se baseiam na eletroforese dos produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) de genes da subunidade 16S do rDNA, em géis de poliacrilamida, contendo um gradiente crescente de agentes desnaturantes (no caso do DGGE), ou de temperaturas (no caso do TGGE). Os genes das subunidades 16S estão presentes em todos os organismos e a partir deles pode-se diferenciar uma espécie bacteriana de outra. Os fragmentos que possuem o mesmo tamanho e seqüências nucleotídicas diferentes podem ser separados em bandas no eletroferograma, baseando-se na diferença de

movibilidade das moléculas após desnaturação química ou térmica de seus domínios (Figuras 10 e 11). Desta forma, o número de bandas fornecidas por DGGE ou por TGGE pode ser utilizado como um estimador da abundância das espécies no ambiente submetido à presença do poluente orgânico, bem como da persistência de algumas espécies durante o processo (Li *et al.*, 2008).

Tabela 4: Gêneros de microrganismos degradadores (Fontes: ATLAS, 1984; ENGLERT & KENZIE, 1993)

Bactérias	Fungos
<i>Achromobacter</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Anthrobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Chromobacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Cytiphaga</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Sarcina</i> , <i>Serratia</i> , <i>Spirillum</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Xanthomonas</i> .	<i>Acremonium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Aureobasidium</i> , <i>Beauveria</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Candida</i> , <i>Chrysosporium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Cochliobolus</i> , <i>Cylindrocarpon</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Geotrichum</i> , <i>Glicocladium</i> , <i>Graphium</i> , <i>Humicola</i> , <i>Monilia</i> , <i>Mortierella</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Phoma</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Scolecobasidium</i> , <i>Sporobolomyces</i> , <i>Sprotrichum</i> , <i>Spicaria</i> , <i>Tolypocladium</i> , <i>Torulopsis</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Verticillium</i> .

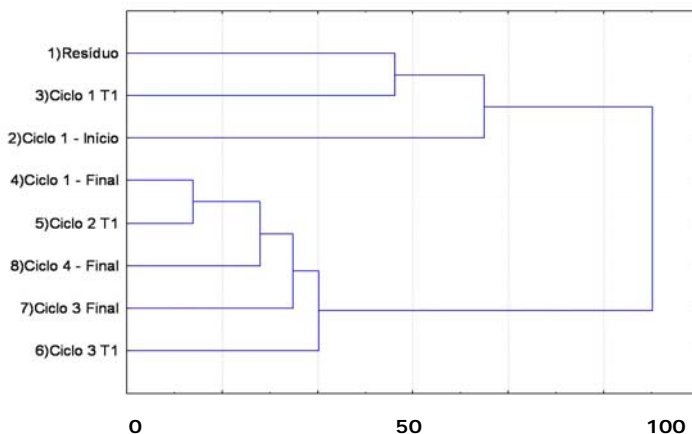


Figura 10: Dendrograma indicando relação parental entre membros da comunidade microbiana mista presentes em residuo oleoso tratado, prevalentes ao longo do processo conduzido por batelada seqüencial. (Fonte: GOMES, 2008).

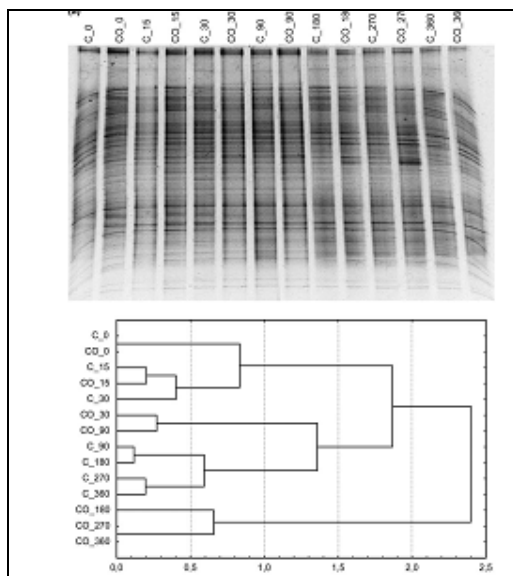


Figura 11: Dendrograma e eletroferograma indicando a estrutura da comunidade microbiana antes de contaminação com óleo (C_0; C_15; C_30; C_90;180; C_270; C360) e depois da contaminação com óleo(CO_0; CO_15; CO_30; CO_90;180; CO_270; CO_360) em tempos de amostragens de 0, 15, 30, 90, 180, 270 e 360 dias. (Fonte: EVANS *et al.* 2004).

Watanabe (2001), em uma revisão, apresenta alguns grupos de microrganismos identificados por técnicas moleculares, os quais estão associados à degradação de hidrocarbonetos, ao tratamento de águas residuárias e à oxidação de metano. São levantados trabalhos nos quais filotipos afiliados à subclasse α (alfa) do grupo *Proteobacteria* (α -*Proteobacteria*) aparecem com freqüência nos "fingerprints" obtidos por DGGE a partir de amostras de sedimentos contaminados com óleo, o que sugere associação desses filotipos à degradação dos hidrocarbonetos presentes no óleo. Em outros trabalhos, como o de Gross *et al.* (2000), que estuda sedimento contaminado por óleo na costa da Noruega, é relatada a presença majoritária de filotipos provenientes da subunidade 16S rDNA afiliados à subclasse γ (gama), γ -*Proteobacteria*, sobretudo representando os gêneros *Pseudomonas* e *Cycloclasticus*, encontrados em sedimento arenoso contaminado com óleo aditivado com fertilizante. Li *et al.* (2006), em um estudo da dinâmica microbiana durante a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo, mostra a ligação da subclasse α -*Proteobacteria* e particularmente da família *Sphingomonadaceae* à degradação de óleo diesel.

Estudos do impacto da bioestimulação e da contaminação por petróleo na diversidade bacteriana de solo têm mostrado que as mudanças na comunidade em solo contaminado são maiores quando comparadas às mudanças na comunidade presente em solo bioestimulado não contaminado. É importante observar que a utilização dessas técnicas moleculares é bastante útil na indicação do momento em que ocorrem mudanças significativas na comunidade a partir da introdução da mistura hidrocarbônica no meio estudado (EVANS *et al.*, 2004).

A utilização dos estudos de ecologia molecular microbiana por técnicas como as de DGGE associada aos biotratamentos de resíduos em biorreatores favorece a investigação das mudanças na comunidade microbiana responsáveis pela degradação do poluente orgânico, podendo-se com isto, por exemplo, inferir em que momento do processo poderemos fazer ajustes nas condições químicas e físico-químicas do meio reacional para favorecer a determinados grupos microbianos.

Outra característica importante nos estudos de ecologia microbiana associada aos biotratamentos é a possibilidade de avaliação do impacto causado na diversidade microbiana pela adição de resíduos oleosos ou outros materiais recalcitrantes. Li Hui *et al.* (2007), estudando a dinâmica das mudanças na estrutura da comunidade microbiana durante a degradação de compostos de petróleo, verificaram que o número de bandas de DGGE decresceu de 40 para 25, quando as concentrações de óleo testadas chegaram a valores de 5.000mg/kg de solo, confirmando com isso que as altas concentrações dos compostos recalcitrantes promovem uma pressão seletiva na comunidade.

Igualmente, verifica-se também a importância assumida pelas investigações dos perfis da comunidade microbiana por DGGE no delineamento de culturas mistas com elevado potencial degradador de hidrocarbonetos de petróleo. Díaz-Ramírez *et al.* (2007), em trabalho recente, avaliaram a atividade degradadora de dez isolados microbianos frente a diferentes hidrocarbonetos de petróleo, analisando os perfis em géis de cada tratamento e observado as seqüências prevalentes em cada situação. Desta forma, os autores propuseram um consórcio microbiano com base nas habilidades degradadoras particulares de cada microrganismo.

Condições preconizadas por processos *ex situ* em biorreator permitem a adaptação de alguns grupos de microrganismos da comunidade presentes nas misturas hidrocarbônicas colocando-os em evidência pelas suas capacidades de tolerar e, principalmente, degradar os hidrocarbonetos do resíduo. Nesse caso o alvo são os reflexos que as mudanças na comunidade podem vir a ter na efetividade do processo.

Convém salientar que investigações da dinâmica das mudanças na comunidade não refletem apenas os microrganismos ativos presentes no resíduo, mas sim todo o rDNA encontrado no meio reacional. Desta forma, citamos, como exemplo, processos conduzidos por bateladas seqüenciais onde destacamos que as bandas reveladas nos géis de DGGE refletem a dominância de grupos, não significando que alguns grupos anteriores, que são evidenciados no início dos processos, possam ter desaparecido nas etapas subseqüentes, mas sim que tenham diminuído significativamente sua população. Do contrário, muitos grupos que são verificados em todas as etapas dos processos, podem não necessariamente estar ligados à biodegradação, mas sim ao acúmulo de biomassa, uma vez que, no caso das bateladas seqüenciais, trabalha-se com a biomassa acumulada ao longo do processo, sendo esta mantida na fase aquosa durante todos os ciclos.

Por certo, é conveniente afirmar a partir das constatações de Eichner *et al.* (1999), que o número e intensidade das bandas de DGGE não são iguais ao número e abundância de genótipos dentro da comunidade microbiana devidos às características da filogenia baseada no 16S rDNA e à tendência à amplificação do PCR a partir de misturas parentais complexas.

É possível que as bandas representem as espécies mais abundantes, mais ativas, ou aquelas cujo DNA seja mais extraível, ou ainda todas essas alternativas ao mesmo tempo. Ainda não existe consenso com relação a qual dessas possibilidades é a mais propensa a acontecer. Entretanto, tem-se observado que a técnica de DGGE é bastante sensível e rápida para a investigação das mudanças na estrutura da comunidade. Para os estudos de biodegradabilidade ou biotratamento em biorreatores, sobretudo quando da condução do processo por bateladas sequenciais, onde é possível a avaliação do material tratado a cada ciclo, esta técnica revela-se como uma ferramenta que pode ser amplamente utilizada na investigação dos agentes biodegradadores, bem como na otimização das condições de tratamento com base nas capacidades de cada espécie isoladamente.

6.2. Aspectos Bioquímicos da Biodegradação de Hidrocarbonetos

O fenômeno da biodegradação de hidrocarbonetos tem como fundamentação a capacidade que muitos microrganismos possuem de utilizar tais substâncias como única fonte de carbono e energia (ATLAS, 1981, ATLAS, 1984, ALEXANDER, 1994). Embora muitos mecanismos de biodegradação sejam conhecidos, alguns aspectos precisam ser ainda elucidados. Portanto, a bioquímica da degradação de hidrocarbonetos está longe de ser um tema trivial. Contudo, algumas generalizações podem ser feitas:

- i) Hidrocarbonetos alifáticos são em geral mais facilmente biodegradados que os aromáticos;
- ii) Hidrocarbonetos alifáticos de cadeia normal são mais fáceis de serem biodegradados que os de cadeia ramificada. A introdução de uma ramificação dentro de uma molécula do hidrocarboneto diminuirá sua biodegradabilidade;
- iii) Hidrocarbonetos saturados são mais susceptíveis à degradação que os insaturados. A presença de dupla ou tripla ligação carbono-carbono dificulta a biodegradação;
- iv) Hidrocarbonetos alifáticos com tamanho de cadeia a partir de 8 átomos de carbono são mais facilmente degradados tanto menor seja o tamanho de sua cadeia. O comprimento de cadeia ótimo para a biodegradação parece ser de dez a vinte átomos de carbono.

▪ Biodegradação de Hidrocarbonetos Alifáticos

Um grande número de bactérias, fungos e leveduras mostram-se capazes de metabolizar os hidrocarbonetos alifáticos e por este motivo, muitos vêm sendo estudados acerca de suas fisiologias, sobretudo no que diz respeito aos mecanismos de assimilação de contaminantes e aos processos metabólicos responsáveis pela iniciação do catabolismo dos mesmos. Os hidrocarbonetos alifáticos representam, para os microrganismos, uma fonte de substrato em potencial. Esta classe engloba substâncias gasosas (como metano e etano), líquidas e sólidas, sendo que o estado líquido prevalece em compostos de até 20 átomos de carbono, patamar além do qual predominam os sólidos. O estado físico é em muito responsável pela susceptibilidade ao ataque microbiano.

Existem, no entanto, algumas exceções citadas na literatura, as quais normalmente resultam das ações cometabólicas. A degradação de asfaltenos (que isoladamente revelam acentuada recalcitrância) por culturas bacterianas mistas, em ambientes contendo *n*-alcanos de 12 a 18 átomos de carbono, ilustra este fenômeno. O cometabolismo evidencia, portanto, a influência da heterogeneidade composicional sobre as taxas de degradação, tanto do óleo como um todo, como das suas frações isoladamente (LEAHY & COLWELL, 1990). Em alguns casos, as taxas de assimilação e de mineralização dos poluentes são proporcionais às concentrações dos compostos presentes e seguem a cinética Monodiana. É o caso da degradação de alguns aromáticos leves, de solubilidade em água relativamente alta, tais como o tolueno. O modelo cinético não é válido, no entanto, para outros hidrocarbonetos insolúveis. O consumo de substâncias aromáticas de maior massa molecular tende a ser controlado pela solubilidade e não pela concentração.

Os hidrocarbonetos alifáticos englobam tanto cadeias lineares, como ramificadas. No entanto, todos os compostos são insolúveis e hidrofóbicos, características facilmente explicáveis, pelo fato de só existirem ligações do tipo carbono-carbono e carbono-hidrogênio. Coerentemente, a solubilidade é inversamente proporcional à massa molecular e exerce influência marcante nas taxas de metabolização da matéria orgânica. Algumas das propriedades físicas de parafinas e olefinas podem ser observadas na tabela 5.

A partir das observações feitas, pode-se afirmar que os agentes degradadores desta classe de compostos apresentam diferentes afinidades pelos substratos. Em geral compostos gasosos e líquidos são mais rapidamente atacados, muito embora hidrocarbonetos líquidos de baixa massa molecular confirmem certo efeito inibitório sobre os microorganismos, face ao caráter solvente dos mesmos. No outro extremo, parafinas de C20 a C40 normalmente obstruem a ação microbiana, exatamente pelo fato de serem sólidas e hidrofóbicas. Não é à toa que são reportadas na literatura como "graxas" (BANERJI *et al.*, 1995).

Geralmente, a degradação só pode ser iniciada sob condições de aerobiose, uma vez que as reações envolvendo as enzimas oxigenases parecem ser indispensáveis para a ativação metabólica das moléculas de alcano, que, aliás, são as substâncias mais estudadas desta classe.

Na literatura podem ser encontrados alguns estudos relativos à degradação de hidrocarbonetos alifáticos, sob condições de anaerobiose. No entanto, os estudos a respeito dos mecanismos envolvidos demonstram, ainda hoje, grande controvérsia. Portanto, face esta realidade e tendo em vista a maior representatividade da aerobiose, as rotas metabólicas em anaerobiose não serão aqui exploradas.

Os alcanos de cadeia normal são degradados primariamente por oxidação do grupo metil terminal, seguido de uma clivagem da molécula na região entre o segundo e o terceiro carbono da cadeia (β -clivagem). Outras vias como a oxidação subterminal pela metanooxigenase encontrada em *Pseudomonas methanica*, também têm sido documentadas. A reação inicial na degradação do grupo metil envolve a adição direta do oxigênio ao carbono terminal do hidrocarboneto. Esta reação é mediada por oxigenases. A adição do oxigênio ao carbono primário promove a formação de um álcool primário, que é oxidado a aldeído e finalmente transformado em ácido graxo. Um fragmento longo de dois

carbonos terminais é clivado produzindo o acetil CoA, que entra na via metabólica do ciclo de *Krebs*. Uma repetição sequencial destas reações resulta na completa oxidação da molécula de hidrocarboneto. Na Figura 12, observa-se a sequência de reações proposta como via de degradação de alcanos (BAKER & HERSON, 1994).

Tabela 5: Propriedades físicas de algumas parafinas e olefinas.
(Fonte: URURAHY, 1998)

Composto	Nº de átomos de C	MM (g/mol)	Ponto de Fusão (°C)	Ponto de Ebulição (°C)	Solubilidade (mg/L)
Etano	2	30,1	- 172,0	-88,6	63,70
n-hexano	6	86,2	-94,3	68,7	12,30
n-decano	10	128,3	-31,0	174,0	0,05
n-hexadecano	16	226,4	19,0	287,0	$5,2 \times 10^{-5}$
n-eicosano	20	282,6	36,7	343,0	$3,1 \times 10^{-7}$
n-hexacosano	26	366,7	56,4	412,2	$1,3 \times 10^{-10}$
2-metilpentano	6	86,2	-154,0	60,3	13,8
2,2,4-trimetilpentano	8	114,2	-107,2	127,0	2,4
4-metiloctano	9	128,3	---	142,0	0,12
1-hexeno	6	84,2	-139,8	63,5	50,0
trans-2-hepteno	7	98,2	-109,5	98,0	15,0
1-octeno	8	112,2	-121,3	121,0	2,7

A presença de ramificações na molécula de alcano dificulta a β -clivagem e torna a molécula refratária à biodegradação. O pristano (2,6,10,14-tetrametil pentadecano), por exemplo, é extremamente resistente à biodegradação devido às suas ramificações. Como mostrado na Figura 13 genericamente teremos as possíveis rotas de oxidação de alcanos de cadeia normal e ramificada, levando inicialmente, à produção de alcoóis primários e secundários.

Alcanos de cadeia ramificada tendem a apresentar degradabilidade inferior, quando comparados aos *n*-alcanos. Inclusive, no processo de degradação de misturas de hidrocarbonetos, a presença de alcanos lineares geralmente reprime a utilização, pelos microorganismos, dos compostos ramificados. Pode-se estabelecer com pequena margem de erro a relação entre as estruturas dos alcanos ramificados e suas respectivas degradabilidades: compostos densamente ramificados apontam para a recalcitrância, em particular os β -ramificados (anteiso-) e os ramificados quaternários, devido ao impedimento estérico oferecido às enzimas envolvidas na oxidação. Obviamente, esta afirmação é generalizante e não contempla, portanto, todos os casos. Por outro lado, várias ocorrências e exceções a essa regra vêm sendo evidenciadas, estando hoje a recalcitrância muito mais ligada à carência de estudos mais aprofundados. Um exemplo desta contradição é o pristano (hidrocarboneto isoprenoide, de 19 átomos de carbono, cuja nomenclatura é 2,6,10,14-tetrametilpentadecano). Este composto costuma ser empregado como padrão interno em análises de amostras

de hidrocarbonetos, devido ao seu elevado grau de persistência, quando dos processos de degradação de óleo cru e de derivados do petróleo. No entanto, sua mineralização por espécies de *Brevibacterium*, *Corynebacterium* e *Rhodococcus* foi bastante estudada, além de claramente elucidada. Foi demonstrado que sua metabolização pode ocorrer por β ou ω -oxidação, tal como sugerido na Figura 14.

