



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
ESCOLA DE QUÍMICA**

**MESTRADO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E  
BIOQUÍMICOS**

**Monitoramento da Atenuação Natural de Solos Artificialmente  
Contaminados com Óleo Diesel B0 e B4**

*Claudia Affonso Barros*

Orientadoras:

Prof<sup>a</sup>. D.Sc. Eliana Flávia Camporese Sérvulo  
D.Sc. Andréa Camardella de Lima Rizzo

Rio de Janeiro  
2010

# **Monitoramento da Atenuação Natural de Solos Artificialmente Contaminados com Óleo Diesel B0 e B4**

**Claudia Affonso Barros**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadoras:

Prof. Dsc. Eliana Flávia Camporese Sérvulo  
Dsc. Andréa Camardella de Lima Rizzo

EQ / UFRJ  
Rio de Janeiro  
2010

Monitoramento da Atenuação Natural de Solos Artificialmente Contaminados  
com Óleo Diesel B0 e B4

**Claudia Affonso Barros**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada por:

---

Prof<sup>a</sup>. D.Sc. Eliana Flávia Camporese Sérvulo – EQ/UFRJ  
(Orientadora – Presidente da Banca)

---

D.Sc. Andréa Camardella de Lima Rizzo – CETEM/MCT  
(Orientadora)

---

D.Sc. Claudia Duarte da Cunha – CETEM/MCT

---

D.Sc. Judith Liliana Solórzano Lemos – EQ/UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. D.Sc. Selma Gomes Ferreira Leite – EQ/UFRJ

## FICHA CATALOGRÁFICA

Barros, Claudia Affonso.

Monitoramento da Atenuação Natural de Solos Artificialmente Contaminados com Óleo Diesel B0 e B4. Claudia Affonso Barros. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2010.

XV, 77p.; il.

Orientadoras: Eliana Flávia Camporese Sérvulo e Andréa Camardella de Lima Rizzo

Dissertação (mestrado) – UFRJ / Escola de Química, Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2010.

1. Monitoramento Microbiológico. 2. Atenuação natural. 3. Solo contaminado. 4. Óleo Diesel. 5. Biodiesel - Tese. I. Título. II. Dissertação (Mestrado - UFRJ/EQ).

## AGRADECIMENTOS

- ✚ A Deus, meu Pai maior, que me sustenta e me fortalece a cada dia;
- ✚ A minha Mãe, quem muito amo, que me deu força para que eu chegasse até aqui;
- ✚ Ao meu pai, já desencarnado, que tanto lutou para a minha educação;
- ✚ Aos meus irmãos, Anna Paula e Antônio Carlos e aos meus sobrinhos, pela compreensão de minha ausência em muitos momentos;
- ✚ Ao meu namorado, Claudio, pelas horas de ausência e pelas horas de estresse;
- ✚ A toda a minha família e amigos pelo incentivo;
- ✚ Ao CETEM, por conceder as suas instalações para a condução dos experimentos deste trabalho e a todos que direta ou indiretamente me ajudaram;
- ✚ As minhas orientadoras Eliana Flávia, EQ/UFRJ e Andréa Rizzo, CETEM/MCT por acreditarem em mim e pelo valioso auxílio neste trabalho;
- ✚ Ao bolsista de Iniciação Científica (CETEM/MCT), Ricardo Terra, pela valiosa contribuição no laboratório;
- ✚ À Claudia Cunha que me ajudou muito na análise de Biologia Molecular.
- ✚ Aos meus amigos do CETEM, pela força e grande ajuda nessa trajetória.
- ✚ À Escola de Química e todos os seus docentes por colaborarem nessa etapa de minha formação acadêmica;
- ✚ À FUNDAÇÃO COPPETEC pela minha bolsa de mestrado.

*Dedico este trabalho ao meu pai  
Sebastião Geraldo (in memoriam) e  
minha mãe Hilda. Agradeço a vocês por  
tudo o que fizeram por mim. Amo vocês!*

## RESUMO

BARROS, Claudia Affonso. **Monitoramento da Atenuação Natural de Solos Artificialmente Contaminados com Óleo Diesel B0 e B4**. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

O presente trabalho teve o objetivo de monitorar o processo de atenuação natural (AN) de um solo franco-argiloso, característico do Estado do Rio de Janeiro, artificialmente contaminado com 10% (m/m) de óleo diesel puro (B0) ou óleo diesel comercial (B4). A prévia caracterização físico-química, química e microbiológica do solo virgem, revelou a presença de  $10^1$  NMP/ g solo de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos (hidrocarbonoclasticas (BHC)). O solo não tinha histórico de contaminação por hidrocarbonetos (HC), era ácido e apresentava baixa fertilidade. Os ensaios de AN foram realizados em sistemas de PVC, de 20 cm de diâmetro e 60 cm de comprimento, contendo 18 kg de solo, a fim de monitorar a degradação dos HC em diferentes profundidades (20; 40 e 60 cm), por 20, 40 e 60 dias. Os resultados obtidos indicaram que, mesmo as características do solo não sendo ideais para a atividade microbiana, a degradação do diesel B0 foi de 14% em 60 dias. Na presença de biodiesel, ou seja, solo contaminado com B4, não foi possível definir a degradação de HC, embora a população de BHC tenha se mantido ativa. A análise dos solos oriundos da AN mediante ensaios ecotoxicológicos para sementes de *Lycopersicon esculentum* (tomate) apontaram a presença de compostos residuais tóxicos, sendo o solo contaminado com B4 mais tóxico do que o contaminado com B0.

## ABSTRACT

BARROS, Claudia Affonso. **Monitoring of Natural Attenuation in Soil Artificially Contaminated with Diesel Oil B0 and B4.** Dissertation (Master in Sciences) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

This study aimed to monitor the process of natural attenuation (NA) of a sandy-clay, characteristic of Rio de Janeiro, artificially contaminated with 10% (w/w) of pure diesel oil (B0), or commercial diesel oil (B4). Previous physical-chemical, chemical and microbiological analysis of the virgin soil revealed the presence of  $10^1$  MPN / g of hydrocarbon degrading bacteria (hydrocarbonoclastic (BHC)). The soil had no a history of soil contamination by hydrocarbons (HC), was acid and had a low fertility. The NA tests were performed on PVC systems, 20 cm in diameter and 60 cm long containing 18 Kg of soil, to monitor the degradation of HC at different depths (20, 40, 60 cm) by 20, 40 and 60 days. The results indicated that even the characteristics of the soil were not ideal for microbial activity, degradation of diesel B0 was 14% in 60 days. In the presence of biodiesel, this is, soil contaminated with B4, it was not possible to define the degradation of HC, although the population of BHC had remained active. The analysis of soil from the NA via ecotoxicological tests for seeds of *Lycopersicon esculentum* (tomato) showed the presence of residual toxic compounds; the B4-contaminated soil being more toxic than the B0-contaminated one.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1:</b>	Constituição de um solo ideal (CETESB, 2007).	6
<b>Figura 3.2:</b>	Constituição Textural do solo (CETESB, 2007).	8
<b>Figura 3.3:</b>	Triângulo de classificação textural de solos (LEMOS e SANTOS, 1984).	9
<b>Figura 3.4:</b>	Tipos de poluição que mais frequentemente acometem o solo (CETESB, 2007).	14
<b>Figura 3.5:</b>	Reação de transesterificação, onde R é uma mistura de várias cadeias de ácidos graxos, e R' = CH <sub>3</sub> , por ser o metanol usualmente o álcool mais empregado (Fonte: Knothe et al., 2006).	14
<b>Figura 4.1:</b>	Britador de mandíbulas usado para a desagregação do solo.	31
<b>Figura 4.2:</b>	Peneiramento do solo.	31
<b>Figura 4.3:</b>	Fração argila do solo.	32
<b>Figura 4.4:</b>	Sistema usado para a determinação da capacidade de retenção de água (CRA) do solo, mostrando as etapas de umedecimento do solo (A) e de escoamento da água não adsorvida ao solo (B).	35
<b>Figura 4.5:</b>	Teste de percolação de água e, posteriormente, diesel em solo.	37
<b>Figura 4.6:</b>	Sistemas estáticos usados nos ensaios de biorremediação dos solos contaminados com diesel e diesel/biodiesel.	38
<b>Figura 4.7:</b>	Detalhe da base dos reatores mostrando as válvulas para escoamento do percolado.	38
<b>Figura 4.8:</b>	Equipamento Infracal, modelo HART -T da Wilks Enterprise.	41
<b>Figura 4.9:</b>	Testes de germinação e crescimento do tomateiro para o solo fértil (A), teste de germinação e crescimento do tomateiro para o solo em estudo (B), mostrando o detalhe da medição do comprimento do caule para o solo fértil (C1) e do solo em estudo (C2).	44
<b>Figura 5.1:</b>	Perfil de distribuição de HTP residual em solo contaminado com óleo diesel (B0) em função da profundidade e tempo.	49

<b>Figura 5.2:</b>	Variação dos números de bactérias heterotróficas totais (BHT) e de bactérias hidrocarbonoclásticas (BHC) em solo após contaminação com óleo diesel (B0) em função da profundidade e do tempo (A= BHT; B= BHC; SV= solo virgem, sem contaminação).	51
<b>Figura 5.3:</b>	Variação do potencial de oxidação-redução (Eh) para amostras de solo contaminado com óleo diesel (B0) em função da profundidade e do tempo (SV= solo virgem, sem contaminação).	53
<b>Figura 5.4:</b>	Nitrogênio total (A) e nitrogênio amoniacal (B) para amostras de solo contaminado com óleo diesel (B0) em distintas profundidades (SV= solo virgem, sem contaminação; CA= controle abiótico).	55
<b>Figura 5.5:</b>	Perfil de distribuição de HTP residual em solo contaminado com óleo diesel (B4) em função da profundidade e do tempo.	57
<b>Figura 5.6:</b>	Concentração das bactérias heterotróficas totais (BHT) e bactérias hidrocarbonoclásticas (BHC) em solo após contaminação com diesel (B4) em diferentes profundidades e para diferentes tempos de monitoramento (A= BHT; B= BHC; SV= solo virgem, sem contaminação).	58
<b>Figura 5.7:</b>	Variação do potencial de oxidação-redução (Eh) para amostras de solo contaminado com diesel/biodiesel em função da profundidade e do tempo (SV= solo virgem, sem contaminação).	59
<b>Figura 5.8:</b>	Nitrogênio total (A) e nitrogênio amoniacal (B) para amostras de solo contaminado com óleo diesel em distintas profundidades (SV= solo virgem, sem contaminação; CA= controle abiótico).	60
<b>Figura 5.9:</b>	Monitoramento de HTP e concentração de bactérias heterotróficas totais (BHT), e de bactérias hidrocarbonoclásticas (BHC) para solo contaminado com óleo diesel (B0).	61

**LISTA DE EQUAÇÕES**

Equação 4.1:	Densidade Aparente ( $D_a$ ).	33
Equação 4.2:	Densidade de Partícula ( $D_p$ )	34
Equação 4.3:	Porosidade.	34
Equação 4.4:	Capacidade de Retenção de Água (CRA)	35

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 3.1:	Composição Química de um Petróleo Típico.	12
Tabela 3.2:	Especificações de diferentes tipos de óleo diesel comercializados no Brasil.	13
Tabela 3.3:	Relação entre a Forma de Respiração Microbiana, Aceptores de Elétrons e Potencial Redox.	26
Tabela 4.1:	Fórmulas usadas para calcular os teores de argila, areia e silte no solo.	33
Tabela 4.2:	Descrição dos ensaios de biorremediação realizados em coluna de solo.	39
Tabela 4.3:	Composição do Meio Agar Simples.	42
Tabela 4.4:	Composição do Meio Mineral.	43
Tabela 5.1:	Caracterização Granulométrica (Textural), Química, Física-Química e Microbiológica do Solo Virgem.	45
Tabela 5.2:	Testes de percolação de água e diesel B0 e B4 em camada de solo de 40 cm, para diferentes percentuais de CRA.	48
Tabela 5.3:	Dados de ensaios de fitotoxicidade realizados com tomate para solos contaminados após atenuação natural.	63

**LISTA DE SIGLAS**

ANFAVEA	Associação Nacional do Fabricantes de Veículos Automotores
ANM	Atenuação Natural Monitorada
ANP	Agência Nacional do Petróleo
BHT	Bactérias Heterotróficas Totais
BHC	Bactérias Hidrocarbonoclásticas
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno
CETEM	Centro de Tecnologia Mineral
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
COAM	Coordenação de Análises Mineraias
COPPE	Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-graduação e Pesquisa de Engenharia
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HTP	Hidrocarbonetos Totais do Petróleo
IBAMA	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente
IMA	Instituto do Meio Ambiente
NAPL	Fase Líquida Não Aquosa
MCT	Ministério da Ciência e tecnologia
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MO	Matéria Orgânica
NMP	Número Mais Provável
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
RJ	Rio de Janeiro
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
USEPA	Agência Americana de Proteção Ambiental

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1:</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	1
<b>CAPÍTULO 2:</b>	<b>JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS</b>	4
<b>CAPÍTULO 3:</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	5
<b>3.1:</b>	<b>Solo.</b>	5
3.1.1:	Definição.	5
3.1.2:	Componentes do Solo.	6
3.1.3:	Composição Granulométrica e Textura do Solo.	7
3.1.4:	Solo como habitat.	9
<b>3.2:</b>	<b>Poluição do Solo.</b>	10
<b>3.3:</b>	<b>O Petróleo e seu derivado: Diesel.</b>	11
3.3.1:	Combustível Diesel com adição de Biodiesel.	14
3.3.2:	Biodegradação dos combustíveis.	16
<b>3.4:</b>	<b>Processos biológicos aplicados na remediação de solos contaminados com petróleo e derivados.</b>	17
3.4.1:	Tratamentos Biológicos.	17
3.4.2:	Fatores que Influenciam a biodegradação.	21
3.4.2.1:	Propriedades Físico-Químicas do Óleo.	22
3.4.2.2:	Teor de Umidade.	22
3.4.2.3:	Teor de Nutrientes.	23
3.4.2.4:	Temperatura.	24
3.4.2.5:	pH	25
3.4.2.6:	Potencial Redox (Eh).	25
3.4.2.7:	Densidade de Microrganismos Degradadores de Óleo.	27
3.4.2.8:	Biodisponibilidade do Contaminante.	28
<b>CAPÍTULO 4:</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	30
<b>4.1:</b>	<b>Solo.</b>	30
4.1.1:	Caracterização do solo.	31
<b>4.2:</b>	<b>Óleo Diesel.</b>	36
<b>4.3:</b>	<b>Detalhamento dos experimentos.</b>	36
4.3.1:	Percolação de água e diesel no solo.	36
4.3.2:	Ensaio de Biodegradação.	37

4.3.2.1:	Sistema experimental.	37
4.3.2.2:	Monitoramento da biodegradação de diesel B0 e B4.	38
<b>4.4:</b>	<b>Análises Quantitativas.</b>	40
4.4.1:	Teor de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP).	40
4.4.2:	Concentração de bactérias heterotróficos totais (BHT).	41
4.4.3:	Concentração de bactérias hidrocarbonoclasticas (BHC).	42
4.4.4:	Teste de Fitotoxicidade.	43
<b>CAPÍTULO 5:</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	45
<b>5.1:</b>	<b>Caracterização do Solo.</b>	45
<b>5.2:</b>	<b>Testes de Percolação Água/Diesel em Solo.</b>	47
<b>5.3:</b>	<b>Efeito do Biodiesel na Biodegradação de Óleo Diesel em Solo Franco-Argiloso.</b>	48
5.3.1:	Ensaio de atenuação natural de solo contaminado com diesel puro.	48
5.3.2:	Ensaio de atenuação natural de solo contaminado com diesel comercial (B4)	56
5.3.3:	Análise comparativa da degradação de hidrocarbonetos de óleo diesel B0 e B4 em coluna de solo.	60
<b>5.4:</b>	<b>Avaliação da toxicidade dos solos contaminados após atenuação natural.</b>	62
<b>CAPÍTULO 6:</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	64
<b>CAPÍTULO 7:</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS: PROBLEMAS E SUGESTÕES</b>	65
<b>CAPÍTULO 8:</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	66

## ***CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO***

Os problemas de poluição e degradação ambiental agravaram-se com o desenvolvimento dos centros urbanos e, sobretudo, a partir da Revolução Industrial, por conta do aumento da geração de resíduos sólidos, efluentes líquidos e compostos voláteis (LEITE, 1995; DIAS, 2000).

Poluentes ambientais são definidos por Hutzinger e Verkamp (1981) e Brasil (1981) como compostos químicos de origem sintética ou natural que são liberados, através de atividades antropogênicas, no ambiente, causando efeitos indesejáveis para o ambiente, ou para o homem via ambiente e ainda, podendo ainda comprometer a biota, tornando inviável a utilização dos recursos para fins comerciais, industriais e recreativos. Na maior parte das vezes, o efeito indesejável é um efeito tóxico, isto é, um efeito prejudicial à vida (DIAS, 2000). Têm importância não só nos aspectos ambientais e de saúde pública, mas também, e principalmente, na ocorrência de episódios críticos de poluição de âmbito mundial, tais como a questão das áreas contaminadas (GÜNTHER, 2005). Em consequência, é crescente a preocupação dos especialistas e das autoridades, o que tem motivado a busca por medidas para prevenir a contaminação do ambiente ou remediar as áreas já afetadas.

A intensa movimentação de óleo cru e derivados pode, ocasionalmente, causar a poluição tanto de solos quanto de cursos ou corpos de água. Por exemplo, aproximadamente 40 milhões de litros de óleo e derivados foram acidentalmente lançados no meio ambiente entre 1975 e 2004, impactando solos, rios, manguezais e praias, no Brasil (BAPTISTA, 2007).

No caso dos solos, o impacto por hidrocarbonetos, que pode inclusive afetar os recursos hídricos subterrâneos, depende não só do tipo de contaminante, mas do tipo de solo envolvido (argiloso, siltoso ou arenoso, por exemplo) (BAPTISTA, 2007).

A crescente contaminação de solos e águas subterrâneas por hidrocarbonetos derivados de petróleo (óleo diesel), tem sido destaque nas últimas décadas, principalmente em função da frequência com que os episódios de contaminação são verificados e da gravidade com que o meio ambiente é afetado. Embora os grandes vazamentos acidentais de petróleo sejam preocupantes e ocupem grande espaço na mídia, estima-se que a principal fonte de contaminação por óleo diesel seja devida a pequenos vazamentos de combustível ocorridos em reservatórios, a falhas mecânicas ou humanas nas operações de descarga e, também, a



acidentes durante o transporte deste produto químico visto que, o modal rodoviário tem sido o mais empregado (BAPTISTA, 2007).

Em virtude de grande parte da frota mundial de veículos automotores utilizar o óleo diesel como combustível, existem vários postos de serviço, terminais de distribuição e refinarias, espalhados por todo o território nacional. Nestes casos, além da poluição do solo e das águas subterrâneas, existe ainda a preocupação da contaminação atmosférica e do risco de explosões e incêndios. Os principais grupos de contaminantes encontrados nas áreas contaminadas foram: solventes aromáticos, combustíveis líquidos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), metais e solventes halogenados. Entre os combustíveis líquidos, destacam-se os derivados de petróleo: óleo diesel e gasolina (CETESB, 2010).

Nas últimas décadas, por causa da escassez do petróleo e do aumento crescente da concentração de monóxido de carbono no ar atmosférico nos grandes centros urbanos, alguns países, entre eles o Brasil, passaram a buscar fontes de combustíveis alternativas, como o etanol e o biodiesel. Segundo a norma da Agência Nacional de Petróleo (ANP), desde julho de 2009, o percentual de biodiesel adicionado ao diesel passou de 3% para 4%. A adição de biodiesel ao diesel pode diminuir os impactos ambientais negativos decorrentes de vazamentos, considerando que o aditivo por ser de origem vegetal ou animal pode favorecer a degradação microbiana (MENEGHETTI, 2007).

Os hidrocarbonetos constituintes do óleo diesel apresentam baixa densidade e, a maioria, não é solúvel em água, ou pelo menos, quando em seu estado original, não se verifica a sua solubilização em aquíferos. A forma como os hidrocarbonetos interagem com o fluxo freático, com os argilo-minerais e com a matéria orgânica (MO) presente no solo é complexa do ponto de vista físico e químico. Além disso, são susceptíveis de sofrer ações biológicas que resultam em alteração do comportamento do contaminante ao longo do tempo (MENEGHETTI, 2007).

Atualmente uma grande variedade de processos físico-químicos tem sido utilizada na remoção de hidrocarbonetos de petróleo e derivados. No entanto, a maioria dos processos utilizados para remediação de áreas contaminadas normalmente envolve longos períodos de tempo, espaço físico e altos custos (MENEGHETTI, 2007).

Dentre as tecnologias viáveis, tem-se a biorremediação, que é um processo que utiliza agentes biológicos tais como microrganismos e plantas, para remover ou neutralizar contaminantes (CHAPELLE, 2000 *apud* MARTINS *et al.*, 2003).

Pelo processo de biorremediação, a degradação do poluente se dá pela ação dos microrganismos presentes (atenuação natural) ou inoculados no solo contaminado (bioaumento), podendo ocorrer naturalmente ou sendo estimulada pela adição de nutrientes

tais como nitrogênio, fósforo entre outros, e oxigênio, contribuindo para o desenvolvimento sustentável do meio ambiente. O processo de biodegradação é baseado na capacidade de populações microbianas de modificar ou decompor determinados poluentes, como os hidrocarbonetos de petróleo ou de seus derivados, utilizando-os como fonte de carbono e energia para suas funções vitais (DIAS, 2000; OLIVEIRA, 2008b).

## ***CAPÍTULO 2: JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS***

Inúmeros são os registros dos acidentes ambientais ocasionados pelo derramamento de combustíveis. Por isso, a necessidade de obtenção de um maior número de dados técnicos sobre tal problema para que se possa promover a recuperação do solo contaminado, para cada caso, sem comprometer a biodiversidade local. Pesquisar e entender a dinâmica dos processos de biorremediação torna-se fundamental para desenvolver atividades de descontaminação do ambiente contaminado, bem como para desenvolver uma técnica econômica e ambientalmente viável. Por exemplo, poucos estudos tratam da ação dos microrganismos degradadores de hidrocarbonetos derivados de petróleo em solos franco-argilosos, característicos de vários estados brasileiros, como é o caso do Rio de Janeiro.

O objetivo desse trabalho, portanto, foi monitorar o processo de atenuação natural de um solo franco-argiloso, artificialmente contaminado com óleo diesel puro (B0) ou óleo diesel comercial (B4) em colunas de PVC com 60 cm de altura e 22 cm de diâmetro.

Para atender o objetivo geral do trabalho, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- Avaliar o comportamento microbiano, por meio da contagem das populações de bactérias heterotróficas totais (BHT) e das bactérias hidrocarbonoclásticas (BHC) nativas durante a atenuação natural do solo contaminado ao longo de 60 cm de profundidade;
- Monitorar a degradação dos contaminantes no solo por espectrometria de IV de modo a definir o potencial de descontaminação por atenuação natural do solo virgem artificialmente contaminado com diesel puro (B0) e diesel comercial (B4);
- Avaliar o impacto toxicológico dos solos contaminados antes e após atenuação natural mediante ensaios de fitotoxicidade.

## ***CAPÍTULO 3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA***

### **3.1 Solo**

#### *3.1.1 Definição*

Os solos são corpos naturais com evolução a centenas de milhares de anos, que compõem a cobertura pedológica que reveste as áreas emersas da Terra. Por sua vez, a cobertura é constituída por uma camada de material resultante de inúmeras combinações de fatores (clima, organismos, tempo, relevo) e de processos (remoção, adição, transporte e transformação) que atuam sobre os materiais de origem (rochas, sedimentos, depósitos orgânicos), o que permite a variedade de solos encontrados (PEDRON *et al.*, 2004).

Com o tempo, os processos de formação dos solos modificam o material original, contribuindo para a formação de diferentes camadas e produzindo uma grande variedade de tipos de solo. A distribuição do solo em camadas tem implicação na migração e destino dos contaminantes na subsuperfície (PEDRON *et al.*, 2004).

Segundo a Comissão das Comunidades Europeias (2002), o solo desempenha uma grande variedade de funções vitais de caráter ambiental, ecológico, social e econômico. São funções do solo:

- ✓ Sustentação da vida e do habitat para pessoas, animais, plantas e outros organismos;
- ✓ Manutenção do ciclo da água e dos nutrientes;
- ✓ Proteção da água subterrânea;
- ✓ Manutenção do patrimônio histórico, natural e cultural;
- ✓ Conservação das reservas minerais e de matérias-primas;
- ✓ Produção de alimentos;
- ✓ Manutenção da atividade sócio-econômica.

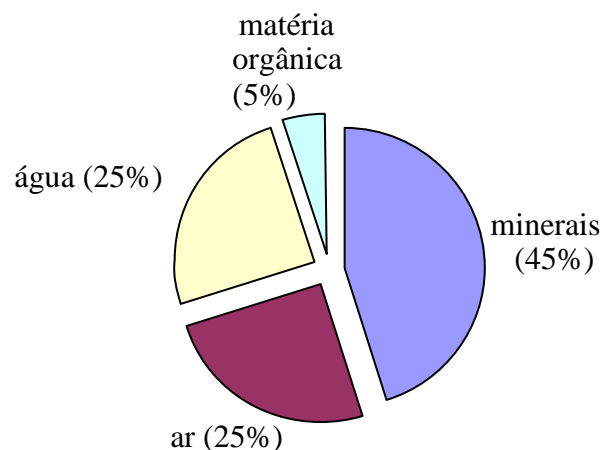
Portanto, a proteção do solo e a limitação dos processos de degradação deste recurso são, reconhecidamente, imprescindíveis para a sustentabilidade do desenvolvimento, sendo esta necessidade reconhecida internacionalmente (RODRIGUES e DUARTE, 2003).

### 3.1.2 Componentes do Solo

De acordo com Moreira e Siqueira (2006), o solo é formado por três fases: líquida (água com materiais dissolvidos), a gasosa (os mesmos gases da atmosfera, em diferentes proporções) e sólida (partículas minerais, raízes de plantas, populações de organismos macro e microscópicos, com metabolismo ativo ou dormente, e matéria orgânica em vários estágios de decomposição).

Estruturalmente, o solo é formado por partículas de diferentes tamanhos (areia, argila, cascalhos, etc), formas e arranjos. As fases líquida e gasosa ocupam os espaços vazios formados entre os sólidos, denominados de espaços porosos, cujas proporções variam continuamente, dependendo das condições de umedecimento/secamento do solo (OLIVEIRA, 2008a).

De modo geral, a fase sólida representa em torno de 45% do volume total; o espaço poroso (fase líquida e gasosa) 50% e, a matéria orgânica (incluindo os organismos vivos), 5%. Porém, a proporção entre as três fases, varia em função do tipo de solo e das condições ambientais (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). A figura 3.1 mostra a constituição de um solo ideal.



**Figura 3.1.** Constituição de um solo ideal (CETESB, 2007).

Nos solos, a matéria orgânica (MO) é formada principalmente por resíduos de plantas, animais e microrganismos; e sua distribuição não é uniforme, variando de acordo com as propriedades físicas, químicas e mineralógicas dos micro-habitats. A MO melhora a estrutura

do solo, reduz a coesão das partículas, aumenta a capacidade de retenção de água (CRA) e a aeração. A estrutura corresponde à agregação da matéria orgânica com as partículas primárias de argila, silte e areia, e outros componentes do solo, levando à formação de agregados estáveis (KIEHL, 1985).

A matéria orgânica tem efeito direto nas características físicas, químicas e microbiológicas do solo. A quantidade e a qualidade da matéria orgânica são determinadas principalmente pela atividade dos microrganismos que, por sua vez, são influenciados pela umidade, arejamento, pH e temperatura (MALAVOLTA, 2002). Porém, nem toda substância orgânica é passível de degradação por microrganismos. As substâncias não degradáveis ou que demoram a serem degradadas, denominadas recalcitrantes, podem ser tanto de origem natural (ex.: húmus) como antropogênica (ex.: xenobióticos, pesticidas, detergentes, etc.) (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006)

Silva *et al.* (1996) descreveram ser rápido o decréscimo do teor de matéria orgânica em decorrência de erosão hídrica e da degradação microbiana, refletindo negativamente na capacidade de troca de cátions pelo solo. Neste caso, as propriedades físicas de importância para o solo, em condições naturais, tais como macroagregação, porosidade e infiltração de água, são reduzidas (BAYER *et al.*, 2004). Em consequência, com o decorrer do tempo, pode haver variação da classe textural, isto é, da proporção de partículas primárias, ao longo das camadas de solo, o que foi comprovado por Faria (2008).

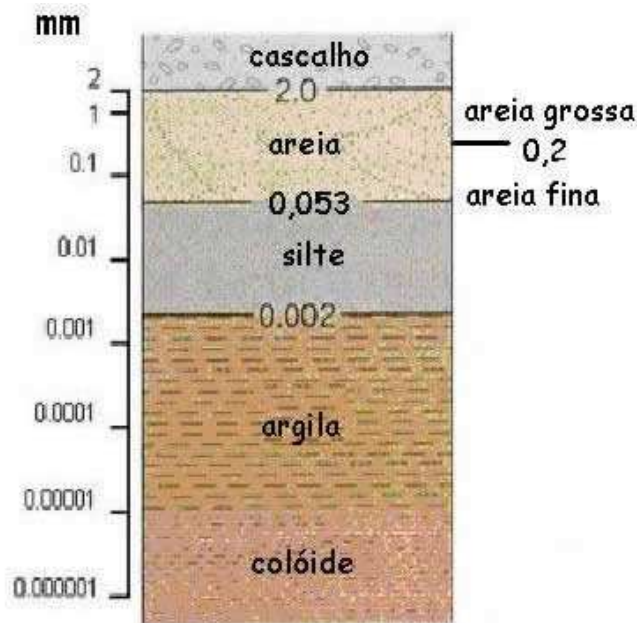
### 3.1.3 Composição Granulométrica e Textura do Solo

O material de origem, qualquer que seja a sua fonte, tem primordial importância em muitos dos atributos dos solos, entre os quais se destacam a textura e a composição química e mineralógica determinantes do comportamento agrônomo e geotécnico.

A composição granulométrica dos constituintes sólidos inorgânicos que constituem os solos depende diretamente da granulometria e da constituição mineralógica do material de origem. Por exemplo, solos oriundos de basaltos e diabásios em condições de clima quente e úmido e em terrenos de relevo suave são, em geral, muito profundos, de textura argilosa e muito argilosa, e apresentam variada composição química e mineralógica (OLIVEIRA, 2008a).

A textura se refere à granulometria das partículas abaixo de 2 mm, como argila, silte e areia (Figura 3.2) que imprimem propriedades importantes ao solo, tais como, reserva de

água, aeração, drenagem, infiltração, erosão, etc. (SILVA, 1996). As frações maiores que a areia são referidas como pedregosidade. A figura 3.2 mostra a constituição da escala textural do solo (CETESB, 2010), que depende da rocha de origem e do seu grau de intemperização (idade).



**Figura 3.2.** Constituição Textural do solo (CETESB, 2010).

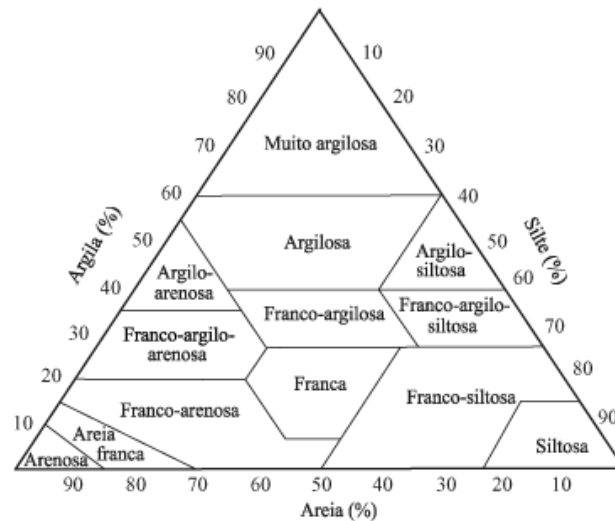
O solo possui textura arenosa quando o teor de argila mais silte for menor ou igual a 15%; textura média se o teor de argila mais silte for maior ou igual a 15%, ou se o teor de argila não superar 35%; textura argilosa se o teor de argila estiver entre 35 e 60%; e, finalmente, textura muito argilosa se o teor de argila for superior a 60% (PRADO, 1995). Para se determinar a textura do solo utiliza-se o triângulo de classificação textural de solos, apresentado na figura 3.3.

A densidade de partículas ( $D_p$ ), também chamada de densidade real, reflete as características do solo em relação a sua massa e volume real. Este parâmetro é de grande relevância como indicativo da composição mineralógica, para o cálculo da velocidade de sedimentação de partículas em líquidos e determinação indireta da porosidade (REINERT e REICHERT, 2006).

A densidade do solo ou densidade aparente ( $D_{ap}$ ), ainda conhecida como densidade *bulk*, é a massa das partículas relacionada a um determinado volume de solo, incluindo o espaço poroso.

Conhecendo-se os valores de  $D_{ap}$  e de  $D_p$  pode-se calcular a porosidade, que está principalmente relacionada à textura, à estrutura e ao teor de matéria orgânica no solo. Da

porosidade depende o transporte e a distribuição de água, bem como a penetração do ar no solo, e ainda o aprofundamento e o desenvolvimento do sistema radicular (SILVA, 1996). Considera-se ideal um solo que apresenta de 50% a 60% de porosidade, o que permite a retenção de água para suprimento de plantas e microrganismos.



**Figura 3.3.** Triângulo de classificação textural de solos (LEMOS e SANTOS, 1984).

### 3.1.4 Solo como habitat

O solo é um habitat de natureza heterogênea complexa e dinâmica, onde organismos com metabolismos díspares convivem lado a lado. Diversos fatores físicos e químicos atuam simultaneamente determinando as condições ambientais, devido à interação de diversos fatores de natureza química, física e biológica, (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Por isso, pode-se estabelecer que o solo é formado por diferentes micro-habitats onde ocorrem relações de dependência essenciais para a sobrevivência das populações nele presentes, proporcionando, assim, condições ideais para a ampla biodiversidade presente em solos.

Cada micro-habitat, microambiente ou microssítio é um local particular onde células, populações ou comunidades microbianas co-existem em um dado momento, sendo seu comportamento influenciado pelas condições físico-químicas e químicas que, por sua vez, também influenciam o ambiente dentro desse espaço (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

No solo, as atividades principais dos organismos são relativas a decomposição da matéria orgânica, produção de húmus, ciclagem de nutrientes e energia, fixação de nitrogênio atmosférico, produção de compostos complexos que causam agregação do solo,



decomposição dos poluentes e controle biológico de pragas e doenças (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

As características do solo são altamente interdependentes, de modo que não se pode modificar nenhuma delas sem modificar as demais, em parte ou na sua totalidade. Assim sendo, tanto uma eventual contaminação do solo quanto a introdução de tecnologias de manejo biológico para sua remediação, na maioria das vezes, modifica sobretudo as características do solo. Nesse sentido, o solo pode ser considerado uma “caixa-preta”, e muitos esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de técnicas que possibilitem estudos visando identificar seus componentes abióticos e bióticos, além da interação entre eles e sua participação nos processos do solo (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

### 3.2 Poluição do Solo

A poluição do solo ocorre pela introdução de elementos ou substâncias que possam afetar a atividade dos componentes bióticos desse ecossistema, e, por conseguinte, comprometer sua funcionalidade e sustentabilidade (BRAGA *et al.*, 2002). Logo, a poluição do solo está relacionada à atividade antropogênica e é dependente da concentração de resíduos incorporados quer acidentalmente quer intencionalmente.

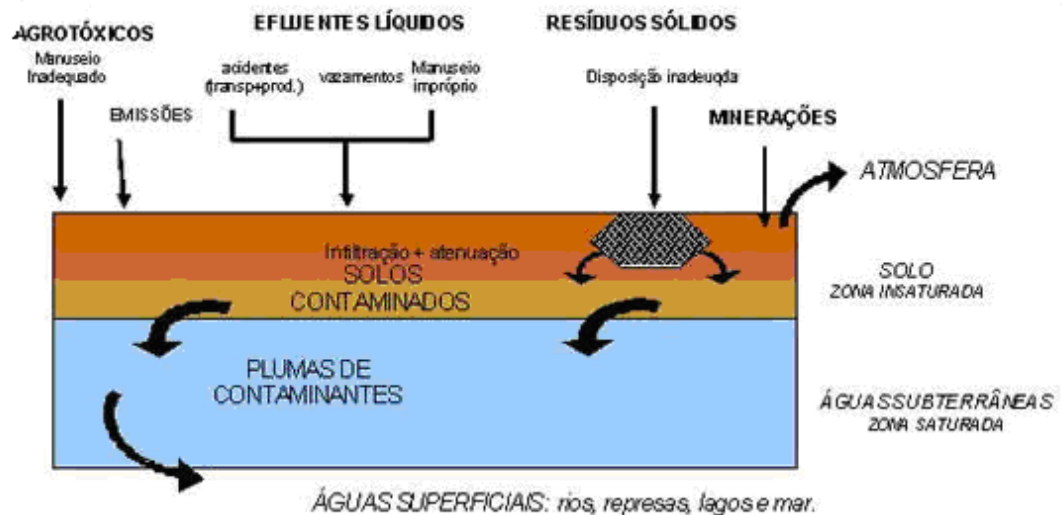
A introdução de contaminantes no solo pode resultar na perda de algumas ou de várias de suas funções e ainda provocar contaminação da água subterrânea. A ocorrência de contaminantes no solo, originados por várias fontes, acima de certos níveis, provoca múltiplas consequências negativas para a cadeia alimentar, para a saúde pública e para os diversos ecossistemas e recursos naturais (RODRIGUES e DUARTE, 2003). A poluição dos solos por metais pesados e substâncias tóxicas orgânicas e inorgânicas tem sido relatada em muitos contextos, sendo essencial sua detecção para evitar problemas relacionados à saúde, bem como às degradações ambientais (BERNARD, 1997; ACCIOLY e SIQUEIRA, 2000).

Um dos poluentes que merece destaque é o petróleo e seus derivados, pelo alto teor de contaminantes com drásticos efeitos no meio ambiente e na saúde. A figura 3.4 apresenta um esboço das formas de contaminação que ocorrem no meio ambiente.

De acordo com a legislação ambiental, certos padrões e indicadores de qualidade do solo devem ser respeitados para controle de um determinado ambiente (BRAGA *et al.*, 2002). Para as inúmeras áreas já degradadas, será necessário adotar formas de tratamento

diferenciadas, caso a caso. Em particular, o tratamento dependerá do tipo de resíduo e das características da própria área.

As tecnologias disponíveis para o tratamento de resíduos em solos são diversas e, muitas vezes, precisam ser utilizadas em conjunto para que se possa enfrentar o problema da multi-contaminação por componentes tóxicos que não podem ser tratados de uma única forma. O tratamento destes resíduos pode incluir métodos químicos, físicos e biológicos (DIAS, 2000).



**Figura 3.4.** Tipos de poluição que mais frequentemente acometem o solo (CETESB, 2007).

### 3.3. O Petróleo e seu derivado: Diesel

Petróleo significa óleo da pedra, por ser encontrado, normalmente, impregnado em determinadas rochas porosas denominadas de arenito, dispostas em camadas geológicas sedimentares. Formou-se na Terra há milhões de anos, a partir da decomposição de pequenos animais marinhos, plâncton e vegetação típica de regiões alagadiças e é encontrado junto ao gás de petróleo, formando bolsões entre rochas impermeáveis ou impregnando rochas de origem sedimentar (FONSECA, 1992 *apud* OLIVEIRA, 2008b). Nele, o carbono e o hidrogênio estão presentes em grandes percentagens, o que comprova ser o petróleo formado

principalmente por hidrocarbonetos. Mas, além de compostos orgânicos, o petróleo também apresenta outros elementos, considerados impurezas, que podem aparecer em toda sua faixa de ebulição, mas tendem a convergir para as frações mais pesadas. As impurezas são: enxofre, o elemento mais abundantemente, encontrado no petróleo na concentração média de 0,65% (m/v); nitrogênio, 0,17% (m/v); oxigênio e metais que podem variar de 1 a 1.200 ppm, sendo a composição e a concentrações dependentes do reservatório de origem.

O petróleo é constituído por uma mistura complexa de centenas de hidrocarbonetos. Assim sendo, a separação em componentes puros ou misturas de composição conhecida é praticamente impossível. Normalmente a separação se dá em frações de acordo com a faixa de ebulição dos compostos. A tabela 3.1 mostra as frações típicas obtidas pelo seu fracionamento (THOMAS *et al.*, 2001).

**Tabela 3.1.** Composição Química de um Petróleo

<b>Hidrocarbonetos</b>	<b>Concentração (%)</b>
Parafinas normais	14
Parafinas ramificadas	16
Parafinas cíclicas (naftênicas)	30
Aromáticos	30
Resinas e asfaltenos	10

Fonte: THOMAS *et al.* (2001).

O óleo diesel é a fração do petróleo composta principalmente por hidrocarbonetos alifáticos, com PE na faixa entre 250 e 400°C. É deste combustível que depende a frota de parte dos motores à explosão (Ciclo Diesel), tais como ônibus, navios, locomotivas, tratores, entre outros, e também, tem uso como fonte de calor (CARDOSO, 2004).

Contudo, a presença de uma mistura complexa de hidrocarbonetos, tais como compostos voláteis, alcanos (de baixa massa molecular) e naftalenos, o torna potencialmente fitotóxico. Crafts e Reiber (1948) *apud* Adam e Duncan (2002) verificaram que a fitotoxicidade aumenta na seguinte ordem: gasolina, querosene, diesel e óleos pesados. Isto indica que as frações leves do combustível causam menos danos às plantas do que as frações mais pesadas, por serem menos tóxicas ou por sua maior volatilidade, o que faz com que a sua perda no solo seja mais rápida. A fração volátil do diesel comercial corresponde de 5 a 10% (v/v) do total na maioria dos casos.

Existem tipos específicos de óleo diesel, cuja característica principal reside no teor de enxofre em sua composição. Os cinco principais tipos são: óleo diesel metropolitano, interior, marítimo e padrão (CARDOSO, 2004, ANP e site Petrobras, 2010), como mostra a tabela 3.2.

**Tabela 3.2.** Especificações de diferentes tipos de óleo diesel comercializados no Brasil

<b>Tipo</b>	<b>Teor de enxofre (%)</b>	<b>Disponibilidade / Utilização</b>
<b>Metropolitano</b>	0,05 (ano 2005)	RJ, SP, MG, SE, BA, PR, RS e ES.
<b>Metropolitano</b>	0,005 (ano 2009)	PA, CE, PE, Cidades: Rio de Janeiro, São Paulo, Curitiba, Belo Horizonte, Salvador, Porto Alegre.
<b>Interior</b>	0,18	Distribuído nas demais cidades do país, possuindo corante vermelho.
<b>Marítimo</b>	$\cong 1,0$	Utilização em motores de embarcações marítimas
<b>Padrão</b>	-	Utilizado para testes em motores a diesel.

Fonte: ANP e Site Petrobras (2010).

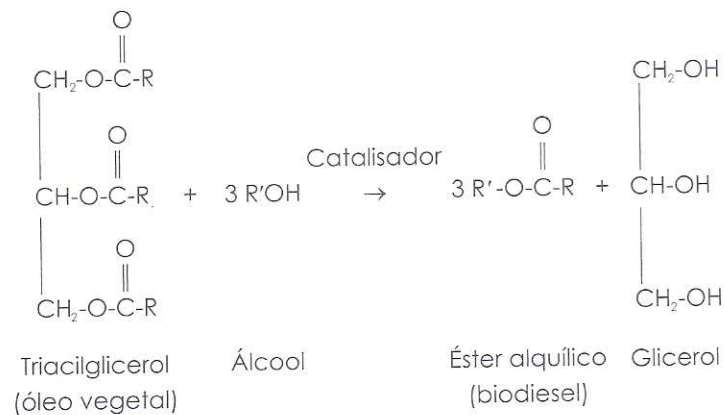
A preocupação quanto à liberação do enxofre para a atmosfera é principalmente devida à chuva ácida, que provoca danos à saúde dos seres vivos, à agricultura, e às construções (prédios, dutos de superfície, e outras estruturas metálicas, etc.). Por isso, a importância de ser feita a redução de enxofre no óleo diesel, principalmente no Brasil, onde há consumo de grandes volumes desse combustível, em função de grande parte destinado ao transporte estar concentrado em rodovias.

Hoje, a Petrobras já disponibiliza o diesel S50 (0,005% de enxofre) para as frotas de ônibus urbanos de algumas cidades brasileiras (Tabela 3.2), o que representa uma redução de dez vezes da emissão de material particulado para o meio ambiente, em relação ao diesel S500 (0,05% de enxofre). A distribuição atende ao cronograma estabelecido pelo Petrobras, Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores (ANFAVEA), Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), Instituto Brasileiro de meio Ambiente (IBAMA), Ministério do Meio Ambiente (MMA), Agência Nacional do petróleo (ANP), e

Instituto do Meio Ambiente (IMA) junto ao Ministério Público Federal, definido sob orientação do Ministério do Meio Ambiente (site: Diário do Comércio, 2010).

### 3.3.1. Combustível Diesel com adição de Biodiesel

O biodiesel é um combustível produzido por transesterificação de óleos vegetais (óleo de soja, caroço de algodão, palma, amendoim, colza/canola, girassol, açafrão, coco), gorduras animais (usualmente sebo), ou óleos de descarte (óleos usados em frituras) com um álcool (Figura 3.5). A escolha da matéria-prima para a produção de biodiesel depende sobretudo dos fatores geográficos e climáticos onde será feita a sua produção.



**Figura 3.5.** Reação de transesterificação, onde R é uma mistura de várias cadeias de ácidos graxos, e R' = CH<sub>3</sub>, por ser o metanol usualmente o álcool mais empregado (Fonte: KNOTHE *et al.*, 2006).