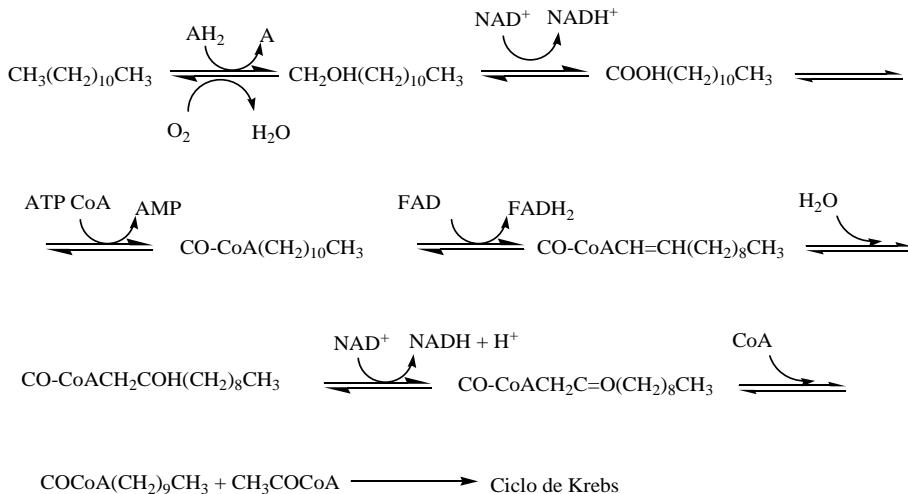


Figura 12: Reações de degradação de *n*-alcanos (BAKER & HERSON, 1994).

Da mesma forma, verificou-se também a degradação de outros alcanos ramificados complexos, tais como o fitano, norpristano e farnesano, como únicas fontes de carbono e de energia, por *Rhodococcus* sp. Em todos estes casos, as unidades isopropil das moléculas são oxidadas a álcoois terminais e, a *posteriori*, aos ácidos correspondentes. Outro mecanismo de decomposição destas substâncias parece ser adotado, no entanto, por *Mycobacterium* sp.: o ataque inicial não ocorre apenas nos grupos isopropil, muito embora os produtos da oxidação sejam sempre álcoois terminais.

Alguns pesquisadores reportaram uma rota diversa envolvendo a utilização de 2,2,4,4,6,8,8-heptametilnonano como fonte única de carbono e energia, por cultura microbiana mista, de origem marinha. O desaparecimento do composto foi relativamente rápido, tendo sido detectados como únicos metabólitos intermediários alguns ácidos graxos de cadeia linear. A via em questão compreende a oxidação do referido composto na posição β , resultando na cetona correspondente, posteriormente oxidada a um éster. O éster, após hidrólise, entra na seqüência comum de β -oxidação. Assim sendo, ressalta-se que muitos outros alcanos altamente ramificados podem ser consumidos, sempre que o carbono β estiver disponível para o ataque.

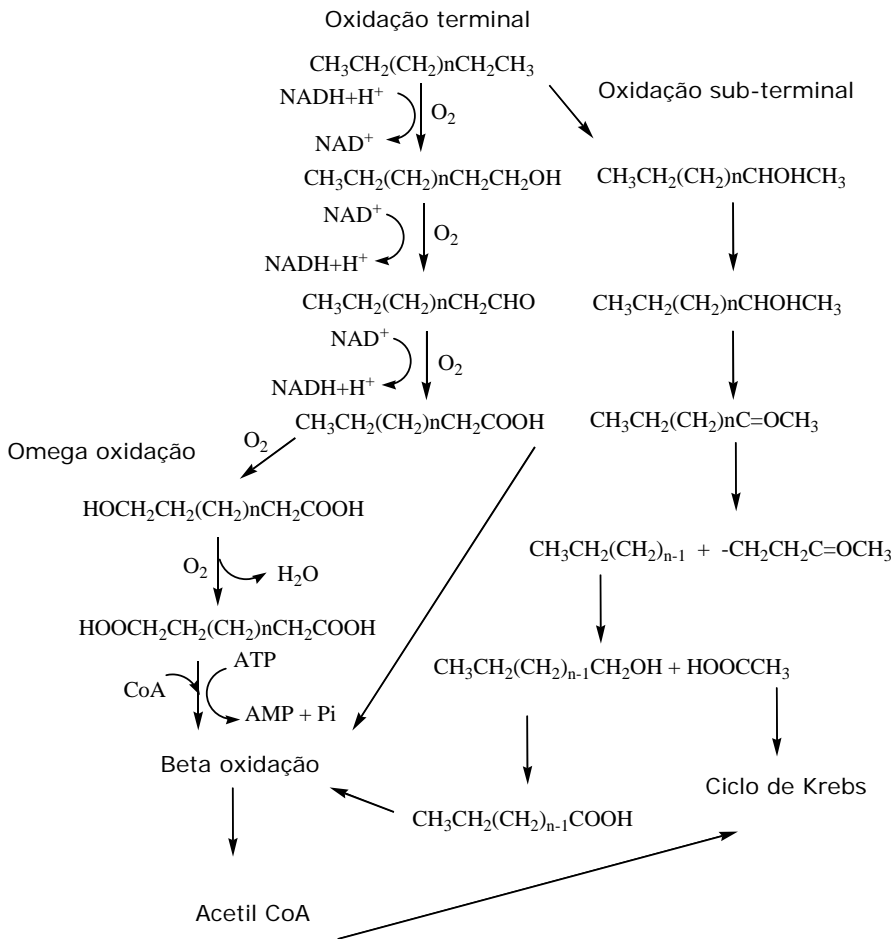


Figura 13: Rotas de oxidação dos alcanos de cadeia normal e ramificada.
(Fonte: URURAHY, 1998).

PRITCHARD *et al.* (1996) foram mais cuidadosos ao afirmar que a biodegradação do pristano e do fitano claramente ocorre na natureza, se mostrando apenas lenta quando comparada à taxa de consumo de alcanos lineares que apresentam tempos de retenção em colunas cromatográficas semelhantes (C17 e C18, respectivamente). Os autores explicam que é justamente esta diferença de susceptibilidade ao ataque microbiano a responsável pela utilização das relações C17/pristano e C18/fitano como indicadores da ocorrência da biodegradação. O conceito se baseia na idéia de que os processos abióticos não provocam perdas diferenciadas em termos de alifáticos e ramificadas, já que estes se comportam quimicamente de maneira similar. Logo, a variação das relações C17/pristano e C18/fitano ao longo do tratamento decorrem, conservativamente, da ação microbiana.

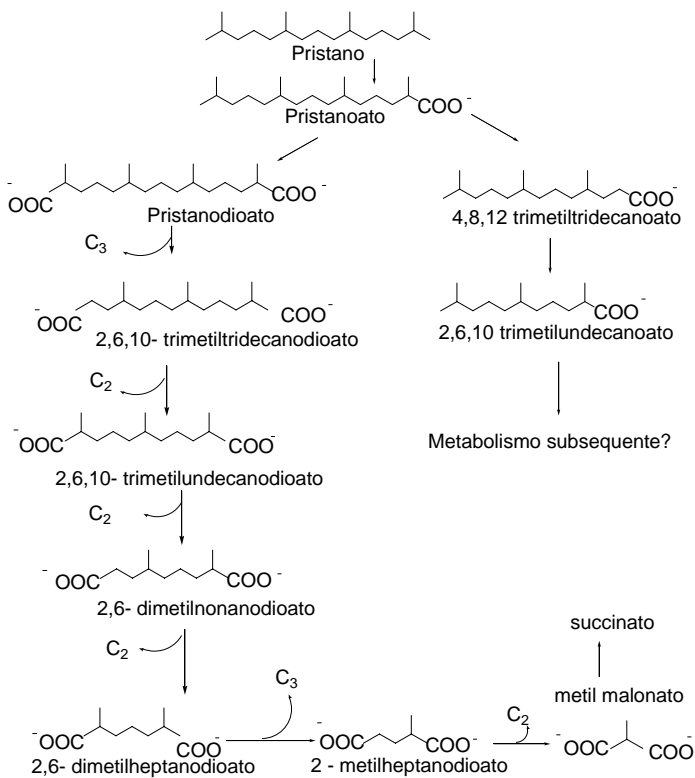


Figura 14: Rotas de degradação do pristano.
(Fonte: URURAHY, 1998).

A oxidação dos hidrocarbonetos alifáticos insaturados não ocorre da mesma forma que a dos alcanos. Muitos estudos de degradação de alcenos têm focalizado moléculas que contêm dupla ligação no carbono terminal. Esta posição permite vários mecanismos de ataque e diversas maneiras de degradação de alcenos têm sido observadas (SEEGER *et al*, 1997). A metabolização dos alcenos pode ser iniciada tanto através do ataque à dupla ligação, como a partir de uma reação de oxidação, analogamente aos *n*-alcenos. Reconhece-se, portanto, quatro importantes mecanismos para a etapa inicial: ataque da enzima oxigenase ao grupo metila terminal (levando à formação de álcoois e de ácidos insaturados correspondentes), ataque subterminal, oxidação da dupla ligação gerando o epóxido correspondente e oxidação da dupla ligação resultando no diol correspondente. O esquema básico do processo metabólico preliminar se encontra na Figura 15, no entanto, deve-se ter em mente que os microorganismos podem ser capazes de realizar mais de uma destas vias.

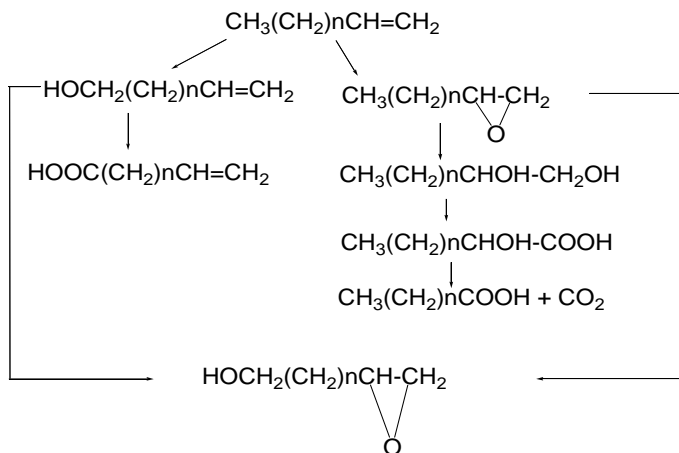


Figura 15: Rotas de degradação de alkenos (Fonte: URURAHY, 1998)

Os cicloalcanos são particularmente resistentes ao ataque microbiano. Inclusive, compostos alicíclicos complexos, tais como os tripentacíclicos apresentam-se como os mais persistentes, quando dos derramamentos de petróleo no meio-ambiente. No entanto, muitas revisões apontam casos de degradação oxidativa e co-oxidativa de cicloalcanos substituídos ou não. Grande parte dos cicloalcanos não substituídos serve como alvo para as ações cometabólicas, dando origem a cetonas ou álcoois. Uma vez oxigenados, o processo de deterioração destes compostos prossegue, havendo a clivagem dos anéis. Contraditoriamente, a degradação de cicloalcanos substituídos parece ocorrer prontamente. Nestes casos, o ataque inicial se dá na posição da substituição, formando um intermediário cíclico de ácido carboxílico. A partir daí, a metabolização, segundo descobertas recentes, passa pela geração de um intermediário aromático, seguida pela clivagem do anel em questão (ATLAS, 1981).

ENGLERT & KENZIE (1993) destacam que a mineralização dos cicloalcanos, por ser extremamente complexa, requer a ação de consórcios microbianos. Além disto, compostos de menos de dez átomos de carbono, em especial os de 5, 6 e 7 átomos, exercem efeitos altamente tóxicos sobre as membranas celulares, enquanto sistemas contendo quatro ou mais anéis condensados são degradados muito lentamente. Para se ter uma idéia de tal complexidade, listaremos as principais etapas do processo de assimilação destas fontes de carbono pelos microorganismos:

- 1) A princípio, os cicloalcanos são transformados nos álcoois cíclicos correspondentes, que então sofrem uma desidrogenação, se transformando em cetonas (as reações em questão são catalizadas, respectivamente, pelas enzimas ciclo-desidrogenases e monooxigenases);
- 2) Numa etapa posterior, há a lactonização do anel por monooxigenases e a abertura do mesmo pela lactona-hidrolase. Tais mecanismos podem ser ilustrados através da representação da via catabólica do ciclohexano na Figura 16, que tanto é seguida por espécies do gênero *Nocardia* quanto *Pseudomonas*.

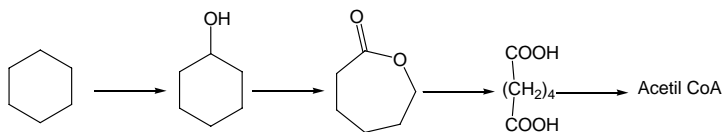


Figura 16: Degradação do ciclohexano. Fonte: ATLAS (1984).

ATLAS (1984) exemplifica, ainda, a transformação de vários cicloalcanos substituídos, por *Pseudomonas aeruginosa*, em álcoois cíclicos (Figura 17).

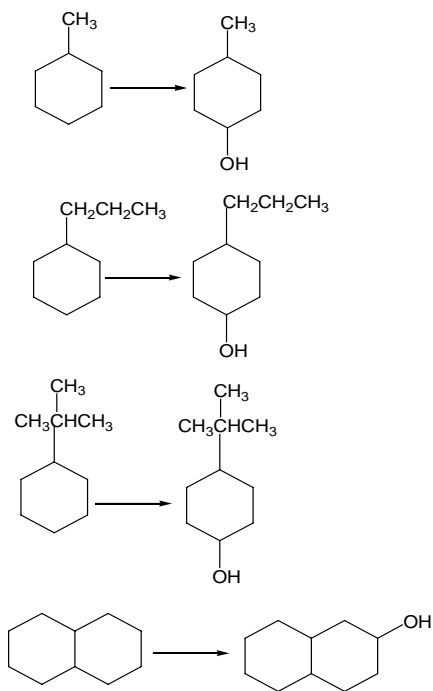


Figura 17: Degradação de ciclohexanos substituídos.
Fonte: ATLAS (1984).

- 3) Os álcoois, por sua vez, vão a cetonas, que sofrem, posteriormente, uma lactonização (Figura 18).

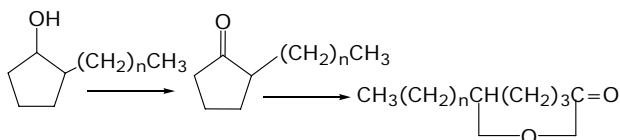


Figura 18: Formação de cetonas a partir de alcoóis cíclicos e posterior lactonização. Fonte: ATLAS (1984).

Muito embora se conclua pelo exposto que as vias catabólicas envolvidas na degradação de hidrocarbonetos alicíclicos apresentam acentuada semelhança, os estudos destas são fundamentais para avaliação do consumo de poluentes derivados do petróleo, uma vez que as substâncias cíclicas costumam se apresentar de forma abundante, em termos de composição percentual, nos óleos crus (de 22 a 67% v/v, contra 27 a 72% v/v de parafinas e 6 a 14% v/v de aromáticos).

▪ Biodegradação de Hidrocarbonetos Aromáticos

Os hidrocarbonetos aromáticos caracterizam-se por possuir uma elevada energia de ressonância, que resulta em considerável estabilidade termodinâmica. Esta estabilidade, por sua vez, reflete-se nas demais propriedades químicas, diferenciando, marcadamente, os referidos compostos dos hidrocarbonetos alifáticos e alicíclicos.

Hidrocarbonetos aromáticos como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno são encontrados, predominantemente, nas frações leves de petróleo, como a gasolina, muito embora possam também estar presentes em quantidades sob a forma de traços, em diversas frações pesadas. Estes compostos são largamente empregados nos mais variados setores da indústria, sendo que a produção anual dos mesmos chega a ultrapassar cifras de milhões de toneladas por ano (SMITH, 1990). Face à freqüente liberação destas substâncias na natureza, os estudos quanto à sua biodegradabilidade têm se tornado freqüente.

A degradação aeróbica de aromáticos por bactérias foi demonstrada pela primeira vez em meados de 1900 (ALEXANDER, 1994). Há um número elevado de vias metabólicas envolvidas na degradação de aromáticos.

O benzeno é degradado primeiro pela conversão em catecol ou em protocatecolato. O núcleo aromático nesses compostos é subsequente aberto por uma dessas duas vias: a orto-clivagem (via do 3-oxodipato) ou pela meta-clivagem. A orto-clivagem envolve a clivagem de catecol ou protocatecolato entre os dois grupos hidroxil. Este processo leva à formação dos respectivos compostos: muconato e mucolactona, os quais são também metabolizados a 4-oxadipato enol-lactona e depois ao 3-oxiadipato (beta-cetoadipato). O metabolismo procede à formação do acetil-CoA e succinato.

Na meta-clivagem, por outro lado, a clivagem inicial do anel ocorre adjacente ao grupo hidroxil, formando o semi-aldeído 2-hidroxil-mucônico como produto inicial da clivagem do anel. Subseqüentemente, a orto e meta-clivagem do anel aromático procedem à formação de piruvato, formiato, e acetaldeído, que vão alimentar o ciclo de *Krebs*.

A Figura 19 mostra a seqüência de reações para a formação do catecol e protocatecolato, proveniente da degradação de benzeno e de poli-aromáticos (antraceno, fenantreno e naftaleno), e na Figura 20 estão apresentados os esquemas das reações de orto e metaclivagem do anel aromático (SEEGER *et al.* 1997; BAKER & HERSON, 1994).

Os compostos benzênicos alquil substituídos (tolueno, etilbenzeno) são inicialmente oxidados utilizando uma das vias existentes. Se o ataque inicial ocorrer no anel aromático, é formado o alquil-catecol, o qual pode ser clivado utilizando-se a meta ou a ortoclivagem. Se o grupo alquil for oxidado inicialmente, quase sempre são formados ácidos carboxílicos aromáticos. Por exemplo, a oxidação inicial da alquil-substituição do *p*-xileno leva à formação do ácido tolúico. Esse ácido carboxílico aromático pode ser convertido em homoagentisato ou gentisato. A clivagem do anel aromático ocorre, subseqüentemente, com a formação de intermediários como fumarato e acetoacetato, que alimentam o ciclo de *Krebs* (ALEXANDER, 1994).