O metanol é o álcool mais utilizado na produção de biodiesel porque tem geralmente o menor custo, por isso serem os produtos da reação muitas vezes denominados metil ésteres de ácidos graxos, ao invés de biodiesel. No entanto, outros alcoóis como etanol ou iso-propanol podem ser empregados para produzir o biodiesel, que resulta em qualidade superior quando obtido pelo emprego de metanol.

O biodiesel é totalmente compatível com o diesel de petróleo em praticamente todas as suas propriedades, principalmente, no número de cetano (indicativo adimensional da qualidade de ignição de um combustível diesel), o que permite a substituição, total ou parcial, do diesel originado do petróleo em diferentes equipamentos (NEWMAN, 1993). Comparativamente ao combustível fóssil, o biodiesel ainda apresenta várias vantagens adicionais, como:

- É derivado de matérias-primas renováveis de ocorrência como soja, girassol, canola, mamona, milho, etc., reduzindo assim a dependência sobre os derivados de petróleo e preservando as suas últimas reservas;
- É biodegradável, ou seja, o biodiesel ou metil ésteres de ácidos graxos são compostos de baixa complexidade estrutural, compostos predominantemente de 8 diferentes ácidos graxos (C<sub>16-18</sub>), incluindo oleato, palmitato, estearato, linoleato, mirístico, laureato e linolenato;
- Gera redução nas principais emissões dos gases de exaustão (com exceção de óxidos de nitrogênio, NO<sub>x</sub>);
- Possui um alto ponto de fulgor, o que lhe confere manuseio e armazenamento mais seguros.

Além disso, o biodiesel apresenta excelente lubricidade, fato que vem ganhando importância se comparado ao petrodiesel de baixo teor de enxofre, cuja lubricidade é parcialmente perdida durante o processo de produção. A lubricidade ideal do petrocombustível pode ser restaurada com a adição de baixos teores de biodiesel (1-2%) (KNOTHE *et al.*, 2006), já que este é miscível com diesel de petróleo em qualquer proporção. Em muitos países, esta propriedade levou ao uso de misturas binárias diesel/biodiesel, ao invés do diesel puro. Essas caracterizadas misturas são designadas por acrônimos, como B20 que representa misturas de 20% de biodiesel no diesel de petróleo.

Em outros países, existem combustíveis à diesel contendo altos teores de biodiesel, chegando a substituição total, como é o caso da Alemanha (OWSIANIAK 2009; site biodiesel.gov.br).

Inicialmente, segundo Brasil (2005) foi fixado em 5% (v/v), o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, em qualquer parte do território nacional, com prazo máximo de aplicação em 2013. Porém, a partir de julho de 2009 foi estabelecido pela ANP a adição de 4% de biodiesel ao diesel; e a partir de janeiro de 2010 já foi adotado o percentual de 5%. A adição de biodiesel (5%) ao diesel gerou uma economia de mais de 900 milhões de reais em importação de diesel por ano. Adicionalmente, cada litro da nova mistura representa um decréscimo de 3% na emissão de CO<sub>2</sub> para a atmosfera, correspondendo a uma diminuição anual de mais de 1,2 milhões de toneladas dessas emissões, além de reduzir também a emissão de material particulado.

### 3.3.2 Biodegradação dos combustíveis

O óleo diesel puramente originado do petróleo é constituído de vários compostos recalcitrantes ao ataque microbiano. A velocidade de biodegradação de cada composto está estreitamente relacionada à sua estrutura química na seguinte ordem de decréscimo de susceptibilidade: n-alcenos > alcanos ramificados > aromáticos de baixa massa molecular > ciclo alcanos >>> aromáticos de alta massa molecular (LEAHY e COLWELL, 1990). Além disso, um maior conteúdo de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA) encontrados no diesel, dentre os óleos combustíveis de destilação média, por conta da sua persistência no ambiente, pode tornar muito mais difícil sua remediação (ADAM e DUNCAN, 1999).

Estudos têm mostrado que em comparação com o diesel, o biodiesel é mais facilmente degradável por microrganismos (MAKAREVICINE e JUNULIS, 2003); DEMELLO *et al.*, 2007). A provável rota para a degradação do biodiesel consiste em: (1) clivagem do metil éster por uma esterase, com geração de ácido graxo e o álcool associado; e (2) hidrólise do ácido graxo noo Ciclo de Krebs, metabolismo respiratório, ou incorporação direta em lipídeos celulares. Certos microrganismos, tais como *Pseudomonas oleovorans*, *P. mendocina*, *P. aeruginosa*, *Marinomonas vaga*, *Escherichia coli*, *Burkholderia gladioli*, *B.cepacia*, *Bacillus subtilis*, apresentam potencial para a degradação de biodiesel (FOLLIS, 1994; VIEIRA *et al.*, 2006).

Alguns pesquisadores relataram a facilidade de degradação de hidrocarbonetos de petróleo e seus derivados quando metil ésteres de ácidos graxos (biodiesel) estão presentes. No entanto, também existem trabalhos publicados que demonstram que a presença do biodiesel não interfere na degradação do diesel.

O cometabolismo é o processo, pelo qual, alguns microrganismos são capazes de transformar compostos químicos de difícil degradação, na presença de outro substrato prontamente metabolizável. Logo, a transformação cometabólica pode ser usada para eliminar substratos recalcitrantes (resistentes), como o petróleo e seus derivados (ZHANG, 1998 *apud* PASQUALINO, 2006).

Estudos realizados por ZHANG *et al.*, 1998; PASQUALINO, 2006; OWSIANIAK, 2009 mostraram ser a degradação do diesel ( $\geq 10\%$  v/v) mais eficiente na presença de biodiesel. Segundo esses autores, a presença do biodiesel, estimula a transformação metabólica dos hidrocarbonetos pelos microrganismos. Mudge e Pereira (1999) também observaram o mesmo efeito cometabólico do biodiesel na biodegradação de hidrocarbonetos

do diesel. Por outro lado, DeMello *et al.* (2007) observaram, que a biodegradação dos hidrocarbonetos do diesel (B0) não foi acelerada pela presença de biodiesel (B8, B25, B100), águas marinhas. Ao contrário, segundo os autores, a presença de biodiesel pode induzir dispersões dos hidrocarbonetos na água. Já, Prince *et al.* (2008) observaram a biodegradação da mesma faixa de alcanos quer em óleo diesel quer na mistura B20.

Os trabalhos citados foram realizados em meios líquidos. E, apesar do extenso levantamento bibliográfico realizado, não foi encontrado nenhuma publicação referente ao efeito do biodiesel na biodegradação de diesel em solo por Atenuação Natural, o que reforça a relevância do presente estudo.

### **3.4 Processos biológicos aplicados na remediação de solos contaminados com petróleo e derivados**

#### *3.4.1. Tratamentos Biológicos*

A aplicação de processos biotecnológicos envolvendo, individualmente ou conjuntamente, microrganismos e/ou enzimas, e surfactantes, com o objetivo de solucionar ou minorar problemas de poluição ambiental, tem se tornado crescente. Logo, a degradação microbiana de hidrocarbonetos constitui um campo de pesquisa em pleno desenvolvimento (BONAVENTURA e JOHNSON, 1997). Destaca-se a biorremediação, que há muitas décadas, vem sendo usada com sucesso no tratamento de efluentes industriais, esgotos domésticos, aterros de resíduos perigosos e aterros de resíduos urbanos, em geral (DIAS, 2000).

A biorremediação baseia-se nos fenômenos de biotransformação de matéria orgânica que ocorrem naturalmente no ambiente, pois emprega organismos vivos, sendo as bactérias e os fungos, os principais responsáveis pela degradação de compostos complexos em outros mais simples, podendo, inclusive, levar à mineralização das substâncias, com geração de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Assim, a biorremediação pode ser definida como um conjunto de tecnologias, que utilizam processo(s) biológico(s), aplicados à recuperação ou remediação de áreas contaminadas, ou ao tratamento de efluentes, que contenham compostos orgânicos tóxicos, o que comprometeria seu descarte direto no ambiente (DIAS, 2000).

O objetivo da biorremediação, quando usada como técnica de tratamento em áreas contaminadas, é induzir ou acelerar os processos biológicos naturais de degradação de



compostos de interesse, incluindo compostos orgânicos ou inorgânicos. Assim, o desafio principal é utilizar a capacidade intrínseca dos microrganismos de degradar matéria orgânica para degradar compostos químicos tóxicos, tanto de origem natural como compostos sintéticos (DIAS, 2000).

Segundo Bernoth *et al.* (2000), nas aplicações mais comuns da biorremediação, microrganismos que ocorrem naturalmente em solos ou águas contaminados são estimulados a acelerar a degradação de contaminantes orgânicos, por meio da manipulação de condições ambientais tais como suprimento de oxigênio, concentração de nutrientes e teor de umidade.

Dentre os parâmetros interferentes, destacam-se ainda, propriedades físico-químicas do solo e histórico do local contaminado, ecologia microbiana (com ênfase para a competição interespecíes) e metodologia do processo. O sucesso da biodegradação também é influenciado pelas fontes de energia (doadores de elétrons), aceptores de elétrons, nutrientes, pH, temperatura e substratos inibidores ou metabólitos, além da densidade da população de microrganismos degradadores de óleo e o seu potencial de biodegradação para a biorremediação de locais contaminados (VOGEL, 1996; BOOPATHY, 2000; BENTO *et al.*, 2005; HAMDI *et al.*, 2007). A biorremediação pode ocorrer sob condição tanto aeróbia quanto anaeróbia, quando os microrganismos utilizam comoceptor final de elétrons o oxigênio molecular, ou outros tipos de aceptores ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , etc.), respectivamente (BAPTISTA, 2007).

Para que a biorremediação seja um processo efetivo nas áreas a serem tratadas, alguns fatores são essenciais (DIAS, 2000):

- presença de agentes biológicos capazes de degradar as substâncias alvo;
- enzimas responsáveis pela degradação do composto-alvo devem estar ativas;
- as condições ambientais devem ser favoráveis (pH, temperatura, umidade, aeração)

A biorremediação é uma prática atrativa de remoção de hidrocarbonetos de petróleo e seus derivados, por causa da simplicidade da manutenção, aplicação em grandes áreas, baixo custo, além da possibilidade de ocasionar a destruição completa do contaminante (BENTO *et al.*, 2005).

A biorremediação vem alcançando importância mundial, uma vez que o aumento da atividade industrial está degradando, cada vez mais, os ecossistemas naturais. O emprego de microrganismos conhecidos para o tratamento de rejeitos potencialmente tóxicos já é uma prática habitual em alguns países desenvolvidos (LEMOS, 2008).

De acordo com o tipo de tratamento, o processo pode ser empregado no local onde ocorreu a contaminação (biorremediação *in situ*) ou através da remoção do meio contaminado (biorremediação *ex situ*). A escolha da técnica a ser utilizada dependerá das condições ambientais (permeabilidade do solo, por exemplo), do custo e do tempo necessário para o tratamento do solo contaminado (BAPTISTA, 2007).

As técnicas *in situ*, geralmente, envolvem o aumento da atividade microbiana no local, por meio da alteração da área degradada, usando-se a adição de nutrientes, ajuste de pH, o controle da umidade e da aeração para propiciar as condições ótimas de degradação biológica dos componentes tóxicos (FERRARI, 1996; BOOPATHY, 2000; MARTINS, 2003).

Na biorremediação *ex situ*, o solo é retirado e transferido até a unidade de tratamento. Para este propósito, emprega-se a remoção do material contaminado, geralmente, por escavação do solo e o bombeamento da água. Quando o tratamento é do tipo *ex situ*, em geral, envolve o uso de biorreatores ou de algum mecanismo que possibilite o aumento do controle dos parâmetros mais importantes do processo de remediação (FERRARI, 1996; BOOPATHY, 2000; MARTINS, 2003).

As tecnologias normalmente empregadas para a biorremediação de solos impactados incluem: atenuação natural monitorada, bioventilação, *landfarming*, fitorremediação, além de técnicas auxiliares, como bioaumento e bioestímulo (SKIPPER, 1999 *apud* BENTO *et al.*, 2005). A técnica deve ser escolhida caso a caso, e vai depender primeiramente da caracterização do local e do contaminante.

A atenuação natural monitorada é uma forma passiva de remediação, que envolve a atividade microbiana sem qualquer forma de intervenção humana (NYER, 1998 *apud* ROSADO, 2005). É uma técnica simples, normalmente lenta, que depende dos processos naturais para reduzir a toxicidade da massa e/ou a mobilidade de um contaminante no solo (SCOW e HICKS, 2005). No entanto, as condições ambientais devem ser adequadas para se empregar tal técnica. Além disso, é necessária a presença de microrganismos nativos capazes de biodegradar o contaminante presente no solo (BAPTISTA, 2007).

Em geral, os microrganismos estão presentes na área impactada, e quanto maior o tempo de exposição deles aos compostos xenobiontes, maior a probabilidade de alguns adquirirem a capacidade genética de decodificar enzimas que atuem na degradação desses compostos (DIAS, 2000).

Segundo a Agência Ambiental Norte-Americana – USEPA - o termo “Atenuação Natural Monitorada” (ANM) refere-se ao uso dos processos de atenuação natural que ocorrem

naturalmente no solo, dentro de um contexto de remediação monitorada e controlada de um sítio, em um período de tempo razoável, com objetivo de reduzir a concentração e toxicidade de contaminantes até níveis adequados à proteção da saúde humana e ao meio ambiente (USEPA, 1999).

Este processo *in situ* inclui biodegradação, dispersão, diluição, sorção, volatilização, estabilização química ou biológica, transformação ou destruição do contaminante. Por depender de processos exclusivamente naturais, a AN pode ser muito lenta, o que pode exigir o uso conjunto de outras técnicas e o monitoramento do local por longos períodos de tempo por meio das análises das concentrações de compostos de interesse (TELHADO, 2009).

O processo de biodegradação ocorre devido à adaptação natural da microbiota nativa do solo à presença do contaminante e pode ser monitorado através do aumento da biomassa microbiana, atividades enzimáticas, etc. (SCHELZA *et al.*, 2007).

Os processos de ANM em sítios com derramamento de petróleo são bem documentados na literatura. Em condições de campo apropriadas, os compostos BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos), por exemplo, podem ser naturalmente degradados pela atividade microbiana e produzir compostos finais não tóxicos, como dióxido de carbono e água (MULLIGAN e YONG, 2004). Se a atividade microbiana for suficientemente rápida, a expansão da pluma de BTEX será reduzida e a concentração desses hidrocarbonetos tanto nas águas subterrâneas quanto no solo poderá eventualmente decrescer a níveis permitidos pela legislação.

A ANM tem vantagens e desvantagens, que devem ser cuidadosamente consideradas durante a caracterização de um sítio e avaliação das alternativas de remediação antes de ser escolhida como a alternativa de remediação. Como qualquer processo *in situ*, gera um volume reduzido de resíduos, diminuindo o risco de contaminação de outros locais, o que pode ocorrer nos tratamentos *ex situ* (ASTM, 2004). Ainda mais, o processo de ANM pode ser aplicado em toda área ou em parte dela, além de poder ser usado em associação com outras tecnologias de remediação.

Em geral, a ANM tem custo reduzido quando comparado a outros métodos de remediação. Além disso, é um método que pode ser usado antes ou após outras tecnologias de remediação (MULLINGAN e YONG, 2004), podendo ser aplicado mesmo quando o contaminante encontra-se amplamente difundido no solo (IWAMOTO e NASU, 2001).

Se as condições não forem satisfatórias há necessidade de se promover as devidas correções dos fatores limitantes de modo a permitir a eficiente biodegradação do

contaminante. Essa técnica é denominada de bioestimulação e visa estimular o crescimento da população microbiana nativa pelo suprimento de nutrientes essenciais, de aceptores finais de elétrons, pela correção do pH e do teor de umidade. Se essas medidas forem realizadas de forma apropriada, a biodegradação de hidrocarbonetos será estimulada com menos impacto ao meio ambiente (BAPTISTA, 2007).

No caso da concentração da população microbiana capaz de degradar os compostos orgânicos contaminantes ser baixa, emprega-se o bioaumento. Essa técnica consiste no aumento dessa população pela adição de microrganismos endógenos (nativos) adaptados às condições do solo e do contaminação a ser tratado (McGILL *et al.*, 1981 *apud* BAPTISTA, 2007). Quando na comunidade microbiana nativa não existe uma população capaz de levar a biodegradação dos contaminantes pode-se adicionar microrganismos exógenos; técnica nomeada de bioenriquecimento.

Devido a multiplicidade de detalhes que envolvem a biorremediação, podem existir aspectos que acabam por complicar extremamente o processo. Dentre eles, pode-se mencionar o nível de toxicidade de contaminantes, a degradação incompleta dos compostos e a biodisponibilidade das substâncias.

Quando um solo contaminado com hidrocarbonetos é submetido à biorremediação, a depleção do hidrocarboneto é, tipicamente rápida. Porém, a taxa de redução decresce ao longo do tempo e, frequentemente, uma concentração residual do contaminante ainda permanece no solo. Esta fração não – biodisponível (recalcitrante ou de difícil degradação por populações microbianas) pode representar um baixo risco ambiental (TELHADO, 2009). A determinação da fração biodisponível em um processo de biorremediação representa uma estimativa do nível máximo de biodegradação alcançado, assim como uma indicação do perigo à saúde ambiental.

#### *3.4.2 Fatores que Influenciam a Biodegradação*

A biodegradação de petróleo e seus derivados está relacionada ao movimento e distribuição dos hidrocarbonetos no solo e a capacidade dos microrganismos de degradá-los. No entanto, outros fatores podem influenciar a taxa de biodegradação de hidrocarbonetos no solo. A manipulação e a otimização destes fatores é fundamental para alcançar uma eficiente biorremediação.

### 3.4.2.1 Propriedades Físico-químicas do Óleo Diesel

O acúmulo de um dado composto no meio ambiente poderá ser influenciado pela sua estrutura, concentração e toxicidade. Os compostos que não podem ser transformados, tenderão a persistir até que haja migração para outro compartimento do ambiente, onde aceptores de elétrons e microrganismos possam estar disponíveis (STREVETT *et al.*, 2002). Alguns compostos são difíceis de serem biodegradados em função do número, do tamanho ou da localização dos grupos funcionais que impedem o ataque enzimático (GODSY, 1994).

Os produtos da biodegradação geralmente são transientes, mas alguns podem se acumular no ambiente. E, pode ocorrer que os produtos gerados pela biodegradação sejam tão ou mais tóxicos do que o produto de origem (STREVETT *et al.*, 2002). Os alcanos C<sub>2</sub> a C<sub>6</sub> podem ter efeito inibitório para alguns microrganismos, pois hidrocarbonetos de baixa massa molecular causam a solvatação, o que resulta na destruição das estruturas da membrana intracelular e pericelular lipídica dos microrganismos. De acordo com SIKKEMA *et al.* (1995), o acúmulo de compostos lipofílicos na membrana de microrganismos tem efeito nas propriedades estruturais e funcionais, ocorrendo a perda de sua integridade e o aumento da permeabilidade de prótons e íons. Observações quanto ao efeito tóxico de aromáticos, cicloalcanos, alcanos, álcoois e fenóis podem ser explicadas pela interação desses compostos com os constituintes da membrana. Os n-alcanos de longa cadeia C<sub>10</sub> a C<sub>22</sub> são geralmente menos tóxicos aos microrganismos e mais biodegradáveis que hidrocarbonetos mais solúveis em água (RISER-ROBERTS, 1998).

Segundo SIKKEMA *et al.* (1995), o óleo refinado pode ser mais tóxico aos microrganismos do que o óleo cru, visto que os hidrocarbonetos voláteis são mais tóxicos do que alcanos de elevada massa molecular. Além disso, o efeito tóxico de hidrocarbonetos (por exemplo, BTEX) aos microrganismos aumenta com a diminuição de sua viscosidade.

### 3.4.2.2 Teor de Umidade

A umidade do solo é essencial para a biodegradação uma vez que a maioria dos microrganismos vive no filme d'água em torno da partícula do solo, na interface óleo-água (McGILL *et al.*, 1981). A área da interface óleo-água limita o espaço de adesão das bactérias e, conseqüentemente, está diretamente relacionada à degradação microbiana (POREMBA *et*

*al.*, 1993). Ademais, a ação dos microrganismos é limitada pela solubilidade dos compostos. Segundo Ortega-Calvo *et al.* (1997), os microrganismos do solo degradam os compostos dissolvidos em água mais facilmente do que aqueles sorvidos na matriz do solo.

A água é importante para o movimento dos microrganismos unicelulares, que, por isso, são restritos aos filmes de água, enquanto fungos filamentosos e actinomicetos (actinobactérias) podem atravessar os vazios insaturados, através do crescimento micelial (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Ademais, a água serve como meio de transporte para alguns nutrientes e compostos orgânicos que se difundem pela célula microbiana e através da qual os produtos metabólicos são removidos.

O teor de umidade também influencia a aeração e o pH do solo. Quando a matriz do solo está completamente preenchida com água, a difusão dos gases através do solo é severamente restringida, criando condições anóxicas, e deste modo vindo a comprometer a atividade metabólica dos microrganismos aeróbios.

De acordo com dados da literatura, o teor de umidade deve estar na faixa de 25 a 85% da capacidade de campo do solo, sendo a faixa ótima de 50 a 80% para a biodegradação de contaminantes em solo (WDNRBRR,2004). No entanto, não há unanimidade quanto ao teor ótimo de umidade, posto que alguns autores citam que este se encontra entre 35 e 65% da capacidade de campo do solo (HUPE *et al.*, 2001).

#### 3.4.2.3 Teor de Nutrientes

As bactérias necessitam para seu crescimento de uma combinação de elementos, macro e micronutrientes, para síntese de moléculas estruturais, material genético, enzimas, entre outros. Logo, o metabolismo e o crescimento microbiano são dependentes da disponibilidade desses nutrientes essenciais.

Devido à grande diversidade das bactérias, a proporção de elementos nutricionais requeridos para crescimento varia muito, sendo carbono, nitrogênio fósforo e enxofre, os principais macronutrientes requeridos. Por isso, em solos e sedimentos aquíferos contaminados com compostos orgânicos, o carbono não é limitante visto ser o principal componente desses compostos (GODSY, 1994).

Os compostos orgânicos biodegradáveis são fontes de carbono e energia para o crescimento microbiano. O enxofre está geralmente disponível em quantidade suficiente para o crescimento de microrganismos. Outros nutrientes (potássio, cálcio, magnésio, etc) são

geralmente encontrados em concentrações adequadas para o metabolismo em muitos solos. Entretanto, alta concentração de cálcio pode precipitar fosfato e reduzir a quantidade de fósforo disponível ao metabolismo microbiano.

Os principais elementos limitantes para crescimento são nitrogênio e fósforo (GODSY, 1994). De acordo com Ferguson *et al.* (2003), solos contaminados que apresentam baixo teor de nitrogênio e fósforo necessitam de correção destes nutrientes para permitir um aumento na degradação de hidrocarbonetos.

Rivera-Espinoza e Dendooven (2004) avaliaram o emprego de biossólidos (ricos em nitrogênio, fósforo e matéria orgânica) na bioestimulação de um solo contaminado com óleo diesel. Os autores concluíram que a adição desses materiais acelerou a mineralização do óleo diesel e diminuiu a concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) residual. No entanto, nem sempre a correção de nutrientes pode favorecer o aumento da eficiência de biodegradação de HTP, como observado por Yerushalmi *et al.* (2003) em seus experimentos. Bento *et al.* (2005) observaram também que a bioestimulação de microrganismos do solo resultou em menor degradação de óleo diesel quando comparado com a atenuação natural. Entretanto, esses autores argumentam que a eficiência da bioestimulação pode ser afetada pela biodisponibilidade dos nutrientes.

#### 3.4.2.4 Temperatura

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que afeta o crescimento e a sobrevivência de microrganismos. À medida que a temperatura aumenta, as reações enzimáticas e químicas na célula ocorrem em maiores velocidades, e, por conseguinte, o crescimento torna-se mais rápido. Entretanto, em temperaturas superiores a 40°C, as proteínas microbianas podem ser irreversivelmente danificadas e, portanto, as reações enzimáticas não ocorrem, causando a interrupção das funções da célula (MADIGAN *et al.*, 2000).

De acordo com GODSY (1994), as velocidades de degradação enzimática e o metabolismo microbiano dobram a cada aumento de 10°C até que seja atingida a temperatura de inativação que geralmente encontra-se entre 40 e 50°C para a maioria das bactérias. De acordo com MOREIRA e SIQUEIRA (2006), as velocidades de reação microbiana são maiores a temperatura em torno de 28°C e sofrem decréscimos acentuados em temperaturas menores que 25°C e maiores que 35°C. A faixa de 30 a 40°C é considerada ideal, por proporcionar máximos de biodegradação de hidrocarbonetos. Acima desta faixa, a atividade

enzimática é reduzida e a toxicidade dos hidrocarbonetos aumenta (LEAHY e COLWELL, 1990).

#### 3.4.2.5 pH

O pH ótimo para mineralização de hidrocarbonetos se encontra na faixa entre 6,5 e 8,0 (DRAGUN, 1998). De acordo com MADIGAN *et al.* (2000), essa faixa é considerada ótima para o crescimento da maioria dos microrganismos. Em valores extremos de pH podem retardar a capacidade da população microbiana de degradar hidrocarbonetos é reduzida (LEAHY e COLWELL, 1990).

Além de afetar o crescimento microbiano, o pH pode também influenciar a solubilidade ou a disponibilidade de nutrientes (por exemplo, fósforo) e a toxidez de nutrientes minerais, a mobilidade do material potencialmente tóxico e a reatividade dos minerais. O ferro, o manganês e o zinco são menos disponíveis em valores de pH acima de 7,0. O ferro, o alumínio e o manganês atingem níveis tóxicos em valores de pH menores que 5,0 e o fósforo está menos disponível em valores extremos de pH (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

#### 3.4.2.6 Potencial Redox (Eh)

Um dos principais fatores que governam a biodegradação é a natureza e a biodisponibilidade de aceptores de elétrons (STREVETT *et al.*, 2002). Para sobreviver, os microrganismos necessitam, além de fontes de nutrientes, de aceptores finais de elétrons.

Na tabela 3.3 é apresentada a relação entre a forma de respiração microbiana, os aceptores de elétrons, as características e o potencial de oxi-redução (BAPTISTA, 2007). O potencial de oxi-redução mede a tendência de uma substância doar ou receber elétrons (MADIGAN *et al.*, 2000) e, por conseguinte, é uma medida quantitativa da energia livre envolvida na transferência de elétrons. Doadores e aceptores de elétrons são denominados redutores e oxidantes, respectivamente.



**Tabela 3.3.** Relação entre a Forma de Respiração Microbiana, Aceptores de Elétrons e Potencial Redox

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

Fonte: DRAGUN (1998); MADIGAN *et al.* (2000) e BAPTISTA, 2007.

\*Potencial muito dependente do pH. O valor listado é para pH 2-3, sendo em pH 7, de aproximadamente +20 mV.

O oxigênio molecular atua comoceptor final de elétrons durante a degradação aeróbia, enquanto nitrato, sulfato ou dióxido de carbono são os aceptores de elétrons envolvidos na degradação anaeróbia. Para microrganismos facultativos, quando o oxigênio molecular está disponível, este tende a ser preferencialmente utilizado em relação aos outros possíveis aceptores presentes (MADIGAN *et al.*, 2000), pois é a opção termodinamicamente mais favorável (STREVETT *et al.*, 2002). Na tabela 3.3, verifica-se que a respiração aeróbia é a mais eletropositiva; logo, mais energia é disponibilizada quando o O<sub>2</sub> é usado do que quando outroceptor de elétrons é empregado (MADIGAN *et al.*, 2000).

Em ambiente rico em matéria orgânica, os processos aeróbios consomem rapidamente o oxigênio estabelecendo uma condição de anaerobiose. Se mais do que umceptor de elétrons está presente, somente um predominantemente suprirá mais energia aos microrganismos nativos e estes tenderão a dominar o ambiente (STREVETT *et al.*, 2002). À medida que o potencial diminui ocorre transição da predominância de aeróbios para facultativos e em seguida anaeróbios (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Portanto, as espécies microbianas atuam de forma sequenciada em função do pH e do potencial redox.

Os organismos aeróbios envolvidos no processo de biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo e derivados, utilizam o oxigênio comoceptor final de elétrons e o carbono orgânico, proveniente dos contaminantes, como fonte de carbono (RIZZO, 2008). A degradação de hidrocarbonetos não substituídos no ambiente, como alcanos, cíclicos saturados e benzenos, têm a oxidação inicial mediada pelo oxigênio

molecular e, após algumas reações, eventualmente, sofrem decomposição pelas vias metabólicas comuns aos microrganismos, como glicólise e ciclo de Krebs (DIAS, 2000). Sabe-se que hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA), e benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) não são facilmente degradados aerobicamente, mas possivelmente isso ocorra sob condição anaeróbia (YOUNG e PHELPS, 2005).

#### 3.4.2.7 Densidade de Microrganismos Degradadores de Óleo

O sucesso da biorremediação é dependente das espécies microbianas presentes, mais especificamente da presença ou ausência de bactérias hidrocarbonoclásticas. A taxa de biodegradação depende da presença e do número de microrganismos no solo capazes de degradar os compostos orgânicos. Existe uma relação direta entre a velocidade de degradação e o tamanho da população, já que quanto maior o número de microrganismos capazes de degradar o composto, mais rápida será a sua degradação (DRAGUN, 1998). O tamanho da população microbiana é maior na superfície do solo, visto que nesta região a temperatura, a umidade, a aeração e a energia são relativamente mais favoráveis para o desenvolvimento dos microrganismos (DRAGUN, 1998).

De acordo com ATLAS (1981), em ecossistemas não poluídos, os microrganismos degradadores de hidrocarbonetos geralmente constituem menos do que 0,1% da população microbiana. O aumento dessa comunidade pode estar relacionado a sua exposição aos hidrocarbonetos em um ambiente não contaminado. Entretanto, quando a concentração da população microbiana degradadora de compostos orgânicos é baixa, uma opção para o aumento desta é a adição de microrganismos endógenos (nativos), ou exógenos (externos) adaptados às condições do solo a ser tratado.

Bento *et al.* (2005) avaliaram a adição de microrganismos exógenos em solos franco-arenosos e verificaram que os solos apresentaram comportamentos distintos. Por exemplo, o solo proveniente de Hong Kong, após bioaumento, apresentou baixa biodegradação de HTP em relação à atenuação natural. Segundo os autores, os microrganismos exógenos não foram capazes de competir com os microrganismos nativos que estavam mais adaptados ao ambiente. Em contrapartida, o bioaumento do solo de Long Beach, foi positivo tanto para a remoção da fração leve quanto para a fração pesada de hidrocarbonetos de petróleo, quando comparados com os da atenuação natural.

As bactérias filamentosas (actinomicetos) também desempenham importante papel na biodegradação de petróleo e derivados. Sob o ponto de vista nutricional, são microrganismos pouco exigentes e capazes de utilizar uma grande variedade de substâncias como fonte de carbono, inclusive hidrocarbonetos aromáticos (MADIGAN *et al.*, 2000).

As bactérias associadas às cianobactérias parecem formar um consórcio eficiente para a biodegradação de hidrocarbonetos. As cianobactérias fornecem oxigênio e nitrogênio, assim como matéria orgânica essencial para a atividade das bactérias heterotróficas aeróbias. Por sua vez, essas bactérias degradam compostos de petróleo, reduzindo seu efeito tóxico para as cianobactérias, que, em consequência, irão potencializar a biodegradação dos resíduos oleosos (ABED e KÖSTER, 2005). O emprego de consórcios microbianos possibilita a degradação de uma variedade de compostos complexos, posto que diferentes microrganismos contribuirão através de seu complexo sistema enzimático.

No solo, os fungos, especialmente os filamentosos por serem os mais freqüentes neste ambiente, participam da biodegradação de hidrocarbonetos. Os fungos são conhecidos pela sua diversidade e notável capacidade de degradar materiais naturais complexos e persistentes, tais como lignina, quitina e celulose microcristalina. Eles também são capazes de crescer sob condições ambientais de estresse, como: baixos valores de pH, carência nutricional e baixa atividade de água, o que favorece o seu predomínio em relação aos demais grupos microbianos (MOLLEA *et al.*, 2005; DAVIS e WESTLAKE, 1978 *apud* ATAGANA, 2006).

#### 3.4.2.8 Biodisponibilidade do Contaminante

A degradação de compostos orgânicos pode ser influenciada pela biodisponibilidade do contaminante à população microbiana do solo. A biodisponibilidade pode estar relacionada tanto às propriedades químicas dos compostos orgânicos quanto às características do solo (MAHRO *et al.*, 2001). Além disso, outro fator que pode influenciar a biodisponibilidade é a transferência de massa do contaminante, ou seja, a taxa com que o substrato pode alcançar a célula microbiana. Como as moléculas apresentam tamanhos muito distintos podem se difundir pelos poros do solo onde a bactéria não tem acesso devido ao seu tamanho (MAHRO *et al.*, 2001). Por conseguinte, a textura e a estrutura do solo influenciam na biodisponibilidade dos hidrocarbonetos, visto que os solos que apresentam partículas maiores como areia viabilizam o acesso dos microrganismos no interior dos poros.

No solo, a matéria orgânica e a argila apresentam elevada capacidade de sorção de compostos orgânicos. Os ácidos fúlvicos, os ácidos húmicos e as argilas frequentemente coexistem no solo, influenciando a biodegradação dos poluentes orgânicos hidrofóbicos (ORTEGA-CALVO *et al.*, 1997). Segundo Harms e Bosma (1997), os compostos químicos estão disponíveis aos microrganismos somente quando estão dissolvidos em água. Conseqüentemente, líquidos não aquosos (NAPL) e compostos sólidos têm que se dissolver, enquanto os substratos sorvidos têm que ser desorvidos para se tornarem biodisponíveis.

Dessa forma, as velocidades de adsorção e desorção podem ser influenciadas pelas propriedades das partículas de argila e da matéria orgânica no solo, ao passo que a velocidade de difusão do óleo pode ser afetada pelo tamanho do poro e da extensão da adsorção do contaminante na superfície da partícula. No entanto, a velocidade de degradação de alguns compostos orgânicos adsorvidos pode ser influenciada pela densidade da população microbiana que se encontra na superfície das partículas do solo e/ou na fase líquida (DRAGUN, 1998).

## ***CAPÍTULO 4: MATERIAIS E MÉTODOS***

### **4.1 Solo**

Neste trabalho foi utilizado solo do tipo argissolo de coloração avermelhada, antigo podzólico vermelho-amarelo, bastante comum no Brasil e, sobretudo, representativo do Estado do Rio de Janeiro (RIBEIRO, 2009). O solo foi coletado no município de Belford Roxo, Rio de Janeiro, em local sem histórico de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo ou de seus derivados. Essa área tem sido usada para empréstimo de solo para aterro em áreas de refinarias, porém existem poucas publicações que abordam tratamentos de biorremediação desse tipo de solo quando contaminado por derivados de petróleo

A coleta do solo se deu em 2006, quando foi distribuído em barricas fechadas que foram mantidas em local coberto à temperatura ambiente. Para esse estudo, em março de 2009, o solo, em quantidade suficiente para o desenvolvimento de todo o trabalho experimental, foi inicialmente seco, por espalhamento no pátio do Centro de Tecnologia Mineral (CETEM/MCT), onde permaneceu à temperatura ambiente durante 3 dias. O solo, já livre de folhas, raízes e gravetos, foi desagregado em um britador de mandíbulas (Figura 4.1), e peneirado em peneira de 1,68 mm, que corresponde a 10 mesh (Figura 4.2). O material com granulometria inferior a 1,68 mm, isto é, que passou pela malha da peneira, foi separado, enquanto que o de maior granulometria foi desagregado em moinho de rolos, e mais uma vez peneirado. O material peneirado foi recolhido e acrescido à fração anterior, totalizando uma massa de 446 kg.

A amostra de solo, com granulometria inferior a 1,68 mm, foi homogeneizada e depois quarteada em 16 cortes de 25 kg cada. As sub-amostras foram devidamente ensacadas e etiquetadas, sendo armazenadas em câmara fria a 4°C até posterior utilização.



**Figura 4.1.** Britador de mandíbulas usado para a desagregação do solo.



**Figura 4.2.** Peneiramento do solo.

#### *4.1.1 Caracterização do solo*

A análise da composição granulométrica (proporção das diferentes classes de partículas) foi realizada segundo EMBRAPA (1997). Esta análise se baseia na velocidade de sedimentação das partículas que compõem o solo.

Para tanto, em um becker de 200 mL de capacidade foi preparada uma solução de solo (20 g do solo em 100 mL de água deionizada) acrescida de 10 mL de dispersante químico (NaOH 1N). O becker foi tampado com vidro de relógio, e a solução de solo permaneceu em repouso, à temperatura ambiente, para a desagregação das partículas. Após 24 h, a solução de

solo foi vigorosamente agitada, em placa de agitação, por 15 minutos e, a seguir, peneirada em peneira de 0,053 mm de malha para separar as frações areia e argila.

O material retido na peneira, isto é, as frações grosseiras (areia fina e areia grossa) foram então secas em estufa à 105°C por 24 h, quando foram pesadas em balança analítica.

A fração argila, material que passou pela peneira, foi transferida para uma proveta e avolumada a 1000 mL com água deionizada (Figura 4.3). Na proveta, a fração argila foi homogeneizada, com auxílio de um bastão de vidro, por 2 minutos e depois, deixada em repouso para sedimentação. O tempo de repouso foi determinado em função da temperatura (EMBRAPA, 1997). Findo o tempo de sedimentação estipulado, foi retirada uma alíquota de 50 mL do material em suspensão, que foi seca em estufa (105°C) e, após 24 h, pesada.



**Figura 4.3.** Fração argila do solo.

A fração de silte foi calculada por diferença das outras frações (areia e argila), correspondendo ao complemento dos percentuais para 100% (EMBRAPA, 1997). O cálculo das frações foi feito com base nas fórmulas apresentadas na tabela 4.1.

**Tabela 4.1.** Fórmulas usadas para calcular os teores de argila, areia e silte no solo.

Teor	Fórmulas
Argila	$[\text{argila (g)} + \text{dispersante (g)}] - \text{dispersante (g)} \times 1000$
Areia fina	$\text{areia fina (g)} \times 50$
Areia grossa	$[\text{areia fina (g)} + \text{areia grossa (g)}] - \text{areia fina (g)} \times 50$
Silte	$1000 - [\text{argila (g)} + \text{areia fina (g)} + \text{areia grossa (g)}]$

A determinação da Densidade de Partícula, Densidade Aparente (*Bulk*), Porosidade do Solo, Capacidade de Retenção de Água e pH, foram realizadas segundo a Instrução de Trabalho (IT) elaborada pelo CETEM / MCT, conforme abaixo detalhado:

a) Densidade aparente do solo ( $D_a$ ) (CETEM - IT 2008-007-00), ou densidade *bulk*, é definida como a razão entre a massa de partículas e o volume que elas ocupam em um recipiente.

Para tanto, o solo deve ser desagregado em graal, seco e peneirado em peneira com abertura de 2 mm de diâmetro (malha 10). A seguir, o solo é colocado em uma proveta vazia previamente pesada (A), até cerca da metade de sua capacidade, tendo o cuidado de assentá-lo o máximo possível. Então, mede-se o volume ocupado pelo solo (V), em mL, e pesa-se o peso da proveta e solo (B). A densidade aparente pode ser calculada pela equação:

$$D_a \text{ (g/mL)} = (B-A) / V \quad \text{(Equação 4.1)}$$

b) Densidade das partículas do solo ( $D_p$ ) (CETEM - IT 2008-008-00), também conhecida como densidade real, pode ser definida como a massa de sólidos presentes no solo por unidade de volume.



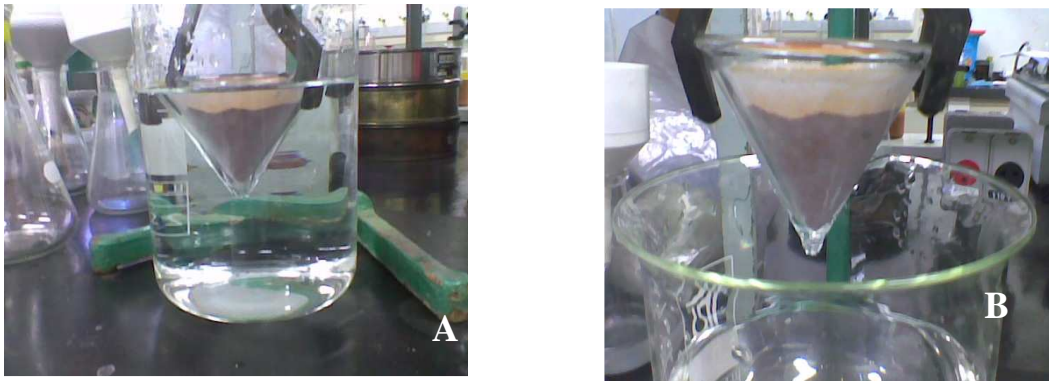
O método para determinação da densidade de partículas se baseia no deslocamento de um volume de líquido por uma de massa de solo conhecida. Para tanto, o solo deve ser previamente desagregado em graal e peneirado em peneira de 2 mm de malha. Em balão volumétrico previamente tarado (A), se introduz uma quantidade conhecida do solo seco peneirado (B), cerca de ¼ da capacidade do balão, e, a seguir, verte-se, no balão, água destilada até cerca da metade de sua capacidade. Em seguida, o conteúdo do balão é aquecido à ebulição, resfriado e avolumado com água destilada. Pesa-se o balão contendo água e amostra (C). O balão é esvaziado, lavado e enchido somente com água destilada, sendo então novamente pesado (D). A densidade da partícula ( $D_p$ ) é dada pela equação:

$$D_p = D_a \times (B - A) / [(B - A) - (C - D)] \quad (\text{Equação 4.2})$$

c) Porosidade do solo (CETEM – IT 2008-006-00) é definida como o volume dos poros do solo dividido pelo volume total de uma amostra de solo. Este parâmetro, expresso em percentagem, é calculado a partir dos valores de Densidade Aparente e Densidade de Partícula, através da equação:

$$\text{Porosidade (\%)} = [100 - (D_a / D_p) \times 100] \quad (\text{Equação 4.3})$$

d) Capacidade de retenção de água (CRA) (CETEM – IT 2008-006-00) do solo foi determinada conforme adaptação do procedimento descrito em Watwood *et al.*, (1991). Para tanto, um funil de vidro previamente coberto com papel de filtro qualitativo foi preenchido com 50 g de solo, compactando-se a sua superfície. Em seguida, o sistema, funil + solo, foi posicionado em um becker de capacidade de 2 L. Sobre o sistema foi adicionada água de forma que o nível não ultrapassasse a borda do papel de filtro. Logo após o solo ter sido umedecido, mais água foi adicionada ao sistema de forma a atingir o nível do topo do funil, como representado na figura 4.4A. Após 30 min. aproximadamente, o sistema foi retirado do becker, de modo a permitir o escoamento da água não adsorvida pelo solo (Figura 4.4B), e em seguida, o solo foi transferido para outro becker, previamente tarado, e o sistema pesado em balança analítica. O sistema foi então seco em estufa à 60°C, por um período de 16 h, e novamente pesado.



**Figura 4.4:** Sistema usado para a determinação da capacidade de retenção de água (CRA) do solo, mostrando as etapas de umedecimento do solo (A) e de escoamento da água não adsorvida ao solo (B).

Para a determinação da CRA foi usada a seguinte equação:

$$\text{C.R.A.} = \left( \frac{m_{\text{sistema}} - m_{\text{seco}}}{m_{\text{úmido}}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 4.4})$$

Onde:

C.R.A. = Capacidade de Retenção de Água [%]

$m_{\text{úmido}}$  = massa do solo antes de se adicionar água [g]

$m_{\text{sistema}}$  = massa do solo após adição da água [g]

$m_{\text{seco}}$  = massa do solo após 16 horas a 60°C [g]

e) A determinação do pH foi realizada segundo o método de Instrução de Trabalho (IT 2008-011-00) elaborado pelo CETEM/MCT. O pH do solo foi medido utilizando o método potenciométrico, empregando-se o potenciômetro da marca Analion, modelo NA 2000, previamente calibrado com soluções tampão (pH 7 e 4).

Para tanto, em béquer de 100 mL de capacidade foram dispostos 25 g de solo, que foi umedecido com 50 mL de água destilada. A mistura foi homogeneizada, por 1 h, com o auxílio de um agitador magnético. A medição do pH foi realizada por meio de eletrodo combinado de vidro imerso na suspensão de solo.

Para a determinação do potencial de oxidação-redução (Eh) foi usado o mesmo procedimento descrito para o pH, sendo utilizado um eletrodo combinado de platina previamente calibrado com soluções tampão (pH 4 e 7), e as leituras expressas em escala de mV.

As determinações de carbono orgânico, fósforo (JARAMILLO, 1996) foram realizadas no Laboratório de Tecnologia Ambiental (Escola de Química/UFRJ) e a capacidade de troca catiônica (CTC) foi realizada no laboratório de Geotecnia da COPPE/UFRJ. O equipamento utilizado para a quantificação dos cátions foi um espectrômetro de absorção atômica, marca Perkin Elmer, modelo A Analyst 300. Os teores de nitrogênio total e amoniacal foram determinados pelo Laboratório de Análises Minerais – COAM/CETEM, pelo método Kjeldahl, utilizando um cromatógrafo de íons Metrohm, com um amostrador automático acoplado a um sistema de diálise modelo 788 IC, um degasificador modelo 837 IC e um detector condutimétrico modelo 819 IC.

## **4.2 Óleo Diesel**

Foi utilizado óleo diesel “puro” (B0), isto é, isento de aditivos, e diesel metropolitano comercial (B4), que contém 4% (m/m) de biodiesel. A fim de garantir a qualidade das amostras, ambas foram fornecidas pela Petrobras.

Nos ensaios, foram usadas as mesmas amostras de combustíveis de modo a garantir a reprodutibilidade e a confiabilidade dos resultados. Por isso, quantidades suficientes de cada um dos combustíveis, foram devidamente acondicionadas em recipientes de plástico, etiquetadas e armazenadas sob refrigeração em câmara fria ( $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), até o momento do uso.