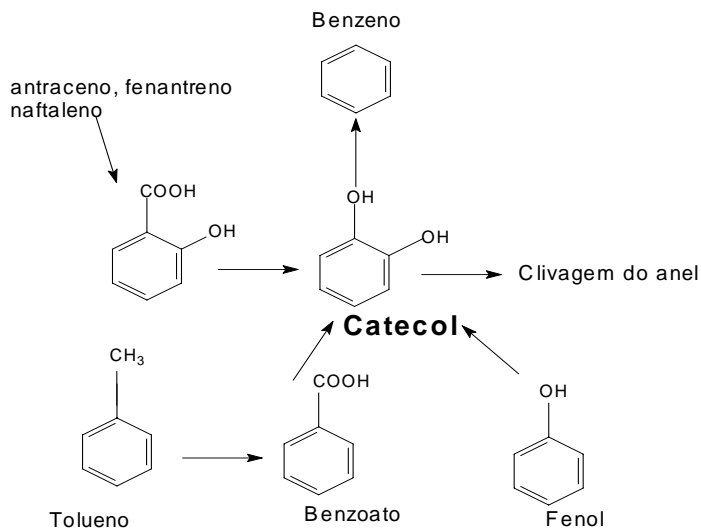
Segundo SMITH (1990), o tolueno, produto da substituição mais simples do benzeno, pode ser tanto atacado no anel (*Bacillus* sp. termotolerante), como sofrer a hidroxilação do grupo metila e formar catecol. Já a metabolização por *Pseudomonas* de monoalquilbenzenos com grupamento de 2 a 7 átomos de carbono, tanto lineares como ramificados (isopropilbenzeno, isobutilbenzeno, sec-butilbenzeno, terc-butilbenzeno e terc-amilbenzeno), se dá exclusivamente através do ataque direto ao anel, ataque este intermediado por enzimas dioxigenases, que são codificadas a nível plasmidial. A partir de 7 átomos de carbono, a via preferencial passa a ser a de ataque inicial ao grupamento e não mais ao anel benzênico.

Descobertas recentes apontam para a biodegradação dos isômeros do xileno (*meta* e *para*) por bactérias do gênero *Pseudomonas*. Primeiro se passa a oxidação de um dos grupos metila, levando aos metilbenzilálcoois correspondentes, tolualdeídos, ácidos tolúlicos e metilcatecóis. Os catecóis resultantes sofrem, então, meta-clivagem. Uma alternativa a estas vias consiste no ataque direto pelas dioxigenases, gerando o cis-dihidrodiol correspondente e consequente aparecimento do catecol substituído (3,6-dimetilcatecol para o *p*-xileno e 3,5-dimetilcatecol para o *m*-xileno), por intermédio das enzimasdesidrogenases. Membros de gênero *Nocardia* são capazes, ainda, de cometabolizar os três isômeros do xileno, muito embora *p*- e *m*-xileno sofram orto-clivagem, enquanto *o*-xileno, meta-clivagem. Da mesma forma, *Pseudomonas stutzeri* e espécies do gênero *Corynebacterium* possuem a capacidade de utilizar o *o*-xileno através da meta-clivagem.

Existem poucos registros acerca da biodegradação de alquênilbenzenos, embora se produza elevada quantidade de estireno na indústria petroquímica. No entanto, sabe-se que algumas bactérias crescem em estireno e metilestirenos, que servem como fontes únicas de carbono e de energia.

Estudos sobre bifenilas vêm crescendo em importância face às freqüentes ocorrências de contaminações do meio-ambiente em todo o mundo por compostos policlorados (PCB) deste tipo. Tais compostos se mostram bastantes resistentes à biodegradação, embora alguns actinomicetes consigam utilizá-los completamente. Os mecanismos envolvidos, no entanto, não foram totalmente elucidados.

(a)



(b)

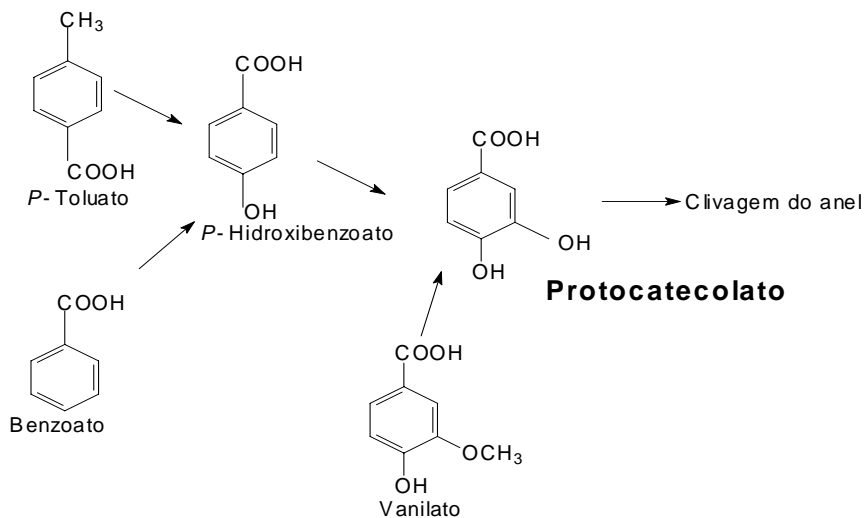
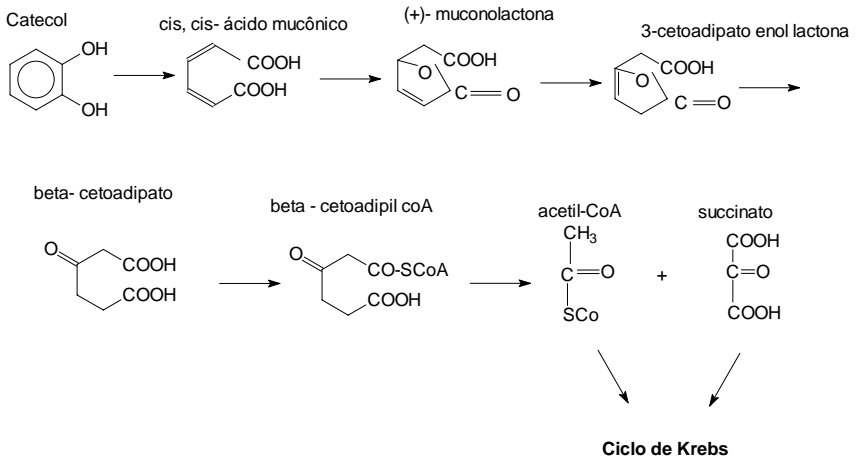


Figura 19: Degradação do benzeno: (a) catecol e (b) protocatecolato.
Fonte: SEEGER *et al.* (1997).

(a)



(b)

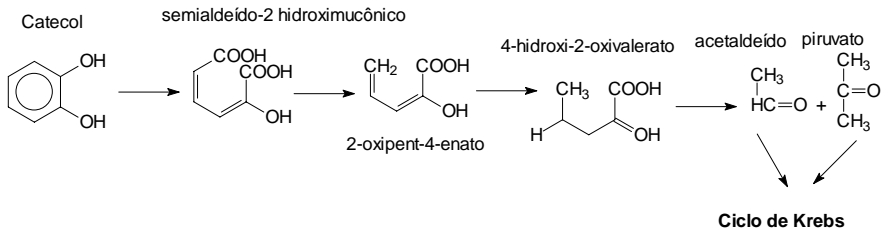


Figura 20: Clivagem do anel: (a) Ortoclivagem (b) Metaclivagem.
Fonte: BAKER & HERSON (1994).

▪ Biodegradação de Hidrocarbonetos Poliaromáticos

Os hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA) constituem a classe de compostos orgânicos perigosos que contém dois ou mais anéis benzênicos condensados, podendo se apresentar sob forma linear, angular ou, ainda, em forma de cacho. Dentre as diferentes origens dos HPA, destacam-se os resíduos oleosos provenientes de tanques de estocagem de refinarias. O desaparecimento dos HPA pode ser causado por diferentes fatores, tais como volatilização, fotooxidação, oxidação química, bioacúmulo, adsorção em partículas sólidas, lixiviação e degradação microbiana. Uma representação esquemática pode ser visualizada na Figura 21.

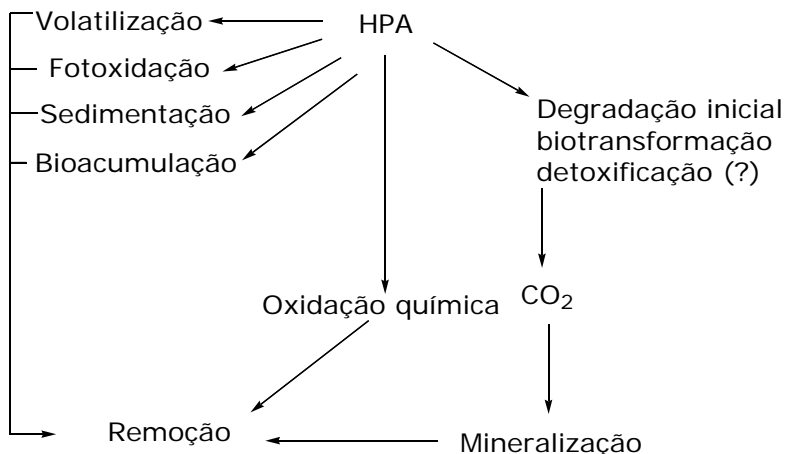


Figura 21: Rotas de degradação dos HPA.
Fonte: CERNIGLIA (1992).

Estes compostos exercem, de maneira geral, efeitos carcinogênicos e mutagênicos, além de tenderem à recalcitrância, devido à elevada hidrofobicidade e conseqüente baixa solubilidade em água. Os efeitos mais comuns são: alterações do DNA (DA); troca de cromátídeos irmãos (SCE); aberrações cromossomiais (CA) e síntese descontrolada do DNA (UDS). Ressalta-se que a persistência costuma agravar-se à medida que aumenta o número de anéis na molécula, o que pode ser verificado na Figura 22. A biodegradação destas substâncias por culturas puras ou por comunidades microbianas pode se estender desde o que se denomina transformação parcial, passando pela detoxificação, até a mineralização. Assim sendo, muito embora a incineração tenha sido, até hoje, o processo mais utilizado para destruir parte dos HPA, a biorremediação vem ganhando força, traduzindo-se como alternativa bastante interessante à efetuação dos tradicionais processamentos térmicos.

Conhece-se atualmente, uma grande variedade de bactérias, fungos e algas que apresentam a habilidade de metabolizar HPA. Os gêneros e espécies mais representativos encontram-se largamente listados na literatura, (CERNIGLIA, 1992). Ressalta-se, no entanto, que a susceptibilidade ao ataque microbiano é inversamente proporcional ao número de anéis condensados compreendidos na molécula do contaminante e diretamente proporcional à sua solubilidade em água.

Os processos de degradação de HPA como o naftaleno, fenantreno, antraceno e acenafeno já serviram como objetos de muitos estudos, o que contribuiu em muito para a elucidação das vias bioquímicas envolvidas. Ao contrário, entretanto, pouco se sabe sobre a ação microbiana sobre os compostos poliaromáticos de maior complexidade; quando disponíveis como únicas fontes de carbono e de energia. Mesmo assim, existem fortes indicativos de que o consumo de tais substâncias segue vias similares ao das estruturas monocíclicas.

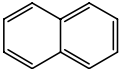
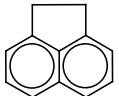
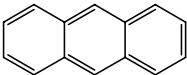
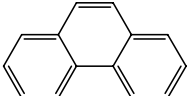
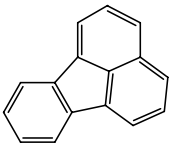
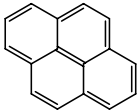
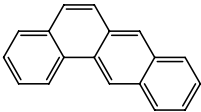
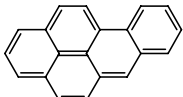
	peso molecular, solubilidade(mg/L) e Genotoxicidade:		
 naftaleno	128,2	31,7	----
 acenafteno	154,2	3,9	+Ames
 antraceno	178,2	0,07	----
 fenantreno	178,2	1,3	----
 fluoranteno	202,3	0,26	fracamente carcinogênico
 pireno	202,3	0,14	Ames; UDS; SCE
 benzo[a]antraceno	228,3	0,002	Ames; CA; SCE +carcinogênico
 benzo[a]pireno	252,3	0,003	Ames; CA; SCE+UDS+carcinogênico

Figura 22: Relação entre a quantidade de anéis dos HPA e os efeitos deletérios.
Fonte: CERNIGLIA (1992).

Quanto aos mecanismos de transformação destes substratos, foi descoberto que, tanto para organismos procariontes como eucariontes, faz-se necessária a presença de oxigênio molecular para dar início ao ataque enzimático. Outros sistemas enzimáticos como os das enzimas metanooxigenases e das ligninaperoxidases também surgem como participantes ativos no catabolismo dos hidrocarbonetos poliaromáticos. Da mesma forma, o envolvimento de plasmídios na degradação do naftaleno e do fenantreno também foi relatado; muito embora pouco se saiba, ainda, sobre os mecanismos genéticos e regulatórios ligados ao consumo de HPA de alta massa molecular. Bactérias e fungos apresentam algumas diferenças quanto à forma de ataque dos substratos em questão: enquanto os fungos filamentosos lançam mão da etapa de hidroxilação para dar início à destoxificação, a maioria das bactérias utiliza a oxidação como ponto de partida para a fissão dos anéis e posterior assimilação. Chama-se atenção para o fato de que ambos, no entanto, apresentam acentuada estereoseletividade. Nas Figuras 23 "a" e "b" podem ser verificadas as vias catabólicas fúngicas e bacterianas envolvidas na biodegradação dos poliaromáticos.

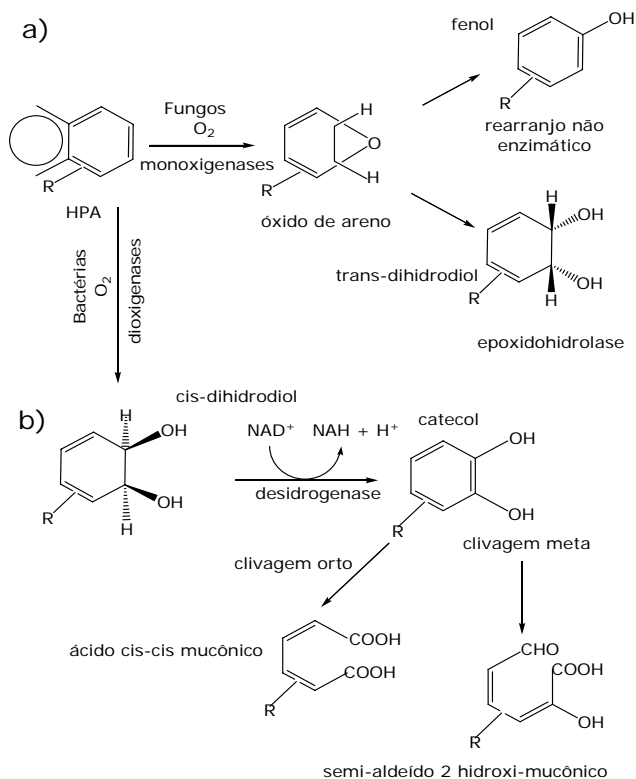


Figura 23: a) Via catabólica fúngica e b) bacteriana.
 Fonte: CERNIGLIA (1992).

A espécie de fungo não ligninolítico estudado com mais sucesso foi o *Cunninghamella elegans*, que emprega enzimas citocromo P-450 monooxigenases para incorporar um átomo de oxigênio no núcleo aromático e levar o outro átomo à água. Esta espécie mostrou-se capaz de realizar a oxidação de derivados substituídos por grupamentos metil, nitro e flúor a trans-dihidrodióis, fendóis, quinonas, tetralonas e conjugados destes metabólitos primários. É interessante destacar que, embora pequenas quantidades de metabólitos mutagênicos e carcinogênicos tenham sido encontradas durante o metabolismo de HPA por esta espécie de fungos, a maior parte dos produtos de transformação exerce efeito mais brando que os compostos iniciais, fato este que revela o poder detoxificante desta espécie. Outras espécies de fungos foram pesquisadas, envolvendo enzimas diversas, como as ligninas peroxidases em *Phanerochaete chrysosporium*.

Em ambos os casos (ação fúngica ou bacteriana), a metabolização de compostos poliaromáticos envolve o oxigênio molecular. Microorganismos procariotas utilizam enzimas dioxigenases a fim de incorporar ambos os átomos do oxigênio molecular nos núcleos aromáticos, o que leva à formação de cis-hidrodióis, os quais, por sua vez, são desidrogenados estereoespecificamente pelas enzimas cis-dihidrodiol desidrogenases, que rearomatizam os núcleos benzênicos, produzindo intermediários dihidroxilados. A subsequente fissão, que depende da existência de duas hidroxilas nas posições orto ou para, também é catalisada por dioxigenases altamente estereoseletivas. Assim sendo, se as hidroxilas se encontram posicionadas, uma com relação à outra, em orto, a clivagem oxigenolítica pode ocorrer entre os dois grupos hidroxil (através da ação de enzimas orto ou intradiol dioxigenases) ou na adjacência dos mesmos (por meta ou extradiol dioxigenases), tal como demonstrado na Figura 24.

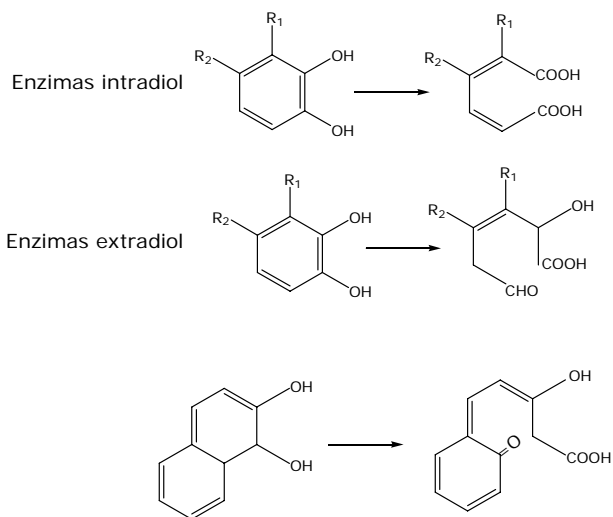


Figura 24: Clivagem oxigenolítica do anel mono e poliaromáticos.
Fonte: CERNIGLIA (1992).