## **4.3 Detalhamento dos experimentos preliminares**

### *4.3.1. Percolação de água e diesel no solo*

Preliminarmente, foi realizado um teste com o objetivo de definir o procedimento para o ajuste do teor de umidade no solo, uma vez que a pretensão era analisar a atividade das bactérias ao longo de uma coluna de 60 cm de solo. Foi definido esse ensaio preliminar

devido ao tamanho da coluna (22cm x 60cm) pois numa contaminação real em área maior esse tipo de análise não seria realizada.

A percolação dos combustíveis no solo foi avaliada antes e após o ajuste da umidade, para distintos valores de CRA do solo (30%, 40%, 50% e 70% da CRA).

Esses testes foram realizados em provetas de 1000 mL de capacidade, de 7 cm de diâmetro por 40 cm de altura (Figura 4.5), em duplicata para cada condição. À 800 g de solo, cuidadosamente disposto em cada proveta, foi uniformemente derramado 10% (m/m) de um dos combustíveis e os diferentes volumes de água, ou vice-versa.



**Figura 4.5.** Teste de percolação de água no solo.

#### *4.3.2. Ensaios de Biodegradação*

##### *4.3.2.1. Sistema experimental*

Os ensaios de biodegradação de diesel (B0) e diesel/biodiesel (B4) foram realizados em sistemas estáticos, confeccionados especialmente para o presente trabalho, de modo a permitir analisar o processo de biorremediação de uma seção de solo contaminado ao longo de 60 cm. O sistema consistiu de coluna de PVC, de 60 cm de altura e 22 cm de diâmetro, composta de 3 seções sobrepostas de 20 cm de altura cada, com a finalidade de possibilitar a coleta das amostras de solo em diferentes profundidades (Figura 4.6). Cada reator possui uma válvula de escoamento do percolado, de modo a permitir a checagem da percolação (Figura 4.7).

Em cada reator foram distribuídos 18 Kg de solo.



**Figura 4.6.** Sistemas estáticos usados nos ensaios de biorremediação dos solos contaminados com diesel (B0) e diesel/biodiesel (B4).



**Figura 4.7.** Detalhe da base dos reatores mostrando as válvulas para escoamento do percolado.

#### 4.3.2.2 Monitoramento da biodegradação de diesel B0 e B4

Foram realizadas duas “baterias” de ensaios com duração de 60 dias cada. Na primeira etapa, o solo foi adicionado de água (40% da CRA) e, a seguir, contaminado com 10% (m/m) de diesel puro (B0). Na etapa seguinte, a contaminação do solo foi feita com 10% (m/m) de diesel comercial (B4).

Foram empregados 3 reatores de sacrifício em cada bateria de ensaios, com a finalidade de coletar amostras representativas de cada seção do reator, para cada um dos tempos monitorados (20, 40 e 60 dias). Assim, a cada 20 dias, um reator era sacrificado para a realização das análises microbiológicas, químicas e físico-químicas.

Para cada solo contaminado, foi também realizado um controle abiótico, cujo sistema foi sacrificado apenas ao 60º dia de monitoramento. Nos controles abióticos foram utilizados solo, água e diesel estéreis.

O solo foi esterilizado em autoclave a 1 atm por 20 min, sendo o ciclo de esterilização repetido 5 vezes seguidas. Posteriormente, este solo foi seco à temperatura ambiente por 2 dias. No reator, o solo estéril foi lavado com solução do biocida azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ ) a 4%(m/v), de modo a garantir a sua esterilidade. A água também foi esterilizada em autoclave a 1 atm por 20 min. E, o óleo diesel, B0 ou B4, foi esterilizado por meio do processo de filtração em membrana Milipore de 0,22  $\mu\text{m}$  de porosidade.

Assim, para cada condição estudada, foram operados 4 reatores, totalizando 8 experimentos realizados. A descrição de cada sistema conduzido encontra-se na tabela 4.2.

**Tabela 4.2.** Descrição dos ensaios de biorremediação realizados em coluna de solo.

Experimento	Condição	Tempo (dias)
1	Solo + Diesel B0	20
2		40
3		60
4	Controle Abiótico (Solo + Diesel B0 + Biocida)	60
5	Solo + Diesel B4	20
6		40
7		60
8	Controle Abiótico (Solo + Diesel B4 + Biocida)	60

Para cada tempo foram coletadas amostras nas profundidades de 20, 40 e 60 cm. Os ensaios foram mantidos à temperatura ambiente, em local refrigerado, ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) com ajustes periódicos de umidade apenas na parte superficial da coluna.

No solo, para cada condição experimental, tempo e profundidade foram feitas análises de:

- ✓ TPH;
- ✓ Contagem de bactérias (heterotróficas totais e hidricarbonoclásticas);
- ✓ Fitotoxicidade.

#### 4.4 Análises Quantitativas

##### 4.4.1 Teor de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP)

A caracterização orgânica das amostras de solo artificialmente contaminadas, foi feita pela análise de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP). Essa análise foi realizada pela técnica de Espectrometria na região do Infravermelho, utilizando o analisador Infracal TOG/TPH, da marca Wilks Enterprise, modelo HART-T (Figura 4.8) (CETEM - IT 2008-005-00).

Através deste medidor portátil de OGT (óleos e graxas totais)/HTP (Figura 15), é possível quantificar os hidrocarbonetos, após extração do óleo do solo com solvente orgânico (n-hexano PA padrão HPLC).

A determinação de HTP por infravermelho baseia-se na medida da absorbância da ligação C-H dos hidrocarbonetos presentes na amostra. As ligações C-H dos hidrocarbonetos alifáticos absorvem energia num comprimento de onda específico, CH (3,38  $\mu\text{m}$ ), CH<sub>2</sub> (3,42  $\mu\text{m}$ ) e CH<sub>3</sub> (3,50  $\mu\text{m}$ ) (EPA, 2001) e a intensidade de absorção é proporcional à quantidade de moléculas de hidrocarbonetos numa amostra (NASCIMENTO *et al.*, 2008). Logo, é possível converter a quantidade total de óleo na amostra original se a razão do solvente com o óleo for cuidadosamente controlada, através de uma calibração.

O teor de HTP nas amostras de solo, para posterior análise no Infracal, foi determinado através de uma extração exaustiva em ultrassom (método convencional). Após secagem a 60°C por 16 h, e maceração, adicionou-se 2 g de sulfato de sódio anidro (VETEC) ao solo contaminado, e submeteu-se ao ultrassom por 60 minutos, utilizando n-hexano (PA, mistura de isômeros - Tedia) como solvente. Posteriormente, depositou-se o extrato em n-hexano na superfície do cristal do aparelho e o solvente foi evaporado, deixando uma fina camada de óleo, que foi quantificada.



**Figura 4.8.** Equipamento Infracal, modelo HART -T da Wilks Enterprise.

#### 4.4.2 Concentração de bactérias heterotróficas totais (BHT)

A quantificação de BHT foi feita pelo método do espalhamento em superfície (*spread plate method*). Para tanto, uma amostra de 5 g de solo foi suspensa em 50 mL de solução salina (8,5 g/L), que uma vez homogeneizada, foi diluída em série na mesma solução de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ . A partir de cada diluição, alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para placas de Petri contendo meio agar simples (Tabela 4.3), para a quantificação de bactérias heterotróficas totais. Após incubação das placas a  $30^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ , por 2 dias, foram feitas as contagens das colônias formadas e os resultados expressos em unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de solo (UFC/g solo).



**Tabela 4.3.** Composição do Meio Agar Simples.

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade (g/L)</b>
Agar	20
Peptona de carne	5
Extrato de Lêvedo	2
NaCl	5
Glicose	10

#### 4.4.3 Concentração de bactérias hidrocarbonoclásticas (BHC)

A quantificação de BHC foi realizada através da técnica do Número Mais Provável (NMP) (BROWN e BRADDOCK, 1990) Para esse procedimento foram preparadas diluições de  $10^{-1}$  até  $10^{-7}$ , em solução salina (8,5 g/L), das quais foram tomadas alíquotas de 0,1 mL que foram semeadas em cada um de 5 poços de placas multipoços, contendo 1,8 mL de meio mineral (Tabela 4.4) e 0,1 mL de óleo cru. As placas foram incubadas a  $30^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 7 dias e o crescimento foi avaliado visualmente, sendo considerado positivo quando havia alteração do aspecto da gota de óleo em relação ao do teste em branco. O teste em branco consistiu da adição de meio mineral estéril à 5 poços da placa e também à 5 poços com a adição de meio mineral estéril acrescido de óleo cru. Dessa forma, pode-se descartar qualquer efeito que não seja causado pela presença dos microrganismos a serem quantificados.

Através dos resultados positivos e negativos foram feitos os cálculos, levando em conta a diluição, sendo a concentração celular expressa em NMP/g de solo seco.

**Tabela 4.4.** Composição do Meio Mineral (VECCHIOLI *et al.*, 1990).

Componentes	Quantidade (g/L)
NaCl	5,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0
KNO <sub>3</sub>	3,0
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2

#### 4.4.4 Teste de Fitotoxicidade

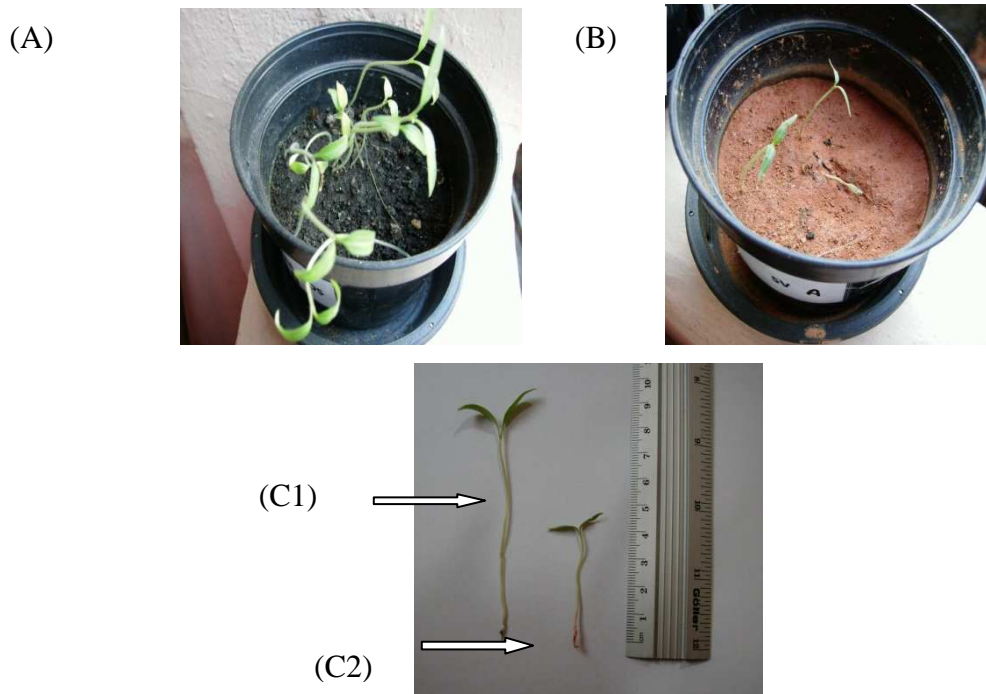
Os testes de ecotoxicidade consistiram da análise da germinação de sementes e crescimento da espécie vegetal *Lycopersicon esculentum* (tomate). Trata-se de um teste simples e de baixo custo que pode indicar a ação fitotóxica de diferentes compostos químicos. Estes testes foram realizados tanto para monitorar a toxicidade do solo contaminado, após tratamento, bem como a fertilidade do solo virgem. Utilizou-se como teste positivo um solo comercial fértil.

O propósito do teste foi verificar o efeito dos compostos residuais no solo no crescimento do tomate, não sendo baseado em outros experimentos de toxicidade citados na literatura.

Os testes foram realizados em pequenos vasos de planta contendo cerca de 200 g de solo onde foram semeadas uniformemente, 18 sementes de tomate distribuídas em 6 orifícios (3 sementes para cada orifício). A espécie empregada foi *Lycopersicon esculentum*, conforme recomendado pela OECD (1984), da marca Isla, isenta de defensivos agrícolas.

No período do ensaio, os vasos ficaram em local arejado, com boa luminosidade natural e, a cada 24 h, foram regados para favorecer a germinação e crescimento das sementes. Após 20 dias, as plantas foram cortadas na altura do solo com auxílio de uma

tesoura de jardineiro, e o comprimento do caule foi medido (Figura 4.9). Cada ensaio foi feito em triplicata.



**Figura 4.9.** Testes de germinação e crescimento do tomateiro em solo fértil (A), solo contaminado com diesel (B) e detalhe da medição dos comprimentos dos caules da muda oriunda do solo fértil (C1) e do solo em estudo (C2).

## CAPÍTULO 5: RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização do Solo

Preliminarmente, o solo virgem foi caracterizado granulométrica (textural), química, físico-química, e microbiologicamente. Na tabela 5.1 constam os parâmetros analisados considerados mais relevantes para o processo de biorremediação.

**Tabela 5.1:** Caracterização Granulométrica (Textural), Química, Física-Química e Microbiológica do Solo Virgem.

Parâmetros	Valores
Relação Areia:Silte:Argila (%)	38:30:32
Densidade aparente (Da) (g/mL)	1,3
Densidade de partícula (Dp) (g/mL)	2,41
Capacidade de retenção de água (CRA) (%)	31
pH	4,7
Concentração de matéria orgânica* (g/Kg)	3,0
Concentração de nitrogênio (g/Kg)	0,17
Carbono Orgânico* (C <sub>org</sub> ) (g/Kg)	0,17
Fósforo* (mg/Kg)	5
Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP) (g/kg)	0 (Zero)
Umidade (%)	3
Capacidade de Troca catiônica (CTC)* (cmolc/dm <sup>3</sup> )	3,72
Bactérias Heterotróficas Totais (BHT) (UFC/g solo)	10 <sup>5</sup>
Bactérias Hicrocarbonoclásticas (BHC) (NMP/g solo)	10 <sup>1</sup>

\* Análises realizadas pelo Laboratório de Geotecnia da COPPE/ UFRJ.

Segundo a classificação textural de solos de Lemos e Santos (1984), apresentada na seção 2.1.4, o solo empregado neste estudo é da classe franco-argilosa, e de textura média, de acordo com Prado (2005).

O valor de densidade aparente determinado para o solo é representativo de superfícies argilosas (FOTH, 1990) e está no limite considerado apropriado para o desenvolvimento microbiano (ARCHER e SMITH, 1972). Solos com maiores valores de Dp apresentam-se

impróprios para o metabolismo das bactérias aeróbicas autóctones por conta da baixa permeabilidade e aeração. A permeabilidade é afetada, principalmente, pelo tamanho da partícula e porosidade do meio. Normalmente os solos argilosos são menos permeáveis (partículas menores) do que os arenosos (partículas maiores), impedindo o fluxo de água de maneira efetiva, e por isso muitas vezes, serem considerados impermeáveis (SEABRA, 1997). De uma maneira geral, quanto mais elevada for a densidade aparente do solo, tanto maior será sua compactação e menor a sua porosidade (KIEHL *et al.*, 1979).

Com base nos dados de densidade aparente e densidade de partícula foi calculada a porosidade do solo, de 45,8%. Este valor é tido como adequado para a atividade microbiana já que permite uma melhor permeação da água e do ar através do solo (SILVA, 1996).

Em relação à análise de pH, o solo caracteriza-se como fortemente ácido (ALVAREZ *et al.*, 1999), e, portanto, impróprio para a atividade da maioria das bactérias. Adicionalmente, a acidez causa a perda de nutrientes pelo solo (OLIVEIRA *et al.*, 2000), o que implica em menor disponibilidade dos elementos essenciais para o metabolismo microbiano na degradação dos contaminantes.

O pH da maioria dos solos se situa na faixa entre 4,5 e 8,0. De acordo com Moreira e Siqueira (2006), os horizontes superficiais dos solos em climas mais úmidos são geralmente ácidos devido à lixiviação de bases e decomposição de serrapilheira. Também, a chuva ácida e a fixação biológica de nitrogênio podem contribuir para abaixar o pH do solo. No caso das argilas, em virtude das cargas negativas, ocorre a atração de íons positivamente carregados (cátions), inclusive  $H^+$ , cujo aumento na superfície da partícula acarretará em redução do pH a valores muito menores do que o da solução do solo.

Adicionalmente, no solo, a presença de matéria orgânica tem um efeito tamponante, prevenindo a ocorrência de variações bruscas de pH, que, por sua vez, podem interferir na atividade microbiana (OLIVEIRA *et al.*, 2000). Logo, o baixo valor de pH determinado para o solo analisado (Tabela 5.1) pode estar, dentre outros fatores, relacionado ao baixo conteúdo de matéria orgânica.

Para o solo em estudo, foi determinada uma concentração de carbono muito baixa, comprovando o seu histórico de não contaminação, o que é corroborado pela análise de HTP.

Além da fonte de carbono, os elementos nitrogênio e fósforo são essenciais para as funções vitais das células microbianas, principalmente àquelas referentes a geração de energia e a síntese de constituintes celulares, sejam eles estruturais ou genéticos (BRUNKEN e

SZARFARE, 1999; GOMES, 2005; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Segundo JARAMILLO (1996), o solo é considerado rico em matéria orgânica, nitrogênio e fósforo, quando seus respectivos teores são maiores que 42 g/kg, 2,22 g/kg e 0,03 g/kg. Portanto, pode-se aferir que o solo analisado é nutricionalmente limitado.

A capacidade de troca catiônica (CTC) do solo, de 3,72 cmolc/dm<sup>3</sup>, corresponde à classe dos solos argilosos, cuja CTC está compreendida entre 3 e 15 cmolc/dm<sup>3</sup>. Baixos valores de CTC (1 a 5 cmolc/dm<sup>3</sup>) indicam grandes perdas de nutrientes por lixiviação, o que resulta em solos de baixo conteúdo de nitrogênio e de fósforo (LOPES, 1992 *apud* RIBEIRO, 2008).

Apesar disso, e das outras características físico-químicas e nutricionais serem também limitantes para a atividade de bactérias, no solo foi detectada a presença de bactérias heterotróficas totais (BHT), em concentração relativamente elevada, e inclusive, de bactérias hidrocarbonoclasticas (BHC), embora em número bastante reduzido. Logo, pode-se concluir que, mesmo sob condições naturalmente ácidas, o solo estudado apresenta moderada capacidade de reter cátions.

## 5.2. Testes de Percolação Água/Diesel em Solo

A capacidade de retenção de água (CRA) corresponde à quantidade máxima de água que um solo pode reter em condições normais ou ao limite máximo de disponibilidade de água para as plantas e microrganismos. Logo, é um parâmetro de grande importância já que influencia diretamente a atividade dos seres vivos.

Antes de dar início aos ensaios de biodegradação propriamente, foi avaliado o efeito da umidade na percolação dos óleos diesel B0 e B4 através do solo franco-argiloso, já que era fundamental estabelecer como seria a distribuição dos hidrocarbonetos ao longo dos 60 cm da coluna de solo.

Segundo Riser-Roberts (1998), o teor de umidade do solo deve estar compreendido entre 30 e 90% do valor da capacidade de retenção de água (CRA), para que a biodegradação dos contaminantes seja eficiente. Assim, e considerando a característica textural do solo, esse estudo contemplou a percolação de água e contaminante para diferentes %CRA (Tabela 5.2).

**Tabela 5.2:** Testes de percolação de água e diesel B0 e B4 em camada de solo de profundidade de 40 cm, para diferentes percentuais de CRA.

Teor de Umidade (% da CRA)	Percolação		Observação
	Água	Diesel	
30	++	++	Não houve percolação total da água e do diesel
40	+++	+++	Houve percolação total da água e do diesel
50	+++	+	Houve percolação total da água; e retenção de diesel na superfície do solo
70	+++	-	Houve percolação total da água; e retenção de diesel na superfície do solo

+++ : ótima; ++ : boa; + : ruim; - : péssima.

Inicialmente, o teste foi feito aplicando o óleo diesel, e logo a seguir, a água. Neste caso, houve redução da permeabilidade do solo, haja visto que houve um acúmulo da água na superfície dos solos previamente contaminados. Por isso na tabela 5.2 são apresentados apenas os resultados referentes aos testes realizados com adição inicial de água seguida do contaminante.

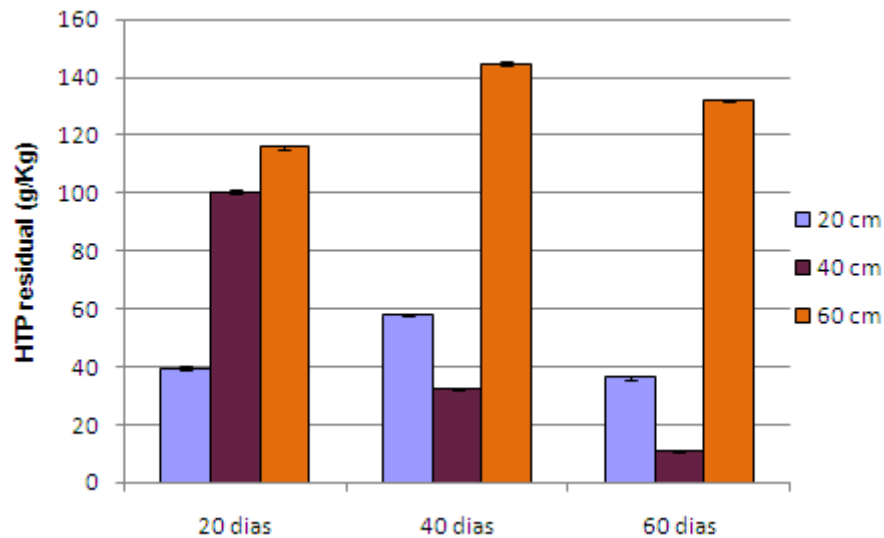
A análise dos dados experimentais permite aferir que 40% da CRA foi a condição mais indicada, o que corresponde a um teor de umidade de 12,4%.

### 5.3 Efeito do Biodiesel na Biodegradação de Óleo Diesel em Solo Franco-Argiloso

A seguir serão apresentados os resultados de monitoramento da biorremediação de óleo diesel puro (B0) e óleo diesel comercial (B4), ao longo de uma coluna de solo de 60 cm por 60 dias.

#### 5.3.1 Ensaios de atenuação natural de solo contaminado com diesel puro (B0)

A figura 5.1 mostra a variação da concentração de HTP residual no solo contaminado com óleo diesel puro (B0), nos diferentes pontos monitorados, ao longo do tempo. Nota-se que a eficiência de degradação de HTP variou em função da profundidade do solo.



**Figura 5.1** . Perfil de distribuição de HTP residual em solo contaminado com óleo diesel (B0) em função da profundidade e tempo.

Decorridos 20 dias da contaminação, no solo oriundo da camada mais próxima à superfície (20 cm) foi evidenciada a menor concentração de HTP. Enquanto que, para o mesmo intervalo de tempo, os solos das camadas mais profundas (entre 40 cm e 60 cm) apresentaram valor de concentração próximo. Tal fato pode estar relacionado à atividade degradadora ser mais intensa nas zonas onde a disponibilidade de oxigênio é maior. E, outra possibilidade, que não exclui a anterior, pode ser a migração dos hidrocarbonetos para as camadas mais profundas do solo.

No decorrer do tempo, verifica-se que a degradação é mais eficiente na zona de 40 cm. Isto é indicativo da participação efetiva dos microrganismos mesmo em condições limitantes de oxigênio.

Por outro lado, na maior profundidade, não foi percebida qualquer redução do conteúdo de HTP, possivelmente em consequência da lenta percolação do óleo diesel pelas camadas do solo, ou, ainda, da migração mais facilitada dos produtos resultantes da degradação microbiana do óleo diesel, acarretando a estagnação dos hidrocarbonetos mais recalcitrantes nas camadas mais profunda do solo

As figuras 5.2 (A e B) apresentam as densidades das populações de bactérias heterotróficas totais (BHT) e bactérias hidrocarbonoclasticas (BHC), respectivamente, no solo contaminado com óleo diesel B0 em função da profundidade e do tempo. Ainda que as condições naturais do solo não fossem adequadas para o metabolismo de bactérias (Tabela



5.1), houve aumento de ambas as populações a partir do óleo diesel como única fonte de carbono introduzido aos sistemas. No entanto, as populações microbianas apresentaram comportamentos diferentes entre si.

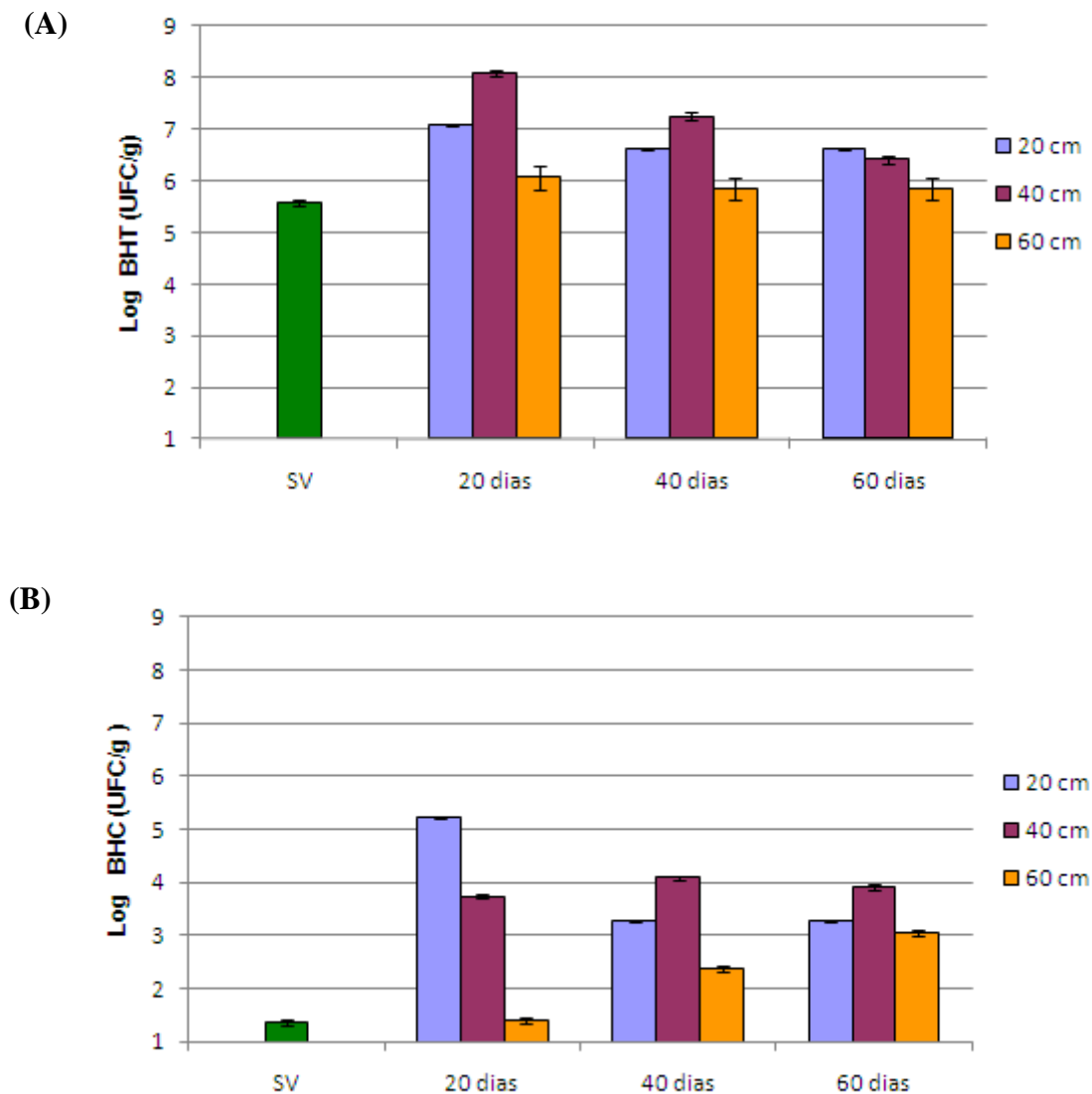
Após 20 dias da contaminação do solo com o combustível, foi observado um ligeiro acréscimo de BHT em relação ao solo virgem, em 40 cm de profundidade. Porém, no 40º dia, houve uma leve redução das concentrações celulares nas profundidades de 20 e 40 cm. O decaimento da concentração das BHT pode estar relacionado à diminuição da concentração de compostos mais facilmente degradáveis e, por conseguinte, ao acúmulo e toxicidade dos recalcitrantes para algumas das espécies microbianas.

Na camada mais profunda do solo (60 cm), a concentração de BHT permaneceu similar a do solo virgem durante todo o período monitorado. Provavelmente, a menor atividade microbiana nesta área deve-se à menor disponibilidade de oxigênio e, inclusive, à toxicidade dos hidrocarbonetos em virtude da sua maior concentração (Figura 5.1).

Em relação às bactérias hidrocarbonoclásticas (BHC), no 20º dia, houve um aumento na profundidade de 20 cm, onde a concentração celular atingiu o maior valor. A análise comparativa desses resultados com os do perfil de distribuição de HTP (Figura 5.1) mostra a importância da presença das bactérias degradadoras ou hidrocarbonoclásticas para se ter a remediação de um solo contaminado.

Na estimativa seguinte, ou seja, aos 40 dias, observou-se uma ligeira queda, na profundidade de 20 cm, embora depois a concentração tenha se mantido constante e ainda superior às profundidades de 40 e 60 cm em 60 dias. Isso nos mostra que a presença de oxigênio propicia um aumento de bactérias aeróbias degradadoras. A leve queda da concentração microbiana específica pode ser devida à toxicidade em face do acúmulo de compostos mais recalcitrantes no ambiente, já que houve um aumento da concentração de HTP (figura 5.1), fazendo com que esses microrganismos não sejam mais capazes de degradá-los.

Por outro lado, a densidade de BHC nas camadas de 40 cm, praticamente não se alterou ao longo do tempo. No período de 60 dias, as concentrações de BHC foram praticamente as mesmas nas duas camadas de 20 e 60 cm de solo analisadas. Isso pode ser explicado pela possível adaptação e seleção de espécies capazes de degradar os compostos mais recalcitrantes.



**Figura 5.2.** Variação dos números de bactérias heterotróficas totais (BHT) e de bactérias hidrocarbonoclasticas (BHC) em solo após contaminação com óleo diesel (B0) em função da profundidade e do tempo (A= BHT; B= BHC; SV= solo virgem, sem contaminação).

Considerando que durante o período monitorado, o número de BHC decresceu ligeiramente ou permaneceu inalterado (Figura 5.2B), sugere-se que a população microbiana varia qualitativamente, com aumento das potencialmente degradadoras, embora não haja variação expressiva do quantitativo. O mesmo perfil comportamental das BHC foi evidenciado por Ferreira (2001).

É possível considerar a interdependência entre os microrganismos no solo, onde a geração de substâncias mais simples a partir da degradação dos compostos recalcitrantes pelas espécies potencialmente mais degradadoras possibilita o desenvolvimento de outras espécies

microbianas, que por sua vez podem estabelecer as condições necessárias para as primeiras ou mesmo de outras diferentes espécies, formando-se um ciclo de atividade microbiana.

O pH do solo não sofreu qualquer alteração em função da contaminação com diesel nem durante o monitoramento, variando entre 4,5 e 5,0. A decomposição da matéria orgânica produz  $\text{CO}_2$ , o qual reage com  $\text{H}_2\text{O}$  com formação de ácido carbônico, que se dissocia em íons  $\text{H}^+$  e  $\text{HCO}_3^-$ , mantendo o pH baixo (PONNAMPERUMA, 1978). Em solos ácidos, o aumento do pH, depende não somente da relação do íon  $\text{OH}^-$  e do consumo do íon  $\text{H}^+$ , mas também da relação de íons  $\text{H}^+$  consumidos/elétrons consumidos. Para que haja aumento do pH, há necessidade de ocorrer um processo de redução em associação com suficiente quantidade de ferro reduzido. Aparentemente, substâncias, tais como compostos ferrosos ( $\text{Fe}^{2+}$ ), sulfeto e amônia, formadas sob condições reduzidas, são mais básicas do que quando sob condições oxidadas (CAMARGO; SANTOS & ZONTA, 1999).

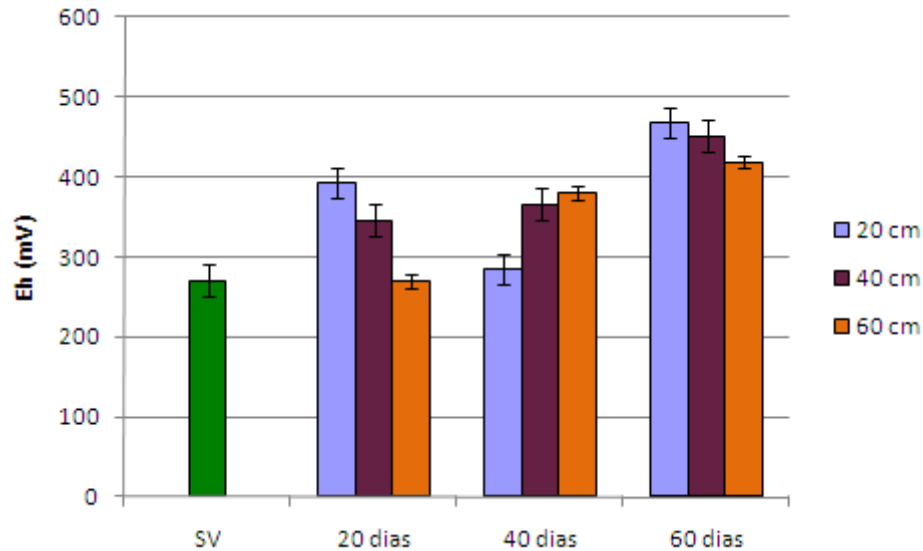
A acidez do solo pode ter influenciado negativamente a atividade bacteriana. Porém, é importante ressaltar que, apesar do solo não ter tido histórico prévio de contaminação por hidrocarbonetos, e do pH não ser o mais adequado para o metabolismo das bactérias, foi constatada a degradação do diesel e aumento do número de células. Em contrapartida, no controle abiótico houve elevação do pH do solo, principalmente na sua superfície, onde atingiu o valor de 8,5. A alcalinização pode estar relacionada à decomposição do biocida empregado (azida de sódio).

O potencial de oxidação-redução (Eh), parâmetro influenciado pela especiação química e pela concentração de oxigênio (FISH, 1993 *apud* TEIXEIRA *et al.*, 1999), ou seja diretamente relacionada com a profundidade de cada seção do solo ao longo do tempo, é mostrado na figura 5.3. Valores de Eh positivos definem sistemas oxidados enquanto os negativos denotam sistemas reduzidos (PONNAMPERUMA, 1972).

Foi evidenciado um pequeno aumento do Eh com o tempo nas camadas mais profundas, como também para cada ponto. Essa variação pode ser creditada à geração de substâncias oxidantes pelos microrganismos autóctones, já que a difusão de oxigênio através das camadas de solos franco-argilosos, com teores de umidade superiores a 10%, é relativamente baixa.

Analisando a figura, verifica-se também que os valores de Eh, em todas as condições apresentadas, foram superiores a 250 mV, o que é favorável a atuação dos microrganismos aeróbicos (BITTON & GERBA, 1984). Segundo Bento (2005), este fator tem grande

influencia na velocidade de degradação do óleo diesel, pois quanto mais oxidante for o solo, mais rápida será a degradação dos hidrocarbonetos dele constituintes.



**Figura 5.3.** Variação do potencial de oxidação-redução (Eh) para amostras de solo contaminado com óleo diesel (B0) em função da profundidade e do tempo (SV= solo virgem, sem contaminação).

Em sistemas redox naturais, os parâmetros Eh e pH estão diretamente relacionados, e a partir de seus valores pode-se determinar o valor de pe (logaritmo da atividade de elétrons), que representa o inverso do log da atividade elétrica (CAMARGO, SANTOS & ZONTA, 1999). Para solos, o valor de pe em função do Eh (-200 a 700 mV) e do pH (4,5 a 8,5) varia de -5 a 12, indicando: solos oxidados ( $pe > 7$ ); solos suboxidados ( $pe$  2 a 7) e solos anóxicos ( $pe < 2$ ). De acordo com o diagrama pe, Eh e pH representado por Tian-Yen (CAMARGO, SANTOS & ZONTA, 1999), o valor de pe para as amostras de solo nas condições estudadas se situa entre 12 e 20 para pH de 4,5 a 5,0 e Eh variando entre 200 e 600 mV.

Os solos suboxidados diferem dos oxidados por apresentarem valores de pe baixos o suficiente para que ocorra depleção de  $O_2$ , porém não tão baixos para haver depleção dos íons  $SO_4^{2-}$  (estado anóxico). Logo, o maior valor de pe (de 12 a 24) representa uma condição oxidada, onde a atividade elétrica é baixa e o potencial de oxi-redução é elevado. Quando há valores baixos ou negativos de pe, o ambiente se encontra no estado reduzido.

No solo, a água desloca o ar dos espaços porosos, criando regiões de anerbiose devido à depleção do oxigênio e ao aumento de  $CO_2$ , o qual é produzido pela respiração

microbiana. No solo, o oxigênio livre presente é rapidamente consumido pelos microrganismos aeróbios, no processo de degradação da matéria orgânica. O consumo de O<sub>2</sub> influencia a atividade de elétrons na solução do solo, enquanto que a liberação de CO<sub>2</sub> regula a atividade de prótons na solução.

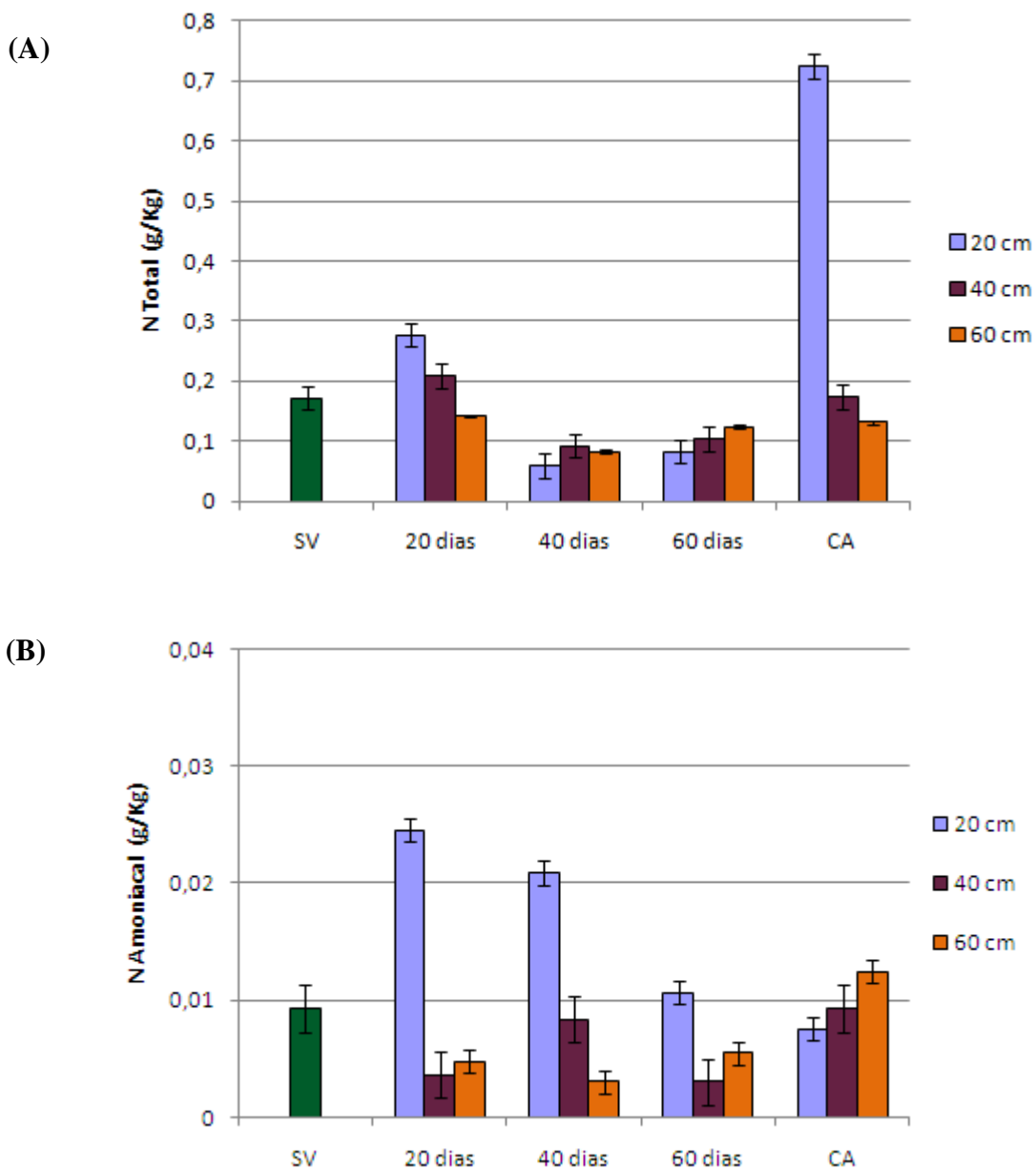
A respiração aeróbia se altera para anaeróbia quando o metabolismo dos carboidratos ocorre em baixa concentração de oxigênio (3 μmol/L). Ambas as vias metabólicas são comuns até a formação do ácido pirúvico utilizando componentes oxidados do solo e produtos da desassimilação da matéria orgânica como aceptores de elétrons (PONNAMPERUMA, 1972).

Como o consumo de oxigênio pelos microrganismos é mais rápido do que o que é suprido por difusão através da fase líquida nos solos, ocorre a formação de um gradiente de concentração de oxigênio, que dá origem a duas camadas distintas, uma de oxidação e outra de redução, pois um solo submerso ou saturado, não é uniformemente desprovido de oxigênio. Desta forma, a concentração do oxigênio pode ser alta na camada superficial, onde a difusão de oxigênio é suficiente para o consumo dos microrganismos aeróbios. Em ambientes reduzidos, a matéria orgânica é o principal doador de elétrons usado pelos microrganismos anaeróbios facultativos no solo, sendo NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Fe<sup>3+</sup>, SO<sub>4</sub><sup>=</sup>, etc., produtos da desassimilação da matéria orgânica (CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>) e até íons H<sup>+</sup> usados como aceptores de elétrons (CAMARGO *et al.*, 1993; BARTLETT & JAMES, 1993),

As figuras 5.4 (A e B) mostram que ao longo do período monitorado existe uma pequena disponibilidade de nitrogênio. Nota-se que nos primeiros 20 dias de tratamento e principalmente nas profundidades de 20 e 40 cm há um pequeno aumento na concentração de nitrogênio total, comparado ao solo não contaminado (Figura 5.4A). Essa variação de nitrogênio total pode estar relacionada à adição de diesel, que o contém em baixas concentrações, ou, ainda, ser resultante da lise celular e/ou hidrólise de proteínas por enzimas extracelulares. Pode-se perceber também um aumento significativo da concentração de nitrogênio no controle (CA), provavelmente devido ao tratamento do solo com o biocida azida de sódio.

Por outro lado, a variação de nitrogênio amoniacal foi diferenciada (Figura 5.4B). Os maiores valores foram evidenciados na faixa de solo mais próxima à superfície (20 cm) nos primeiros 40 dias de tratamento.

Em estudos visando o estabelecimento de relações nutricionais adequadas para a biorremediação de solos contaminados por óleo cru, foi verificado que dosagens excessivas, de nitrogênio (SORIANO, 2001 *apud* Rizzo, 2008) e de fósforo (BAPTISTA, 2007) podem interferir negativamente no processo de biodegradação. O mesmo efeito inibitório foi comprovado por Trindade *et al.* (2004) tendo como base estudos realizados por Walworth *et al.* (2005).



**Figura 5.4.** Nitrogênio total (A) e nitrogênio amoniacal (B) para amostras de solo contaminado com óleo diesel (B0) em distintas profundidades (SV= solo virgem, sem contaminação; CA= controle abiótico).

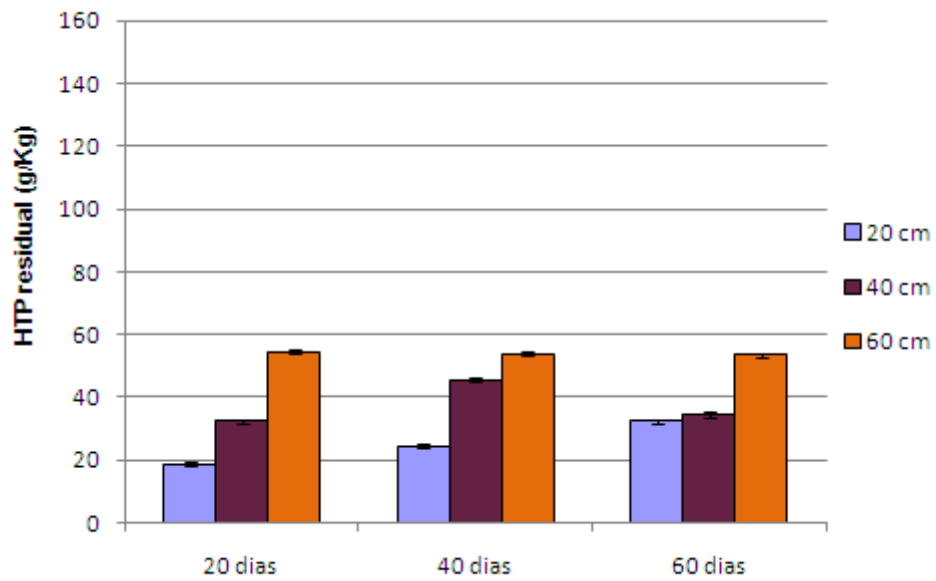
Em geral, os estudos de biorremediação de solos contaminados com óleo cru estimam, para efeito de cálculo da relação C:N:P, que 85% do valor de HTP correspondem à concentração de carbono. Se considerada válida esta razão para diesel, a relação C:N:P para o solo após adição de 10% m/m de diesel será de 100:0,2:0,005, isto é, muito aquém do indicado para o processo de biorremediação que é de 100:10:1 (JARAMILLO, 1996)

### 5.3.2 *Ensaio de atenuação natural de solo contaminado com diesel comercial (B4)*

O perfil de distribuição de HTP residual do solo contaminado com óleo diesel comercial (B4) ao longo da coluna de solo e do tempo monitorado é apresentado na figura 5.5. Comparativamente ao perfil de HTP estabelecido para solo contaminado apenas com diesel (Figura 5.1) evidencia-se um comportamento diferenciado.