Destaca-se ainda, o cometabolismo de HPA por bactérias metanotróficas, realizado, por exemplo, pela espécie *Methylococcus trichosporium*. Para exemplificar o processo de degradação de poliaromáticos de baixo peso molecular, costuma-se utilizar o naftaleno. As reações de transformação encontram-se representadas na Figura 25.

Como já foi explanado, a recalcitrância de um HPA, quando do ataque microbiano, é diretamente proporcional a sua massa molecular e ao seu coeficiente de partição octanol:água ($\log K_{ow}$), e inversamente proporcional à sua solubilidade em água. Desta forma compostos leves como o naftaleno, possui curto tempo de meia-vida, enquanto os de alta massa molecular, como o benzo[a]pireno, persistem indefinidamente. Um esquema comparativo deste fato se encontra representado na Figura 26.

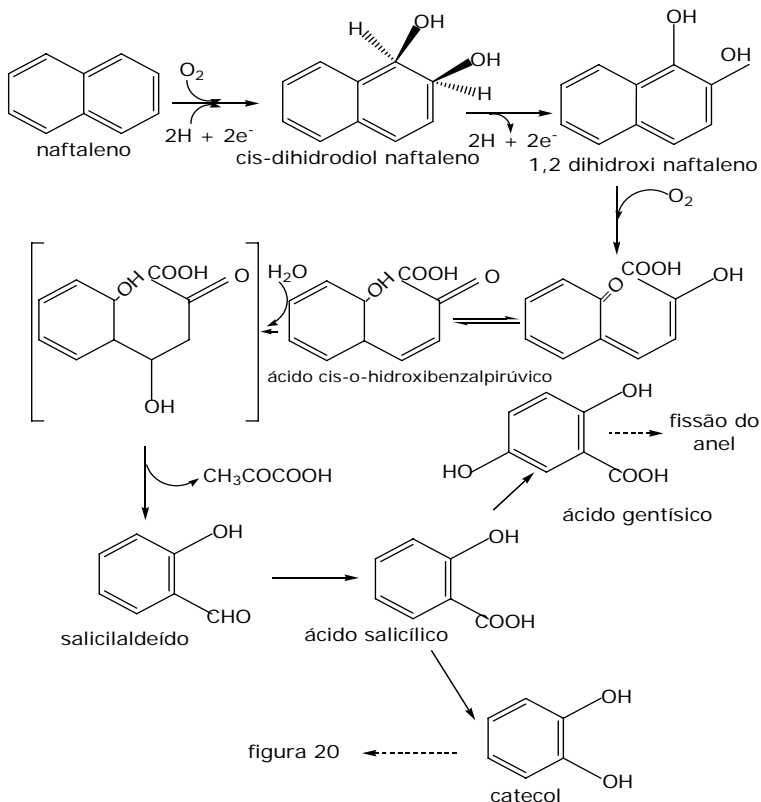


Figura 25: Clivagem de poliaromáticos de baixa massa molecular. Fonte: SMITH (1990).

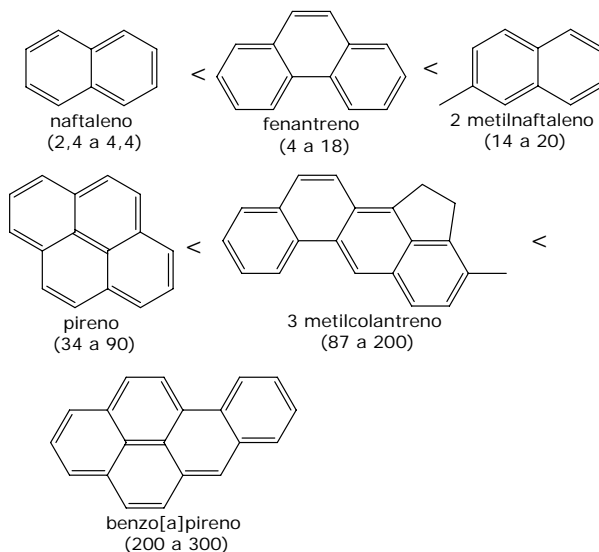


Figura 26: Recalcitrância de poliaromáticos de alta massa molecular (tempo de meia-vida em semanas). Fonte: CERNIGLIA (1992).

Em processos de biodegradação, o tempo de meia-vida é definido como o tempo necessário para que haja a mineralização de 50% da matéria orgânica, quando submetida à ação microbiana.

É de se esperar que o tempo de meia-vida aumente com o grau de condensação dos hidrocarbonetos poliaromáticos, já que o ataque microbiano se dá em um anel de cada vez.

Embora as vias de degradação para compostos de mais de três anéis já tenham sido propostas, até hoje se têm poucas informações acerca da utilização microbiana de tais poluentes. Mesmo assim, a biotransformação dos HPA tetracíclicos fluoranteno e pireno por microorganismos eucariotas se encontram relatadas, assim como foram isoladas algumas espécies de bactérias com propriedades oxidativas e co-oxidativas destas substâncias.

Pesquisas em laboratório demonstraram a habilidade de *Mycobacterium sp* não só de mineralizar substancialmente fluoranteno, naftaleno e pireno em cultura pura, como também de proporcionar o aumento do consumo destes poluentes em culturas mistas, de microorganismos nativos de um determinado sedimento. A Figura 27 apresenta as vias propostas para o catabolismo do pireno por *Mycobacterium sp*.

A biodegradação dos compostos em questão pode variar desde simples oxidação, passando por intermediários, até a mineralização completa. Sob o ponto de vista toxicológico, devem-se levar em conta os efeitos destes produtos intermediários no meio-ambiente, no que tange à questão da ameaça tanto à saúde humana, quanto à integridade do ecossistema.

▪ Biodegradação de Asfaltenos

A metabolização dos asfaltenos não é muito bem entendida, uma vez que as estruturas altamente complexas são de difícil análise, demandando metodologias químicas nada convencionais. Pode-se afirmar, portanto, que a elucidação dos processos bioquímicos envolvendo tais compostos se constitui, ainda hoje, no maior desafio no campo de pesquisas referentes à biodegradação do petróleo.

A própria definição de material asfáltico não é muito precisa. Normalmente, os critérios que estabelecem a caracterização dos mesmos baseiam-se na solubilidade. De uma maneira simplificada, rotula-se como asfaleno uma substância aromática de alto peso molecular, comumente encontrada no petróleo e em borras de petróleo, insolúvel em *n*-heptano, em excesso de éter de petróleo e em gasolinas leves. É esta a diferença de solubilidade que distingue, por exemplo, resinas neutras de asfaltenos. Ambos, no entanto, são solúveis em benzeno, clorofórmio e dissulfeto de carbono (MOORE *et al.*, 1965). Devido a esta similaridade, asfaltenos e resinas freqüentemente ocorrem associados, associação esta que se configura em partículas coloidais de 35 e 45 Å, nas quais o material asfáltico ocupa o centro das micelas e as resinas, a periferia. Não há, entretanto, interface distinta. Embora a estabilidade das partículas coloidais asfálticas seja atribuída a resinas a elas adsorvidas, o fato dos asfaltenos serem carregados eletricamente também contribui para a estabilização de emulsões. A simples neutralização da carga negativa dos asfaltenos promovida, por exemplo, por uma acidificação do meio, pode acarretar em sua precipitação na superfície de partículas sólidas e na conseqüente formação de camadas altamente protetoras. Por outro lado, a considerável polaridade promove repulsão das cargas como um todo, dificultando a coalescência das gotas e a formação de uma única fase.

Alguns estudos mostraram que existe uma grande tendência do material asfáltico ser atraído para a interface água-óleo, que se torna particularmente suscetível à acidificação. Na medida em que o meio se acidifica, ocorre um enrijecimento e corrugação deste filme, que pode ser permanente ou não, dependendo do óleo em questão (MOORE *et al.*, 1965). Este fenômeno tem significativa importância em sistemas multifásicos de tratamento biológico, nos quais a formação de uma interface rígida e de baixa permeabilidade pode dificultar o ataque microbiano e se contrapor aos fluxos de transferência de massa.

As maiores preocupações com esta classe de composto advêm da sua elevada complexidade estrutural, que é responsável em grande parte pelo alto grau de persistência na natureza. Nas refinarias, é comum destinar as frações asfálticas à produção de asfalto, porém é difícil separá-lo de resíduos tais como borras oleosas. As pequenas quantidades de asfaltenos presentes nestes resíduos, cujo reaproveitamento é muito pouco viável economicamente, podem, no entanto, dificultar, e muito, o tratamento biológico dos resíduos em questão. A aplicação da borra como um todo nas fábricas de asfalto também não é favorável, na medida em que a variabilidade composicional pode resultar em asfaltos facilmente oxidáveis e quebradiços ou que dêem origem a pavimentos ondulados e não uniformes.

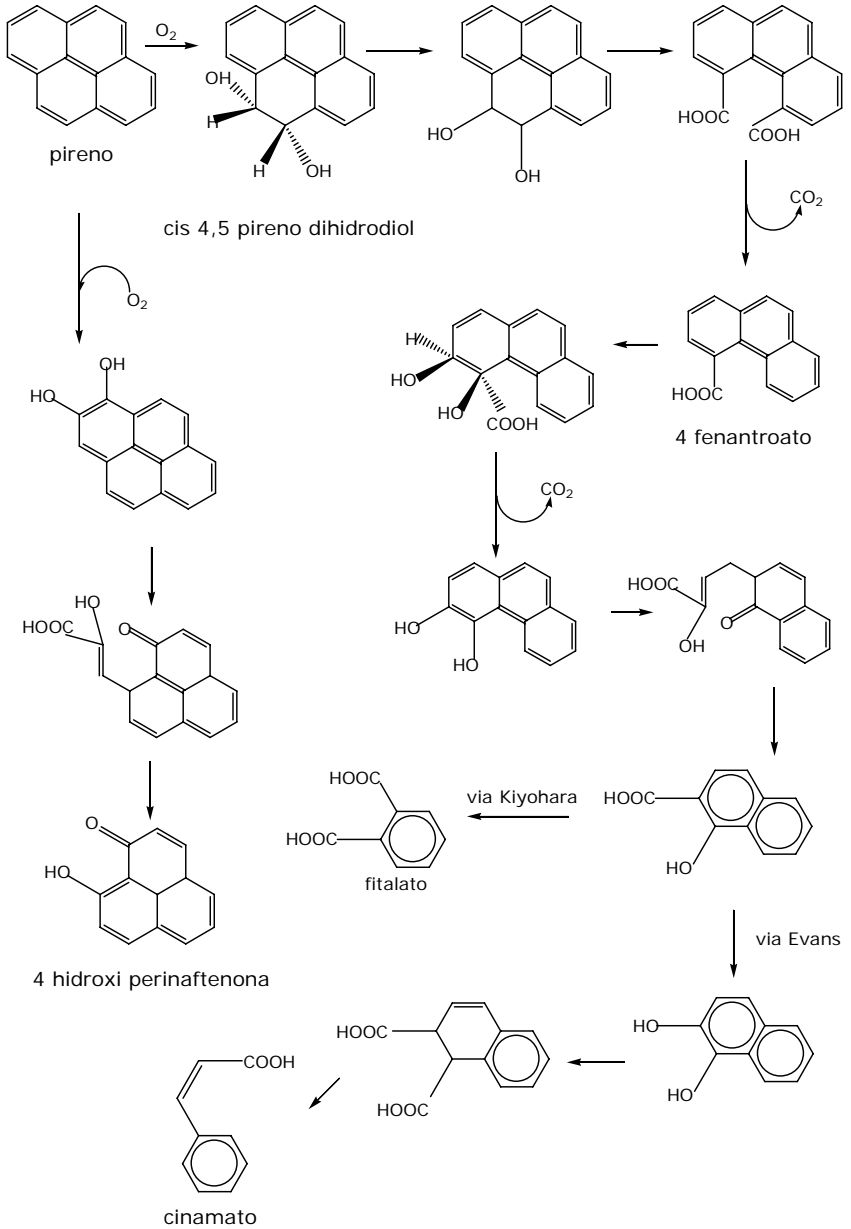


Figura 27: Catabolismo do pireno. Fonte: CERNIGLIA (1992).

▪ **Biodegradação de Misturas Complexas de Poluentes Recalcitrantes**

Os mecanismos de biodegradação podem ser bastante alterados, sobretudo em meios contendo diferentes poluentes e espécies microbianas distintas. É muito difícil prevêê-los quando se estuda, por exemplo, um resíduo tão complexo quanto uma borra oleosa proveniente de refinaria de petróleo. De maneira concisa, pode-se dizer que as características químicas, as interações entre as substâncias, a potencialidade microbiana e as condições ambientais ditam, em conjunto, o grau de biodegradabilidade de uma mistura de poluentes.

Quanto à recalcitrância de um composto de origem antropogênica, sabe-se que é função do baixo grau de similaridade entre este composto e um composto comumente encontrado na natureza. Este fato decorre da falta ou inadequação de aparato enzimático necessário para o seu metabolismo. Desta forma, até que a população microbiana local não esteja preparada para utilizar fonte de carbono e energia até então desconhecidas, o poluente tende a persistir no meio-ambiente. O preparo da microbiota, por assim dizer, poderá vir de uma modificação do composto original, de tal forma que o torne reconhecível, ou após a ocorrência de alterações genéticas que possibilitem a flora microbiana biodegradar o contaminante. Obviamente, estratégias tomadas pelo homem podem acelerar ou mesmo proporcionar a ocorrência de um ou ambos os eventos.

Muitas vezes, ocorre a degradação de novas substâncias por parte dos microorganismos. Este fenômeno é frequentemente encarado como um indicador do grau de tolerância exibida por enzimas a alterações estruturais dos substratos. Em contrapartida, sistemas enzimáticos mais rígidos, ou de maior especificidade, não sendo capazes de reconhecer o substrato, por sua vez não promovem a ligação enzima-substrato, tornando o poluente inatacável. Substratos, por exemplo, que alteram o equilíbrio de cargas do centro ativo das enzimas, normalmente não são reconhecidos por elas. Por outro lado, há registros de que ações enzimáticas “fortuitas” ou “gratuitas” podem ocorrer, mesmo que não haja a garantia de que a rota metabólica de degradação envolvida possa acomodar todos os produtos sucessivos de degradação. Neste caso particular, aumenta a probabilidade de completa mineralização do composto teoricamente xenobiótico em meios de alta biodiversidade. Por outro lado, a eventual perda da similaridade no decorrer do processo fatalmente leva à degradação incompleta e à formação de produtos mais ou menos tóxicos que o original. Como se pode perceber, o assunto é profundo e extenso e para que seja compreendido, fazem-se necessárias discussões de ordem química, bioquímica e biológica.

Um mapeamento dos principais fenômenos biológicos pode ajudar também, a proporcionar condições para a maximização da atividade biológica, quando do desenvolvimento de processos biológicos de tratamento.

6.3 Fenômenos Interficiais

A biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo ocorre em um sistema multifásico composto por matéria orgânica insolúvel, água, sais e microrganismos. Neste sistema, a interface água-óleo é bastante distinta, por causa da imiscibilidade das fases aquosa e oleosa. A compreensão dos fenômenos ocorridos nesta interface permite fazer o controle dos processos de assimilação de compostos orgânicos, bem como a otimização de parâmetros nutricionais e respiratórios.

Segundo Rosemberg (1991), a assimilação de hidrocarbonetos exige hidrofobicidade da superfície celular, embora nem todos os microrganismos que possuem esta hidrofobicidade são degradadores de hidrocarbonetos e nem todos os degradadores de hidrocarbonetos são capazes de sobreviver em superfície oleosa (RON & ROSEMBERG, 2001; 2002).

O grau de solubilidade dos hidrocarbonetos de petróleo é um fator importante para avaliar o mecanismo utilizado pelos microrganismos na degradação. Na Tabela 6, estão apresentadas as solubilidades de alguns hidrocarbonetos encontrados no petróleo e seus derivados (ALEXANDER, 1994).

Tabela 6: Solubilidade em Água de Alguns Hidrocarbonetos do Petróleo (Alexander, 1994).

Grupo	Composto	Solubilidade (mg.L ⁻¹)
Hidrocarbonetos alifáticos	Heptano	2,9x10 ⁰
	Octano	6,6x10 ⁻¹
	Nonano	2,2x10 ⁻¹
	Decano	5,2x10 ⁻²
	Hexadecano	2,0x10 ⁻⁵
	Eicosano	1,1x10 ⁻⁶
Hidrocarbonetos aromáticos	Naftaleno	3,1x10 ¹
	Bifenil	7,2x10 ⁰
	Acenafteno	4,3x10 ⁰
	Antraceno	5,0x10 ⁻²
	Fenantreno	1,1x10 ⁰
	Pireno	1,3x10 ⁻¹
	Criseno	2,0x10 ⁻³
	1,2 – Benzopireno	5,3x10 ⁻³

Existem três mecanismos através dos quais se explica a assimilação de hidrocarbonetos por via microbiana. Estes mecanismos focalizam a forma como o hidrocarboneto é transferido do ambiente à superfície da célula, e depois é transportado através da membrana para regiões intracelulares por ação enzimática (ALEXANDER, 1994; URURAHY, 1998). Tais mecanismos são:

a) Utilização do composto orgânico apenas na fase aquosa

O microrganismo é capaz de utilizar apenas as moléculas que estão dissolvidas na fase aquosa. Estes microrganismos são comumente encontrados associados a substratos de baixa solubilidade. A presença de substância ou mistura de substâncias de baixa solubilidade na fase aquosa pode ser medida pelo coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), que é a razão entre a quantidade da substância que está efetivamente dissolvida em octanol e a quantidade que está dissolvida em água, em um sistema com quantidades iguais de água e octanol. Desta forma, a utilização de substrato disponível apenas na fase aquosa é comum em substâncias com baixos valores de K_{ow} . O crescimento microbiano (decorrente da degradação do poluente) está condicionado à disponibilidade do composto orgânico a estes microrganismos, presumivelmente não produtores de biossurfactantes. Para que haja uma degradação efetiva, é necessário que a taxa de dissolução espontânea seja maior que a taxa de biodegradação. Quando ocorre um aumento significativo de biomassa, a demanda biológica de carbono

excede a taxa de dissolução espontânea da substância e a atividade microbiana ficará limitada a esta taxa de dissolução.

b) Contato direto dos microrganismos com a fase não-aquosa

Os microrganismos aderem diretamente à superfície da fase oleosa e metabolizam os seus constituintes. Bactérias que crescem em hidrocarbonetos alifáticos em solução aquosa freqüentemente se fixam ao substrato orgânico e, se este se encontra sob a forma de gotículas, as células retidas por estas gotículas também podem formar aglomerados. Para muitos microrganismos, a aderência da célula é um pré-requisito para a degradação.

c) Excreção de produtos que induzem a formação de gotículas de substrato menores que 1µm

Em muitos casos é evidenciada a produção de substâncias que são capazes de aumentar a taxa de consumo de substrato oleoso. Nestes casos, a taxa de biodegradação aumenta concomitantemente com a biomassa e não há dependência direta da taxa de dissolução espontânea da fase não-aquosa. Estas substâncias são chamadas de biossurfactantes, ou bioemulsificantes, e sua produção aumenta o coeficiente de partição da substância para a fase aquosa, potencializando a taxa de biodegradação. Os surfactantes de um modo geral são moléculas anfifílicas, que possuem uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica. Em baixas concentrações, os surfactantes são solúveis em água e a proporção em que se aumenta a concentração, os surfactantes se agregam em micelas. A menor concentração em que se observa a produção de micelas é chamada de concentração micelar crítica (CMC).

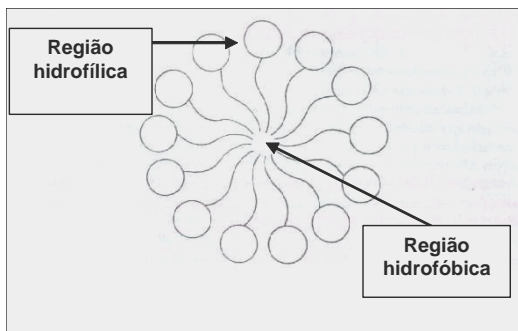


Figura 28: Representação esquemática de uma micela (Fonte: ALEXANDER, 1994).

As micelas são formadas por uma região interna hidrofóbica e uma região externa hidrofílica (Figura 28). A porção terminal hidrofílica fica voltada para o meio aquoso. O substrato hidrofóbico não-solúvel fica presumivelmente incorporado no interior da micela aparentando estar dissolvido na fase aquosa. Este fenômeno é conhecido como "pseudossolubilização", uma vez que a gotícula oleosa está retida na região interna da micela e não está dissolvida na fase aquosa. Muitos microrganismos degradadores de alcanos ou de óleo cru,

excretam agentes emulsificantes que induzem a formação de gotículas de substrato, de tamanhos que variam entre 0,1 e 1,0 μ m.

Nota-se que, termodinamicamente, o mecanismo (c) oferece uma maior estabilidade. Contrariamente, o (b) revela uma elevada instabilidade, tendendo à coalescência. A coalescência, por sua vez, finda por retardar o processo de biodegradação. Já o (a) dificilmente ocorre devido à baixa solubilidade em água da maior parte dos hidrocarbonetos (com exceção dos aromáticos e gasosos). O contato direto prevalece em sistemas onde não há formação de metabólitos emulsificantes extracelulares. Diversamente, a pseudosolubilização é justamente fruto da ação de tais metabólitos. É claro que ambos os mecanismos (b e c) podem ser verificados simultaneamente; se houver uma fase oleosa pouco dispersa (mecanismo b) e outra pseudosolubilizada (mecanismo c). GOSWAMI & SINGH (1991) em seus estudos acerca do comportamento de duas diferentes linhagens de *Pseudomonas*, verificaram que uma delas não produzia biosurfactante, embora apresentasse propriedades superficiais tais, que garantiam uma aderência firme à fase rica em hidrocarbonetos. Ficou claro, portanto, o predomínio do mecanismo (b) na assimilação da fonte de carbono. Paralelamente, testes com o mesmo substrato, porém com outra linhagem, levaram a observações opostas: capaz de produzir um agente emulsificante poderoso, esta última solubilizava o hidrocarboneto, assimilando-o, assim, através do mecanismo (c).

Baseado no caráter hidrofílico, os biosurfactantes podem ser agrupados nas seguintes classes: Glicolipídios, Lipopeptídios, Ácidos Graxos, Fosfolipídios e Lipídios Neutros. A maior parte é neutra ou carregada negativamente. O caráter aniônico se deve aos grupos carboxilados. Raros surfactantes apresentam funções amina, que lhes conferem, portanto, comportamento catiônico. A classe mais representativa é a de glicolipídios, sintetizados por microorganismos como *Actinomycetes*, *Rhodococcus erythropolis* e *Nocardia corynebacteroides*. Algumas linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* também são capazes de produzir biosurfactantes glicolipídicos (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984). Lipopeptídios, por sua vez, são produzidos por *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, entre outros.

Cabe ressaltar que apenas um limitado número de bactérias e leveduras é capaz de produzir compostos interfacialmente ativos, estando esta capacidade relacionada à habilidade de tais microorganismos em utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono. Em contrapartida, sabe-se, também, que a geração dos biosurfactantes não se encontra necessariamente associada ao crescimento. Exemplo curioso deste fato é de que alguns bioemulsificantes (como os produzidos por *Bacillus subtilis*) parecem estar ligados, simplesmente, à metabolização de matéria orgânica solúvel em água, ao invés de resultarem da necessidade de se provocar a pseudosolubilização dos substratos oleosos presentes no meio. As enzimas envolvidas na síntese de surfactantes encontram-se, de maneira geral, reprimidas em células ativas ou em crescimento. É a exaustão, limitação ou carência, seja ela relativa às fontes de carbono, nitrogênio ou fósforo, que leva à desrepressão das enzimas do seu metabolismo secundário. Desta maneira, as células lançam mão da produção e excreção dos bioemulsificantes como forma de driblar uma situação de profundo "stress" nutricional. Outros agentes surfactantes, como ésteres de trealose e ácidos coenocílicos são similares aos constituintes da parede celular e estão associados ao processo de adaptação dos microorganismos às condições do meio.

Entretanto, independente do mecanismo específico de formação, as substâncias em questão podem promover o crescimento microbiano em hidrocarbonetos, sendo que algumas delas possuem, até mesmo e paradoxalmente, propriedades antibióticas. De forma resumida, os microorganismos produzem bioemulsificantes em situações nas quais apenas os mecanismos de adesão não garantem o seu crescimento. Se de maneira geral esta produção incorre em uma melhora da reologia do sistema, além de estimular a biodegradação, é factível que a adição biosurfactantes a poluentes pouco solúveis em água, aumentará a disponibilidade no caso da não produção de agentes tensoativos pela população presente.

Ocorre que o pré-tratamento de óleo com agentes emulsificantes tanto pode inibir, quanto estimular a sua biodegradação (ROSENBERG *et al.*, 1992). HOMMEL (1990) relatou que microorganismos como *Candida lipolytica* e *Acinetobacter calcoaceticus*, apesar de serem espécies produtoras de bioemulsificantes, são fortemente inibidas pela adição de certos surfactantes. Este fenômeno se encontra provavelmente correlacionado à repressão de seus equipamentos enzimáticos. Enquanto os biosurfactantes iônicos provocam a pseudosolubilização de alcanos e aumentam a área superficial das gotículas de óleo, os não iônicos promovem a hidrofobicidade da superfície celular, facilitando a aderência e o subsequente transporte passivo de alcanos para o interior da célula.

De acordo com a classificação de Zajic & Mahomedy (1984), podem-se dividir os biosurfactantes em: glicolipídeos, lipossacarídeos, lipopeptídeos, fosfolipídios e ácidos graxos. A Figura 29 mostra dois exemplos de glicolipídios: soforolipóidio e raminolipídio.

A recuperação de petróleo em poços maduros pode ser conduzida por processos mecânicos (injeção de água) (Enhanced Oil Recovery - EOR) ou por processos e produtos microbianos (Microbiologically Enhanced Oil Recovery - MEOR). Quando se aplica o processo MEOR, lança-se mão de microrganismos que produzem uma variedade de biomoléculas como biosurfactantes, polissacarídeos, capazes de reduzirem a tensão interfacial entre a rocha e o óleo, o que promove a movimentação do mesmo através dos poros das rochas (BANAT *et al.*, 2000). A recuperação por MEOR pode chegar a percentuais próximos a 62% (MAKKAR & CAMEOTRA 1997).

Finalmente, estas moléculas anfífilas apresentam importante papel no processo de biorremediação de solos impactados, emulsionando hidrocarbonetos, aumentando a solubilidade e disponibilizando-os para a biodegradação realizada pelos microrganismos autóctones (BANAT *et al.*, 2000; SHULGA *et al.*, 2000); na limpeza de reservatórios de óleo, promovendo a redução da viscosidade de metais pesados e a formação de emulsões óleo/água, facilitando a recuperação e transporte em oleodutos (BANAT *et al.*, 2000).

Há pelo menos duas maneiras pelas quais os biosurfactantes estão envolvidos na biodegradação de hidrocarbonetos: através do aumento da superfície de contato do material oleoso e do aumento da biodisponibilidade do hidrocarboneto. Neste último caso, o biosurfactante atua na dessorção das moléculas do hidrocarboneto de baixa solubilidade (RON & ROSEMBERG, 2002).

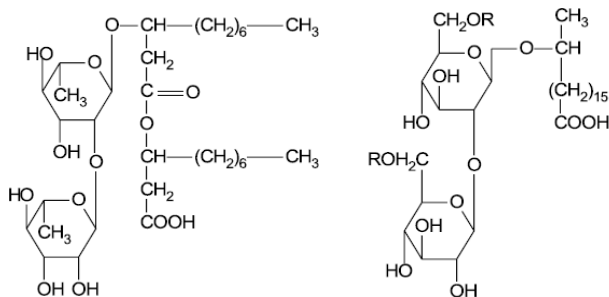


Figura 29: Estruturas de biossurfactantes (esquerda: sofrorolípido; direita: raminolípido) (Fonte: GOMES, 2008).

Muito embora se dê bastante atenção à importância da manutenção das condições de favorecimento do crescimento microbiano, a grande parte dos estudos neste campo ainda negligencia a questão dos fenômenos de transporte dos nutrientes, do oxigênio e outras substâncias entre o meio e as células. No entanto, os mecanismos de transporte, em especial aqueles que se dão na interface, desempenham papel fundamental e até mesmo controlador nos processos de assimilação dos mais diversos compostos pelos microorganismos; podendo ocorrer tanto através do fluxo convectivo como por difusão.

Como se sabe, a biodegradação de hidrocarbonetos se dá em um sistema multifásico, que envolve gases (O₂/CO₂), material orgânico insolúvel em água, água, sais dissolvidos, sólidos e microorganismos. Devido à imiscibilidade do óleo na água, a interface óleo/água se torna bem distinta, favorecendo a atração de células com maior caráter hidrofóbico. Logicamente, o organismo que tiver relativa hidrofobicidade conjugada à habilidade de metabolizar hidrocarbonetos vai obter mais vantagens desta adesão (NEUFELD *et al.*, 1980). Esta adesão à interface é ideal, pois da mesma forma que os agentes decompositores buscam a fonte de carbono na fase orgânica, eles também necessitam de nutrientes e de oxigênio (indispensável aos processos oxidativos de degradação) que se encontram disponíveis na fase aquosa. Logo, com o propósito de solucionar as questões nutricionais e respiratórias, tanto bactérias quanto fungos tendem a se desenvolver, justamente na interface água/óleo. Por este motivo, meios emulsionados propiciam o estabelecimento de uma densa população microbiana.

Quanto à adesão de organismos a gotas de óleo, ao contrário do que freqüentemente se pensa, não são apenas as bactérias degradadoras de hidrocarbonetos que exibem esta propriedade, e nem todos os microorganismos consumidores deste tipo de matéria orgânica são capazes de se estabelecer em superfícies oleosas (ROSENBERG, 1991). É o caso de *Pseudomonas aeruginosa*, espécie reconhecidamente hábil em consumir fontes de carbono hidrocarbônicas. Desta forma, a metabolização do substrato não parece ser a única razão de ser do crescimento de bactérias em interfaces água-óleo. O fator que controla o fenômeno de adesão é a hidrofobicidade que os microorganismos podem apresentar. Assim sendo, ensaios de adesão microbiana a hidrocarbonetos vêm

servindo como importante ferramenta na avaliação do grau de hidrofobicidade das superfícies celulares.

Além dos desafios decorrentes do estabelecimento dos microorganismos em sistemas tão complexos, surge também a dificuldade de mantê-los em concentrações compatíveis com a necessidade de se obter altas conversões dos poluentes. É neste ponto que surge o potencial de utilização de métodos de imobilização celular.

A alta hidrofobicidade oferecida pela membrana celular de algumas espécies bacterianas é causada pela presença de substâncias hidrofóbicas não polares, de origem graxa, que favorecem a migração da célula para a fase oleosa. Já espécies que não possuem hidrofobicidade tão acentuada são capazes de se estabelecer na interface óleo/água e de retornar à fase aquosa.

NEUFELD *et al.* (1980) demonstraram que no início do processo de biodegradação de hexadecano por *Acinetobacter calcoaceticus* em reator (primeiras dez horas) toda a população se encontrava aderida à fase orgânica, fenômeno comprovado analiticamente e visualizado pelo clareamento do meio reacional quando da interrupção da agitação e da aeração, clareamento este provocado pela total concentração das células na fase orgânica sobrenadante. A situação se alterou entre 10 e 18 horas de operação, quando 85% das células haviam migrado da fase orgânica e da interface para a fase aquosa. Tal alteração foi acompanhada por decréscimos das tensões interfacial e superficial, entre 10 e 14 horas de teste. A referida queda de tensão superficial coincidiu com a produção de bioemulsificantes durante a fase exponencial de crescimento, a qual totalizou 13 horas. Neste estudo, os pesquisadores verificaram que ao criarem condições de agitação, aeração e concentrações de substrato favoráveis, foi possível magnificar uma habilidade biológica da espécie em questão, bastante útil à assimilação do hidrocarboneto, muito embora não tenham relacionado as mudanças ocorridas no meio à extensão da biodegradação.

Os agentes emulsificantes facilitam a biodegradação, já que aumentam, através da formação de gotículas, a superfície de contato entre as fases de interesse. Tal característica foi verificada por ROJAS (1993), que após ter isolado algumas bactérias do petróleo, pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, pôde associar a produção de biosurfactantes ao grau de biodegradação de óleo cru pesado. As substâncias com poder surfactante levam à organização dos hidrocarbonetos em pequenas micelas, aumentando sua solubilidade e favorecendo o adensamento celular. Conseqüentemente, as taxas de consumo sofrem incrementos significativos (BURY & MILLER, 1993). Contraditoriamente, para alguns autores, os biosurfactantes são biopolímeros que de maneira geral não reduzem a tensão interfacial, embora dificultem a coalescência de gotas de óleo (HOMMEL, 1990). Podemos citar como exemplo o EMULSAN (biopolímero excretado pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* quando em meio de crescimento à base de etanol ou alcanos) e do LIPOSAN (produzido em meios contendo alcanos de cadeia longa, metabolizados por *Candida lipolytica*).

A maioria dos autores, no entanto, afirma que a ocorrência de biosurfactantes promove justamente a queda da tensão superficial da fase aquosa, estabilizando, com isto, as emulsões de óleo em água (COOPER & GOLDENBERG, 1987). Esta queda de tensão é comum em processos de degradação de hidrocarbonetos, nos quais os microorganismos presentes passam a produzir agentes tensoativos

extracelulares, compostos por uma mistura de ácidos carboxílicos e lipídios neutros, tais como ésteres, álcoois e glicerídeos. As microemulsões podem ser geradas a partir de agitação, embora as gotículas voltem a coalescer. Já as microemulsões provocadas pela ação microbiana tendem à estabilidade, aumentando o transporte de hidrocarbonetos.

Os bioemulsificantes em geral apresentam uma composição similar à da parede celular dos microorganismos. Alguns, no entanto, possuem estrutura definida: a porção lipofílica é usualmente hidrocarbônica, formada por um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados. Este ácido graxo se liga ao grupo hidrofílico, através de uma ponte glicosídica, estérica ou amídica.

Hommel (1990) exemplificou a ação positiva de surfactantes extracelulares no processo de biodegradação de uma mistura de hidrocarbonetos, por uma população bacteriana oriunda do solo, em reatores agitados. Naturalmente, primeiro ocorreu o consumo de componentes solúveis em água. Em seguida, a produção de biosurfactantes coincidiu com a quase completa exaustão dos alcanos. Neste caso, a adição de diferentes bioemulsificantes ao sistema gerou a duplicação da taxa de degradação dos poluentes. Além disto, a fase de adaptação foi reduzida e, posteriormente, observou-se a degradação do agente emulsificante adicionado, concomitantemente à síntese de glicolipídios com poderes surfactantes. Resultados menos favoráveis foram obtidos por Foght *et al.* (1989) quando do pré-tratamento de óleo cru com EMULSAN: a comparação entre o grau de biodegradação em amostras pré-tratadas e não tratadas revelou que a ação do emulsificante comprometia o processo, uma vez que reduzia o consumo dos contaminantes. Em termos de alcanos lineares e outros hidrocarbonetos saturados, a queda da extensão da biodegradação alcançou patamares de 50 a 90%, tanto em sistemas constituídos por populações mistas, quanto por culturas puras. Já para os compostos aromáticos houve um decréscimo da degradação de 90% em culturas mistas, sendo que as culturas puras não foram afetadas pelo EMULSAN, tendo mesmo sido ligeiramente estimuladas.

Uma aplicação dos bioemulsificantes realmente inovadora vem sendo posta em prática no Instituto Colombiano del Petróleo - ECOPEPETROL. DÍAZ & GROSSO (em documento de circulação interna não datado) citam que os biosurfactantes produzidos por espécies do gênero *Pseudomonas* têm auxiliado no transporte de hidrocarbonetos pesados em tubulações, na preparação de combustíveis não convencionais a partir de óleos combustíveis pesados, na biodegradação de borras oleosas, assim como em vários outros segmentos da indústria, como por exemplo na lixiviação de minerais, na agricultura, em alimentos, bebidas, fármacos, couro, papel, têxteis e cosméticos. Nota-se, por aí que o número de utilidades dos biosurfactantes se amplia, trazendo consigo novas perspectivas ao ramo da biotecnologia.

Neste contexto, não se pode deixar de apresentar a possibilidade de emprego de agentes surfactantes de origem sintética, no caso específico de tratamento de borras oleosas. Um agente tensoativo sintético hoje bastante empregado é o TWEEN 80 ("polyoxyethylene sorbitan monooleate"). A pré-solubilização de hidrocarbonetos pesados com este emulsificante foi realizada com sucesso por Janiyani *et al.* (1993): através da quantificação do carbono orgânico total (TOC) na fase aquosa, foi possível a observação do incremento da carga orgânica nesta fase após adição de TWEEN, o que evidenciou o processo de solubilização. O

trabalho apontou para a facilitação do ataque dos hidrocarbonetos pelos microorganismos, resultado da solubilização dos componentes do óleo em água, embora nenhum teste posterior tenha sido feito, a fim de verificar possíveis inibições por parte deste surfactante, ou mesmo a provável utilização do mesmo como fonte alternativa de carbono, em detrimento da matéria orgânica presente.