Nos dois primeiros períodos, 20 e 40 dias, verifica-se um aumento gradativo de HTP ao longo do reator, sendo esse comportamento diferente em 60º dia, concentrando menos HTP na seção intermediária do reator.

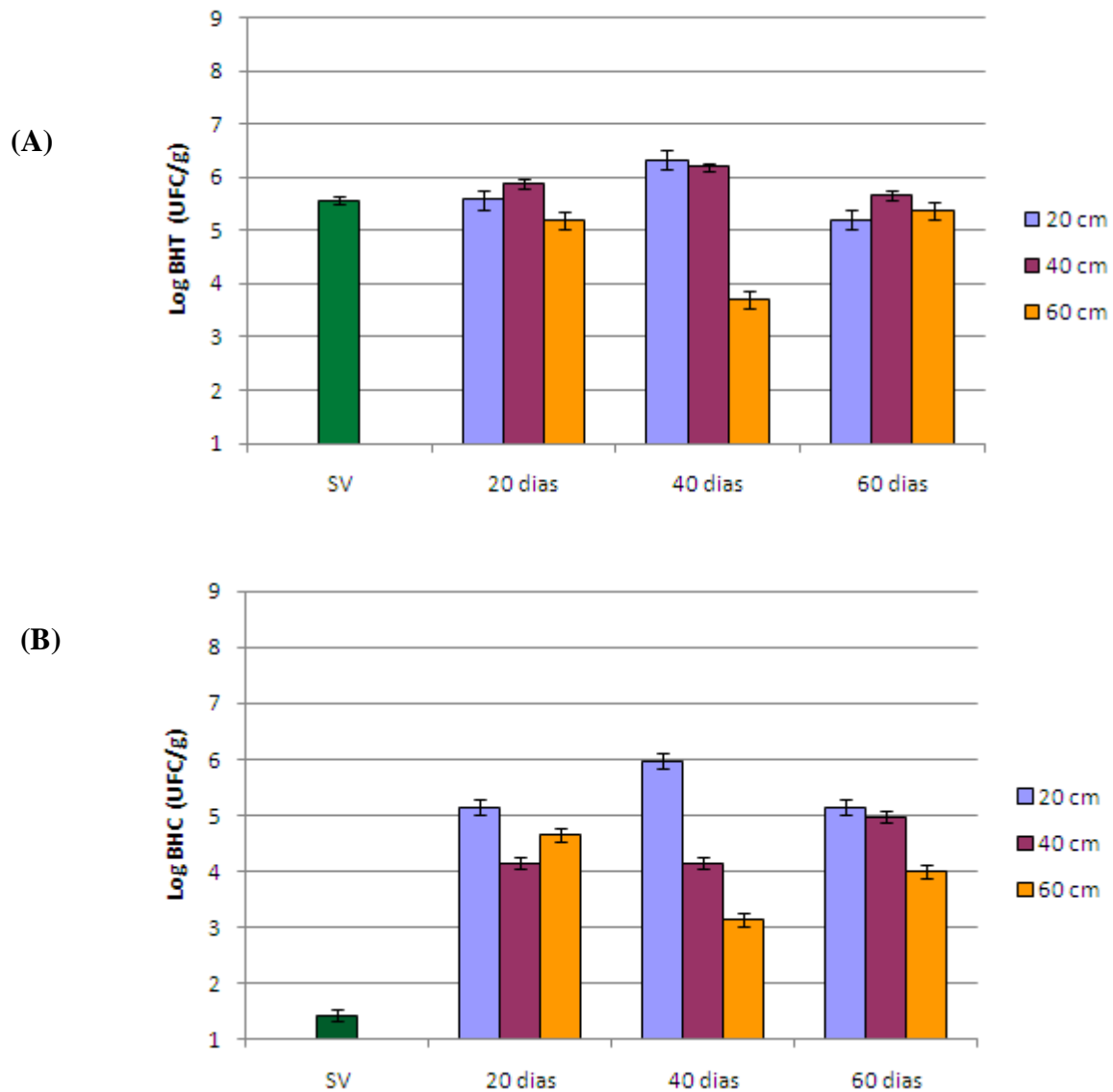
Para a metodologia aplicada na quantificação de HTP, foi utilizado o aparelho, Infracal, cuja eficiência foi comprovada no trabalho realizado por Telhado, 2008, para esta análise em óleo cru. A partir disso empregou-se essa técnica para a quantificação de HTP em diesel puro (B0) e em diesel com 4% de biodiesel (B4), já que estes se caracterizam por conter hidrocarbonetos derivados de petróleo. Para a análise de diesel puro, obtivemos resultados condizentes em todo o trabalho, mas para o combustível B4, observam-se inconsistentes resultados, possivelmente pelo fato da presença do biodiesel ao diesel sendo, portanto, descartada essa análise.



**Figura 5.5.** Perfil de distribuição de HTP residual em solo contaminado com óleo diesel (B4) em função da profundidade e do tempo.

A análise da figura 5.6 permite evidenciar que a população de BHT se manteve inalterada em relação ao solo virgem, durante todo o período monitorado. No entanto, a presença de biodiesel estimulou o crescimento das BHC na maioria das condições testadas.

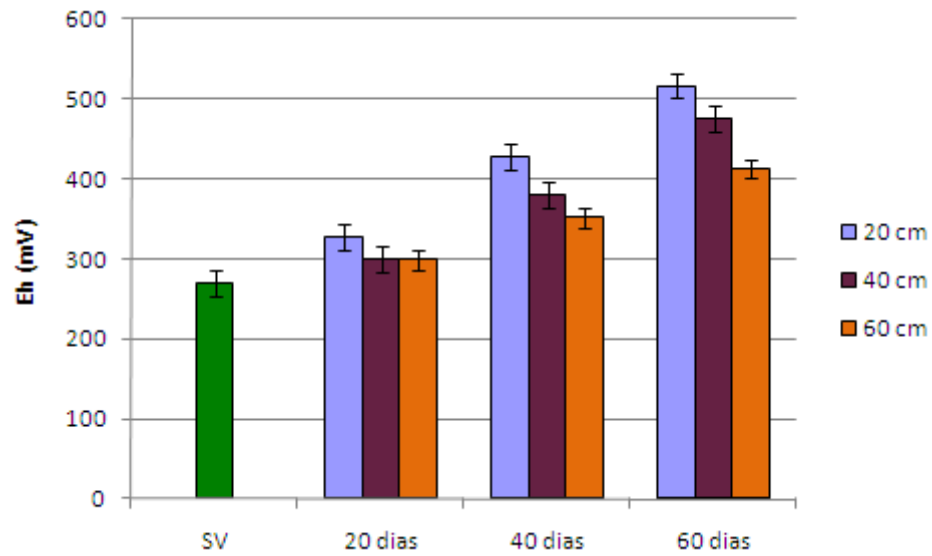




**Figura 5.6.** Concentração das bactérias heterotróficas totais (BHT) e bactérias hidrocarbonoclasticas (BHC) em solo após contaminação com diesel (B4) em diferentes profundidades e para diferentes tempos de monitoramento (A= BHT; B= BHC; SV= solo virgem, sem contaminação).

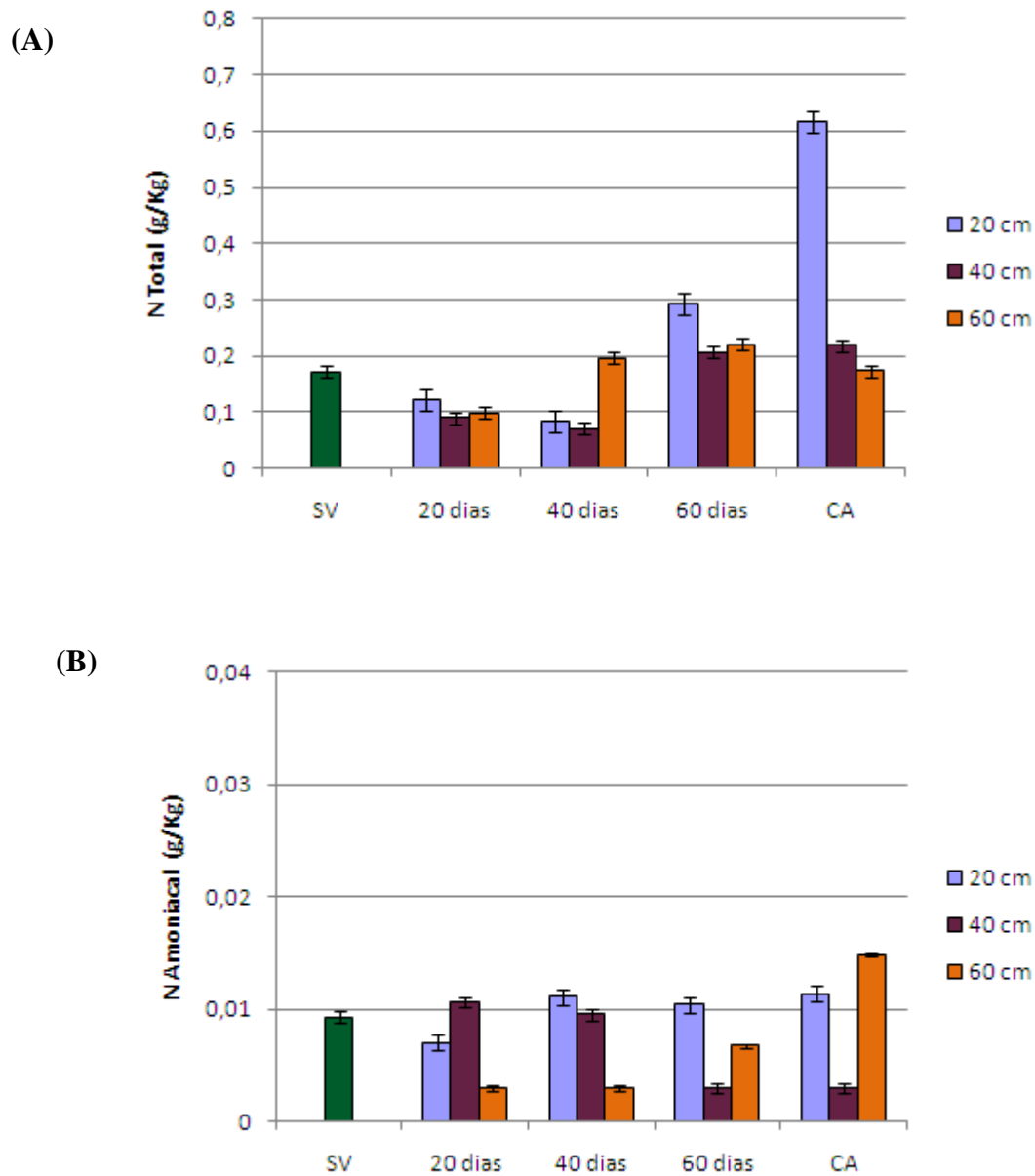
A presença de matéria orgânica mais facilmente degradável (biodiesel) não alterou o pH do solo, que se manteve ácido, em torno de 5, nas três profundidades por 60 dias.

A adição de biodiesel ao diesel também não teve efeito no potencial de oxidação-redução do solo (Figura 5.7). E, analogamente ao evidenciado para diesel B0 (Figura 5.3), o Eh se manteve positivo.



**Figura 5.7.** Variação do potencial de oxidação-redução (Eh) para amostras de solo contaminado com diesel/biodiesel em função da profundidade e do tempo (SV= solo virgem, sem contaminação).

Comparativamente, as concentrações de nitrogênio total (Figura 5.8 A) e amoniacal (Figura 5.8 B) apresentaram diferentes perfis em relação ao ensaio de AN com solo contaminado com diesel/biodiesel (Figuras 5.4 A e B). Observa-se um teor máximo de nitrogênio total no 60º dia de monitoramento.



**Figura 5.8.** Nitrogênio total (A) e nitrogênio amoniaca (B) para amostras de solo contaminado com óleo diesel (B4) em distintas profundidades (SV= solo virgem, sem contaminação; CA= controle abiótico)

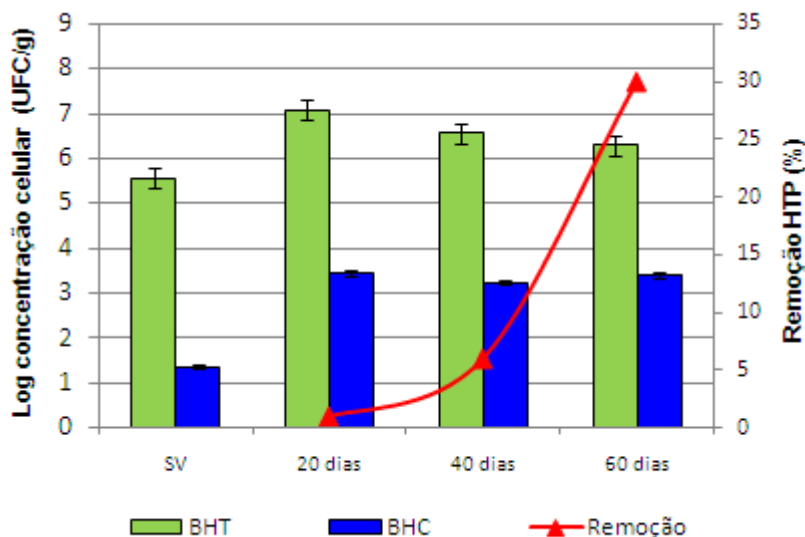
### 5.3.3 Análise comparativa da degradação de hidrocarbonetos de óleo diesel B0 e de contagem de BHT e BHC em coluna de solo

Para fins comparativos, na figura 5.9 foram plotados os valores dos percentuais de degradação de HTP, bem como os dados referentes às concentrações de BHT e BHC, para

solo contaminado com diesel puro (B0).

Para o solo contaminado apenas com óleo diesel puro (B0), a degradação de HTP foi lenta, tendo início após 20 dias da sua contaminação. A remoção de HTP no controle abiótico foi de 24%, atingindo, portanto, uma degradação de 14% ao final do monitoramento (Figura 5.9). Porém, de acordo com o perfil apresentado, a biorremediação tende a continuar. Os valores máximos tanto de BHT quanto de BHC ocorreram no mesmo período, sendo mais rápido quando a contaminação do solo foi feita com óleo diesel. Porém, com a continuidade do monitoramento, evidencia-se uma leve tendência ao declínio da viabilidade de ambas as populações. Isso pode ser devido a seleção natural, despontando a atividade preferencial de algumas espécies, em função do acúmulo de frações orgânicas de maior complexidade e, portanto, mais recalcitrantes, uma vez que a atividade na etapa inicial se atribui ao consumo das frações mais leves, ou seja, de menor complexidade. A redução do número de células também pode ser atribuída a depleção de nutrientes, como, por exemplo, a fonte de nitrogênio, o que é um impeditivo para a manutenção das funções vitais das células.

Portanto, acredita-se que a degradação dos hidrocarbonetos foi favorecida pela atividade microbiana, mesmo sem ter havido a ingerência para estabelecer condições que favorecessem o metabolismo bacteriano.



**Figura 5.9.** Monitoramento de HTP e concentração de bactérias heterotróficas totais (BHT), e de bactérias hidrocarbonoclasticas (BHC) para solo contaminado com óleo diesel (B0).

#### 5.4. Avaliação da toxicidade dos solos contaminados após atenuação natural

Amostras dos solos artificialmente contaminados com óleo diesel B0 e B4, e naturalmente atenuadas, foram ensaiadas para definir o potencial tóxico dos compostos residuais gerados pela ação microbiana e química sobre os hidrocarbonetos. Os ensaios de ecotoxicidade foram realizados com sementes de tomate, sendo feita a observação de percentual de germinação e crescimento do vegetal (Tabela 5.3).

Note-se que no solo virgem tanto o percentual de germinação das sementes quanto o crescimento do vegetal foram bem inferiores ao determinado para o controle positivo. Isto comprova o baixo valor nutricional do solo empregado.

Comparativamente, o solo contaminado apenas com óleo diesel (B0) apresentou maior germinação de sementes e maior crescimento das plantas de tomate, para as amostras retiradas tanto da superfície quanto na mistura das camadas de maior profundidade (40 e 60 cm). No caso do solo contaminado com óleo diesel B4, somente as amostras superficiais do solo propiciaram germinação e crescimento. Logo, na possível remoção de hidrocarbonetos para o solo contaminado com diesel/biodiesel, os compostos resultantes do processo de biodegradação não atingiram o mesmo grau de decomposição da ocorrida no solo contaminado com diesel; daí, a maior toxicidade. A causa disto pode ser a baixa disponibilidade de nutrientes no solo.

**Tabela 5.3:** Dados de ensaios de fitotoxicidade realizados com tomate para solos contaminados após atenuação natural

Amostras	Tempo de Tratamento (dias)	Ponto de Coleta	Sementes de tomate	
			Germinação (%)	Altura média do caule (cm)
Solo contaminado com Óleo Diesel (B0) naturalmente atenuado	20	Superfície	0	-
		Mistura <sup>*1</sup>	7	-
	40	Superfície	14	1
		Mistura	14	-
	60	Superfície	7	1
		Mistura	14	-
Solo contaminado com Óleo Diesel/Biodiesel (B4) naturalmente atenuado	20	Superfície	7	-
		Mistura	0	-
	40	Superfície	18	1
		Mistura	0	-
	60	Superfície	7	1
		Mistura	0	-
Solo Virgem	-	-	62	5
Controle positivo <sup>*2</sup>	-	Mistura	100	10
Controle abiótico <sup>*3</sup> (Diesel)	-	Mistura	0	-
Controle abiótico <sup>*3</sup> (Diesel/Biodiesel)		Mistura	0	-

<sup>\*1</sup> Mistura dos solos nas camadas de 40 e 60 cm de profundidade; <sup>\*2</sup> Controle positivo= solo comercial próprio para cultivo de plantas; <sup>\*3</sup> Controles abióticos= solo contaminado adicionado do biocida azida de sódio.

## ***CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES***

A atenuação natural (AN) do solo, artificialmente contaminado com óleo diesel puro (B0), resultou em crescente degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) ao longo de 60 dias, quando foi determinada uma remoção de cerca de 30%; embora as condições nutricionais e ambientais fossem desfavoráveis à atividade microbiana;

Comparativamente, o crescimento de bactérias heterotróficas totais (BHT) foi maior no solo contaminado com B0, enquanto que no solo contaminado com óleo diesel comercial B4 houve um aumento de BHC, o que sugere que a presença do biodiesel favorece a atividade microbiana;

A avaliação da toxicidade dos solos contaminados com B0 e B4, após atenuação natural, por meio de ensaios de fitotoxicidade com sementes de tomate revelou a presença de compostos tóxicos, sendo o solo contaminado com B4 o mais tóxico;

Não foi possível obter resultados a partir das análises de atividade desidrogenásica e de biologia molecular do solo, nem antes e nem após AN, o que se credita a interferências causadas pelas suas características físico-químicas.

## ***CAPÍTULO 7: CONSIDERAÇÕES FINAIS: PROBLEMAS E SUGESTÕES***

- Aplicar técnicas de biorremediação como o bioestímulo para obter uma relação de nutrientes mais favorável para a atividade microbiana;
- Repetir as análises de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP) tanto para B0 como para B4 usando a técnica de cromatografia;
- Realizar testes comparativos com outras concentrações de biodiesel como também B100;
- Analisar as possíveis causas da não obtenção dos resultados para as análises de biologia molecular e da atividade desidrogenásica.



## CAPÍTULO 8: BIBLIOGRAFIA

- ABED, R.M.M., KÖSTER, J.(2005) The direct role of aerobic heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria in the degradation of oil compounds. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 55, p. 29-37.
- ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA. J. (2000) O. Contaminação química e biorremediação do solo. In NOVAIS, R.F.; Álvares, V. H.; SCHAEFER, C.E. G. R. **Tópicos em ciência do solo**, Viçosa: SBCS, V. 1, p.299-352.
- ADAM, G.; DUNCAN, H. J. Influence of diesel fuel on growth of selected plant species. (1999) **Environmental Geochemistry and Health**, v. 21, p. 353-357.
- ALVAREZ, V. *et al* (1999) Uso de gesso agrícola. In: RIBEIRO, A.C.; ALVAREZ, V.; GUIMARÃES, P.T.G. **Recomendações para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais**, 5ª aproximação, RIBEIRO, A.C.; ALVAREZ, V.; GUIMARÃES, P.T.G., 359p.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS ASTM . (1998) E-1943-98: Remediation by Natural Attenuation (RNA) at Petroleum Release Sites. West Conshohocken, USA: **ASTM**. *apud* TELHADO, M.C.S.C.L, (2009). **Avaliação da biodisponibilidade de contaminante orgânico em solo**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Escola de Química/UFRJ. Rio de Janeiro, RJ, 115p.
- ARCHER, J.R. & SMITH, P.D. (1972) The relation between bulk density, available water capacity, and air capacity of soils. **J. Soil Sci.**,vol. 23, pp. 475-480.
- ATLAS, R. M. (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiological Reviews**, v.45 (1), p. 180-209.
- BAPTISTA, S. J. (2007) **Avaliação do Emprego de Biossurfactante na Biorremediação de Solos Contaminados com Óleo Diesel**. Tese de Dsc., EQ/UFRJ. Rio de Janeiro, RJ, 141p.
- BARTLETT, R.J., JAMES, B.R. (1993) Redox chemistry of soil. **Advances in Agronomy**, New York, v. 50, p. 151-208.

- BENTO, F.M., CAMARGO, F.A.O., OKEKE, B.C., FRANKENBERGER, W.T. (2005) Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1049-1055.
- BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK J.; PAVINATTO A. (2004) Armazenamento de carbono em frações lábeis da matéria orgânica de um Latossolo Vermelho sob plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.**, Brasília, v.39, n.7, p.677-683, jul.
- BERNARD, A. M. (1997) Effects of heavy metals in the environment on human health. In: **Contaminated soils**. Paris : INRA, Les Colloques, 85:21-33,.
- BERNORTH, L.; FIRTH, I.; MCALLISTER, P. E RHODES, S. (2000) Biotechnologies For Remediation and Pollution Control in the Mining Industry. **Minerals & Metallurgical Processing**, v.17 n.2, p. 105-111.
- BONAVENTURA, C.; JOHNSON, F. M. (1997) Healthy environments for healthy people: Bioremediation today and tomorrow. **Environmental Health Perspectives**, 105: 5 – 20.
- BOOPATHY, R. (2000) Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, 74: 63 – 67.
- BRAGA, B.; HESPANHOL, I.; CONEJO, LOTUFO, J. G.; BARROS, M. T. L. DE; SPENCER, M.; PORTO, M.; NUCCI, N.; JULIANO, N.; EIGER, S. **Introdução à Engenharia Ambiental**. Prentice Hall, São Paulo, 305 p, 2002.
- BRASIL (1981) **Lei Federal** n. 6.939, de 31 de agosto de 1981. Define a Política Nacional do Meio Ambiente.
- BRASIL (2005) **Lei Federal** n. 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira, 2005.
- BRITTON, G. e C.P. GERBA. (1984). **Groundwater pollution microbiology**. John Wiley and Sons, New York.
- BROWN, E.; BRADDOCK, J. (1990). Sheen Screen, a miniaturized most-probable-number method for enumeration of oil-degrading microorganisms. **Applied Environmental Microbiology**, 56 (12) 3865-3896.
- BRUNKEM, G.S.; SZARFAC, S.C. (1999) Ferro: Metabolismo, Excesso, Toxicidade e Recomendações. **Cadernos de Nutrição**, 18:23-34.

CAMARGO, F.A.O., SANTOS, G.A., ROSSIELLO, R.O.P., *et al.* (1993) Produção de ácidos orgânicos voláteis pela planta de arroz sob condições anaeróbias. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 337-342.

CAMARGO, F.A.O.; SANTOS, G.A.; ZONTA, E. (1999) Alterações eletroquímicas em solos inundados, **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 1, p. 171-180.

CARDOSO, L.C.S. (2004) - Logística do petróleo: transporte e armazenamento. Rio de Janeiro: **Interciência**, 192p.

CETEM - **Centro de Tecnologia Mineral**. IT 2008-005-00: Guia rápido para uso do analisador de TOG/HTP por infravermelho, infracal, em amostras de solo. Instrução de trabalho, 2008.

CETEM - **Centro de Tecnologia Mineral**. IT 2008-006-00: Determinação da Capacidade de Retenção de Água em Amostras de Solo. Instrução de trabalho, 2008.

CETEM - **Centro de Tecnologia Mineral**. IT 2008-007-00: Método de determinação da densidade bulk em amostras de solo. Instrução de trabalho, 2008.

CETEM - **Centro de Tecnologia Mineral**. IT 2008-008-00: Método de Determinação da Densidade de Partículas em Amostras de Solo. Instrução de trabalho, 2008.

CETEM - **Centro de Tecnologia Mineral**. IT 2008-009-00: Determinação da Porosidade em Amostras de Solo. Instrução de trabalho, 2008.

CETEM - **Centro de Tecnologia Mineral** IT 2008-011-00: Método de Determinação de pH em Amostras de Solo Utilizando o Medidor de pH Modelo NA 2000 Analion. Instrução de trabalho, 2008.

CETESB (2010) - **Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental**. Secretaria do estado do Meio Ambiente. São Paulo. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br>, pesquisado em Janeiro 2010.

CHAPELLE, F.H. (2000) **Ground-water microbiology and geochemistry**. Ed. New York, John Wiley and Sons *apud* MARTINS, A.; DINARDI, A.L.; FORMAGI, V.M.; LOPES, T.A.; BARROS, R.M.; CONEGLIAN, C.M.R.; BRITO, N.N.; SOBRINHO, G.D.; TONSO, S.; PELEGRINI, R. (2003) Biorremediação. III Fórum de Estudos Contábeis, Faculdades Integradas Claretianas, Rio Claro, SP.

- COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS (2002). **Communication from the Commission on the Council, the European Parliament, the Economic and Social Committee and the Committee of the regions**, <<Towards a Thematic Strategy for Soil Protection >>, COM (2002), Bruxelas.
- CRAFTS, A.S., REIBER, H. G. (1948). **Herbicidal properties of oils**. Hilgardia v. 20(19), p. 77-153, *apud* ADAM, G.; DUNCAN, H. J. (2002). Influence of diesel fuel on seed germination. **Environmental Pollution**, v. 120, p. 363-370.
- DEMELLO, JARED A.; CARMICHAEL, CATHARINE A.; PEACOCK, EMILY E.; NELSON, ROBERT K.; AREY, SAMUEL J.; REDDY, CHRISTOPHER M. (2007). **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, pp. 894-904.
- DEUEL, L.E.; HOLLIDAY, G. H. (1997) **Soil remediation for the petroleum extraction industry**. 2<sup>a</sup> ed., Tulsa, U.S.A.: PennWell, 242 p.
- DIAS, A. E. X. O. (2000) Biorremediação de áreas afetadas por resíduos sólidos tóxicos. In: SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA, R. M. (Org.) **Resíduos Sólidos, Ambiente e Saúde: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 142 p.
- DAVIS, J.S.; WESTLAKE, D.W.S. (1978) Crude oil utilization by fungi. *Can. J. Microbiol.* 25: 146-156 *apud* ATAGANA, H.I.; HAYNES, R.J. & WALLIS, F.M. (2006) Fungal Bioremediation of creosote contaminated soil: a laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi. **Water, Air, and Soil Pollution**, 172: 201-219.
- DRAGUN, J. 1998. **The soil chemistry of hazardous materials**. Massachusetts: Amherst Scientific Publishers Ed., 830 p.
- EMBRAPA. 1997. Manual de Métodos de análise de solo. Centro Nacional de Pesquisas de Solo. 2 ed. Rio de Janeiro: **EMBRAPA-CNPS**, 212p.
- EPA. (2001) Innovative technology verification report field measurement technologies for TPH in soil. **Horiba instruments incorporated – OCMA-350 oil content analyzer**. Washington D.C., EPA/600/R-01/089.
- FARIA, G.E. DE; BARROS, N.F. DE; SILVA, I.R.; NOVAIS, R.F. DE; PAIVA, A.O. (2008). **Carbono orgânico total e frações da matéria orgânica em diferentes distâncias de cepas de eucalipto**. *Cerne, Lavras*, v. 14, n. 3, p. 259-266, jul./set. 2008.
- FERRARI, M. D. (1996). Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y su aplicación em la biorremediación de suelos y lodos contaminados. **Revista Argentina de Microbiología**, 28: 83-98.

- FERREIRA, M.M., DIAS JR., M.S. (2001) **Física do solo**. Lavras: UFLA/FAEPE. 117p.
- FERGUSON, S.H., FRANZMANN, P.D., REVILL, A.T., SNAPE, I., RAYNER, J.L. (2003) The effects of nitrogen and water on mineralisation of hydrocarbons in diesel-contaminated terrestrial Antarctic soils. **Cold Regions Science and Technology**, v. 37, p.197-212.
- FOLLIS, P.A. (1994) An Investigation into the biodegradability of soy diesel under various environmental conditions. Masters Thesis. **School of Natural and Environmental Sciences**, Dusquesne Univesity. 58p.
- FONSECA, M. R. M. (1992) **Química: química orgânica**. São Paulo: FTD, 368 *apud* OLIVEIRA, S.D. (2008b). **Avaliação das técnicas de bioaumentação fúngica e bioestímulo em processos de biorremediação utilizando solo contaminado por petróleo**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Escola de Química/UFRJ. Rio de Janeiro, RJ, 140p.
- FOTH., H. D., (1990) **Fundamentals of soil science**, 8th ed. John Wiley & Sons, ISBN 0-471-52279-1
- GODSY, E.M. (1994) Microbiological and geochemical degradation processes. In: **Symposium on natural attenuation of ground water**. EPA/600/R-94/162.
- GOMES, N.M. (2005) **Variabilidade espacial de atributos físico-hídricos do solo da sub-bacia hidrográfica do Ribeirão Marcela na região do Alto Rio Grande, MG**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras. 124p.
- GOMES, M. M.; MACEDO, J. R.; CORRÊA, S. M. (2006). **Biorremediação de solos contaminados por petróleo e mistura de diesel e biodiesel em biorreator aeróbico**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Civil - Ênfase em Sanitária) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
- GÜNTER, H. (2005) **Poluição dos solos**. In: Philippi JR. A., Pelicioni M. C. (Ed.). **Educação Ambiental e Sustentabilidade**. São Paulo, Manole, pp.191.
- HAMDI, H.; BENZARTI, S.; MANUSADZIANAS, L.; AOYAMA, I. & JEDIDI, N. (2007) Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, 39: 1926 – 1935.

- HARMS, H., BOSMA, T.N.P. (1997) Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.18, p.97-105.
- HUPE, K., KONING, M., LÜTH, J.C., HEERENKLAGE, J., STEGMANN, R. (2001) Optimization of microbial soil treatment. In: **Treatment of contaminated soil: fundamentals, analysis, applications**. Stegmann, R., Brunner, G., Calmano, W., Matz, G. (Eds). Berlin: Springer, 658p.
- IWAMOTO, T.; NASU, M. (2001) Current Bioremediation Practice and Perspective. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 92, n° 1, p.1-8.
- HUTZINGER, O. & VERCAMP, W. (1981). **Microbial degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds**. London: Academic press.
- JARAMILLO, I. R. (1996) **Fundamentos teóricos-práticos de temas selectos de la ciencia del suelo**. Universidade Autónoma Metropolitana, México.
- KIEHL, JE. (1979) **Manual de edafologia: relações solo-planta**. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, 264p.
- KIEHL, E. J. (1985). **Fertilizantes Orgânicos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 482p.
- KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J., RAMOS, L. P. (2006). **Manual do Biodiesel**. Ed. Edgard Blücher, 340p.
- LALLY, C.; RUSSEL, M. (1996). **Soil and water bioremediation using bioreactors**. In: Rizzo, A. C. de L. *et al* 2007, **Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores** - Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2007. 76p. (Série Tecnologia Ambiental, 37).
- LEITE, W.C.A. (1995) **Resíduos sólidos urbanos: contribuição para gerenciamento**. In: TAUKTOMISIELO, S.M. et al. (Orgs) **Análise Ambiental: estratégias e ações**. São Paulo: T. A. Queiroz Editora Ltda.
- LEAHY, J. G., COLWELL, R. R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews**, v.54 (3), p.305-315.
- LEMOS, J.L.S.; BARROS, C.A.; OLIVEIRA, S. D.; REICHE, A. P. (2008) Fungos Filamentosos: Agentes de degradação de Petróleo e de hidrocarbonetos aromáticos

- policíclicos (HAPs). **Série Tecnologia Ambiental, 46. Centro de Tecnologia Ambiental - CETEM/MCT.** Rio de Janeiro, RJ.
- LEMONS, R.C. & SANTOS, R.D. (1984) Manual de descrição e coleta de solo no campo. Campinas, **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 46p.
- LIU, S. & SULFITA, M. (1994) Anaerobic biodegradation of methyl esters by *Acetobacterium woodii* and *Eubacterium limosum*. **Journal Industrial Microbiology**, 13, 321-327.
- MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. (2000) **Brock Biology of microorganisms**. New Jersey: Prentice Hall, 991p.
- MAHRO, B., MÜLLER, R., KASCHE, V. (2001) Bioavailability – the key factor of soil bioremediation. In: **Treatment of contaminated soil: fundamentals, analysis, applications**. Stegmann, R., Brunner, G., Calmano, W., Matz, G. (Eds). Berlin: Springer, 658p.
- MALAVOLTA, E.; GOMES, F. P.; ALCARDE, J. C. (2002) **Adubos e adubações**. São Paulo: Nobel, 200p.
- MAKAREVICIENE, V.; JANULIS, P. (2003) Environmental Effect of Rapeseed Oil Ethyl Ester. **Renewable Energy**, v.28, pp. 2395-2403.
- MARTINS, A.; DINARDI, A.L.; FORMAGI, V.M.; LOPES, T.A.; BARROS, R.M.; CONEGLIAN, C.M.R.; BRITO, N. N.; SOBRINHO, G.D.; TONSO, S.; PELEGRINI, R. (2003) Biorremediação. **III Fórum de Estudos Contábeis, Faculdades Integradas Claretianas**, Rio Claro, SP. Disponível em: [www.ceset.unicamp.br](http://www.ceset.unicamp.br). Pesquisado em 11/2009.
- MCGILL, W.B., ROWELL, M.J., WESTLAKE, D.W.S. (1981) Biochemistry, ecology and microbiology of petroleum components in soil. In: Soil Biochemistry. Ed.: Paul, E.A., Ladd, J.N.. New York: Marcel Dekker *apud* BAPTISTA, S. J. 2007. **Avaliação do Emprego de Biossurfactante na Biorremediação de Solos Contaminados com Óleo Diesel**. Tese de Dsc., EQ/UFRJ. Rio de Janeiro, RJ, 141p.
- MENEGHETTI, L. R. R. (2007) **Bioremediação na descontaminação de solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel**. Dissertação (Mestrado em Engenharia) Faculdade de Engenharia e Arquitetura, UPF, Passo Fundo, RS, 112p.
- MOLLEA, C.; BOSCO, F. & RUGGERI, B. (2005) Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies. **Chemosphere**, Jul.60(5):636-43.

- MOREIRA, F.M.S., SIQUEIRA, J.O. (2006) Microbiologia e bioquímica do solo. 2ª Ed. Lavras: UFLA/FAEPE, 729p.
- MUDGE, S.M.; PEREIRA, G. (1999). Stimulating the Biodegradation of Crude Oil with Biodiesel Preliminary Results. **Spill Science & Technology Bulletin**, Vol. 5, No. 5/6, pp. 353-355.
- MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N. Natural attenuation of contaminated soils. **Environment International**, v.30, p. 587– 601, (2004).
- NASCIMENTO, R.; ZIOLLI, R. L.; ARARUN, J. T.; PIRES, C. S.; SILVA, T. B. (2008) Avaliação do desempenho analítico do método de determinação de TPH (Total Petroleum Hydrocarbon) por detecção no infravermelho. **Eclética Química**, v.33, no.1, p.35-42.
- NEWMAN, A. (1993) Growing your own diesel fuel. **Environmental Science Technology** 27, 427.
- NYER, E.K. (1998) In: Groundwater and soil remediation: practical methods and strategies. Ann Arbor Press, Michigan *apud* ROSADO, A. (2005) **Microbiologia e Biorremediação de Petróleo e Derivados**. Rio de Janeiro: Núcleo de Ciências Ambientais/UFRJ, 62 p.
- OECD – **Organization for Economic Cooperation and Development** (1984) Guideline for testing of chemicals n°207.
- OLIVEIRA I.P. de, Cunha R., R. Santos, S. M. dos, Faria, C. D. de e Cunha, G. F. da (2000) Efeito da correção da fertilidade do solo no desenvolvimento da *brachiaria brizantha* cv. marandu em latossolo com diferentes históricos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 30(1): 57-64, jan./jun. 2000 .
- OLIVEIRA, J. B. (2008a) **Pedologia Aplicada**. FEALQ, 3ª ed., 592p.
- OLIVEIRA, S.D. (2008b) **Avaliação das técnicas de bioaumento fúngico e bioestímulo em processos de biorremediação utilizando solo contaminado por petróleo**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Escola de Química/UFRJ. Rio de Janeiro, RJ, 140p.



- ORTEGA-CALVO, J.J., LAHLOU, M., SAIZ-JIMENEZ, C. (1997) Effect of organic matter and clays on the biodegradation of phenanthrene in soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.40, p.101-106.
- OWSIANIAK, MI.; CHRZANOWSKI, Ł.; SZULC, A.; STANIEWSKI, J.; OLSZANOWSKI, A.; OLEJNIK-SCHMIDT, A. K.; HEIPIEPER H. J. (2009) Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. **Bioresource Technology** 100 p. 1497-1500.
- PASQUALINO, J. C.; MONTANÉ, D.; SALVADO, J. (2006) Synergic Effects of Biodiesel in the Biodegradability of fossil-derived fuels. **Biomass & Energy**, v.30, pp. 874-879.
- PEDRON, F. de A.; DALMOLIN, R. S. D.; AZEVEDO, A. C. et al. (2004) Solos Urbanos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, 1647-1653,.
- POREMBA, K. (1993) Influence of synthetic and biogenic surfactants on the toxicity of water-soluble fractions of hydrocarbons in sea water determined with the bioluminescence inhibition test. **Environmental Pollution**, v. 80, p. 25-29.
- PRADO, H. (1995) **Solos tropicais - potencialidade, limitações, manejo e capacidade de uso**. Piracicaba, 166p.
- PRINCE, R. C.; HAITMANEK, C.; LEE, C.C. (2008) The Primary Anaerobic Biodegradation of Biodiesel B20. **Chemosphere**, v. 71, pp. 1446-1451.
- PONNAMPERUMA, F.N. (1972) The chemical of submerged soil. *Advances in agronomy*, v.24, p.29-96.
- PONNAMPERUMA, F.N. (1978) Electrochemical changes in submerged soils and the growth of rice. 421-441 p. In: **International Rice Research Institute, Soil and rice, Los Baños, Philippines**.
- REINERT, D. J.; REICHERT, J. M. (2006). **Propriedade física do solo**. Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, p.18.
- RIBEIRO, A. C. (2009) **Potencial da acacia holocericea e da mimosa caesalpinifolia em fitorremediar solo tropical contaminado com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos**. Tese de Doutorado Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, XI, 200 p.

RISER-ROBERTS, E. (1998) **Remediation of Petroleum Contaminated Soils**. Boca Raton: Lewis Publishers, 542p.

RIVIERA-ESPINOZA, Y., DENDOOVEN, L. (2004) Dynamics of carbon, nitrogen and hydrocarbons in diesel-contaminated soil amended with biosolids and maize. **Chemosphere**, v. 54, p. 379-386.

RIZZO, A.C.L. (2008) **Desenvolvimento de biorreator não convencional para o tratamento de solos contaminados por petróleo**. Rio de Janeiro: UFRJ/Escola de Química, 188 p.

RODRIGUES, S.; DUARTE, A. C. (2003) Poluição do solo: revisão generalista dos principais problemas. In: CASTRO, A., DUARTE, A., SANTOS, T. (Ed.). **O Ambiente e a Saúde**. Lisboa, Instituto Piaget, pp. 136-176.

SCELZA, R.; RAO, M. A.; GIANFREDA, L. (2007) Effects of compost and bacterial cells on the decontamination and the chemical and biological properties of an agricultural soil artificially contaminated with phenanthrene. **Soil Biology & Biochemistry**, v.39, p.1303 – 1317.

SCOW, K.M., HICKS, K.A. (2005) Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p.1-8.

SEABRA, P.N.C. (1997) **Uso de tensoativos na mobilização e biodegradação de óleo diesel em solos impactados**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro.

SIKKEMA, J., BONT, J.A.M., POOLMAN, B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 201-222.

SILVA, L.F. da (1996) **Solos Tropicais. Aspectos pedológicos, ecológicos e de manejo**. Ed. Terra Brasilis, 137p.

SINGER, M.E. & FINNERTY, W.R. (1984) Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes. In: **Petroleum Microbiology**, Atlas, R.M. (eds). New York, Macmillan Publishing, p.1-60.

SITES acessados: [www.diariodocomercio.com.br](http://www.diariodocomercio.com.br), acessado em Fevereiro de 2010.  
[www.biodiesel.gov.br](http://www.biodiesel.gov.br), acessado em Março de 2010.  
[www.camara.sp.gov.br](http://www.camara.sp.gov.br), acessado em Maio de 2010.

SKIPPER, H. D. (1999) Bioremediation of contaminated soils. In: Sylvia, D. M. (Ed.), Principles and Applications of Soil Microbiology. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ: 469 -481 *apud* BENTO, F.M., CAMARGO, F.A.O., OKEKE, B.C., FRANKENBERGER, W.T. (2005) Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1049-1055.

SORIANO, A. U. (2001) RT 08/2001 CETEM/MCT: Tratamento de solos argilosos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. Relatório de Atividades Apresentado ao CNPq, Processo no 300479/99-9, Área – Engenharia Química. *apud* RIZZO, A.C.L. (2008). **Desenvolvimento de biorreator não convencional para o tratamento de solos contaminados por petróleo**. Tese (doutorado) – UFRJ/ Escola de Química/Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Rio de Janeiro, 188 p

STREVETT, K., DAVIDOVA, I., SUFLITA, J.M. (2002) A **comprehensive** review of the screening methodology for anaerobic biodegradability of surfactants. **Reviews in Environmental Science & BioTechnology**, v. 1, p. 143-162.

TELHADO, M.C.S.C.L, (2009). **Avaliação da biodisponibilidade de contaminante orgânico em solo**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Escola de Química/UFRJ. Rio de Janeiro, RJ, 115p.

THOMAS, J.E., TRIGGIA, A.A., CORREIA, C.A., VEROTTI FILHO, C., XAVIER, J.A.D., MACHADO, J.C.V., SOUZA FILHO, J.E., PAULA, J.L., DE ROSSI, N.C.M., PITOMBO, N.E.S., GOUVEIA, P.C.V.M., CARVALHO, R.S., BARRAGAN, R.V. (2001) Fundamentos de engenharia de **petróleo**. Rio de Janeiro: Interciência/PETROBRAS, 271p.

TRINDADE, P.V.O., et al, (2004) Biorremediation of a Weathered and recently Oil Contaminated Soils from Brazil: a Comparison Study, **Chemosphere** V.58, p.515-522.

U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – (USEPA) (1999.). Directive 9200.4-17P: **Use of Monitored Natural Attenuation at Superfund, RCRA Corrective Action, and Underground Storage Tank Sites**. Disponível em:<<http://www.epa.gov/oust/directiv/d9200417.pdf>>. Acesso em Julho de 2010.

WALWORTH, JAMES, ANDREW POND, IAN SNAPE, JOHN RAYNER, SUSAN FERGUSON, AND PAUL ARVEY. (2005). “**Fine Tuning Soil Nitrogen to Maximize Petroleum Bioremediation.**” **RCSACC** (2005): 251-257.

- WATWOOD, M.E.; WHITE, C. S.; DAHAN, C. N. (1991) Methodological modifications for accurate and efficient determination of contaminant biodegradation unsaturated calcareous soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57 , n. 3, p.714-720.
- WDNRBRR – Wisconsin Department of Natural Resources Bureau for Remediation and Redevelopment. **Naturally Occurring Biodegradation as a Remedial Action Option for Soil Contamination** – Interim Guidance (Revised). PUBL-SW-515-95. Madison: WI53707, 1994. Updated Disclaimers September, 2004.
- VECCHIOLI, G.L.; Del PANNO, M.T.; PAINCEIRA, M.T. (1990) Use of selected autochthonous soil bacteria to enhance degradation of hydrocarbons in soil. **Environmental Pollution**, vol. 67 , pp. 249-258.
- VIEIRA, T.M.; SILVA, E.P.; ANTONIOSI FILHO, N.R.; VIEIRA, J.D.G. (2006) Determinação e quantificação da degradação bacteriana de biodiesel de óleo de palma. **I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel**. Brasília/DF.
- VOGEL, T. M. (1996) Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. **Current Opinion in Biotechnology**, 7: 311 -316.
- 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**, 7, p. 37-51.
- YOUNG, L.Y., PHELPS, C.D. (2005) Metabolic biomarkers for monitoring in situ anaerobic hydrocarbon degradation. **Environmental Health Perspectives**, , v. 113, p. 62-67.
- ZHANG, X.; PETERSON, C.; REECE, D.; MOLLER, G.; HAWS, R.(1998) Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. *Transactions of ASAE*;41:1423–30 *apud* PASQUALINO, J. C.; MONTANÉ, D.; SALVADO, J. (2006). Synergic Effects of Biodiesel in the Biodegradability of fossil-derived fuels. **Biomass & Energy**, v.30, pp. 874-879.