Outro fator que influencia a extensão da biodegradação e também está relacionado aos fenômenos interfaciais é à disponibilidade de nutrientes.

Rosenberg *et al.* (1992) chamaram a atenção para o fato de que da mesma forma que a microbiota desenvolve mecanismos de coesão às gotículas de óleo, ela também é capaz de provocar a desorção das fontes já esgotadas. Esta habilidade é imprescindível à continuidade da degradação. Tais pesquisadores apontaram a questão nutricional como a maior limitante da biorremediação. Segundo eles, a alta solubilidade dos sais de fosfato e das fontes de nitrogênio em água ocasiona uma rápida diluição dos mesmos, causando a perda de eficiência do processo em sistemas abertos. A fim de contornar este problema, foi sugerido o uso de fertilizantes hidrofóbicos, a base de polímeros modificados de uréia-formaldeído. Os polímeros são passíveis de despolimerização, efetuada por microorganismos, sempre que liberados aos poucos no meio de crescimento.

Um fertilizante oleofílico muito estudado em derrames no mar foi o INIPOL EAP22, uma microemulsão de óleo em água, contendo ácido oleico, lauril-fosfato, 2-butoxil-1-etanol, uréia e água. O uso deste tipo de fertilizante, no entanto, trouxe uma série de desvantagens: contendo grandes quantidades de ácido oléico (que aliás passou a servir como uma fonte alternativa de carbono), esta substância tornou-se responsável pelo aumento da relação C:N no ambiente. Além disto, suspeitou-se que o emulsificante poderia oferecer perigo ao ecossistema marinho. Adicionalmente, assim que o fertilizante entrava em contato com a água, a emulsão se quebrava, liberando uréia para a fase aquosa e deixando o nitrogênio indisponível aos microorganismos. Como consequência destes problemas, a utilização de tais compostos, que já se encontrava limitada a casos de acidentes ou derrames, restringiu-se ainda mais. No caso de sistemas fechados (tratamento de efluentes oleosos), seu emprego não foi nem cogitado, face às facilidades de manutenção das condições nutricionais ideais.

Uma forma de minimizar as questões de transferência e de suplantar as limitações impostas pelos fenômenos interfaciais seria substituir células íntegras por enzimas e efetuar o tratamento de poluentes em solventes orgânicos e não dispersos em água.

Alguns trabalhos já citam a degradação de compostos aromáticos, por via enzimática, em sistemas compostos por solventes orgânicos miscíveis à água, como o metanol, isopropanol, N,N-dimetilformamida, acetonitrila e tetrahydrofurano (VAZQUEZ-DUHALT *et al.*, 1994). É claro que nestes processos não há limitações quanto à transferência de massa, no entanto, torna-se necessária a prévia formulação biológica da enzima, além da sua separação e purificação. Passam a existir, portanto, outros empecilhos, ditados pela especificidade das próprias enzimas, pelo risco de perda de atividade e pela elevação substancial do custo de processo.

7. Aspectos Físico-químicos e Ambientais da Biodegradação de Hidrocarbonetos

Como descrito anteriormente, a biodegradação de materiais orgânicos no ambiente é mediada geralmente por bactérias e fungos. As bactérias possuem características metabólicas diversas que as colocam num grupo de microrganismos de reconhecida atividade degradadora. Variabilidade genética, crescimento rápido e facilidade para se aclimatar rapidamente em diversos ambientes são as principais características. Essas características são fundamentais na seleção de microrganismos para processos de biorremediação. A otimização de parâmetros como: pH, nutrientes, oxigênio e temperatura possibilitam um melhor desempenho dos microrganismos na biodegradação. Uma máxima eficiência nesse processo de biodegradação levará a mineralização do poluente com a produção de CO₂ e água (FRANKENBERGER Jr, 1992; ATLAS & BARTHA, 1972).

Citaremos aqui alguns aspectos de relevância para a biodegradação.

▪ Disponibilidade de Oxigênio

Geralmente, sob condições aeróbicas, a biorremediação ocorre mais facilmente. Regiões próximas à superfície do solo têm demonstrado maior taxa de biodegradação, enquanto que em regiões mais profundas verifica-se que estas taxas diminuem.

▪ Presença de Matéria Orgânica

A presença de matéria orgânica pode indicar a presença de elementos alternativos que aumentam a taxa de biodegradação (IJAH, 1998). Este fenômeno, largamente estudado, é comumente chamado de cometabolismo (ATLAS, 1984; ALEXANDER, 1994; MAIER, 1999). Atentamos para esta conceituação, levando em consideração as discussões suscitadas por Alexander (1994), nas quais o autor chama a atenção para algumas discordâncias de ordem semântica. Classicamente, o termo cometabolismo tem sido utilizado para descrever o fenômeno em que microrganismos utilizam mais de um substrato. Nesta visão, cometabolismo se refere unicamente ao fenômeno em que os microrganismos assimilam um substrato que não é utilizado para o crescimento, mas que é metabolizado na presença de um segundo substrato que dá suporte ao crescimento. A idéia de cometabolismo aqui adotada, entretanto, é aquela utilizada na obra de Alexander (1994), "*Biodegradation and Biodeterioration*", cuja conceituação, por sua vez, está respaldada e fundamentada nos diversos trabalhos que nesta obra estão discutidos. Segundo este autor, cometabolismo é a "*transformação de um composto orgânico por um microrganismo inapto a utilizá-lo (ou inapto a utilizar algum de seus constituintes) como fonte de carbono e energia*". Desta forma, por exemplo, um determinado microrganismo pode oxidar compostos orgânicos sem crescer sua população às expensas desta oxidação e, por sua vez, os compostos oxidados estarão bioquimicamente disponíveis a outro grupo de microrganismos. Este segundo grupo de microrganismos cresce às expensas desses compostos oxidados e os degrada a moléculas de tamanhos diferentes as quais poderão ser substrato para crescimento de outro grupo e assim sucessivamente. A idéia de "co", neste conceito, refere-se à atuação conjunta de dois ou mais grupos microbianos. Na

conceituação clássica, a idéia de “co”, parece estar ligada apenas ao fato de termos mais de um substrato envolvido no fenômeno.

▪ **Disponibilidade de Nitrogênio e Fósforo**

Bactérias heterotróficas e fungos, além de uma fonte de carbono, necessitam para o crescimento, de um outro grupo de nutrientes e de um aceptor de elétrons. Este aceptor de elétrons é o O₂ para os aeróbios, mas pode ser nitrato, sulfato, CO₂, ferro férrico ou compostos orgânicos para bactérias que têm habilidades para utilizar essas substâncias como aceptor de elétrons no processo de metabolização da fonte de energia. Muitas bactérias ou fungos requerem baixas concentrações de vitaminas, aminoácidos, vitaminas lipossolúveis, que são moléculas orgânicas chamadas de fatores de crescimento. A ausência dessas moléculas no ambiente pode prejudicar o crescimento microbiano (ATLAS & BARTHA 1972). Descargas de óleo por vazamentos acidentais de tanques de navios, em ambientes marinhos e estuarinos, têm suscitado muitos estudos a respeito das condições nutricionais em tais ambientes. Estas investigações mostram que a degradação do óleo em água do mar é mais rápida quando compostos à base de nitrogênio e fósforo são adicionados (FERNANDES, 1994; RAMADAN, 1990).

▪ **Temperatura**

A temperatura varia de ambiente para ambiente e de acordo com a sazonalidade. Para um determinado aumento ou decréscimo de temperatura a magnitude da resposta quanto à biodegradação varia com o ambiente e com o tipo de poluente, o que é refletido na fisiologia dos microrganismos envolvidos. Em geral, temperaturas ideais para a biodegradação estão na faixa entre 20 e 35°C (LEAHY & COLWELL, 1990).

▪ **pH**

Para a maioria dos microrganismos envolvidos no processo de biorremediação, a faixa de pH mais favorável para o seu crescimento se situa entre 6,0 e 8,0 com um valor ótimo em torno de 7,0, sendo que os fungos são mais tolerantes às condições ácidas. Em solos, os valores de pH podem ser muito variados, estendendo-se desde de 2,5 a 11,0 em solos ácidos e em desertos alcalinos, respectivamente. Esse parâmetro nesses valores extremos influencia negativamente a capacidade dos microrganismos degradarem hidrocarbonetos em solo (ATLAS, 1998; LEAHY & COLWELL, 1990).

▪ **Salinidade**

Alta salinidade parece afetar negativamente a atividade microbiana. É sabido que os fungos resistem menos às condições de alta salinidade do que as bactérias. Em ambientes costeiros, a biorremediação é afetada pela alta concentração salina (YANG *et al.*, 1999; DEL'ARCO & FRANÇA, 1999).

▪ **Atividade de Água**

A atividade de água se refere à quantidade de água que efetivamente está disponível para os microrganismos no processo de biodegradação. Esta atividade está condicionada ao tipo de solo e à estrutura do poluente (DIBBLE & BARTHA, 1976).

Além dos fatores já mencionados, pode-se citar ainda um fator biótico importante, que é a predação por protozoários. Alguns protozoários são predadores naturais de bactérias e sua presença, muitas vezes, é inevitável no ambiente que precisa ser biorremediado (RAMADAM *et al.*, 1990).

8. Estudos de Ecotoxicologia e Avaliação da Ecotoxicidade dos Hidrocarbonetos

O domínio da toxicologia inclui a compreensão dos tipos de efeitos causados pelas substâncias, os processos bioquímicos e fisiológicos responsáveis por esses efeitos, as sensibilidades relativas dos diferentes tipos de organismos à exposição a estas substâncias e a toxicidade relativa das diferentes substâncias e classes de substâncias. Porém a ecotoxicologia estuda a existência das formas de toxicidade nos organismos e a relação de tais organismos no ambiente, através de testes específicos com organismos padrão, selecionados de acordo com critérios definidos, baseando-se entre outras coisas, nos níveis tróficos aos quais estes organismos pertencem (BAIRD *et al.*, 1996; CHAPMAN, 1995; CHAPMAN, 2002). Desta forma, substâncias reconhecidamente tóxicas como hidrocarbonetos, por exemplo, que freqüentemente são encontradas causando contaminação nos diversos ambientes, devem ser avaliadas quanto à sua ecotoxicidade.

Faremos aqui uma abordagem sucinta do tema ecotoxicologia, mostrando primeiramente a diferenciação entre toxicologia ambiental e ecotoxicologia, e em seguida apresentando alguns termos mais comuns utilizados neste campo. Por fim, mostraremos alguns critérios de seleção de organismos-teste e avaliação da ecotoxicidade de misturas hidrocarbônicas.

8.1 Diferenças entre Ecotoxicologia e Toxicologia Ambiental

Durante muito tempo, estudos toxicológicos do ambiente têm sido caracterizados como estudos de toxicologia ambiental. Tais estudos são conduzidos independentemente de considerações ecológicas e subseqüentemente comparados com estudos ecológicos por aproximação. Porém, muitas considerações sobre ecologia, são em geral mais extrínsecas do que intrínsecas e estes testes clássicos, embora conduzidos com organismos que podem ser facilmente isolados e testados, não levam em conta a significância ecológica, ou lhe confere uma importância quase sempre secundária (INGERSOLL *et al.*, 1997).

Entretanto, uma mudança de paradigma surge no campo da observação dos efeitos tóxicos das substâncias, assumindo crescente importância na predição e avaliação dos riscos ao meio ambiente e às comunidades, levando em conta os aspectos fisiológicos e, sobretudo as relações tróficas dos organismos-teste. O termo "**toxicologia ambiental**" dá lugar ao termo **ecotoxicologia**, que compreende a integração entre os domínios da toxicologia e da ecologia, e tem por objetivo entender e prever os efeitos das substâncias tóxicas nas comunidades naturais sob condições realísticas de exposição (CHAPMAN, 2002).

Os primeiros estudos no campo da ecotoxicologia surgiram junto com a necessidade de se estabelecer critérios para estudar os efeitos tóxicos de determinadas substâncias poluentes sobre a biota, a fim de se ter um controle da

emissão de poluentes no ambiente, ou de se estabelecer parâmetros para saber quais os níveis toleráveis de poluição (ABEL, 1991; CHAPMAN, 1995; CHAPMAN, 2002). Frequentemente, as maiores dificuldades encontradas têm sido as de se determinar a abrangência de tais efeitos nos organismos e a representatividade que esses efeitos observados para um grupo de organismos possam ter para uma comunidade. Os efeitos tóxicos das substâncias nos organismos vivos podem se manifestar em diferentes níveis: sub-celular ou celular, nos tecidos, nos órgãos ou no organismo inteiro. Embora o conhecimento do mecanismo de ação seja muito importante para fins de estudos meramente toxicológicos, por si só, não é o bastante para prever danos à biota susceptível à exposição ao poluente (ABEL, 1991).

O surgimento da ecotoxicologia em contraposição à toxicologia ambiental sugere um novo olhar sobre os testes clássicos de toxicidade realizados com espécies isoladas, os quais não visam relacionar os efeitos das substâncias tóxicas sobre as comunidades ou sobre a combinação de espécies pertencentes a níveis tróficos diferentes. Algumas espécies testadas de forma combinada, podem inclusive resultar em uma reduzida toxicidade quando comparadas com espécies isoladas, e membros de uma comunidade podem magnificar seu desempenho funcional além do que seria esperado de uma simples contribuição aditiva de cada membro da comunidade.

Existe uma preocupação que parece emblemática na toxicologia ambiental, que são os custos com os testes e a concentração da substância tóxica. Para a toxicologia ambiental, o foco, em primeira instância, não é a solução dos problemas relacionados à ecotoxicologia, mas sim a solução dos problemas relacionados ao teste. Em contrapartida, a preocupação da ecotoxicologia é, sobretudo, com os custos de uma decisão incorreta, os quais serão tão maiores quanto forem os níveis de destruição causados pelas substâncias ou mesmo por desequilíbrios entre os membros da comunidade, uma vez que a substância tóxica é, em última análise, apenas um dos aspectos avaliados pela ecotoxicologia.

8.2 Algumas Definições em Ecotoxicologia

A seguir, mostraremos as definições de alguns termos recorrentes empregados nos estudos de Ecotoxicologia e nos ensaios / testes de Ecotoxicidade.

Agente tóxico: substância ou outro material, tal como formulação química, efluente líquido, ou água do mar superficial ou intersticial que pode causar efeitos danosos quando em contato com organismos-teste (Nascimento *et al.*, 2002).

CE₅₀: Estimativa da concentração da amostra utilizada que causa um efeito subletal a cinquenta por cento dos organismos expostos (Nascimento *et al.*, 2002).

Ciclo de vida: Fases, mudanças ou estágios pelos quais um organismo passa durante a vida desde a etapa de célula ovo até a fase reprodutiva (Nascimento *et al.*, 2002).

CI₅₀: Estimativa da concentração da amostra utilizada que causa um efeito inibitório a cinquenta por cento dos organismos-teste durante o período de exposição às condições do teste (Nascimento *et al.*, 2002).

CL₅₀: Estimativa da concentração da amostra utilizada que é letal para cinquenta por cento dos organismos expostos, sob condições específicas, no período do teste. Pode ser estatisticamente ou graficamente determinada.

Concentração de Efeito Não-Observado (CENO): Maior concentração de agente tóxico que não causa efeito deletério estatisticamente significativo sobre o organismo-teste, durante o tempo experimental de exposição, às condições do teste.

Concentração de Efeito Observado (CEO): Menor concentração de algum agente tóxico que causa efeito deletério estatisticamente significativo sobre os organismos-teste, num determinado período de exposição, às condições do teste.

Contaminante e poluente: Podem ser descritos separadamente, mas são freqüentemente utilizados como sinônimos. Ambos são empregados para descrever substâncias químicas que são encontradas em níveis acima daqueles que normalmente seriam esperados. Poluentes têm o potencial de causar danos, enquanto que contaminantes são necessariamente danosos. Esta é talvez uma distinção não muito fácil de fazer. Se um contaminante é ou não poluente, pode depender do seu nível no ambiente e o organismo ou sistema a ser considerado. Desta forma, uma substância em particular pode ser um **contaminante** em relação a uma espécie, mas **poluente** em relação à outra. Por fim, na prática muitas vezes fica difícil de demonstrar que o dano não está sendo causado, e freqüentemente poluente e contaminante tornam-se sinônimos.

Efeito agudo: Efeito deletério causado por agentes tóxicos aos organismos vivos, num curto período de exposição.

Efeito crônico: Efeito deletério causado por agentes tóxicos aos organismos vivos, que normalmente manifesta-se após dias ou anos, dependendo do ciclo vital da espécie estudada.

Efeito sub-letal: Resposta a um agente tóxico, em uma concentração que está abaixo do nível que causa morte.

Eluição: Dessorção provocada por um fluxo de líquido ou de gás através de um adsorvente.

Organismo-teste: Organismo utilizado no teste de toxicidade / avaliação da ecotoxicidade.

TIE: "Toxicity Identification Evaluation": É a expressão consagrada na língua inglesa usada para designar os **Estudos de Avaliação da Toxicidade e Identificação dos Agentes Tóxicos**. Consiste de uma série de procedimentos utilizados para identificar agentes químicos específicos, responsáveis pela toxicidade de uma amostra composta.

Toxicidade: Capacidade inerente a uma substância ou amostra ambiental de causar um efeito deletério a organismos vivos.

Toxicidade aguda: Condição na qual os efeitos observáveis aos organismos-teste ocorrem em curto espaço de tempo.

Toxicidade crônica: É aquela que resulta da exposição contínua a uma substância.

Xenobiótico: Esse termo é usado para de descrever compostos que são incomuns a um determinado organismo, ou seja, tais compostos não desempenham nenhum papel na bioquímica normal deste organismo. Uma substância que é normal para um organismo pode ser estranha para outro, o que nos faz inferir que os xenobióticos podem ocorrer naturalmente ou podem ser resultantes de ações antrópicas (Walker *et al* 1996). O termo **xenobiótico** muitas vezes também é usado para descrever substâncias estranhas ao ambiente ou exógenas (Römbke & Moltmann 1995).

8.3 Organismos-teste

Há dois temas-chave nos estudos de ecotoxicidade: as respostas crônicas e agudas e os critérios para seleção das espécies. Para escolher o organismo padrão, são necessários alguns critérios. Um deles é a disponibilidade do organismo no ambiente. Este critério leva em conta a existência em grande quantidade do organismo e a sua relação direta com o equilíbrio do ambiente, porém pode apresentar falha com relação à exatidão dos resultados e a aproximação das condições realísticas (CHAPMAN, 1995; 2002).

A substância tóxica pode atuar direta ou indiretamente no organismo-teste. De forma direta, causa mortalidade em curto prazo e, indiretamente, causa toxicidade aguda em produtores ou consumidores primários, ou toxicidade crônica em níveis tróficos subseqüentes. Desta forma, para uma resposta mais abrangente faz-se necessário o estudo da toxicidade da substância nos quatro níveis tróficos: produtor, consumidor primário, consumidor secundário e decompositor (CALOW, 1996).

Chapman (1999) sugere critérios para seleção de organismos-teste, dos quais listamos a seguir os mais comumente referidos pela maioria dos autores:

- I. Os organismos devem pertencer a espécies chaves ou dominantes, que serão identificadas por estudos de comunidade de base;
- II. Disponibilidade do organismo – o organismo deve estar razoavelmente disponível;
- III. Os *endpoints* devem ser toxicologicamente e ecologicamente relevantes;
- IV. As respostas devem ser consistentes e mensuráveis em relação aos tóxicos testados;
- V. Os organismos devem ser facilmente testados em campo e laboratório.

A ecotoxicologia marinha tem ganhado grande destaque, sobretudo devido ao fato de que os grandes centros urbanos mundiais localizam-se em sua grande maioria no litoral e desta forma, o aporte de substâncias tóxicas poluentes aos ambientes marinhos é muito grande. Agregando-se a este cenário a grande visibilidade dos incidentes envolvendo a liberação de hidrocarbonetos nos mares e oceanos, optamos por citar aqui alguns organismos marinhos ou de ambientes estuarinos e dulciaquícolas utilizados em testes de toxicidade para avaliação

ecotoxicológica, que são empregados em ensaios envolvendo misturas hidrocarbônicas.

▪ Microalgas

As microalgas planctônicas habitam as camadas de superfície de todas as águas interiores e marinhas. São os principais produtores de matéria orgânica para os demais organismos aquáticos. As diferentes espécies de microalgas respondem de forma diferente aos compostos dissolvidos. A espécie mais adequada deverá ter: alta taxa de crescimento; respostas fisiológicas bem conhecidas quanto a fatores abióticos como radiação luminosa, temperatura e salinidade; necessidades nutricionais bem conhecidas; pequena variabilidade genética e fenotípica; disponibilidade de obtenção em cultivo; boa caracterização taxonômica e facilidade de manuseio em laboratório.

As espécies costeiras mais utilizadas são: *Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum*, *Minutocellus polymorphus*, *Thalassiosira pseudonana*, *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis chuii*, *Chaetoceros calcitrans*. Entre outras espécies dulciaquícolas a espécie *Pseudokirchneriella subcaptata* é a mais utilizada (Figura 30).



Figura 30: Frascos com cultura crescida de *P. subcaptata* (Fonte: Gomes, 2008)

▪ Ostras e Mexilhões

Testes de toxicidade com embriões de ostras, mexilhões e outros bivalves vêm sendo realizados desde a década de 1960, nos Estados Unidos, Canadá e em alguns países da Europa. Em países de clima temperado são usados embriões de algumas espécies de bivalves na avaliação da toxicidade de compostos químicos e amostras de água e sedimentos contaminados, coletados em campo. *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea virginica*, *Crassostrea gigas* e *Mercenaria mercenaria* são as espécies mais utilizadas nesses países.

No Brasil, testes de toxicidade com espécies de ostra *Crassostrea rhizophorae* e de mexilhão *Perna perna* já são bastante utilizados, necessitando porém, de testes mais abrangentes envolvendo maior número de espécies nativas (Figura 31).

Ensaio com estágios embriolrvariais destes organismos são importantes no diagnóstico da contaminação ambiental por se tratarem de fases mais sensíveis do ciclo de vida.

▪ **Echinodermatas**

Estudos com a utilização de gametas de ouriço-do-mar vêm sendo realizados desde a década de 1960. Características como amplo conhecimento da embriologia, facilidade de obtenção e manuseio, e ainda, o sincronismo do seu desenvolvimento fazem do ouriço-do-mar um excelente indicador biológico. Testes com embriões de algumas espécies de ouriço-do-mar foram padronizados pela US-EPA em 1991 e pela *Environment Canada* em 1992.

No Brasil, testes de toxicidade crnica são realizados com embriões das espécies *Echinometra lucunter* e *Lytechinus variegatus* (Figuras 32 e 33).

▪ **Crustáceos**

Testes com crustáceos como *Artemia sp.*, misidceos (crustacea: Mysidacea) são realizados com base na sensibilidade a vários agentes tóxicos, na facilidade do seu manuseio e cultivo, desenvolvimento direto e ciclo de vida curto (Figura 34).

Em particular, testes com misidceos no Brasil têm sido utilizados para avaliar a toxicidade de produtos químicos.

8.4 Ensaio de Ecotoxicidade Utilizando a Fração Solúvel em água dos Hidrocarbonetos

Os testes de toxicidade desempenham um papel muito importante na detecção de contaminantes potencialmente danosos ao meio ambiente. Os hidrocarbonetos de petróleo são em sua grande maioria pouco solúveis em água, e como tem sido evidenciado e discutido em seções anteriores, as substâncias de menores massas moleculares, em geral, possuem maior solubilidade e maior toxicidade.

A dissolução de uma mistura hidrocarbônica como a gasolina, por exemplo, ocorre quando compostos mono e dicclicos aromáticos bem como compostos polares são incorporados à fração solúvel em gua. A absorção da fração solúvel em água, acompanhada da incorporação de quantidades sub-letais de hidrocarbonetos, representa a rota de exposição geradora dos efeitos tóxicos primários no fitoplâncton e na maioria dos embriões de invertebrados.

Em particular, os testes envolvendo hidrocarbonetos de petróleo, prevêem a utilização da fração solúvel em gua (**FSA**) desses hidrocarbonetos. Tais testes seguem metodologias consagradas de extração da **FSA**. Em geral, utilizam-se frascos tipo Mariott, nos quais o material é adicionado a meio de cultura ou água do mar sinttica, ou mesmo água do mar esterilizada, sob agitação durante um dado período de tempo após o qual é retirada uma alíquota da fase aquosa (Figura 35).

8.5 Considerações Acerca dos Estudos de Ecotoxicologia

Embora os estudos de ecotoxicologia apontem para uma avaliação global e mais realística dos efeitos das substâncias tóxicas sobre os organismos,  observável a

existência de uma lacuna entre as respostas fisiológicas dos organismos e as concentrações das substâncias tóxicas obtidas através do emprego de metodologias de extração e quantificação. Se, por um lado, os testes ecotoxicológicos indicam as concentrações letais ou tóxicas efetivas de determinadas substâncias para os organismos, por outro lado, fenômenos químicos relacionados às interações ocorridas entre as substâncias químicas e a matriz à qual elas estão ligadas, podem tornar tais substâncias menos biodisponíveis embora as metodologias analíticas de extração e quantificação culminem numa resposta indicativa de altos valores de concentração. Assim, muitas vezes os valores das concentrações das substâncias encontrados mediante emprego de análises químicas não estão relacionados diretamente a uma resposta tóxica, mas sim a uma magnificação da extração. Igualmente, as determinações analíticas não são capazes de prever os efeitos sinérgicos entre diferentes substâncias (ARAÚJO & NASCIMENTO, 1999). Diante destas constatações, novos esforços estão sendo empreendidos na perspectiva de convergir respostas fisiológicas e químicas, para que se estabeleçam novos parâmetros avaliativos de ecotoxicidade; parâmetros estes que sejam integradores e abrangentes, sem perder, contudo o caráter prático.



Figura 31: Estágios embriolarvais de *C. rhizophorae* (Fonte: GOMES, 2008)

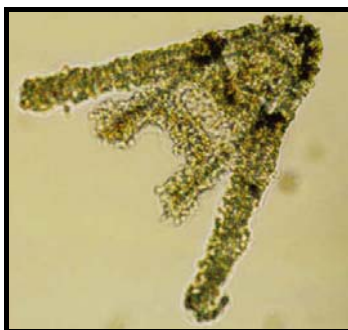


Figura 32: Estágio embriolarvar de *E. lucunter* (Fonte: Gomes, 2008)



Figura 33: Espécimes adultos de *E. lucunter* (Fonte: Gomes, 2008).



Figura 34: Espécie *Artemia salina* (Fonte: www.akvaryum.com).



Figura 35: Extração da fração solúvel em água em frascos tipo Mariott (Fonte: GOMES, 2008).

9. Considerações Finais

Todos os avanços recentes na Biotecnologia Ambiental concernentes aos tratamentos de resíduos do setor petrolífero convergem para a utilização cada vez mais freqüente dos recursos modernos da Biologia Molecular, bem como das técnicas e estudos de Ecotoxicologia.

Dadas as exigências crescentes no âmbito da qualidade ambiental dos resíduos gerados nas diversas etapas da cadeia produtiva do petróleo, os tratamentos desses resíduos devem levar em conta mais do que nunca, a efetividade dos processos relacionada à qualidade ambiental. Os objetivos do emprego de técnicas biotecnológicas no tratamento de resíduos apontam, por tanto, para a obtenção de altas taxas de biodegradação associadas a uma redução a níveis toleráveis de ecotoxicidade. Por outro lado, novas estratégias de seleção e investigação de espécies microbianas envolvidas na biodegradação de hidrocarbonetos, são sustentadas por técnicas moleculares. É importante salientarmos que, com o advento do emprego destas técnicas, um número ainda maior de microrganismos tem sido encontrado associado ao fenômeno da biodegradação. Além disso, esses métodos e técnicas têm sido utilizados com sucesso na composição de "pool" ou consórcios de microrganismos degradadores.

No que concerne ao processo propriamente dito, as tendências indicam a condução de processos *ex situ* que priorizem a realimentação do biorreator com carga orgânica poluente a fim de se explorar a aclimação de microrganismos potencialmente degradadores. Ao mesmo tempo, estas condições devem ser mais aproximadas das condições operacionais em que ocorrem os descartes. De maneira mais ampla, há também uma tendência à utilização de processos bióticos e abióticos combinados.

Não menos importante, é a contribuição dos estudos da utilização de biossurfactantes na biodisponibilização e biodegradação de hidrocarbonetos.

Neste sentido, da inovação, os Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos (**LADEBIO**) da UFRJ buscam posicionar-se à dianteira das pesquisas no âmbito da Biotecnologia Ambiental, a fim de melhorar os tratamentos de resíduos e borras oleosas provenientes do setor petrolífero, respaldando-se, sobretudo nas bases biotecnológicas e da engenharia de bioprocessos.

Com base nas suas pesquisas no campo do tratamento de borras oleosas de refino e produção, de borras de derivados, e ainda da produção de biossurfactantes com vistas à otimização da remoção de hidrocarbonetos, é que o LADEBIO vem fortalecendo seu patrimônio intelectual e projetando-se para uma posição de destaque nesta temática.

10. Referências Bibliográficas Recomendadas

- ABEL, P. D. (1991): Approaches to measuring the toxicity of pollutants to marine organisms. In: *Ecotoxicology and Marine Environment*. New York. Ellis Horwood Limited.
- AIDAR, E.; PEREIRA, S. A.; SOUSA, E.C.P.M.; BRASIL-LIMA, G.M.S. (2002): "Testes de Ecotoxicidade com Microalgas" in *Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil*. Editores: Iracema Andrade Nascimento, Eudinetty Ceci Pereira Moreira de Sousa, Marion Nipper. Editora Artes Gráficas. 1ed. 262p. São Paulo.
- ALEXANDER, M. (1994): *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press, 2ed.
- AMELLAL, N.; PORTAL, J., M.; BERTHELIN, J.(2001): Effect of Soil Structure on the Bioavailability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons within Aggregates of a Contaminated Soil". *Applied Geochemistry*. v. 16, p. 1611-1619.
- ANP (2000): Agência Nacional do Petróleo - Portaria N° 137, de 1° de Agosto de 2000.
- API, (2000a): "Non-Aqueous Phase Liquid (NAPL) Mobility Limits in Soil," G. E. DeVaul and E. J. Brost, *Soil and Groundwater Research Bulletin No. 9*, American Petroleum Institute, Washington, DC.
- API, (2000b): "Simulation of Transport of Methyl Tert-Butyl Ether (MTBE) to Groundwater from Small Volume Releases of Gasoline in the Vadose Zone," *Soil and Groundwater Research Bulletin No. 10*, American Petroleum Institute, Washington, DC.
- API (2001): "Risk-Based Methodologies for Evaluating Petroleum Hydrocarbon Impacts at Oil and Natural Gas E&P Sites". API Publication Number 4709. American Petroleum Institute, Washington, DC.
- ARAÚJO, M.M. & NASCIMENTO, I.A. (1999): Testes Ecotoxicológicos Marinhos: Análise de sensibilidade. *Ecotoxicology and Environmental restoration*. V. 2, p.41-47.
- ARAÚJO, M.M.S & PRÓSPERI, V.A.(2002): Testes de Toxicidade Crônica com *Lytechinus variegatus* in: *Métodos em Ecotoxicologia Marinha. Aplicações no Brasil*. I.A. Nascimento, E.C.P.M. Sousa, M. Nipper editores. São Paulo.
- ARAÚJO, M.M.S.; & NASCIMENTO, I.A. (1999): Testes Ecotoxicológicos Marinhos: Análise de Sensibilidade. *Ecotoxicological and Environmental Restoration*. Coimbra-Portugal Instituto Ambiente e Vida. 2 (1) 41-47.
- ATLAS, R. M. & BARTHA, R.(1972): *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. Menlo Park, California. Benjamin/Cumins Publishing Company.
- ATLAS, R. M. (1981a): Microbial degradation of Petroleum Hydrocarbons.: An environmental Perspective. *Microbial Reviews*. v. 45, n. 1, p. 180-209.
- ATLAS, R. M. (1981b): Fate of Oil from Two Major Oil Spills: Role of microbial Degradation in Removing Oil from The AMOCO Cadiz and IXTOC I Spills. *Environmental International*. v. 5, p. 33-38.
- ATLAS, R. M. (1984): *Petroleum Microbiology*. New York. Macmillan Publishing Company.
- ATLAS, R. M. (1995a): Bioremediation of Petroleum Pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*. p. 317- 327.
- ATLAS, R. M. (1995b): *Handbook of Media for Environmental Microbiology*. London. CRC Press.

- BAIRD, D. J.; MALTBY, L.; GREIG-SMITH, P. W.; DOUBEN, P. E. T. (Editors). (1996): *ECOTOXICOLOGY: Ecological Dimensions*. Chapman Hall, London.
- BAKER, K. H.; HERSON, S. (1994): *Bioremediation*. New York. McGraw-Hill, inc. 375p.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. (2000): Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53: 495-508.
- BANERJI, S. K.; ZAPPI, M. E.; TEETER, C.L., GUNNISON, D.; CULLINANE, M. J. & MORGAN, R. T. (1995). "Bioremediation of soils contaminated with petroleum hydrocarbons using bioslurry reactors". U.S. Army Corps of Engineers, Washington,DC, october, 61p.
- BARTHA, R. & ATLAS, R.M. (1977): *The Microbiology of Aquatic Oil Spills Advances in Applied Microbiology*. Volume 22, 1977, Pages 225-266.
- BILLET, S.; ABBAS, I.; Le Goff, J.; VERDIN, A.; ANDRE, V.; LAFARGUE, P.; HACHIMI, A.; FRANÇOIS, CAZIER, F.; SICHEL, F.; SHIRALI, P.; GARÇON, G. (2008): Genotoxic potential of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-coated onto airborne Particulate Matter (PM_{2.5}) in human lung epithelial A549 cells. *Cancer Lett.* (2008) doi:10.1016/j.canlet.2008.04.044.
- BURY, S. J. & MILLER, C. A. (1993). "Effect of micellar solubilization on biodegradation rates of hydrocarbons". *Environmental Science Technology*, 27 (1), 104-110.
- CALOW, P. *Ecology (1996) in ecotoxicology: some possible 'rules of thumb'*. In: *Ecotoxicology: ecological Dimensions*. London. Baird, D. J., Maltby, L., Greig-Smith, P. W., Douben, P.E.T. eds. p. 5-12.
- CERNIGLIA, C. E. (1992). "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons". *Biodegradation*, 3, 351-368.
- CHAPMAN, P.M. (1995): *Sediment Quality Assessment: Status and Outlook*. *Journal of Aquatic Ecosystem Health* 4, 183-194.
- CHAPMAN, P.M.; HO, T.K.; MUNNS Jr, W.R. SOLOMON, K.; WEINSTEIN, M.P. (2002): *Issues in Sediment Toxicity and Ecological Risk Assessment*. *Marine Pollution Bulletin*. V. 44, p.271-278.
- COOPER, D. G. & GOLDENBERG, B. G. (1987). "Surface-active agents from two *Bacillus* species". *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (2), 224-229.
- CORSEUIL, H. X.; HUNT, R. S.; SANTOS, R. C. F. (1997): The Influence of the Gasoline Oxygenate Ethanol on Aerobic and Anaerobic BTEX Biodegradation. *Water Research*. v. 32. p. 2065 – 2072.
- DEL'ARCO, J. P.; FRANÇA, F. P. (1999): Biodegradation of Crude Oil in Sandy Sediment. *International Biodeterioration & Biodegradation* . v. 44. p. 87-92.
- DÍAZ-RAMÍREZ, I.J.; ESCALANTE-ESPINOSA, E.; FAVELA-TORRES, E.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M.; RAMÍREZ-SAAD, H. (2007): Design of Bacterial Defined Mixed Cultures for Biodegradation of Specific Oil Frctions, Using Population Dynamics Analysis by DGGE. *Int. Biodt. And Biodeg.* (2007) doi:10.1016/j.ibiod.2007.11.001.
- DIBBLE, J. T.; BARTHA, R. (1976): Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. v.37, p. 729-739.

- EICHNER, C. A.; ERB, R. W.; TIMMIS, K. N. (1999): Thermal Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Bioprotection from Pollutants Shocks in the Activated Sludge Microbial Community. *Applied Environmental Microbiology*, v. 65, pp. 102-109.
- ENGLERT, C. J. & KENZIE, E. J. (1993). "Bioremediation of petroleum products in soil" *in* "Princ. Prac. Pet. Contam. Soils". *API*, 40 (82917-79059h), 111-129.
- EVANS, F. F.; ROSADO, A. S.; SEBASTÁN, G. V.; CASELLA, R.; MACHADO, L.O.A.; HOLMSTRÖM, C.; KJELLEBERG, S.; VAN ELSAS, J.D.; SELDIN, L. (2004): Impact of Oil Contamination and Biostimulation on the Diversity of Indigenous Bacterial Communities in Microcosms. *FEMS Microb. Ecol.* V. 49 p.295-305.
- FERNANDES, M. (1994): Efeito da 9, 10 – Fenatrenoquinona na Fotodegradação do Petróleo. Dissertação de mestrado – Instituto de Química UFRJ.
- FLOODGATE, G. D. (1984): The Fate of Petroleum in Marine Ecosystem *in*: Petroleum Microbiology. New York. Macmillan publishing company.
- FOGHT, J. M.; GUTNIK, D. L. & WESTLAKE, D. W. S. (1989). "Effect of Emulsan on biodegradation of crude oil by pure and mixed bacterial cultures". *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (1), 36-42.
- FRANKENBERGER Jr., W.T. (1992): The need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons. *In*: Hydrocarbon contaminated soils and groundwater Boca Raton. E.J. Calabrese and P.T. Kostecki eds. p. 237-293.
- GLAZER, A. N.; NIKAIIDO, H.(1995): Microbial Biotechnology - Fundamentals of Applied Microbiology. New York. W. H. Freeman and Company Editors.
- GOSWAMI, P. & SINGH, H. D. (1991). "Different modes of hidrocarbon uptake by two Pseudomonas species". *Biotechnology and Bioengineering*, 37, 1-11.
- GUERRA-SANTOS, L.; KAPPELI, O. & FIECHTER, A. (1984). " Pseudomonas aeruginosa biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source". *Applied and Environmental Microbiology*, 48 (2), 301-305.
- GUPTA, R. S.; FONDEKAR, M. S.; SHAILAJA, M.; SAKANARAYNAN, S. (1996): Maersk Navigator Oil Spill in the Great Channel (Andaman Sea) in January 1993 and its environmental Impacts. *Spill Science and Technology. Bulletin* v.2/3 p. 113-119.
- HAWTHORNE, S. B. & MILLER, D. J. 1998. "Hydrocarbon Characterization of Gas Condensates and Impacted Soils," Proceedings of the International Petroleum Environmental Conference, Albuquerque, NM, October 20-23.
- HARMSSEN, J. (1991). Possibilities and limitations of landfarming for cleaning contaminated sites. *In*: On-Site Bioreclamation: Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment. HINCHEE, R.E., OLFENBUTTEL, R.F. (Editors.). Butterworth-Heinemann, London.
- HOMMEL, R. K. (1990). "Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms - Biosurfactants in hydrocarbon utilization". *Biodegradation*, 1, 107-119.
- IJAH, U. J. J. (1998): Studies on Capabilities of Bacterial and yeast Isolates from Tropical Soil in degrading Crude Oil. *Waste Management.* (18), 293-299.
- IJAH, U. J. J.; ANTAI, S. P. (2003): "Removal of Nigerian light Crude Oil in Soil Over a 12-month Period". *International Biodeterioration and Biodegradation.* v. 51, 93-99.

- JANIYANI, K. L.; WATE, S. R. & JOSHI, S. R. (1993). "Solubilization of hydrocarbons from oil sludge by synthetic surfactants". Journal of Chemical Technology Biotechnology, 56, 305-308.
- INGERSOLL, E. P.; WILT, F. H. (1997): Matrix Metalloproteinase Inhibitors Disrupt Spicule Formation by Primary Mesenchyme Cells in the Sea Urchin Embryo. Developmental Biology 196, 95-106.
- KANIKKANNAN, N.; LOCKE, B. R.; SINGH, M. (2004): Effect of Jet Fuels on the skin morphology and irritation in hairless rats. Toxicology. v.175, p. 37-47.
- KHAN F.L I.; HUSAIN, T.; HEJAZI, R. (2004): An Overview and Analysis of Site Remediation Technologies. Journal of Environmental Management. V. 71, p.95-122.
- KOWALICK, W. W., JR. (1991): Removing Impediments to the use of Bioremediation and Other Innovative Technologies *in*: Environmental Biotechnology for waste Treatment. New York. G. S. Saylor, R. Fox, and J. W. Blackburns editors. Plenum Press, p. 53-60.
- LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. (1990): Microbial Degradation of hydrocarbons in the Environment. Microbiol. Ver. v.54, p. 305-315. 1990.
- LI, A.; YANGA, S.; LI, X.; GUB, J. (2008): Microbial population dynamics during aerobic sludge granulation at different organic loading rates. Water Research. V. 42, p. 3552 – 3560.
- LI HUI, ZHANG, Y.; KRAVCHENKO, I.; XU Hui; ZHANG, C. (2007): Dynamic changes in microbial activity and community structure during biodegradation of petroleum compounds A laboratory experiment. Journal of Environmental Sciences v.19, p.1003-1013.
- MAKKAR, R.S. & CAMEOTRA, S.S. (1997): Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. Journal American Oil Chem. Society 74: 887-889.
- MAIER, R. (1999): Environmental Microbiology. Academic Press, New York.
- MARTY, J. C., SALIOT, A. (1976): Hydrocarbons (n-Alkanes) in the Surface Microlayer of Seawater. Deep Sea Resources. v. 23, p. 863-874.
- MOORE, E. W.; CROWE, C. W. & HENDRICKSON, A. R. (1965). "Formation, effect and prevention of asphaltene sludges during stimulation treatments". Journal of Petroleum Technology, september, 1023-1028.
- NASCIMENTO, I.A.; SMITH, D.H.; PEREIRA, S.A.; SAMPAIO DE ARAÚJO, M.M.; SILVA, M.A.; MARIANI, A.M. (2000): Integration of Varying Responses of Different Organisms to Water and Sediment Quality at Sites Impacted and not Impacted by the Petroleum Industry. Aq. Ecos. Health and Man. V. 3, p. 449-458.
- NEUFELD R. J.; ZAJIC, J. E. & GERSON, D. F. (1980). "Cell surface measurements in hydrocarbon and carbohydrate fermentations". Applied and Environmental Microbiology, 39 (3), 511-517.
- NOCENTINI, M.; PINELLI, D.; FAVA, F. (2000): Bioremediation of Soil Contaminated by Hydrocarbon Mixtures: The Residual concentration Problem. Chemosphere. v.41, p.1115-1123.
- OKPOKWASILI GC, AMANCHUKWU SC.(1988): Petroleum hydrocarbon degradation by *Candida* species. Environment International. V.14, pp.243-47.

- PATEL K. M.; DESAI, J. D. E DESAI, A. J.(1979): "Amino Acid Production by Submerged Cultivation of *Pseudomonas fluorescens* on Gasoline". *Folia Microbiol.* v.30, p. 420-426.
- PIÑA, J.; MERINO, J.; ERRAZU, A. F.; BUCAL, V.(2002): Thermal Treatment of soils Contaminated with Gas Oil: Influence of Soil Composition and Treatment Temperature. *Journal of Hazardous Materials.* v. 94, p. 273-290.
- PLICE, M. J. (1948). "Some Effects of Crude Petroleum on Soil Fertility," *Soil Science Society Proceedings 1948*, 13: 413-416.
- PRITCHARD, P. H.; LIN, J. E.; MUELLER, J. G. & SHIELDS, M. S. (1996). "Bioremediation research in EPA: An overview of needs, directions and potentials". International Symposium of Biotechnology Industrial Waste Treatment and Bioremediation, 1992. Published in 1996 by Hickey, R. F. & Smith, G. Boca Raton, U.S.A., 3-26.
- RAAG - Remediation Alternative Assessment Group (2000): Evaluation of Risk Based Corrective Action Model. Memorial University of New found land, StJohnis, NF, Canada.
- RAMADAN, M. A.; EL-TAYER, O. M. E ALEXANDER, M. (1990): Inoculum Size as a Factor Limiting Success of Inoculation for Biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology.* v. 56, p. 1392-1396.
- REDDY, C.M. & QUINN, J.G.(1999): GC-MS Analysis of Total Petroleum Hydrocarbons and Polycyclic Aromatics Hydrocarbons in Sea Water Samples After the *North Cape* Oil Spill. *Marine Pollution Bulletin.* V.38. n.2. p. 126-135.
- ROJAS, J. O. (1993). "Emulsificacion de petroleo pesado por cultivos bacterianos". Encuentro de Especialistas en Biotecnología Aplicada a la Industria Petrolera - CODICID / ARPEL.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. (2001): Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology.* 3(4): p.229-236.
- RON, E. Z. & ROSENBERG, E. (2002): biosurfactants and Oil Bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology.* v. 13: p.249-252.
- ROSADO, A. S.; SELDIN, L.; WOLTERS, A.; VAN-ELSAS, J. (1997): Molecular Microbial Ecology: A Minireview. *Braz. J. Microbiol.* 28, 135-147.
- ROSEMBERG, M. (1991): Basic and Applied Aspects of Microbial Adhesion at the Hydrocarbon: Water Interface. *Critical Reviews in Microbiology.* v. 18, n.2, p. 159-173.
- ROSEMBERG, E.; LEGMANN, R.; KUSHMARO, A.; TAUBE, R.; ADLER, E. & RON, E. Z. (1992). "Petroleum bioremediation - A multiphase problem". *Biodegradation*, 3, 337-350.
- SEEGER, M.; TIMMIS, K., N.; HOFER, B. (1997): Bacterial Pathways for the Degradation of Polychlorinated Biphenyls. *Marine chemistry.* v. 58, p. 327-33.
- SHULGA, A.; KARPENKO, E.; VILDANOVA-MARTISHIN, R.; TUROVSKY, A.; SOLTYS, M. (2000): Biosurfactant-enhanced remediation of oil contaminated environments. *Adsorption Science and Technology* 18: 171-176, 2000
- SMITH, M. R. (1990). "The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria". *Biodegradation*, 1, 191-206.

- SONG H.G., PREDERSEN T.A., BARTHA R. (1986): Hydrocarbon mineralization in soil: Relative bacterial and fungal contribution. *Soil Biology and Biochemistry*. V.28 n.1, pp.109-11.
- URURAHY, A. F. P. (1998) Biorremediação de Resíduo Oleoso Proveniente de Refinaria. Tese de Doutorado em Ciências. Escola de Química, UFRJ, Rio de Janeiro.
- USEPA (1995a): How to Evaluate alternative cleanup technologies for Underground storage tank sites. Office of Solid Waste and Emergency Response, US Environmental Protection Agency. Publication#EPA 510-B-95-007, Washington, DC.
- USEPA (1995b): Abstracts of remediation case studies. Office of Solid Waste and Emergency Response, US Environmental Protection Agency. Publication number EPA-542-R-95 001, Washington, DC.
- USEPA (1996): A citizens guide to soil washing. Office of Solid Waste and Emergency Response, US Environmental Protection Agency Publication #EPA542-F-96-002, Washington, DC.
- USEPA (1998): Soil vapor extraction (SVE). Office of the Underground Storage Tank, US Environmental Protection Agency. Publication # practice. Air and Waste Management Association's Magazine for EPA510-B-95-007, <http://www.epa.gov/swrust1/cat/sve1.htm>
- VAZQUEZ-DUHALT, R.; WESTLAKE, D. W. S. & FEDORAK, P. M. (1994). "Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents". *Applied and Environmental Microbiology*, february, 60 (2), 459-466.
- WALKER JD, PETRAKIS L, COLWELL RR. (1978): Degradation of petroleum by pure cultures of bacteria, algae, yeasts and filamentous fungi. *Archives of Microbiology*. V.30, pp.79-81.
- WATANABE, K. (2001): Microorganisms Relevant to Bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, p.237-241.
- WATANABE, K. (2002): Linking Genetics, Physiology and Ecology: an Interdisciplinary Approach for Advancing Bioremediation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. V. 94, 557-562.
- WSPA – (Western States Petroleum Association) (1993): Chemical and Physical characteristics of Crude Oil, Gasoline, and Diesel Fuel: A Comparative Study, Western States Petroleum Association, Glendale, California, September 17.
- YANG, L.; LAI, C. T.; SHIEH. (1999) "Biodegradation of Dispersed Diesel Fuel under High Salinity Conditions". *Wat. Res.* v. 34, n. 13 p. 3303 –3314.
- YERUSHALMI, L.; ROCHELEAU, S.; CIMPOIA, R.; SARRAZIN, M.; SUNAHARA, G.; PEISAJOVICH, A.; LECLAIR, G.; GUIOT, S. R. (2003): Enhanced Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Contaminated Soil. *Bioremediation Journal*. v.7.n.1, p. 37 - 51.
- ZAJIC, E. & SUPPLISSON, B. (1972): Emulsification and degradation of Bunker C" fuel oil by microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*. V.14, pp.331-43.



Os Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos (LADEBIO) da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Os temas de pesquisa desenvolvidos no LADEBIO advogam uma mudança de paradigma das atividades econômicas, em particular dos processos de produção industrial, integrando os princípios e estratégias de qualidade total com os requisitos de qualidade ambiental.

As linhas de pesquisa coordenadas pelo Professor Nei, ao longo de 30 anos de experiência, são características da sua área de especialização e estão ligadas ao **"Desenvolvimento de Bioprocessos"**, envolvendo, em sua grande maioria, trabalhos de natureza teórico-experimental, com aplicação prática. São temas de estudo: o desenvolvimento de processos visando à produção de biocombustíveis, enzimas, polióis, antibióticos, bioinseticidas, biossurfactantes, ácidos orgânicos, aromas e fragrâncias, bem como o desenvolvimento de processos biológicos para o tratamento de resíduos e efluentes industriais.

Como ferramentas para o desenvolvimento de bioprocessos nos projetos do LADEBIO, as seguintes estratégias são comumente adotadas: seleção e melhoramento de linhagens (naturalmente ocorrentes ou recombinantes), construção de biocatalisadores ótimos; otimização de meios; modos de operação e cinética de bioprocessos; imobilização de células e enzimas; caracterização e aplicação de bioprodutos, como também a avaliação do desempenho de biorreatores.

Devido à característica tecnológica das pesquisas do LADEBIO, em todos os trabalhos estabelecem-se compromissos com o desenvolvimento de bioprocessos que possam ser transformados em realidade industrial. Além disso, estudos envolvendo a gestão tecnológica são realizados a fim de se ter uma visão mais ampla e identificar tendências e desafios dos diferentes segmentos ligados à Biotecnologia, como por exemplo: estudos de Prospecção Tecnológica para a produção de combustíveis e outras substâncias químicas com base nas matérias-primas renováveis (Biorrefinaria), Transgenia, Biodiversidade, Meio Ambiente e Patente. Devido à natureza multidisciplinar da área Biotecnológica, um grande número de trabalhos é desenvolvido em parceria com outros grupos de pesquisa da própria UFRJ e de outras instituições de ensino e pesquisa externas, e também com empresas.

O conjunto de nossas atividades tem gerado resultados que hoje alimentam consórcios de pesquisa entre nossos laboratórios e Universidades e Centros de pesquisa nacionais e internacionais, tendo sido os Laboratórios de Bioprocessos da EQ/UFRJ credenciados pelo Programa Ibero-Americano de Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento (IBEROEKACYTED/Espanha). Tem propiciado, também, interações entre a Universidade e a Indústria, como é o caso de projetos que vem sendo desenvolvidos em parcerias com a PETROBRAS, ARACRUZ CELULOSE, BIONASA e OXITENO. Estas parcerias têm se constituído em um excelente exercício, não só para a busca de soluções para as empresas, mas também para a geração de conhecimento e formação de recursos humanos altamente capacitados para o desenvolvimento tecnológico em nosso país.

Contato:

Nei Pereira Jr., *PhD*

Professor Titular

Escola de Química – CT/UFRJ

Departamento de Engenharia Bioquímica - LADEBIO – sala E 121

Cidade Universitária - Ilha do Fundão - Rio de Janeiro – RJ

Cep: 21949-900

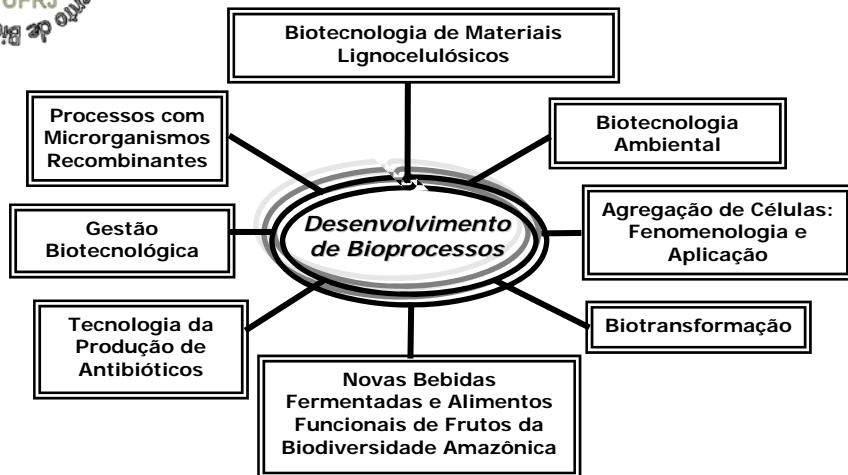
Tels: OXX.21.2562 7644/7645/7646

Fax: OXX.21.2562 7616

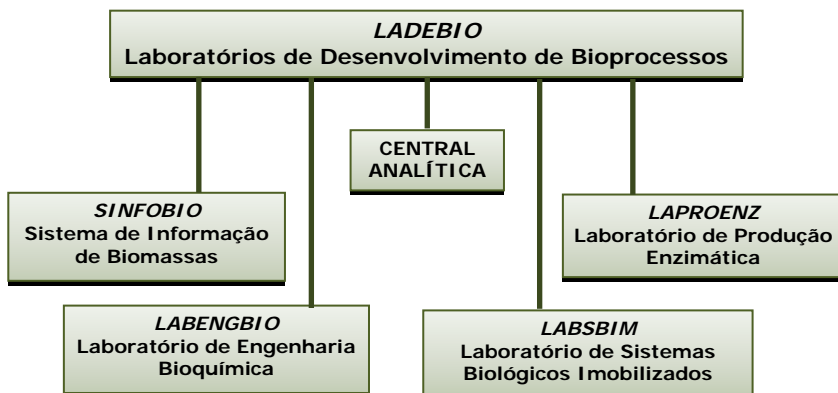
e-mail: nei@eq.ufrj.br



LINHAS DE PESQUISA



INFRA-ESTRUTURA LABORATORIAL





Agradecimentos as seguintes instituições e empresas pelo apoio financeiro:

