Avaliação da adição do pó da casca de coco verde, como material estruturante, na biorremediação de solo contaminado por petróleo

Renata da Matta dos Santos

Tese submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadores: Selma Gomes Ferreira Leite – Engenheira Química, D.Sc.

Luís Gonzaga Santos Sobral – Engenheiro Químico, PhD.

Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Abril de 2007

Santos, Renata da Matta.

Avaliação da adição do pó da casca de coco verde, como material estruturante, na biorremediação de solo contaminado por petróleo/ Renata da Matta dos Santos. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2007.

xiii, 143 p.; il.

(Dissertação) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2007.

Orientadores: Selma Gomes Ferreira Leite e Luis Gonzaga Santos Sobral.

1. Biorremediação. 2. Petróleo. 3. Material Estruturante. 4. Tese. (Mestrado – UFRJ/EQ). 5. Leite, Selma Gomes Ferreira e Sobral, Luis Gonzaga Santos. I. Título.

Dedico esse trabalho ao meu filho Gabriel.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por conceder-me equilíbrio e saúde para trilhar os caminhos por mim escolhidos.

Ao meu filho, Gabriel, pelo imenso carinho e amor, alicerces para que eu alcançasse os meus objetivos de vida.

Aos meus pais, Carlos e Fátima, que apesar dos obstáculos na vida, sempre incentivaram meus estudos.

A Andréa Rizzo pela amizade sincera, pelo carinho, pelos ensinamentos e incentivos profissionais.

Aos meus orientadores, Selma Leite e Luis Sobral, pela confiança e orientação.

A Elias, Hugo, Telma e Patrícia pelo incentivo e carinho.

Aos amigos, Ary Caldas, Pedro Felix, Jorge Luiz, Daniele Reichwald, Diego Cara, Gisele Gisee, Tatiane Moura, Paula Baptista e Daniele Rocha por todo auxílio experimental durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos vários colegas de laboratório, Bianca, Sabrina, Claudia, Paula, Grace, Juan, Michel, Rodnei, Gustavo e Felipe pela saudável convivência.

Aos técnicos da COAM, em especial, a Vanessa Rocha e Antonieta Middea, pelas análises de caracterização realizadas.

Ao técnico Frederico Landa e a engenheira Adriana Ururahy, do CENPES/PETROBRAS, pela presteza na realização da análise de hidrocarbonetos totais de petróleo.

Ao Centro de Tecnologia Mineral (CETEM/MCT), por toda a infra-estrutura fornecida para o desenvolvimento experimental da dissertação, em especial, a Ronaldo Santos, Coordenador de Processos Metalúrgicos e Ambientais.

Ao CENPES/PETROBRAS pelo fornecimento do solo e petróleo, e a EMBRAPA, na pessoa do químico Gustavo Saavedra, pelo fornecimento do pó da casca de coco verde; materiais essenciais para o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao apoio financeiro da **Agência Nacional do Petróleo** – ANP – e da **Financiadora de Estudos e Projetos** – FINEP – por meio do Programa de Recursos Humanos da ANP para o Setor de Petróleo e Gás – PRH-ANP/MCT, em particular ao **PRH 13**, da Escola de Química - Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria do Petróleo e Gás Natural.

RESUMO

Resumo da Tese de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química/UFRJ como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências, com ênfase na área de Petróleo e Gás Natural.

AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DO PÓ DA CASCA DE COCO VERDE, COMO MATERIAL ESTRUTURANTE, NA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO POR PETRÓLEO

Renata da Matta dos Santos
Abril, 2007

Orientadores: Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc.
Luis Gonzaga Santos Sobral, PhD.

A biorremediação é uma tecnologia eficiente na remediação de solos contaminados por petróleo. A aeração adequada é essencial para a obtenção de elevadas taxas de degradação do óleo pelos microrganismos. Neste trabalho, uma das técnicas mais aplicadas na biorremediação para promover a aeração foi estudada: a adição de agentes estruturantes para aumentar a porosidade do solo contaminado. Foi realizada uma etapa de investigação preliminar de caracterização do solo sem contaminação e do pó da casca de coco verde. Os experimentos de biodegradação envolveram três etapas: ensaios em microcosmos, em biopilhas e em biorreatores.

O primeiro experimento em microcosmos avaliou o efeito da adição de nutrientes (N e P) e estabeleceu a relação nutricional C:N de 100:10 como a melhor, alcançando 215 mg de remoção de carbono, calculada com base na geração de CO_2 no processo de respiração do solo. Essa relação foi aplicada em um segundo experimento, no qual a adição do pó de coco como agente estruturante foi testada em duas diferentes granulometrias e concentrações (5 e 10% p/p). Duas fontes de correção de nitrogênio (uréia e nitrato de sódio) foram testadas neste experimento. A concentração de pó de coco de 10%p/p forneceu a maior remoção de carbono de 500 mg e o maior crescimento de microrganismos heterotróficos e degradadores de aproximadamente 10^9 UFC e 10^7 NMP g^{-1} solo seco, respectivamente. Essa condição, corrigida com uréia, foi responsável por uma remoção de carbono 66% maior que no seu controle. A concentração de 10% p/p foi reproduzida sob as mesmas condições nutricionais no terceiro experimento em microcosmos testando outros agentes estruturantes, como: vermiculita, serragem e casca da mamona. A maior remoção de hidrocarbonetos totais de petróleo de 23% foi obtida para a condição com pó de coco, seguida pela serragem com 22% e, por último, a vermiculita com 14% de remoção. Todas as melhores condições foram corrigidas com uréia. O uso da mamona como agente estruturante foi descartado devido à elevada biodegradação desse material.

A segunda etapa de biodegradação consistiu em um experimento em biopilhas de bancada, no qual o pó de coco foi adicionado na concentração de 5 e 10% p/p, melhor agente estruturante definido na primeira etapa, e a relação nutricional de 100:10, pela adição de uréia e nitrato de sódio que foram testados novamente. A melhor

condição empregada (remoção de óleos e graxas de 38%) foi a biopilha com 10% p/p de pó de coco e corrigida com uréia. Esta condição foi testada, na terceira etapa, em um protótipo de biorreator de fase sólida. O experimento objetivou determinar a influência do sistema de aeração na degradação de petróleo em solo. Como era esperado, o experimento realizado no biorreator forneceu uma maior taxa de remoção de TPH, 93% maior que o ensaio em microcosmo e 64% maior que o ensaio em biopilhas. Isto prova que a maior degradação do contaminante depende do sistema de aeração adotado, e a incorporação do pó de coco, como agente estruturante, foi mais eficiente promovendo maior aeração ao sistema solo/contaminante/conatminante/microrganismos.

ABSTRACT

Abstract of a Thesis presented to Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - EQ/UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science with emphasis on Petroleum and Natural Gas.

EVALUATION OF THE YOUNG COCONUT PEEL POWDER ADDITION, AS BULKING AGENT, IN PETROLEUM CONTAMINATED SOIL BIOREMEDIATION

Renata da Matta dos Santos
April, 2007

Supervisors: Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc.
Luis Gonzaga Santos Sobral, PhD.

Bioremediation is an efficient technology used to remediate organic contaminated soil such as petroleum hydrocarbons. Adequate aeration is essential to achieve elevated rates of oil degradation through microorganisms. In this work one of the most common technique applied in bioremediation field to promote aeration was studied: the addition of bulking agents to increase contaminated soil porosity's. The preliminary screening step of soil without contamination and coconut powder characterization were accomplished. Biodegradation experiments involved three steps: microcosms, biopiles and bioreactor tests.

The first set of microcosms experiments evaluated the effect of nutrients (N and P) addition and established a nutritional relationship C:N of 100:10 as the better reaching 215 mg of carbon removal, calculated based on carbon dioxide quantified by soil respiration. This relationship was applied in a second experiment, where the addition of coconut powder was tested as bulking agents in two different particles size and concentrations (5 and 10% w/w). Two chemical sources of nitrogen correction (urea and sodium nitrate) were also tested on this experiment. The coconut powder's concentration of 10% w/w and its particles size above the one of the contaminated soil provided the higher performance as carbon removal of 500 mg and high growth of heterotrophics and oil-degrading microorganisms from approximately 10^9 CFU and 10^7 NMP g^{-1} dry soil, respectively. This condition, corrected by urea, was liable for a carbon removal 66% higher than its control. The concentration of 10% w/w was reproduced under the same nutritional conditions on the third experiment in microcosm testing other bulking agents, such as: vermiculite, sawdust and castor bean. The analysis of total petroleum hidrocarbons removal pointed out the best condition of 23% removal with coconut powder, followed by the sawdust with 22% removal and, at last, the vermiculite with 14% removal. All the best conditions were corrected with urea. The use of castor bean as bulking agent was discarded due to high degradation of that material.

The second biodegradação step consisted on an experiment in bench bio-piles, in which the coconut powder was added in the concentrations of 5 and 10%, better bulking agent defined in the first step, and the C:N nutritional relationship of 100:10, by urea and sodium nitrate addition were tested again. The best condition for removing oils and greases of 38% was the bio-pile with 10% w/w of coconut powder and corrected with urea. This condition had been tested, in a third step, in a prototype of solid phase

bioreactor. The experiment aimed at determining the influence of aeration system in the degradation of petroleum in soil. As it was expected, the experiment accomplished in the bioreactor had consequence in monthly removal rate of TPH, 93% higher than microcosm ones and 64% higher than the ones in bio-piles. This proves that the higher contaminant degradation depends on the aeration system adopted, which implies that the one incorporating coconut powder, as bulking agent, was far more efficient.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO 1

2 OBJETIVOS 4

2.1 OBJETIVO GERAL 4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 4

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 5

3.1 ALTERNATIVAS DE TRATAMENTO DE SOLOS CONTAMINADOS 5
3.2 A BIORREMEDIAÇÃO 7
3.3 TECNOLOGIAS DE BIORREMEDIAÇÃO 8
Atenuação Natural Monitorada 10
Biosparging 10
Bioventing 11
Bioslurping 11
Fitorremediação 12
Landfarming 12
Compostagem 14
Biorreatores 14
Biopilhas 15
3.4 COMO DECIDIR A MELHOR TECNOLOGIA DE REMEDIAÇÃO A SER APLICADA? 16
3.4.1 Técnicas auxiliares às tecnologias de biorremediação 17
3.4.2 Monitoramento do processo de biorremediação 18
3.5 FATORES QUE INTERFEREM NO PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO – DA MELHOR TECNOLOGIA AOS MELHORES RESULTADOS DE REMOÇÃO DE CONTAMINANTES 19
3.5.1 Características do Solo 20
3.5.2 Características do Contaminante - Petróleo 26
3.5.3 Diversidade Microbiana nos Solos 30
3.5.4 Fatores ambientais 34
Temperatura 34
pH 36
Nutrientes 36
Umidade 37
Aeração 38
3.6 UTILIZAÇÃO DE MATERIAIS ESTRUTURANTES COMO FORMA AUXILIAR AO PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO 39
3.6.1 Reaproveitamento da Casca de Coco Verde: Utilização como Material Estruturante 42
O Coqueiro 42
O Coco 43
O Reaproveitamento do Coco 44

4 MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS 47

4.1 SOLO 47
4.1.1 Caracterização Complementar do Solo 47
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 48
Difração de Raios-X (DRX) 49

Análise de Fertilidade do Solo 49
4.2 PETRÓLEO EMPREGADO COMO CONTAMINANTE 50
4.3 PÓ DA CASCA DE COCO VERDE EMPREGADO COMO MATERIAL ESTRUTURANTE 51
4.4 ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO 53
4.4.1 Primeira Etapa: Ensaios em microcosmos 54
1º Teste de Biodegradação em microcosmos 54
2º Teste de Biodegradação em microcosmos 56
3º Teste de Biodegradação em microcosmos 58
4.4.2 Segunda Etapa: Ensaio em Biopilhas 60
4.4.3 Terceira Etapa: Ensaio em Biorreator 61
4.5 METODOLOGIAS ANALÍTICAS DE MONITORAMENTO DOS ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO 63
Análise Cromatográfica do CO_2 gerado 63
Quantificação dos Microrganismos Heterotróficos Totais e Microrganismos Degradadores 64
Análise do teor de óleos e graxas 66
Análise da Concentração de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo 66

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 67

5.1. CARACTERIZAÇÃO DO SOLO 67
Difração de Raios X (DRX) 70
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 73
5.2 CARACTERIZAÇÃO DO PÓ DA CASCA DE COCO VERDE 77
5.3 ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO 82
5.3.1 Primeira Etapa: Ensaios em Microcosmos 82
1º Teste de Biodegradação em microcosmos 83
2º Teste de Biodegradação em microcosmos 87
3º Teste de Biodegradação em microcosmos 100
5.3.2 Segunda Etapa: Ensaios em Biopilhas 111
5.3.3 Terceira Etapa: Ensaio em Biorreator 121

6. CONCLUSÕES 126

7. SUGESTÕES 131

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 132

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Denominações usualmente empregadas para biorremediação 9
Figura 2: Esquema de um perfil de solo mostrando os principais horizontes..... 22
Figura 3: Diagrama Triangular adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência do Solo para classificação das classes texturais do solo 24
Figura 4: Partes do Coco Verde 43
Figura 5: Local de coleta do solo - Unidade de Negócios de Exploração e Produção Sergipe Alagoas (UN-SEAL), no município de Carmópolis, Sergipe 47
Figura 6: Esquema do Processamento do Coco Verde realizado pela EMBRAPA..... 51
Figura 7: Material resultante do processamento da casca do coco verde..... 52
Figura 8: Foto do microcosmo utilizado para os Testes de Biodegradação..... 54
Figura 9: Foto das biopilhas instaladas no Laboratório 2, da CPMA/CETEM 61
Figura 10: Esquema representativo do protótipo de biorreator de fase sólida, empregado no Ensaio de Biodegradação..... 62
Figura 11: Difratograma de raios X da amostra de solo bruta 71
Figura 12: Difratograma de raios X da amostra solo orientada sem matéria orgânica 71
Figura 13: Micrografia obtida pelo MEV de partículas do solo sem contaminação 74
Figura 14: EDS de partículas do solo sem contaminação 75
Figura 15: Micrografia de partículas do pó da casca de coco 80
Figura 16: EDS de partículas do pó da casca de coco..... 80
Figura 17: Difratograma do pó da casca de coco 81
Figura 18: Evolução de CO_2 do 1º Teste de Biodegradação em microcosmos..... 84
Figura 19: Matriz do Planejamento Fatorial Completo (2^3) do 2º Teste de Biodegradação em microcosmos, gerada pelo software *Statistica* 6.0..... 89
Figura 20: Carbono removido no 2º Teste de Biodegradação em microcosmos 90
Figura 21: Análise de Variância (ANOVA), gerada pelo software *Statistica* 6.0, para o 2º Teste de Biodegradação em microcosmos 91
Figura 22: Gráfico de Pareto, gerado pelo software *Statistica* 6.0, para o 2º Teste de Biodegradação em microcosmos 92
Figura 23: Gráfico das Médias dos Tratamentos, gerado pelo software *Statistica* 6.0, para o 2º Teste de Biodegradação em microcosmos 93

Figura 24: Superfície de Resposta – Condições Corrigidas com Uréia 94
Figura 25: Curva de Nível – Condições Corrigidas com Uréia 95
Figura 26: Superfície de Resposta – Condições Corrigidas com Nitrato de Sódio 95
Figura 27: Curva de Nível – Condições Corrigidas com Nitrato de Sódio..... 96
Figura 28: Resultados de contagem dos microrganismos Heterotróficos Totais do 2º Teste de Biodegradação em microcosmos..... 97
Figura 29: Resultados de contagem dos microrganismos Degradadores de óleo cru do 2º Teste de Biodegradação em microcosmos 97
Figura 30: Evolução de CO_2 do 3º Teste de Biodegradação em microcosmos..... 101
Figura 31: Remoção de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP) 105
Figura 32: Microrganismos Heterotróficos Totais do 3º Teste de Biodegradação em microcosmos..... 107
Figura 33: Microrganismos Degradadores do 3º Teste de Biodegradação em microcosmos 107
Figura 34: Microrganismos Heterotróficos Totais do 3º Teste de Biodegradação em microcosmos, Controles 109
Figura 35: Microrganismos Degradadores do 3º Ensaio de Biodegradação, Controles ... 109
Figura 36: Resultados da Contagem de Microrganismos Heterotróficos Totais e Degradadores para o ensaio em biopilhas 112
Figura 37: Remoção de hidrocarbonetos por cromatografia (HTP) e gravimetria (OG) para 6 meses de ensaio, em Biopilhas 115
Figura 38: Cromatogramas de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo 118
Figura 39: Resultados do teor de óleos e graxas (OG) do ensaio em biorreator..... 122
Figura 40: Cromatogramas de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo do Ensaio em Biorreator..... 122
Figura 41: Taxa mensal de remoção de HTP para os três sistemas testados: microcosmos, biopilhas e biorreator..... 123
Figura 42: Resultado da Contagem de Microrganismos Heterotróficos Totais do Ensaio de Biodegradação em Biorreator 124
Figura 43: Resultado da Contagem de Microrganismos Degradadores do Ensaio de Biodegradação em Biorreator..... 124

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Principais operações e/ou processos físicos e químicos utilizados para tratamento de resíduos sólidos 6
Tabela 2: Classificação das frações do solo de acordo com o diâmetro das partículas..... 23
Tabela 3: Estrutura Química e Biodegradabilidade 28
Tabela 4: Caracterização química típica da casca de coco verde..... 44
Tabela 5: Caracterização do solo não contaminado 48
Tabela 6: Metodologias utilizadas na análise de fertilidade do solo..... 50
Tabela 7: Condições adotadas no 1º Teste de Biodegradação em microcosmos 55
Tabela 8: Condições adotadas no 2º Teste de Biodegradação em microcosmos 57
Tabela 9: Variáveis e níveis estudados no Planejamento Experimental do 2º Teste de Biodegradação em microcosmos 58
Tabela 10: Condições adotadas no 3º Teste de Biodegradação em microcosmos 59
Tabela 11: Condições adotadas no Ensaio em Biopilhas 60
Tabela 12: Composição do meio orgânico sólido 65
Tabela 13: Composição do meio mineral líquido 65
Tabela 14: Caracterização do solo de Carmópolis contaminado em laboratório com 5% p/p de óleo Sergipano Terra 69
Tabela 15: Caracterização química do pó de coco e do seu solubilizado 78
Tabela 16: Composição química de fibras de coco e sisal 79
Tabela 17: Remoção de carbono para o 1º Teste de Biodegradação..... 86
Tabela 18: Remoção de carbono total e referente ao óleo cru 104

1 INTRODUÇÃO

O grande crescimento da população é de forma direta ou indireta, um dos principais fatores responsáveis pelo fenômeno de impacto ambiental, em função da produção de quantidades cada vez maiores de resíduos, seja eles de origem doméstica ou industrial. O crescimento populacional gerou um aumento de consumo, no qual tão somente a necessidade de adequar um produto a sua maior e melhor comercialização, pode acarretar em um impacto ambiental sem precedentes (BRITO *et al.*, 2004). Como exemplo, tem-se a substituição de embalagens de vidro para bebidas por embalagens plásticas, as quais vêm causando grandes impactos ao meio ambiente, pela disponibilização, de forma desregrada, em lixões ou cursos d'água, pelo tempo extenso que levam para serem degradados no meio ambiente.

A atividade industrial não tem ficado à margem desses problemas, causando extensa degradação do meio ambiente, através de emissões gasosas não controladas, disponibilização inadequada de rejeitos industriais que causam a contaminação de águas subterrâneas, dentre diversas outras formas. Essas preocupações ambientais, incipientes até a ocorrência da 2ª Guerra Mundial, demonstraram ser de vital importância na medida em que mais e mais acidentes ambientais passaram a ocorrer, estimulando a pesquisa de forma a reparar ou minimizar, nos processos produtivos, esses danos ambientais. Além disso, a pressão por parte dos governos e da opinião pública tem forçado essa postura ambientalmente correta das indústrias, estabelecendo leis que regulam o gerenciamento ambiental (MARTINS *et al.*, 2003; MOLINA-BARAHONA *et al.*, 2004; BAYARDINO, 2004).

Nesse contexto, encontram-se as indústrias de petróleo reconhecidamente grandes causadoras de impactos ambientais. Tais impactos vêm do consumo de quantidades consideráveis de água e energia da produção de efluentes e resíduos sólidos de difícil tratamento e disposição, e da liberação de gases tóxicos na atmosfera. Por outro lado, é extensa e fundamental a importância do petróleo em nossa sociedade, tal como está atualmente organizada. O petróleo não é apenas uma das principais fontes de energia utilizadas, mas também seus derivados são matérias-primas para a manufatura de inúmeros

bens de consumo e, deste modo, tem um papel cada dia mais presente e relevante na vida das pessoas (MARIANO, 2005).

Não obstante, casos como o ocorrido na Baía de Guanabara em 2000, onde 1,3 milhões de litros de petróleo vazaram de um oleoduto, alertam para a necessidade de minimizar esses impactos da indústria petrolífera, bem como recuperar os ambientes já contaminados. A disposição inadequada de resíduos oleosos, por exemplo, vem causando a contaminação de solos, recursos hídricos superficiais e subterrâneos e, eventualmente, dependendo da volatilidade dos compostos orgânicos presentes nos resíduos, a contaminação do ar (BAYARDINO, 2004). Atualmente, esforços estão sendo envidados no desenvolvimento de novas alternativas de remediação desses meios contaminados por petróleo, principalmente quando se trata de solos. Isto se deve ao fato das tecnologias de remediação aplicadas ao tratamento de solos contaminados encontrarem na heterogeneidade desse material um grande desafio, principalmente comparado com a menor complexidade no tratamento de efluentes líquidos industriais. Diante disso, no tratamento de solos contaminados por compostos orgânicos, como petróleo, pode ser exigida a utilização de uma combinação de tecnologias biológicas, físicas e químicas para reduzir a contaminação a um nível seguro e aceitável (KHAN *et al*., 2004).

Os processos biológicos, quando comparados aos processos físico-químicos, são mais seguros e com custo relativamente baixo. Além disso, o aumento das pesquisas nessa área está relacionado também com o fato de que o tratamento biológico é menos agressivo ao meio ambiente, já que, muitas vezes, concentra seus esforços em otimizar, tão somente, o processo naturalmente existente nos solos contaminados sendo por isso conhecido como biorremediação (MARTINS *et al*., 2003; BRITO *et al*., 2004; MOLINA-BARAHONA *et al.*, 2004; D'ANNIBALE e*t al.*, 2006).

A biorremediação é uma tecnologia ecologicamente aceitável para a remediação de solos contaminados, a qual utiliza o estímulo da atividade microbiana para degradar compostos orgânicos, em especial hidrocarbonetos de petróleo, resultando na transformação em metabólitos ou mineralização dos contaminantes (MOLINA-BARAHONA *et al*., 2004; NAKAGAWA e ANDRÉA, 2006). As tecnologias de biorremediação para a recuperação de solos contaminados por petróleo são principalmente baseadas em processos aeróbicos, cujas etapas iniciais de degradação dos hidrocarbonetos

envolvem a oxidação de substratos por enzimas oxigenases (BOOPATHY, 2003). Assim, a concentração de oxigênio no solo pode ser reconhecida como um fator limitante e, favorecer as condições de aeração, seria uma etapa importante de otimização desse processo. Alguns métodos utilizados para promover a aeração são: o revolvimento, o bombeamento de ar no solo e a adição de agentes estruturantes, os quais aumentam a porosidade do solo a ser tratado (RHYKERD *et al.*, 1999). Os materiais estruturantes mais comuns são a serragem, palhas e cascas de origem vegetal, resíduos agrícolas, dentre diversos outros.

Nos últimos anos, especial atenção vem sendo dada para minimização ou reaproveitamento de resíduos sólidos gerados nos diferentes processos industriais, como na indústria agroindustrial. Por exemplo, o aumento crescente no consumo coco verde fruto e a vocação natural para a industrialização de sua água vem aumentando a geração de rejeito (casca de coco), que corresponde a cerca de 85% do peso do fruto. O resíduo da casca de coco verde vem sendo utilizado, em estudos mais recentes, na agricultura intensiva, principalmente no cultivo de plantas ornamentais e hortaliças; na indústria de papel; na engenharia de alimentos para complementação alimentar humana e animal e na produção de enzimas; na indústria de construção civil e em matrizes poliméricas.

Tornar viável o aproveitamento da casca do coco verde, gerado tanto como resíduo industrial quanto como lixo urbano, significaria mais uma alternativa de lucro para os sítios de produção. Valendo-se dessa ampla gama de possíveis aplicações da fibra e do pó de coco, diferentes rotas de aproveitamento da casca de coco verde vêm sendo propostas. Dentre estas, a rota de aplicação do pó da casca de coco verde como agente estruturante de solos contaminados por petróleo foi desenvolvida durante o trabalho aqui apresentado.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral estudar a influência da adição do pó da casca de coco verde, como material estruturante, na remediação de um solo contaminado por petróleo, utilizando diferentes tecnologias de biorremediação. O estudo realizado faz parte de um projeto desenvolvido em parceria com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, que visa buscar inovações tecnológicas ligados à reutilização da casca de coco verde.

2.2 Objetivos Específicos

— Caracterizar o solo não contaminado, identificando possíveis fatores limitantes ao processo de biorremediação;

— Caracterizar o pó da casca de coco verde utilizado como material estruturante do solo contaminado;

— Definir a melhor relação nutricional a ser aplicada nos ensaios de biodegradação;

— Determinar a melhor concentração e granulometria do pó de coco verde a ser adicionado ao solo;

— Comparar a eficiência da aplicação do pó da casca de coco verde com a aplicação de outros materiais estruturantes: casca da mamona, serragem e vermiculita.

— Determinar e melhor fonte de correção de nitrogênio, nitrato de sódio ou uréia, para todos os materiais estruturantes testados;

— Verificar a influência da aeração/homogeneização do solo contaminado com adição do pó da casca de coco em três diferentes sistemas estudados: microcosmos, biopilhas e biorreatores;

— Agregar valor a um resíduo agroindustrial, o pó da casca de coco verde, através da sua utilização como insumo em processos de biorremediação.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Alternativas de tratamento de solos contaminados

A destinação adequada a ser dada aos resíduos sólidos industriais ainda é um problema que preocupa, devido à grande diversidade dos mesmos, decorrentes principalmente das diferenças nas concentrações e composições dos contaminantes em cada um deles. Muitas vezes, uma diferença sutil entre dois resíduos de origem semelhante (como teor de umidade, por exemplo) pode inviabilizar o uso de uma mesma solução para disponibilizar ambos (MARIANO, 2005). Na indústria do petróleo esse fato é ainda mais alarmante, pois as diferenças na origem do óleo cru e no seu processamento, já interferem na composição dos resíduos produzidos, os quais envolvem, normalmente, grande quantidade de solos. Segundo Trindade (2002), de todas as etapas que compõem a cadeia produtiva do petróleo, desde a prospecção até o consumo final, a produção em terra, o refino e a distribuição através de oleodutos são as que potencialmente podem vir a contaminar o solo.

A contaminação de solos por petróleo e seus derivados tem sido um dos principais problemas ambientais das últimas décadas, tendo em vista a complexidade desses compostos e a dificuldade de remediação dos mesmos (FRANCO *et al.*, 2004). Os métodos de tratamento mais utilizados na indústria de petróleo são normalmente divididos em três grandes categorias: métodos físicos, químicos e biológicos (KHAN *et al.,* 2004).

Os tratamentos físicos envolvem a separação das fases do solo e contaminante, como, por exemplo, na extração por solvente utilizada durante a lavagem de solos ou ainda na extração por vapor (SVE), utilizada na remediação de solos não saturados contaminados com compostos orgânicos voláteis e semivoláteis. Já os tratamentos químicos se baseiam nas diferenças das propriedades químicas dos diversos componentes dos contaminantes e envolvem, geralmente, uma ou mais das seguintes reações químicas: neutralização, fotólise e/ou oxi-redução. Como exemplo de processos químicos, o processo conhecido como estabilização refere-se à redução do risco de alastrar a contaminação pela conversão do resíduo em um contaminante menos solúvel, imóvel ou em uma forma menos tóxica. Já processos como vitrificação e incineração são processos térmicos, cuja forma de ação dependerá da composição do contaminante (MARIANO, 2005). Os tratamentos biológicos,

a serem estudados durante o desenvolvimento da presente dissertação, serão melhor abordados oportunamente.

A Tabela 1, a seguir, apresenta as principais operações e/ou processos físicos e químicos utilizados em todo mundo para tratamento de resíduos sólidos.

Tabela 1: Principais operações e/ou processos físicos e químicos utilizados para tratamento de resíduos sólidos.

Operação/Processo	**Objetivo**	**Tipos de Resíduos**
Encapsulamento	Estocagem	1, 2, 3, 4 e 5
Extração por Solvente	Separação	1, 2, 3, 4 e 5
Neutralização	Detoxificação	1, 2, 3 e 4
Oxidação (POAs)	Detoxificação	1, 2, 3 e 4
Vitrificação	Imobilização, Detoxificação	1, 2, 3, 4 e 5
Dessorção Térmica	Redução de volume, separação, detoxificação	1, 2, 3, 4 e 5
Incineração	Redução de volume, detoxificação	3, 5, 6, 7 e 8

Tipos de Resíduos: 1, químicos inorgânicos sem metais pesados; 2, químicos inorgânicos com metais pesados; 3, químicos orgânicos sem metais pesados; 4, químicos orgânicos com metais pesados; 5, radioativos; 6, biológico; 7, inflamáveis; 8, explosivos.
Fonte: Adaptada de CETESB *apud* MARIANO, 2005.

Dentre as técnicas citadas, a incineração é uma das alternativas mais empregadas para a destruição de resíduos sólidos de características orgânicas. É um método de tratamento que utiliza a decomposição térmica via oxidação, com o objetivo de tornar um resíduo menos volumoso, menos tóxico ou atóxico, ou ainda eliminá-lo, em alguns casos. O processo de incineração envolve 5 sistemas, os quais têm como função: preparar o resíduo para a queima, a combustão do resíduo, tratamento de gases de saída, tratamento de efluentes líquidos, acondicionamento e disposição dos resíduos sólidos gerados no processo de queima e nos equipamentos de controle de poluição do ar. Alguns resíduos contendo enxofre, flúor, cloro, bromo e iodo, produzem gases extremamente tóxicos para o meio ambiente durante a queima na incineração, exigindo tratamento das emissões gasosas geradas (lavadores Venturi, de atomização, de pratos, torres de enchimento, precipitadores eletrostáticos) o que encarece o processo (ROCCA, 1993).

3.2 A Biorremediação

O tratamento biológico, ao contrário dos processos físicos e químicos, é considerado um método seguro, eficiente e de menor custo a ser aplicado na remediação de solos contaminados por compostos orgânicos (TRINDADE, 2002; D'ANNIBALE *et al.*, 2006). Este tratamento é baseado na capacidade microbiana de degradar esses compostos, denominado biodegradação, que quando aplicado como uma tecnologia de remediação ambiental, é chamado de biorremediação (MARTINS *et al.,* 2003).

A biorremediação é uma tecnologia ecologicamente aceitável para a remediação de solos contaminados, a qual utiliza o estímulo da atividade microbiana para degradar compostos orgânicos, em especial hidrocarbonetos de petróleo, resultando na transformação em metabólitos ou mineralização dos contaminantes (MOLINA-BARAHONA *et al*., 2004; NAKAGAWA e ANDRÉA, 2006).

A biorremediação tem sido definida de muitas formas. A Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA) apresenta uma definição genérica sobre a prática da biorremediação: *Biorremediação é o processo de tratamento que utiliza a ocorrência natural de microrganismos para degradar substâncias toxicamente perigosas transformando-as em substâncias menos ou não tóxicas*. O Escritório de Estudos Geológicos do Departamento do Interior do Governo Americano (USGS), por sua vez, adota a definição do American Heritage Dictionary of the American Language que define biorremediação como: *O uso de agentes biológicos tais como bactérias e plantas, para remover ou neutralizar contaminantes, como poluentes do solo e da água* (CHAPELLE *apud* MARTINS *et al.,* 2003).

Resumindo, a biorremediação é a ciência que busca, através do estudo, controle e aplicação da propriedade biodegradativa dos microrganismos, a remediação ambiental.

O Brasil vem intensificando estudos na área de biorremediação de solos, objetivando reduzir alguns impactos ambientais resultantes de derramamentos acidentais de óleo. Não somente os solos têm recebido esse destaque, mas também a descoberta de que certas bactérias que vivem nos sedimentos marinhos, inclusive nas areias das praias, podem degradar os componentes do petróleo abriu a possibilidade de usar métodos biológicos no tratamento dos derrames também em ambientes marinhos (CRAPEZ *et al.*, 2002). Uma das maiores vantagens no estudo da biorremediação de ambientes contaminados por óleo cru é

seu custo-benefício, quando comparado a algumas técnicas físico-químicas que são caras e precisam ser rigorosamente controladas para atingir bons resultados.

No tratamento biológico de solos contaminados por petróleo, os microrganismos, sendo as bactérias as mais estudadas, utilizam os hidrocarbonetos, principais constituintes do contaminante, como fonte de carbono e energia alternativa para formação de biomassa. Esse conceito de que os microrganismos podem utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia é difundido há muito tempo. Em 1895, um estudo mostrou a degradação da parafina pelo fungo *Botrytis cinerea*. Desde então, o metabolismo de hidrocarbonetos tem sido extensivamente estudado (HIGGINS e BURNS *apud* MORAIS, 2005). Esse metabolismo envolve a transformação dos hidrocarbonetos em unidades menores e, posteriormente, a incorporação como material celular (biotransformação) ou conversão a gás carbônico (mineralização), resultando na redução da concentração de hidrocarbonetos de petróleo (SCHROEDER *et al.*, 2002). Dessa forma, a caracterização microbiológica que identifica a presença dos microrganismos potencialmente degradadores é uma etapa importante no processo de biorremediação, merecendo destaque mais a frente.

3.3 Tecnologias de Biorremediação

As tecnologias de biorremediação de solos podem ser aplicadas *in situ*, isto é, no próprio local onde ocorreu a contaminação (impacto), não havendo necessidade da remoção dos solos contaminados (ALEXANDER, 1999). Este processo pode ocorrer de forma engenheirada ou intrínseca, tendo esta última reduzida interferência da ciência já que a biorremediação se vale dos microrganismos existentes no local para a biodegradação (MARTINS *et al.,* 2003).

Como exemplo, a contaminação de solos por BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e os três isômeros do xileno), normalmente associados a vazamentos de produtos derivados de petróleo, atinge rapidamente águas subterrâneas devido a grande mobilidade desses compostos. Com isso, o processo tradicional de remoção de BTEX envolve o bombeamento das águas subterrâneas contaminadas para tratamento com carvão ativado e remoção de gases. No entanto, a atenuação natural vem recebendo atenção crescente pelo seu menor custo de aplicação e por ser ambientalmente mais segura devido ao menor

distúrbio da área contaminada, menor geração de resíduos e reduzida exposição humana ao meio contaminado (ALVAREZ, 2004).

Há casos em que a biorremediação é possível, porém é necessária uma série muito maior de providências do que o simples auxílio ao meio ambiente natural. Nesses casos, é comum a aplicação de técnicas de engenharia como construções de dutos para oxigenação, recolhimento/tratamento de gases, modificações topográficas do local, adição de microrganismos exógenos, implantação de biorreatores, aplicação de nutrientes, entre outras. As técnicas que exigem grandes quantidades de recursos tecnológicos são conhecidas como biorremediação engenheirada, podendo também ser realizada *in situ*, o que inicialmente é sempre recomendável por questões econômicas e de menor agressão ao meio ambiente (ALEXANDER, 1999; TRINDADE, 2002; MARTINS *et al.,* 2003).

Casos existem, entretanto, cuja remoção do material contaminado de sua origem para um local adequado, com um tratamento posterior, é exigida para evitar riscos de alastramento da área contaminada, como contaminação de cursos de água ou lençóis freáticos. Neste caso as tecnologias aplicadas são denominadas *ex situ* (ALEXANDER, 1999).

A Figura 1 apresenta um resumo das principais denominações que a biorremediação pode assumir segundo a localização onde ela é praticada e as ações aplicadas.

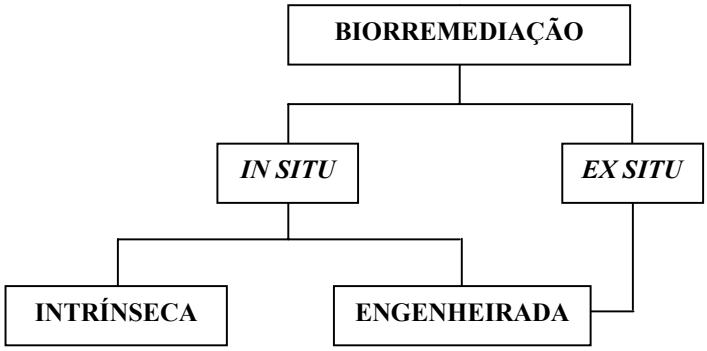


Figura 1 - Denominações usualmente empregadas para biorremediação.

O sucesso da biorremediação quer seja *in situ* ou *ex situ,* está diretamente ligado a uma compreensão abrangente das condições locais e a uma avaliação cuidadosa da aplicabilidade de uma determinada tecnologia (STIER, 2004). Na revisão realizada por Khan e colaboradores (2004), são apresentadas, de forma detalhada, as tecnologias

química, biológicas e físicas atualmente disponíveis no tratamento de solos e águas subterrâneas contaminados por petróleo e produtos relacionados. Para cada alternativa de remediação, foram avaliados e discutidos o processo, aplicabilidade, vantagens, limitações e preocupações, parâmetros específicos do local e custos. A seguir dar-se-á destaque às principais tecnologias de biorremediação *in situ* e *ex situ* aplicadas ao tratamento de solos contaminados por petróleo.

Atenuação Natural Monitorada

Atenuação natural, também conhecida como remediação passiva, biorremediação *in situ*, remediação intrínseca, bioatenuação, e biorremediação intrínseca, é um método de tratamento *in situ* que usa processos naturais biológicos, químicos e físicos. O processo ocorre sem intervenção humana de forma a conter a expansão da contaminação, reduzindo a massa, a toxicidade, o volume ou concentração dos contaminantes. Esta redução pode ocorrer pela biodegradação do contaminante, sua diluição simples, dispersão, volatilização ou ainda pela adsorção, isto é, ligação desses compostos a partículas do solo para prevenir a migração do contaminante (KHAN *et al.,* 2004).

Dentre as principais vantagens do processo de atenuação natural o custo-benefício é o de maior destaque, tendo em vista que está relacionado somente aos custos de avaliação local e monitoramento. O êxito da atenuação natural como opção de remediação depende da caracterização adequada da área, um plano de monitoramento em longo prazo, avaliação e controle da fonte, além da determinação de um prazo razoável para alcançar os objetivos da remediação (JOHNSTON e DAVIS, 1997; ALVAREZ, 2004). A aplicação da atenuação natural como uma tecnologia de remediação não é indicada para um elevado grau de contaminação e de comprometimento do local contaminado, tendo em vista que por ser um processo mais lento, pode apresentar riscos à população.

Biosparging

O *biosparging* é um processo semelhante ao *air sparging,* o qual envolve a injeção de ar atmosférico, sob pressão, transferindo os contaminantes da zona saturada para a zona insaturada (superfície), onde o aumento das concentrações de oxigênio promove a

degradação aeróbia dos compostos orgânicos. Esse fluxo de ar não deve ser excessivo a ponto de transferir os compostos voláteis para a atmosfera (KHAN *et al.,* 2004). Porém, no *biosparging*, além da injeção de ar na zona saturada do solo (lençol freático), nutrientes podem ser injetados no solo com o objetivo de aumentar a degradação de contaminantes pelos microrganismos autóctonos.

As condições geológicas do local contaminado são fatores limitantes à aplicação tanto do *biosparging,* quanto do *air sparging*, como, por exemplo, solos com baixa permeabilidade reduzem a efetividade do sistema. O custo do tratamento de solos ou águas subterrâneas contaminados por petróleo utilizando *air sparging* varia entre US$20 e US$50 por m^3 de solo (USEPA, 2004) e o custo de *biosparging* é considerado competitivo com este (TRINDADE, 2002; KHAN *et al.,* 2004).

Bioventing

O processo de *bioventing* consiste na injeção de ar no solo contaminado para maximizar a biodegradação *in situ* e minimizar, ou eliminar, a volatilização dos contaminantes para a atmosfera. Diferentemente do *biosparging*, que envolve a insuflação de ar e o bombeando de nutrientes na zona saturada, o *bioventing* insufla ar na zona não saturada ou vadoza (TRINDADE, 2002). O *bioventing*, quando comparado ao *biosparging*, também favorece a degradação de contaminantes orgânicos menos voláteis e, como requer um volume menor de ar, permite o tratamento de solos menos permeáveis. Sua atratividade é representada pela pouca quantidade de equipamentos necessários, pelo tempo de tratamento requerido de 6 meses a 2 anos e pelo custo na faixa de US$30 a US$90 por tonelada de solo contaminado (USEPA, 2004).

Bioslurping

Bioslurping é uma nova tecnologia de remediação *in situ* que associa elementos de *bioventing* e bombeamento para recuperar contaminantes livres de águas e solos subterrâneos promovendo a biorremediação aeróbia de hidrocarbonetos. O sistema de *bioslurping* consiste na instalação de um tubo de sorção, conectado a uma bomba de vácuo, o qual remove o produto livre (vapor) junto com um pouco da água subterrânea. Os

líquidos (produto e solução de água subterrânea) são enviados a um separador óleo/água, e os vapores para um separador de líquido/vapor. Além disso, a extração de vapores pelo tubo promove a aeração da zona insaturada, aumentando o conteúdo de oxigênio e a taxa de degradação aeróbia. Assim como o *bioventing,* esse processo é ineficaz em solos com baixa permeabilidade (KHAN *et al.,* 2004). Como a quantidade de águas subterrâneas extraídas é menor, o custo do *bioslurping* é menor quando comparado ao processo de bombeamento e tratamento (US$200 mil para implantação), não citado neste trabalho por ser exclusivo para o tratamento de águas subterrâneas.

Fitorremediação

A fitorremediação é um processo baseado na habilidade de plantas absorver, acumular e/ou degradar compostos que estão presentes nos solos e em ambientes aquáticos. Há cinco processos básicos que podem ocorrer durante a fitorremediação: a rizofiltração, na qual a remediação de águas ocorre pelo transporte dos contaminantes pelas raízes das plantas; fitoextração que envolve a captação do contaminante do solo; fitotransformação que é aplicável para solos e água e envolve a degradação do contaminante pelo metabolismo da planta; fitoestimulação ou biorremediação auxiliada pela planta que envolve o estimulo da degradação microbiana pelos microrganismos localizados na rizosfera; e fitoestabilização que utiliza plantas para reduzir a migração dos contaminantes no solo (TRINDADE, 2002; KHAN *et al.,* 2004).

O custo da remediação de um acre (40470 m^2) de solo contaminado para uma profundidade de 50 cm é estimado ser de US$60 a US$100 mil. Em comparação, a escavação e a destinação em aterros do mesmo volume de solo custaria de US$400 mil a US$1,7 milhões.

Landfarming

Landfarming é uma tecnologia de remediação *ex situ* que reduz a concentração de componentes de petróleo presentes em solos através de processos associados à biorremediação. Esta tecnologia envolve a distribuição do solo contaminado escavado em uma pequena camada (não mais que 1,5 m) na superfície do solo de um local em

tratamento. O revolvimento periódico do solo aumenta o contato entre os microrganismos e os compostos orgânicos e fornece o oxigênio necessário para a degradação biológica aeróbica. Dependendo da taxa de degradação, o solo contaminado por petróleo pode ser aplicado no local a intervalos regulares, dispondo os hidrocarbonetos e mantendo a atividade biológica (KHAN *et al.,* 2004).

Esta tecnologia de biorremediação tem sido praticada a mais de 100 anos, e a cerca de 25 anos mais intensivamente pela indústria de petróleo. Para melhorar a tendência natural dos microrganismos do solo na decomposição de hidrocarbonetos de petróleo, muitas técnicas auxiliares ao *landfarming* têm sido propostas e testadas: fertilização mineral, aditivos orgânicos, sistemas de aragem etc. (FRANCO *et al.*, 2004).

Os hidrocarbonetos de petróleo mais leves, inclusive os componentes de gasolina, tendem a serem removidos por evaporação durante o processo de aeração, e em menor extensão, degradados através da respiração microbiana. Já o inverso ocorre para os hidrocarbonetos de petróleo mais pesados. Eles não evaporam durante a aeração, mas podem ser degradados pelos microrganismos presentes no solo. Em alguns casos, se a presença de contaminantes voláteis for significativa, torna-se necessária à implantação de um sistema de pré-tratamento dos gases emanados a fim de evitar uma possível poluição do ar (FRANCO *et al.*, 2004).

A disponibilidade de oxigênio ao longo da zona de incorporação de um *landfarming* influencia a taxa de biodegradação dos produtos de petróleo, tendo em vista que o processo microbiano atuante é essencialmente aeróbico. A concentração ótima de oxigênio pode ser alcançada pelo revolvimento periódico dessa zona de incorporação, evitando solos saturados.

Por requerer um grande espaço para sua implementação, o *landfarming* pode não ser a melhor forma de tratamento, apesar da sua relação custo-benefício relativamente favorável quando comparada a outras tecnologias de remediação. O custo de um *landfarming* para a remediação de solos contaminados por petróleo varia normalmente de US$30 a US$60 por tonelada de solo tratado, e pode levar de 6 meses a 2 anos (mais longo para compostos mais pesados de petróleo) (USEPA, 2004).

Compostagem

Na compostagem, o resíduo orgânico é metabolizado e transformado em húmus e subprodutos inertes, tais como dióxido de carbono, água e sais minerais, tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas. É uma forma de estabilização de resíduos (estercos de animais e resíduos urbanos orgânicos) há muito tempo utilizada para reduzir o impacto da geração desses, possibilitando a reutilização da matéria orgânica como adubo, por exemplo.

O processo de compostagem inclui duas fases principais. Na primeira fase, chamada de "fase ativa", ocorrem, principalmente, as reações de degradação: a matéria orgânica dissolvida é usada como fonte de carbono e energia pelos microorganismos para o seu metabolismo. Durante a segunda fase, chamada "fase de cura" macromoléculas orgânicas, como substâncias húmicas, são sintetizadas (TREMIER *et al.,* 2005).

Nos últimos anos, a compostagem também tem sido empregada no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, HPA, pesticidas e explosivos, com bons resultados (BAHERI e MEYSAMI, 2002; USEPA, 2004). Segundo Seabra (2005), muitas publicações utilizam os termos biopilhas e compostagem quase como sinônimos. No entanto, esta última caracteriza-se pelo elevado teor de matéria orgânica a ser estabilizado, gerando temperaturas elevadas (na faixa termofílica), o que não ocorre normalmente com os solos contaminados.

Biorreatores

Os tipos de biorreatores mais comuns para o tratamento de solos contaminados são os reatores de lama ou "bioslurry". Este tratamento biológico *ex situ* requer a remoção do solo contaminado, o qual é misturado, em seguida, a uma fase aquosa (teor de sólidos de 10 a 40% p/p) que pode conter microrganismos, nutrientes, entre outros aditivos (KHAN *et al.,* 2004). Uma outra opção em termos de configuração de biorreatores é o reator de fase sólida, onde se trabalha com teores reduzidos de umidade no solo (10 – 20%).

Dentre as tecnologias *ex situ*, a utilização de biorreatores vem apresentando vantagens tais como: monitoramento efetivo do processo, maior controle das variáveis (valor de pH, temperatura, umidade etc.) e melhor incorporação de aditivos. Além disso, os

biorreatores são sistemas fechados que permitem o controle de emissões e possibilita, na maioria dos casos, a redução do tempo de processo (RAIMUNDO e RIZZO, 2002).

A necessidade de remover o solo para o tratamento por tecnologias *ex situ*, encarece muito o processo. No entanto, nos reatores o maior custo é compensado pelo menor tempo de tratamento requerido, de um mês a vários meses. O custo varia na faixa de US$130 a US$200 por metro cúbico. Quando tratamento de gás é requerido, por causa da presença de compostos voláteis, o custo aumenta. Além disso, o desenvolvimento e instalação de equipamentos também elevam o custo, chegando a US$2 milhões (KHAN *et al.,*2004).

Biopilhas

O sistema de biopilhas ou biocélulas é uma tecnologia *ex situ* de biorremediação, que envolve o empilhamento de solos contaminados. O objetivo do processo é simular a atividade microbiana aeróbia acelerando a degradação do poluente pela aeração, adição de nutrientes e correção de umidade (KHAN *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2004; MORAIS, 2005).

A área de disposição das pilhas é freqüentemente coberta com uma manta impermeável para reduzir a lixiviação do poluente para o solo não contaminado. A aeração dessas pilhas pode ser realizada de duas formas: mecanicamente ou por um sistema subterrâneo de passagem de ar (dutos). Além disso, freqüentemente, as biopilhas são cobertas para prevenir a perda por evaporação e volatilização bem como para manter a temperatura (KHAN *et al.*, 2004).

Segundo Jorgensen *et al.* (2000), as biopilhas têm muito sucesso na remediação de locais contaminados por compostos orgânicos, em especial, na degradação de hidrocarbonetos de petróleo. Porém, quando estes compostos são voláteis ou semivoláteis tendem a evaporar ao invés de biodegradar e, algumas vezes, esse vapor gerado pode requerer tratamento antes de ser descarregado (KHAN *et al.*, 2004).

O custo do tratamento por biopilhas é dependente do contaminante, do procedimento usado, do pré- ou pós-tratamento, ou da necessidade de equipamentos para controle de emissão. Esse custo pode variar de US$130 a US$260 por jarda cúbica (0,764 m^3).

3.4 Como decidir a melhor tecnologia de remediação a ser aplicada?

Constatada a ocorrência de uma contaminação, faz-se necessária uma etapa inicial de investigação quanto às formas de remediação possíveis. Dando ênfase à viabilidade ou não de aplicação da biorremediação, Martins *et al.* (2003) destacam que a investigação inicial não se restringe à identificação dos contaminantes e à determinação do nível de biodegradação desses, ela deve, ainda, compreender:

- Características ambientais do local contaminado: condições de manipulação *in situ* dos microrganismos, acessibilidade do local, possibilidade de isolamento e contenção da contaminação;
- Avaliação do ecossistema microbiano como um todo, determinando os microrganismos passíveis de serem utilizados na biorremediação;
- Tempo requerido para biorremediação, no caso específico de uma aplicação *in situ*, considerando se o seu tempo de resposta é desejável em vista da potencialidade de alastramento do agente contaminante.

Assim, estabelecida a biorremediação como forma adequada à reparação de determinado impacto ambiental, o próximo passo é determinar a melhor tecnologia a ser adotada. A seleção da tecnologia envolve estudos geológicos do local contaminado, e das características físico-químicas e composição dos contaminantes (ALVAREZ, 2004). Apesar de concordar, Martins *et al.* (2003) acreditam que esse estudo deve partir primeiramente de um detalhamento aprofundado dos dados obtidos na investigação inicial, citados anteriormente.

No caso da seleção de uma tecnologia de biorremediação intrínseca é importante determinar, principalmente, os tipos e freqüência de monitoramentos a serem realizados, mas também a possibilidade de utilização de técnicas auxiliares a essas tecnologias. Segundo Liebeg e Curtright *apud* Trindade (2002) existem três técnicas auxiliares a biorremediação, as quais podem ser aplicadas em todas as tecnologias: bioaumento, bioestímulo e a combinação de ambas. Porém, segundo a USEPA (2004), a técnica de bioaumento já consideraria a incorporação de nutrientes, essenciais para a manutenção dos microrganismos adicionados ao solo.

No caso da seleção de uma tecnologia de biorremediação engenheirada, seja ela *in situ* ou *ex situ*, todos esses fatores devem também ser considerados, porém, talvez mais do que na intrínseca, seja exigido um monitoramento rígido, visto que seus efeitos devem ser estritamente limitados a remoção dos contaminantes, evitando-se ações e efeitos indesejáveis ao meio ambiente.

3.4.1 Técnicas auxiliares às tecnologias de biorremediação

O bioaumento consiste na adição de microrganismos para a aumentar a atividade biológica específica, buscando aumentar a taxa de remediação do solo. Essa técnica não é aceita como muito eficiente em casos de adição de microrganismos exógenos (bioenrriquecimento). Isto porque as vantagens de aumentar a atividade biocatalítica utilizando microrganismos exógenos nem sempre compensam as vantagens de promover um aumento da atividade dos microrganismos autóctonos. Essa re-inoculação do solo com microrganismos autóctonos diretamente isolados do mesmo solo é incluída freqüentemente no termo bioaumento (VOGEL, 1996).

Já o bioestímulo consiste no aumento da atividade da população microbiana autóctona pela adição de nutrientes e/ou aceptores finais de elétrons, tais como o oxigênio (processo aeróbio) ou nitrato (TRINDADE, 2002; OLANIRAN *et al.,* 2006). A manutenção da concentração ótima de oxigênio é importante, tendo em vista que a recuperação de solos contaminados por petróleo é principalmente baseada em processos aeróbicos, cujas etapas iniciais de degradação dos hidrocarbonetos envolvem a oxidação de substratos pelas enzimas oxigenases (BOOPATHY, 2003).

O bioaumento apresenta certas vantagens, quando comparado ao bioestímulo, como em casos onde a toxicidade do poluente ou a ausência de microorganismos degradadores demonstram afetar o processo de biodegradação. Porém, o sucesso potencial da técnica de bioaumento requer uma compreensão da biodisponibilidade do poluente, da sobrevivência e atividade dos microrganismos adicionados e das condições ambientais gerais que controlam a taxa de biorremediação no solo.

D'Annibale *et al.* (2006) estudaram o bioaumento como uma alternativa para o bioestímulo dos microrganismos autóctonos, considerando que essa técnica pode favorecer

a degradação de contaminantes orgânicos no tratamento de locais muito contaminados ou contaminados por um longo tempo. O bioaumento consistiu no isolamento de fungos autóctonos de um local contaminado seguido pela sua inoculação. Esta técnica mostrou-se positiva devido à boa tolerância dos microrganismos a altas concentrações de contaminantes tóxicos e pela capacidade destes competirem com os microrganismos autóctonos. Porém, os autores identificaram melhores resultados quando foi adicionado um suplemento nutricional externo (bioestímulo), que segundo eles foi devido a menor capacidade dos fungos, quando comparados às bactérias, de utilizar poluentes orgânicos, como fonte primária de carbono.

3.4.2 Monitoramento do processo de biorremediação

O monitoramento do processo de biodegradação de petróleo é normalmente baseado na quantificação de hidrocarbonetos nas amostras de solo, o qual é considerado um método direto de acompanhamento da degradação desse cotaminante. Essas metodologias de quantificação podem variar desde formas mais simples, como o método de óleos e graxas baseado em um procedimento gravimétrico (NASCIMENTO *et al.,* 2003), até formas mais complexas utilizando a cromatografia gasosa: determinação de hidrocarbonetos totais de petróleo, de hidrocarbonetos poliaromáticos, das frações de saturados, aromáticos, resina e asfaltenos (SARA) ou ainda a determinação por faixas distribuídas de acordo com o tamanho das moléculas.

Para Fiúza e Vila (2005), a análise química periódica da concentração de contaminantes no solo deve ser relacionada à determinação de parâmetros biológicos, métodos indiretos de monitoramento, como concentrações de oxigênio e gás carbônico na atmosfera do solo em tratamento e quantificação da biomassa. Concordando com esses autores, e indo mais além, Margesin *et al*. *apud* Morais (2005) também destaca como parâmetro biológico para monitorar a evolução da biorremediação, a respiração dos microrganismos no solo pelo consumo de O_2 ou produção de CO_2 (testes de respirometria), mas acrescenta a quantificação da atividade enzimática e a contagem de microrganismos heterotróficos totais e degradadores do contaminante. Os estudos prévios também são, muitas vezes, realizados por testes respirométricos.

Segundo Morais (2005), estudos envolvendo a medida da taxa de mineralização através da produção de CO_2 podem fornecer importantes informações sobre a biodegradabilidade de hidrocarbonetos em solos contaminados. Esta metodologia tem sido eficiente para o aperfeiçoamento das técnicas de biorremediação a serem adotadas, pois fornecem resultados rápidos, podendo ser testadas diversas opções como, por exemplo, a adição de nutrientes, de microrganismos, de materiais estruturantes, de biosurfatantes, de co-substratos, entre outros.

A produção de CO_2 foi citada por Ortiz *et al.* (2006) como um dos métodos mais simples para avaliar a atividade global da comunidade microbiana do solo, visto que a produção de CO_2 reflete a respiração endógena microbiana e esta quantidade pode ser relacionada diretamente à presença de biomassa ativa nas amostras de solo.

No entanto, a análise da evolução da biodegradação de hidrocarbonetos, principalmente em processos *in situ*, é mais difícil quando comparada aos estudos realizados em laboratórios. A determinação da concentração residual de hidrocarbonetos pode ser complexa uma vez que sua distribuição no ambiente é tipicamente heterogênea, requerendo um alto número de amostras para a obtenção de resultados representativos (MORAIS, 2005). Então, a maior necessidade de acompanhamento dos processos engenheirados vem ao encontro da melhor forma de monitoramento nos tratamentos *ex situ*, sendo estes então preferencialmente designados para a remediação de compostos orgânicos com elevada toxicidade e que apresentam risco a saúde humana.

3.5 Fatores que Interferem no Processo de Biorremediação – Da melhor tecnologia aos melhores resultados de remoção de contaminantes

Há diversos fatores que influenciam o processo de biorremediação e devem ser monitorados, tanto na etapa de investigação inicial auxiliando na escolha da melhor tecnologia a ser aplicada, quanto no monitoramento ao longo do tempo de processo. Estes incluem a temperatura, o tipo de solo, tipo de contaminante e sua concentração, disponibilidade de nutrientes e de oxigênio e a concentração de microrganismos no local impactado (SCHROEDER *et al*., 2002; MOLINA-BARAHONA *et al.*, 2004; CHAÎNEAU *et al*., 2005). Desta forma, há uma necessidade de ajustar algumas condições ambientais como melhorar a aeração do solo, monitorar e corrigir umidade e pH, a fim de estimular a

atividade de microrganismos autóctonos e, com isso, obter melhores remoções do contaminante (SCHROEDER *et al*., 2002; BAPTISTA *et al.,* 2005; CHAÎNEAU *et al*., 2005).

Como exemplo da importância da etapa de investigação inicial, no caso de uma contaminação na Alemanha por tetracloroetileno, em 1992, a escolha pela Extração de Vapores do Solo (SVE), uma tecnologia *in situ,* não alcançou sucesso reduzindo somente 55 Kg do contaminante em 6 anos. O erro poderia ter sido evitado, visto que na etapa de caracterização do solo contaminado, foi identificado que o mesmo era denso demais para permitir uma ventilação eficiente. Em 1999, foi adotada a fitorremediação como alternativa mais viável. Foram plantados 130 pés de álamo (*Populus robusta canadensis* híbrida) na pilha (STIER, 2004).

A seguir serão apresentados e discutidos alguns dos fatores limitantes na biorremediação, os quais devem fazer parte do protocolo inicial de investigação do potencial de aplicação do processo biológico, da etapa seguinte de escolha da melhor tecnologia a ser aplicada, assim como do monitoramento efetivo do processo.

3.5.1 Características do Solo

O solo atua como um filtro, sendo capaz de, muitas vezes, reter as impurezas que nele são introduzidas. Porém, o solo possui também uma capacidade de resiliência, isto é, a capacidade de voltar a um equilíbrio dinâmico após perturbação, assim como a capacidade intrínseca de recuperar-se de uma contaminação (FRANCO *et al.*, 2004). Conhecer a capacidade do ecossistema de um solo para degradar um dado poluente, bem como sua formação, características estruturais, textura, as quais interferem diretamente neste processo, torna-se tarefa fundamental para recuperar esse recurso natural, numa época em que tanto se fala da escassez do mesmo.

Dentre as inúmeras importâncias do solo, o crescimento e o desenvolvimento de plantas é um dos mais importantes. Estas, além de consumirem água, oxigênio e gás carbônico, retiram do solo quinze elementos essenciais. Desses, seis são absorvidos em quantidades relativamente grandes, designados macronutrientes, compreendendo: nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre. Os outros nove igualmente essenciais, mas usados em quantidades muito pequenas, são denominados micronutrientes:

boro, cloro, cobre, ferro, manganês, molibdênio, níquel, cobalto e zinco (LUCHESE *et al.*, 2001).

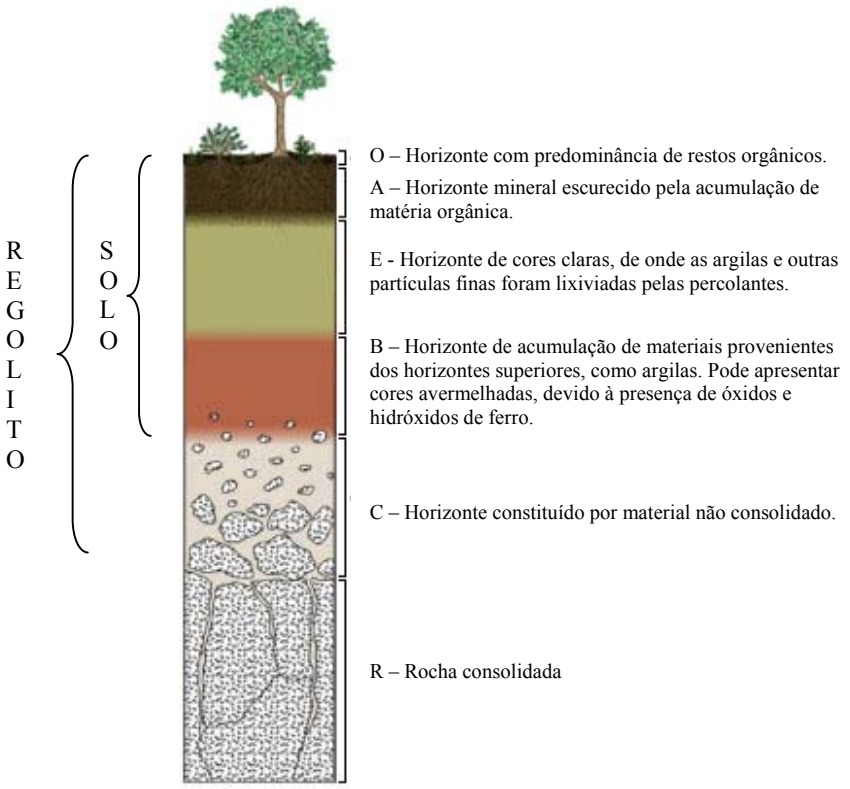
A definição de solo varia muito de acordo com a área específica de estudo. No entanto, para os pedólogos, o solo é algo dinâmico, ou seja, é uma coleção de corpos naturais dinâmicos que contêm matéria viva.

A formação do solo é iniciada a partir de rochas da litosfera que, quando expostas à atmosfera, sofrem a ação direta do calor do sol, da umidade das chuvas, e do crescimento de organismos, dando início a processos dos quais decorrem inúmeras modificações no aspecto físico e na composição química dos minerais. A esses processos dá-se o nome de intemperismo (físico ou químico) ou meteorização, fenômeno responsável pela formação do material semiconsolidado que dará origem ao solo. A rocha, depois de alterada, recebe o nome de regolito ou manto de intemperização, porque forma uma camada que recobre as que estão em vias de decomposição. É na parte mais superficial do regolito que se dá a formação do solo (LUCHESE *et al.*, 2001; LEPSCH, 2002).

Com o intemperismo, uma rocha pode transformar-se em um material solto, possibilitando a vida de plantas e pequenos animais. A decomposição dos restos das plantas e das folhas que caem, formam o húmus. Ao mesmo tempo, alguns dos minerais menos resistentes ao intemperismo, vão se transformando em argilas. As águas que se infiltram no terreno podem as deslocar de uma parte mais superficial para outra um pouco mais profunda.

Assim, pouco a pouco, sob a ação de um conjunto de fenômenos biológicos, físicos e químicos, o solo começa a formar-se, organizando-se em uma série de camadas sobrepostas de aspecto e constituição diferentes. Essas camadas são aproximadamente paralelas à superfície, e denominadas horizontes.

O conjunto de horizontes, num corte vertical que vai da superfície até o material semelhante ao que deu origem ao solo é o perfil do solo. As transformações e remoções, ocasionadas pelo intemperismo, ocorrem com maior intensidade na parte superior deste perfil. O perfil de um solo completo e bem desenvolvido possui basicamente quatro tipos de horizontes, que costumavam ser chamados de “horizontes principais” (Figura 2) e são convencionalmente identificados pelas letras maiúsculas O, A, E, B, C e R (NRCS *Soils*).



Fonte: Glossário Ilustrado de Termos Geológicos

Figura 2: Esquema de um perfil de solo mostrando os principais horizontes.

O termo solo, muitas vezes, é designado somente para a camada mais superficial de 20-30 cm de espessura, correspondendo à parte do horizonte A. Nesse caso mais restrito, os horizontes B e C são conhecidos como subsolo.

O solo é um sistema coloidal muito complexo, composto por três fases: sólida, líquida e gasosa. Em condições ideais um solo apresenta 50% dos componentes na fase sólida, que pode ser mineral ou orgânica, 15 a 35% na fase líquida, 15 a 35% na fase gasosa. As variações da porcentagem dos dois últimos componentes se devem à quantidade de água presente (LUCHESE *et al.*, 2001; LEPSCH, 2002; ITAMURA, 2004; TREMIER *et al.*, 2005).O ar situa-se nos poros do solo tanto entre os agregados (macroporos) como entre partículas de argila e silte (microporos). A proporção de água e ar nos poros do solo não é fixa, existindo uma relação dinâmica entre as fases liquida e gasosa. Assim, à medida

que o volume de água aumenta, o volume de ar decresce, variando com a capacidade de retenção de água deste solo, com os períodos de chuva, dentre outros.

A estrutura do solo refere-se ao tamanho, forma e aspecto do conjunto dos agregados (partículas de areia, silte e argila aglomeradas) que aparecem naturalmente no solo. A formação destes agregados é ocasionada principalmente pela aderência entre as partículas devido à presença de húmus e substâncias minerais, como os óxidos de ferro e a própria argila. As partículas do solo são classificadas em frações obedecendo aos limites descritos na Tabela 2, a seguir.

Tabela 2: Classificação das frações do solo de acordo com o diâmetro das partículas.

Fração	**Diâmetro médio (mm)**
Calhaus	200 a 20
Cascalho	de 20 a 2
Areia	de 2 a 0,05
Silte	0,05 a 0,002
Argila	menor que 0,002

Já textura do solo refere-se à proporção relativa das frações areia, silte e argila, visto que um horizonte é constituído por uma combinação dessas três frações granulométricas. A determinação da classe de textura é identificada graficamente pelos diagramas triangulares (Figura 3).

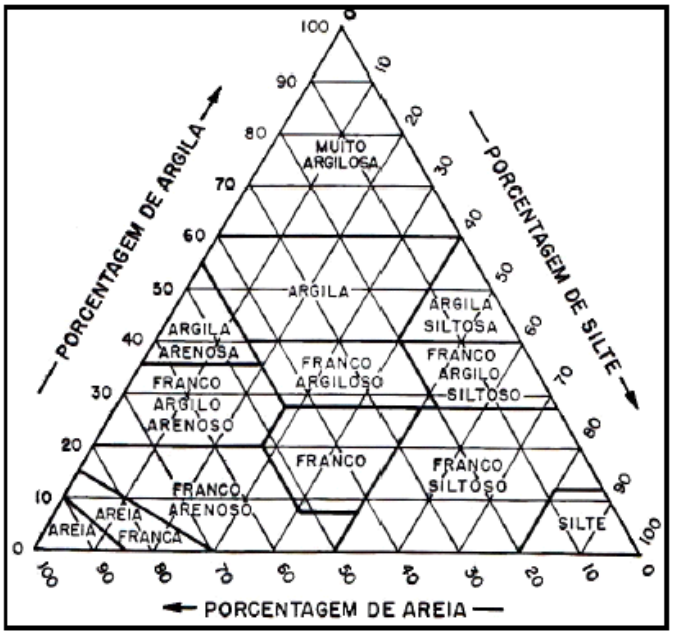


Figura 3: Diagrama Triangular adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência do Solo para classificação das classes texturais do solo (EMBRAPA, 1999).

Determinar a estrutura do solo é imprescindível, visto que um grande número de propriedades físicas e processos químicos e biológicos são afetados pelo tipo, tamanho e grau de desenvolvimento dos agregados do solo, principalmente a maior ou menor permeabilidade da água. Segundo Itamura (2004), embora a capacidade de retenção de água e nutrientes esteja relacionada com outras características tais como o conteúdo de matéria orgânica, tipo de argila e de cátions, possui boa relação com os conteúdos de argila, aumentando em geral proporcionalmente com o seu conteúdo. Por esse motivo, os solo argilosos são menos permeáveis e mais difíceis de serem trabalhados no cultivo das lavouras (LEPSCH, 2002).

Diversos trabalhos têm apresentado as interferências das características do solo no processo de biorremediação de solos contaminados por petróleo.

No trabalho desenvolvido por Trindade (2002), foi observada uma grande dificuldade na recuperação de solos impactados por petróleo e/ou seus derivados quando estes apresentam características argilosas, o que é bastante comum no Brasil. A matriz desse tipo de solo apresenta fortes interações com o contaminante, além de baixa permeabilidade que dificulta a penetração de nutrientes e oxigênio, indispensáveis à

biodegradação. Solos argilosos apresentam ainda uma alta retenção de água, fator esse também prejudicial na aplicação de algumas tecnologias de remediação.

Ocorrendo uma contaminação (perturbação), a microbiota é afetada imediatamente podendo servir como uma advertência da deterioração da qualidade do solo. Parâmetros como pH, matéria orgânica, teor de argila e manejo de colheita, podem afetar a atividade microbiana no solo. Assim, estudar tais parâmetros pode ser útil na avaliação da resiliência microbiológica de diferentes solos e a sua capacidade potencial em relação não só a degradação, mas também a volatilização e adsorção de hidrocarbonetos na matriz organo-mineral (FRANCO *et al.*, 2004).

No caso de uma contaminação por óleo cru, as propriedades do solo também influenciam na quantidade do contaminante que é perdida por volatilização. Os solos com teor de matéria orgânica mais alto, por exemplo, absorvem mais fortemente os componentes de óleo cru, diminuindo a sua volatilidade. Segundo Franco *et al.* (2004), em solo com alto teor de matéria orgânica (aproximadamente 6%), ocorreu a volatilização de somente 12% do óleo presente no solo, enquanto houve a volatilização de 22 a 26% de óleo em solos apresentando matéria orgânica na faixa de 1,68 a 3,02%.

Um outro exemplo de como as alterações das características de solos contaminados interferem na degradação de contaminantes foi o trabalho desenvolvido por Nakagawa e Andréa (2006). Alterações no solo foram efetuadas pela adição de fontes de matéria orgânica, adição de cal ou alagamento das amostras, em laboratório, buscando observar os efeitos sobre a comunidade microbiana e sobre a degradação do composto hexaclorobenzeno. A atividade microbiana foi maior nas amostras com adição de bagaço de cana-de-açúcar, assim como a densidade de bactérias e de fungos.

Schroeder *et al.* (2002) também verificaram no seu trabalho a influência do tipo de solo na degradação de petróleo, destacando as condições ambientais, textura e teor de matéria orgânica. De forma interessante, eles observaram também que a eficiência de degradação varia de acordo com a utilização prévia do solo. Por exemplo, um solo com intenso uso agrícola mostrou reduzida taxa de respiração comparada ao mesmo solo quando utilizado para pasto, provavelmente devido à degradação do solo pelo intenso uso e administração inadequada ou imprópria, o que reduz os nutrientes no meio. Além disso, uma relação entre a taxa de respiração e a concentração de carbono orgânico pôde ser

observada, mostrando uma tendência geral de aumento da taxa de respiração com o aumento das concentrações de carbono orgânico até um certo limite. Amostras argilosas são exceções a esta tendência, têm menores taxas de respiração, provavelmente devido à aeração reduzida nessas amostras.

3.5.2 Características do Contaminante - Petróleo

O petróleo é formado por processos biogeoquímicos e, por isso, é uma mistura complexa de hidrocarbonetos cuja composição varia em função de sua localização geográfica e das condições físico-químicas e biológicas que o originaram. Cerca de 60% a 90% são hidrocarbonetos alifáticos, passíveis de biodegradação. Nessa classe, o fitano e o pristano são mais resistentes à degradação e podem ser usados como marcadores químicos durante o monitoramento de ambientes expostos a contaminação por petróleo. Entretanto, o restante, bruto ou refinado, é recalcitrante, isto é, demora a desaparecer por meios naturais. O destino dessas substâncias recalcitrantes, após um derrame, dependerá da interação de vários fatores levando a diferentes processos de remoção (CRAPEZ *et al.,* 2002).

Segundo Morais (2005), os processos de remoção de produtos derivados do petróleo do ambiente diferem de acordo com a composição e estrutura química destes. Os compostos altamente voláteis podem sofrer evaporação, os compostos solúveis na água podem ser dispersos e penetrar no solo, e ainda pode ocorrer a oxidação química, a foto-oxidação e a biodegradação.

A biodegradação é a capacidade microbiana de degradar compostos orgânicos, como o petróleo e seus derivados (MARTINS, 2003). Diversas espécies de bactérias (denominadas hidrocarbonoclásticas) e fungos, os quais fazem parte da microbiota presente em solos, águas e sedimentos, têm habilidade para degradar os componentes de petróleo. Essa habilidade é evidenciada quando diferentes ambientes são contaminados por petróleo, após uma etapa de adaptação ou aclimatação dos microrganismos. Estes, por sua vez, passam a assimilar os componentes do óleo como fonte de carbono, iniciando o processo de degradação. Na grande maioria dos casos, uma alta concentração de bactérias hidrocarbonoclásticas pode servir como um indicador de ambiente impactado cronicamente

por petróleo, tendo em vista que sucessivos derrames no mesmo ambiente aceleram o crescimento dessa biomassa (CRAPEZ *et al.,* 2002).

De acordo com Khan *et al.* (2004) as classes de compostos orgânicos mais suscetíveis a biodegradação são os hidrocarbonetos de petróleo (por exemplo, aqueles contidos na gasolina e no óleo diesel combustível), solventes não-clorados, algumas combinações aromáticas cloradas, e alguns compostos alifáticos clorados. Dentro da classe de hidrocarbonetos, a biodegradação dos alcanos ocorre na seguinte ordem: linear>ramificado>cíclico>aromático; indicando uma ordem preferencial de assimilação das fontes de carbono (CHAÎNEAU *et al*., 2005). Essa preferência microbiana indica que os microrganismos degradam primeiramente contaminantes que são assimilados mais facilmente ou fornecem mais energia (MARTINS *et al.,* 2003). Embora quase todos os compostos de petróleo sejam produtos tipicamente biodegradáveis, os compostos com estrutura molecular mais complexa são mais dificilmente removidos pelo tratamento biológico. Além disso, geralmente, compostos de baixo peso molecular (nove ou menos átomos de carbono) alifáticos e monoaromáticos são mais facilmente biodegradados que os compostos orgânicos alifáticos de alto peso molecular ou poliaromáticos, com exceção dos compostos com caráter solvente, os quais podem ser tóxicos aos microrganismos (USEPA, 2004). Na Tabela 3 é listada a ordem de taxa decrescente do potencial de biodegradabilidade de alguns constituintes comuns de petróleo.

Os componentes do petróleo de alto peso molecular, como os encontrados em óleos de aquecimento e lubrificantes, exigem períodos de tempo mais longos para serem degradados. Porém, a adição de um segundo substrato orgânico (co-substrato) pode alterar substancialmente a taxa de degradação destes compostos orgânicos mais pesados (recalcitrantes). Ortiz *et al.* (2006) estudaram o efeito do tolueno como co-substrato na degradação de hidrocarbonetos de petróleo, sendo observada uma remoção 29% maior no solo com adição de tolueno do que na sua ausência.

Em alguns casos, pode ser observada também a degradação parcial desses contaminantes formando sub-produtos, os quais podem apresentar um nível de toxicidade mais alto que o contaminante (MARTINS *et al.*, 2003). No estudo da degradação de bifenilas policloradas, por exemplo, foi observada a degradação do composto de partida, praticamente completa, num período de 80 dias. Porém, vários produtos intermediários

mostraram ser altamente recalcitrantes, não sendo degradados nem por tratamentos em tempo superior a 120 dias (VAN DORT *apud* BRITO *et al.*, 2004). Testes de toxicidade das amostras de solo durante o processo de biorremediação, normalmente, auxiliam na verificação do impacto destes sub-produtos nos microrganismos presentes no local contaminado.

Tabela 3: Estrutura Química e Biodegradabilidade.

Biodegradabilidade	**Exemplo de constituintes**	**Derivados nos quais os constituintes são normalmente encontrados**
Mais Biodegradável	n-butano, n-pentano, n-octano	Gasolina
	Nonano	Óleo diesel
	Metilbutano, dimetilpentenos,	Gasolina
	Benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos	Gasolina
	Propilbenzenos	Óleo diesel, querosene
	Decanos	Óleo diesel
	Dodecanos	Querosene
	Tridecanos	Óleos combustíveis para aquecimento
	Tetradecanos	Óleos Lubrificantes
	Naftalenos	Óleo diesel
	Fluorantenos	Querosene
	Pirenos	Óleos combustíveis para aquecimento
Menos Biodegradáveis	Acenaftenos	Óleos Lubrificantes

Fonte: USEPA, 2004.

A hidrofobicidade dos compostos orgânicos também vem a ser um fator que pode interferir nas taxas de biodegradação dos mesmos. Os compostos orgânicos com elevada hidrofobicidade podem não ser biodegradados ou o serem em menores taxas, devido ao processo de adsorção, o qual acontece quando os contaminantes ficam presos ou sorvidos nas partículas do solo. Hidrocarbonetos combustíveis, por exemplo, são hidrofóbicos e

ficam presos a matéria orgânica e aos minerais argilosos, além de repelirem a água (KHAN *et al.,* 2004). Portanto, a hidrofobicidade agrava a limitada disponibilidade desses compostos aos microrganismos degradadores, que são encontrados na fase aquosa (FRANCO *et al.*, 2004).

A exemplo de compostos hidrofóbicos estão os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), asfaltenos e muitos compostos ramificados (maior que 20 átomos de carbono). Estes hidrocarbonetos pesados são resistentes a biorremediação e, no caso dos HPA, são considerados nas avaliações de risco a saúde humana, devido às possíveis atividades carcinogênicas e mutagênicas (BAHERI e MEYSAMI, 2002).

A eficiência da biodegradação depende de fatores associados às características do contaminante, os quais podem afetar diretamente o metabolismo microbiano. Dentre estes, Martins *et al.* (2003) mencionam como os mais significativos: a biodisponibilidade dos contaminantes, o seu nível de toxicidade, a preferência microbiana e a degradação incompleta destes compostos.

A baixa biodisponibilidade de compostos orgânicos é principalmente atribuída a sua solubilidade limitada e a sua adsorção pela matéria orgânica da matriz do solo, podendo ser elevada por algumas propriedades microbianas como a produção de surfatantes naturais e a composição hidrofóbica de sua parede celular. Assim, mesmo quando microrganismos capazes de degradar os poluentes estão presentes no sistema e todas as condições ambientais estão adequadas, a inabilidade destes microrganismos em entrar em contato com os compostos poluentes pode vir a interferir negativamente nas taxas de degradação (TRINDADE, 2002).

A concentração dos contaminantes também interfere no processo de biorremediação devido ao nível de toxicidade dos mesmos. Porém, a forte dependência da taxa de biodegradação em relação à concentração é, geralmente, observada nos hidrocarbonetos de maior solubilidade em água, isto é, de menor peso molecular e maior polaridade. Concentrações elevadas destes compostos atingem níveis de toxicidade que impossibilitam ou retardam a degradação pelos microrganismos (MARTINS *et al.,* 2003). As altas concentrações de contaminantes podem reduzir as taxas de respiração, inibindo a biodegradação mais pela aeração dificultada do sistema e pela limitação de nutrientes do que pela toxicidade dos contaminantes (SCHROEDER *et al.,* 2002; SEABRA, 2005),

Dibble e Bartha *apud* Seabra (2005) demonstraram que a concentração de hidrocarbonetos na faixa de 1,25 a 5%, de um lodo oleoso aplicado em solo, provocou um aumento da evolução de CO_2, indicando uma maior atividade microbiana. Contudo, para a concentração de hidrocarbonetos de 10% houve um decréscimo de 15% na evolução de CO_2, em relação à respiração do solo.

A escolha da tecnologia de biorremediação mais apropriada a ser aplicada, em resumo, deve levar em consideração as seguintes características do contaminante apresentadas: produtos leves de petróleo como gasolina tendem a ser removidos durante a aeração por evaporação visto que eles contêm compostos orgânicos voláteis (VOCs); produtos de peso molecular médio como diesel ou querosene contêm baixas quantidades de componentes voláteis, sendo a biodegradação deles é mais efetiva; já combinações mais pesadas de óleo de aquecimento e lubrificante não evaporam, assim a combinação da biodegradação com outras alternativas pode ser necessária (KHAN *et al.*, 2004).

3.5.3 Diversidade Microbiana nos Solos

A comunidade microbiana dos solos é constituída por representantes dos três domínios: *Bacteria, Archaea* e *Eucarya*, com os procariotos (domínios Bacteria e Archaea) representando a maior parte da biota da Terra. Lambais *et al.* (2005) sugere que uma elevada parte da diversidade de fungos e procariotos é de espécies não-cultiváveis. Curtis *et al. apud* Lambais *et al.* (2005) estimaram que a diversidade de bactérias no solo seria de 6.400 a 38.000 espécies por grama de solo, porém somente 0,1–0,5% dos procariotos do solo podem ser cultivados utilizando-se os meios tradicionais, dificultando a estimativa de sua diversidade. No caso dos fungos, aproximadamente 74.000 espécies são conhecidas, mas estima-se que o número total de espécies possa chegar a 1.500.000 (LAMBAIS *et al.,* 2005).

As atividades da microbiota do solo são essenciais para a reciclagem da matéria orgânica, formação do húmus, nitrificação e fixação biológica do N_2, entre outros processos, os quais podem contribuir para a alteração da disponibilidade de nutrientes e na alteração das características físicas dos solos. Desta forma, os microrganismos dos solos são responsáveis por transformações fundamentais nos ciclos biogeoquímicos, geralmente

sob diferentes condições edáficas ou em resposta a diferentes tipos de distúrbios. Sendo assim, essas comunidades microbianas podem ser utilizadas como indicadores de qualidade, definindo estratégias para preservação da biomassa e identificando a presença de contaminantes (LAMBAIS *et al.*, 2005).

Durante uma contaminação, as transformações químicas ocorridas podem alterar a capacidade metabólica dos microrganismos autóctonos. Esses microrganismos podem não degradar o contaminante numa exposição inicial, mas fazê-lo após uma exposição prolongada devido a adaptações das populações biodegradantes ou mutações genéticas. As adaptações são importantes porque garantem a presença de microrganismos com poder de degradar os compostos químicos poluentes introduzidos no meio ambiente. Estima-se que o consórcio de microrganismos que se encontra em ambientes durante muito tempo em contato com um agente contaminante, pode apresentar um elevado grau de especificidade para a degradação de compostos de estrutura similar (BRITO *et al.,* 2004).

Assim, diferentes estratégias vêm sendo empregadas para estudar a diversidade microbiana em solos contaminados, a qual pode ser usada como indicador de qualidade. Contudo, essas estratégias dependem de técnicas, as quais, por mais modernas que sejam, possuem limitações.

No estabelecimento de um procedimento biológico de remediação, uma das etapas de maior importância, consiste na escolha dos microrganismos adequados. Os primeiros indícios são obtidos através do estudo das colônias de microrganismos que habitam os solos contaminados. A lógica é bastante simples: se um grupo de microrganismos consegue proliferar num ambiente contaminado, existe uma grande chance de que possua um sistema que lhe permita metabolizar as espécies químicas existentes. Os consórcios microbianos podem ser extraídos destes locais, submetidos à adaptação a um contaminante específico e finalmente utilizados na sua degradação. Porém, estabelecer quais são os microrganismos responsáveis pelos processos de degradação é difícil, porque na presença de muitos tipos de cntaminantes a existência de efeitos sinérgicos é muito freqüente (BRITO *et al.*, 2004).

Segundo Khan *et al.* (2004), existem três processos pelos quais os microrganismos degradam os hidrocarbonetos: fermentação, respiração aeróbia e respiração anaeróbia. Durante a fermentação, o composto orgânico utilizado como fonte de energia, é hidrolisado

por uma série de reações mediadas por enzimas que não envolve a cadeia de transporte de elétrons. Esses compostos orgânicos podem agir como doadores e aceptores de elétrons.

Na respiração aeróbia, o composto é transformado pelos microrganismos por uma série de reações mediadas por enzimas, na qual o oxigênio serve como um aceptor de elétrons externo e parte do carbono do contaminante é oxidado pelo oxigênio molecular gerando CO_2 e, a parte não oxidada, é utilizada na produção de biomassa celular. Os compostos orgânicos nitrogenados, na via aeróbica, são transformados em íons nitrito ou nitrato, os compostos fosforados, formam ortofosfatos e os sulfurados formam sulfatos (BRITO *et al.,* 2004).

Já as condições anaeróbias suportam a atividade microbiana na ausência de oxigênio. Nelas os microrganismos hidrolisam os compostos químicos do solo para liberar a energia necessária por reações também mediadas por enzimas. No entanto, o nitrato, sulfato, gás carbônico, e outras combinações oxidadas (excluindo oxigênio) servem como aceptores de elétrons. Os produtos da respiração anaeróbia podem ser formas reduzidas de metais, metano, sulfeto de hidrogênio e gás nitrogênio (MORAIS, 2005).

Nas condições aeróbias, é de se esperar uma queda da concentração de oxigênio quando os microrganismos estão ativos. Da mesma forma, em condições anaeróbias, a concentração de outros aceptores de elétrons deve diminuir com o incremento proporcional das espécies reduzidas de tais compostos.

Desses três processos, os métodos de biorremediação para a recuperação de solos, sedimentos e água contaminados por derrame de óleo são principalmente baseados nos processos aeróbios. Nesse âmbito, os estudos de ecologia microbiana de solos contaminados por petróleo vêm focalizando em grande parte os microrganismos aeróbios. Boopathy (2003) afirma que muitas culturas puras de linhagens bacterianas aeróbicas capazes de degradar o poluente têm sido isoladas de solos contaminados havendo poucos exemplos de culturas puras de bactérias anaeróbicas que degradem os compostos orgânicos presentes no petróleo. O domínio das tecnologias que exploram a atividade aeróbica está relacionado a observações históricas de que as etapas iniciais de degradação dos hidrocarbonetos pelos microrganismos envolvem a oxidação de substratos pelas enzimas oxigenases e pelo reconhecimento do oxigênio como um fator limitante em muitos ambientes naturais.

Não obstante, há casos onde as condições do solo forçam um metabolismo anaeróbico. Por exemplo, Nakagawa e Andréa (2006) observaram um aumento da taxa de degradação de compostos organoclorados em um solo alagado, no qual havia uma predominância de microrganismos anaeróbios. Porém, os processos anaeróbios não serão aqui aprofundados.

O processo de degradação de compostos orgânicos requer, geralmente, a formação de consórcios microbianos, com bactérias de diferentes espécies, cada uma especializada em degradar uma ou várias frações do óleo derramado. Os principais gêneros são *Acidovorans, Acinetobacter, Agrobacterium, Alcaligenes, Aeromonas, Arthrobacter, Beijerinckia, Burkholderia, Bacillus, Comomonas, Cycloclasticus, Flavobacterium, Goordona, Moraxella, Mycobacterium, Micrococcus, Neptunomonas, Nocardia, Pasteurella, Pseudomonas, Rhodococcus, Streptomyces, Sphingomonas, Stenotrophomonas e Vibrio* (ALEXANDER, 1999; CRAPEZ *et al.,* 2002).

Cho *et al. apud* Morais (2005) desenvolveram experimentos em escala de laboratório para biorremediação de solo contaminado por petróleo durante a guerra do Golfo em 1991 e verificaram a degradação das frações saturadas e aromáticas de petróleo pelos microrganismos isolados do local. As principais espécies de bactérias encontradas no solo biorremediado que supostamente foram as responsáveis por essa degradação foram *Rhodococcus sp*. e *Nocardia asteróides*.

Ward *et al.* (2003) indicaram que uma cultura mista utilizada em qualquer processo de biodegradação de petróleo tende a aumentar a eficiência deste. Uma cultura de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos – gêneros *Acinetobacter, Pseudomonas e Rhodococcus* – foram responsáveis pelo aumento da taxa de degradação de compostos orgânicos voláteis. Já Trindade (2002) observou o efeito positivo da adição de microrganismos degradadores de óleo cru, em separado e combinados, de três gêneros *Nocardia,Pandora e Rhodotorula,* isolados do próprio solo contaminado.

Embora as bactérias sejam responsáveis pela biodegradação da maioria dos hidrocarbonetos, algumas espécies de fungos filamentosos e leveduras têm habilidade de degradar esses compostos como os gêneros *Debaryomyces, Rhodotorula, Sporobolomyces, Aspergillus, Aureobasidium, Chrysosporium, Cladosporium, Cochliobolus, Dendryphiella,*

Fusarium,Gongronella,Graphium, Penicillium, Phialophora, Rhizopus, Scolecobasidium, Scopulariopsis, Sprotrichum, Spicaria, Tolypocladium e Verticilium (TRINDADE, 2002).

Os fungos são considerados mais eficientes que as bactérias sob condições adversas do processo como, por exemplo, valores extremos de pH, limitação de nutrientes e baixos teores de umidade. Dentre os gêneros de fungos citados, as linhagens de *Penicillium sp.* e *Aspergillus sp*. são reconhecidas como sendo capazes de degradar uma maior quantidade de hidrocarbonetos (TRINDADE, 2002).

Segundo Moreno *et al.* (2004), o potencial dos fungos no processo de descontaminação está principalmente associado às características do seu sistema enzimático e do desenvolvimento de micélios, que permitem o crescimento destes microrganismos em diferentes substratos. Por exemplo, fungos de podridão branca estão sendo aplicados na degradação de hidrocarbonetos de petróleo devido a sua produção de enzimas extracelulares (lacase e lignina peroxidase) durante a degradação da lignina, um polímero polifenólico heterogêneo de difícil degradação (D'ANNIBALE *et al.*, 2006),

3.5.4 Fatores ambientais

Além dos microrganismos com a habilidade em degradar hidrocarbonetos de petróleo, das características do solo, concentração e tipo do contaminante, diversos fatores ambientais influenciam este processo melhorando a degradação do contaminante. Os mais importantes são a temperatura, concentração de oxigênio (aeração eficiente), teor de umidade, pH e nutrientes inorgânicos (MORAIS, 2005). Molina-Barahona *et al.* (2004) consideram o ajuste dessas condições imprescindível para a remoção de óleo diesel em solos.

Temperatura

A temperatura atua tanto na natureza física e química dos hidrocarbonetos de petróleo, como pela alteração das populações microbianas. Nas temperaturas abaixo de 15ºC predominam microrganismos psicrófilos que são organismos extremófilos capazes de crescer e reproduzir em temperaturas frias abaixo de 15ºC. A membrana celular lipídica quimicamente resistente ao enrijecimento causado pelo resfriamento extremo, é responsável

por manter o meio intracelular líquido e proteger o DNA até mesmo em temperaturas abaixo do ponto de congelamento da água. Já os mesófilos são microrganismos que crescem melhor em temperaturas moderadas, nem muito quente nem muito fria, tipicamente entre 25 e 40°C. Os termófilos, outro tipo de extremófilos, são microrganismos que crescem a temperaturas relativamente altas, acima de 45°C. Como uma condição prévia para a sua sobrevivência, os termófilos contêm enzimas que resistem a altas temperaturas (TREMIER *et al.,* 2005).

Assim, a degradação microbiana dos hidrocarbonetos pode ocorrer em uma faixa grande de temperatura, entre 0 a 70ºC, porém seu ponto máximo ocorre à temperaturas de 30-40ºC (MORAIS, 2005). Segundo Seabra (2005), as taxas de degradação enzimática e o metabolismo microbiano, teoricamente, dobram a cada aumento de 10ºC de temperatura, até atingir temperaturas inibitórias, usualmente, em torno de 40ºC.

Nos processos de compostagem, altas temperaturas são observadas no tratamento aeróbio de matéria orgânica sólida, alcançando 60 a 70ºC. No inicio do processo, as reações diminuem a temperatura, mas o acúmulo do substrato sólido acarreta seu aumento ainda que a atividade biológica seja decrescente. Temperaturas ótimas para todo o processo variam de 35 a 70ºC, dependendo do substrato sólido (TREMIER *et al.,* 2005).

Em geral, baixas temperaturas acarretam o aumento da viscosidade do óleo e a volatização dos alcanos de cadeias curtas é reduzida, o que leva a um processo mais lento, devido à redução na atividade enzimática (MORAIS, 2005; SEABRA, 2005). Nesse contexto, Rike *et al.* (2003) desenvolveram experimentos com o objetivo de avaliar se a biodegradação *in situ* de hidrocarboneto ocorria em um solo ártico contaminado, verificando uma possível redução na atividade de degradação durante os meses de inverno (RIKE, 2003). Tal redução foi confirmada, pois quando a população microbiana estava na fase de crescimento a taxa de degradação de hidrocarboneto era reduzida de 100 para 64 mg de hidrocarboneto por kg/dia quando a temperatura diminuía de 20 para 5ºC.

Em alguns estudos, a variação na taxa de degradação do contaminante é observada durante um mesmo dia. Isto porque os microrganismos têm um ciclo diário de atividade biológica relacionado principalmente a flutuações diárias de temperatura (FIÚZA e VILA, 2005).

pH

Valores extremos de pH são inibitórios para a grande maioria dos processos microbianos de degradação (MORAIS, 2005). A faixa ótima para a mineralização de hidrocarbonetos em solos é de 5,5 a 8,5. No entanto, as bactérias predominam em solos levemente alcalinos e próximos da neutralidade, já os fungos são mais tolerantes a solos ácidos (ALEXANDER *apud* NAKAGAWA e ANDRÉA, 2006). Além de estar diretamente relacionada ao metabolismo dos microrganismos, a alteração de pH pode influenciar a solubilidade dos contaminantes em água como também a intensidade da sorção destes no solo (TRINDADE, 2002).

Em alguns casos, o controle do pH durante o processo pode ser de extrema importância para a eficiência do mesmo. Segundo Boopathy (2003), o valor de pH durante o processo de tratamento de um solo em reator de lama pode reduzir devido ao aumento da concentração de ácidos graxos durante a metabolização do contaminante, como foi verificado pelo autor, para óleo diesel. Uma forma de elevar os valores de pH seria adicionando óxido de cálcio (cal).

Nutrientes

Os nutrientes essenciais ao crescimento celular são o nitrogênio e o fósforo, os quais devem estar balanceados, propiciando uma boa relação com o carbono. Geralmente, em ambientes contaminados por hidrocarbonetos, o aumento da quantidade de carbono proveniente deste contaminante faz com que estes nutrientes necessários para o crescimento ótimo microbiano estejam presentes em quantidades inferiores. Assim, freqüentemente há necessidade de correção das concentrações de nitrogênio e fósforo utilizando fontes externas desses nutrientes como sais inorgânicos (amônio, nitratos e fosfatos) ou fertilizantes utilizados na agricultura, como uréia.

Diferentes relações nutricionais C:N:P vêm sendo testadas na literatura. Molina-Barahona *et al.* (2004) testaram duas relações C:N de 100:10 e 100:30. A adoção de uma relação nutricional C:N de 100:10, combinada com um teor de umidade de 30% e adição de resíduo de milho a 3%, resultou em uma atividade metabólica mais alta, favorecendo uma maior remoção de diesel combustível de 67%.

A influência da adição de nutrientes na biodegradação de um óleo cru em um solo agrícola foi estudada em microcosmos utilizando solos não fertilizados e fertilizados com duas concentrações distintas de nutrientes: alta (3000 μg N, 450 μg P e 1500 μg por quilo de solo seco) e baixa (850 μg N, 85 μg P e 240 μg K por quilo de solo seco). O autor observou que a adição de nutrientes no solo propiciou uma maior remoção de hidrocarbonetos em ambas as condições, além de estimular os microrganismos heterotróficos totais e degradadores de óleo. Porém, este estímulo teve um limite, pois nas concentrações mais altas de nutrientes, foi observado um efeito inibitório na microbiota. Ao final de 90 dias de experimento, para a alta concentração de nutrientes foi observada uma remoção de hidrocarbonetos lineares, ramificados e cíclicos de 91, 75 e 37%, respectivamente. Enquanto para as baixas concentrações de nutrientes foi observada uma remoção de hidrocarbonetos lineares, ramificados e cíclicos de 100, 85 e 57% (CHAÎNEAU *et al*., 2005).

A relação nutricional que deve ser adotada varia em cada caso, pois esta é influenciada pela forma e concentração dos nutrientes presentes no solo. Sendo assim, a melhor forma de se encontrar a relação de nutrientes adequada para um processo de biodegradação é realizando testes de biotratabilidade (investigação inicial) conforme foi observado por Trindade (2002).

Umidade

O solo deve conter umidade suficiente para estimular o crescimento dos microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, mas não em excesso que leve à redução da permeabilidade do solo, a qual reduz a difusão do oxigênio e, conseqüentemente, a taxa de degradação destes contaminantes (RIKE *et al.,* 2003; SEABRA, 2005). Com isso, o teor de umidade ótimo dependerá principalmente das propriedades do solo.

Geralmente, obtêm-se taxas ótimas de biodegradação em solos contaminados por óleo cru quando o teor de umidade do solo está compreendido entre 30 e 90% do valor da capacidade de retenção de água do mesmo (ALEXANDER, 1999).

Segundo Schroeder *et al*. (2002), um teor de umidade elevado (50-75% da capacidade de retenção de água) favorece a taxa de biodegradação e reduz o tempo de tratamento. Porém, o excesso de umidade do solo, gera condições de anaerobiose,

favorecendo os microrganismos anaeróbios, o que não seria favorável tendo em vista que o processo de biodegradação de compostos orgânicos ocorre essencialmente sob condições aeróbicas (ALEXANDER *apud* NAKAGAWA e ANDRÉA, 2006). Além disso, dificulta o processo em função das barreiras impostas ao transporte de oxigênio e à diluição de nutrientes (ALEXANDER, 1999)

Aeração

A quantidade de oxigênio é outro fator importante na biorremediação de solos contaminados por resíduos de petróleo, pois geralmente este processo é aeróbio e os microrganismos heterotróficos utilizam o oxigênio como aceptor final de elétrons, mas também como substrato nas reações catalisadas pelas enzimas oxigenases. Conseqüentemente, uma baixa concentração de oxigênio afeta a mineralização dos hidrocarbonetos pelos microrganismos, tornando-se um fator limitante. Fatores como tipo de solo, teor de umidade, baixa permeabilidade e baixas temperaturas podem afetar a aeração do solo, reduzindo a troca de gás com o ar atmosférico, assim como reduzindo a difusão do oxigênio no solo.

A difusão é o principal processo de transporte do oxigênio no solo, que pode ser maior quando a aeração forçada é aplicada, aumentando a concentração de oxigênio no solo, bem como transferindo para o ar atmosférico o gás carbônico, produto do metabolismo microbiano. Porém, quando somente a difusão do ar atmosférico é responsável pelo transporte de oxigênio no solo ocorre a formação de gradientes verticais deste gás, resultante do consumo microbiano do mesmo durante o processo de biodegradação. Nos solos sem contaminação a difusão do ar atmosférico normalmente é suficiente para suprir as deficiências de oxigênio e reduzir o excesso tóxico de gás carbônico proveniente da metabolização do contaminante, o que não é observado para os solos contaminados com óleo, por exemplo, o qual requer uma aeração forçada (SALANITRO *et al*. *apud* REIKE *et al*., 2003).

Dessa maneira, segundo Morais (2005), muitos estudos envolvendo as biopilhas como tecnologia de biorremediação têm sido realizados com a injeção de ar através de tubulações para suprir a necessidade de oxigênio o que pode ser financeiramente dispendioso. Uma outra alternativa é a utilização de materiais estruturantes que aumentam a

aeração do solo como serragem, palhas e cascas de origem vegetal, resíduos de colheita, dentre diversos outros que serão citados no item a seguir (RHYKERD, 1999; MEYSAMI e BAHERI, 2003; MOLINA-BARAHONA *et al.*, 2004).

3.6 Utilização de Materiais Estruturantes como Forma Auxiliar ao Processo de Biorremediação

É imprescindível determinar algumas características dos solos para alcançar o sucesso da tecnologia de biorremediação escolhida, tais como: textura, permeabilidade, quantidade de umidade e densidade *bulk*. Solos com uma baixa permeabilidade são difíceis de aerar, e freqüentemente formam aglomerados, tornando difícil a distribuição de umidade, ar, adição de nutrientes (bioestímulo) e de microrganismos (bioaumento), porém retêm água melhor que os solos com uma alta permeabilidade. A influência negativa da permeabilidade está diretamente relacionada ao transporte ativo dificultado de aditivos em solos menos permeáveis (VOGEL, 1996). Assim, por causa da distribuição não uniforme destas características no solo, pode ser requerido o revolvimento ou a aragem para promover ótimas condições para a biodegradação (KHAN *et al.*, 2004).

O revolvimento ou aragem é uma manipulação mecânica do solo que visa melhorar suas condições, através da mistura física do mesmo. Desta forma a atividade microbiana é estimulada separando agregados de solo e expondo as fontes de carbono orgânico e nutrientes (RHYKERD *et al.*, 1999). Outros métodos que buscam promover a aeração do solo são o bombeamento de ar e a adição de agentes estruturantes para aumentar a porosidade do solo, servindo como aeradores do solo. Segundo Schroeder *et al.* (2002), os agentes estruturantes mais comuns são areia, resíduos agrícolas e materiais vegetais.

Agentes estruturantes são materiais de baixa densidade que, quando adicionados ao solo, reduzem a densidade *bulk* do mesmo, aumentando a sua porosidade, possibilitando maior difusão de oxigênio, ou ainda auxiliando na formação de agregados estáveis com a água. Esses materiais devem possuir características tais como: baixo custo, não competitividade com o contaminante como fonte de carbono (reduzida biodegradação) e disponibilidade próxima à área do seu reaproveitamento, dentre outras. Alguns trabalhos encontrados na literatura reportam o aumento da degradação de compostos orgânicos em sistemas de compostagem ou de *landfarming*, utilizando agentes estruturantes, como

cavacos de madeira, palha, feno de grama, diferentes tipos de resíduos agroindustriais, além de materiais inorgânicos como a vermiculita (RHYKERD *et al*., 1999; BARRINGTON *et al*., 2002; CHOI *et al*., 2003; MOLINA-BARAHONA *et al.*, 2004).

Tais materiais ou agregados são adicionados ao solo contaminado com a finalidade de aumentar a permeabilidade, aeração e facilitar o contato da água e dos nutrientes com os microrganismos conseqüentemente intensificando a atividade microbiana. Meysami e Baheri (2003) verificaram que alguns tipos de materiais, como os resíduos de agricultura, podem permitir o crescimento e penetração de fungos ligninolíticos no solo contaminado, pois servem de substratos para esses microrganismos que passam a secretar enzimas responsáveis pela despolimerização da lignina e que ainda podem biodegradar compostos poluentes como os hidrocarbonetos.

Diversos materiais vêm sendo adicionados aos solos com esse objetivo de tornar suas características físicas mais propícias a biorremediação. A exemplo disso, Baheri e Meysami (2002) utilizaram turfa, cavacos de madeira e flocos de farelo de trigo, ou uma mistura destes, como agentes estruturantes de um solo contaminado. Depois de alguns testes preliminares, a mistura de turfa e flocos de farelo de trigo foi selecionada para os testes principais aplicados em conjunto com o bioaumento fúngico e a correção de umidade. Uma remoção média de 29% dos hidrocarbonetos foi obtida pela combinação destes fatores em dois níveis: concentração de estruturante, 6 e 12%; bioaumento ou não adição de fungos; e teor de umidade, 30 ou 50%. No entanto, através do tratamento estatístico, os autores observaram que somente a adição do material estruturante foi o fator relevante para o resultado de remoção observado.

A concentração de agente estruturante a ser utilizada no tratamento de solos pode variar de 2 a 12% p/p (BAHERI e MEYSAMI, 2002; MOLINA-BARAHONA *et al.*, 2004). No mesmo estudo desenvolvido por Baheri e Meysami (2002), citado anteriormente, os resultados mostraram que a alteração na concentração do agente estruturante (mistura de turfa e flocos de farelo de trigo) de 6 a 12% causou uma maior redução de hidrocarbonetos, aproximadamente 4 a 5%, após 98 dias de tratamento.

Barrington *et al.*(2002) utilizaram quatro materiais estruturantes para compostagem, a saber: cavacos píneos, uma mistura de feno de grama longo e cortado, feno de palha de trigo cortado e longo (inteiro). Os experimentos objetivaram medir e descrever a pressão

estática de ar que flui pelo material composto, utilizando parâmetros como tamanho de partícula, porosidade, profundidade e características do canal de corrente de ar através do material composto. O composto com cavacos píneos ofereceu a menor resistência para corrente de ar, conseqüentemente, uma maior permeabilidade, característica essa essencial para a compostagem.

Na literatura, os solos com adição de estruturantes propiciam uma redução mais rápida de hidrocarbonetos de petróleo quando comparado com tratamentos sem a adição desses materiais. No trabalho realizado por Rhykerd *et al.* (1999), por exemplo, foram testados parâmetros de tratamentos que envolviam agentes estruturantes (capim cortado, serragem e vermiculita) e aeração (estático, aeração por revolvimento e forçada). A taxa mais rápida de remediação aconteceu durante as primeiras 12 semanas no tratamento com revolvimento e adição de feno de capim cortado onde o teor de hidrocarbonetos totais de petróleo HTP diminuiu 82%. Já a taxa de remedição mais lenta aconteceu no tratamento estático e sem adição de estruturante, onde o conteúdo de HTP diminuiu apenas 33%, no mesmo período.

Choi *et al.* (2003) estudaram o efeito da adição de bolas de argila (utilizadas normalmente na horticultura) na biorremediação do solo de um *landfill,* não sanitário, no qual eram dispostos resíduos sólidos como comida, papel, madeira, dentre outros. A mistura do solo com esse agente estruturante resultou no aumento da taxa de evolução de CO_2, devido ao efeito positivo da aeração na biodegradação. Já Tremier *et al.* (2005) observaram que a compostagem de resíduos domésticos incorporando agentes estruturantes lenhosos, como pedaços de madeira, propicia a produção de um composto de qualidade que pode ser usado tanto para condicionar o solo quanto como um fertilizante orgânico.

Dentre os vários fatores que afetam a remediação de locais contaminados por compostos orgânicos, como aeração, uso de nutrientes inorgânicos ou fertilizantes e o tipo de espécies microbianas, todos foram avaliados nos experimentos realizados por Vasudevan e Rajaram (2001). Os autores testaram em laboratório o efeito da presença de um consórcio bacteriano, nutrientes inorgânicos, composto e um agente estruturante (farelo de trigo) por um período de 90 dias. O solo estruturado com farelo de trigo mostrou uma degradação de óleo mais rápida comparada a todos os outros aditivos, atingindo 76% de

remoção de hidrocarbonetos. Já na condição onde houve apenas o bioestímulo da microbiota autóctona do solo contaminado essa remoção foi de 66%.

Molina-Barahona *et al.* (2004) avaliaram os efeitos da suplementação de nutrientes e da adição de resíduos de colheita, para bioestimular os microrganismos autóctonos na biodegradação de díesel. Os experimentos foram realizados em microcosmos utilizando um planejamento experimental fatorial fracionário para a avaliação dos efeitos de relação nutricional C:N (100:10 ou 100:30), teor de umidade (20% ou 30%, p/p), concentração (2% ou 3%, p/p) e tipo (milho ou cana-de-açúcar) de resíduos de colheita. A condição contendo uma relação C:N de 100:10, 30% de umidade e 3% resíduo de milho apresentou a atividade metabólica mais alta com 7,7 vezes maior produção de CO_2. Foi observado também, nesta mesma condição, o crescimento de microrganismos heterotróficos e degradadores de hidrocarbonetos, removendo 67% de diesel em 109 dias.

A adição de materiais estruturantes orgânicos, geralmente, pode estimular a atividade microbiana de uma forma geral, resultando em aumento da biomassa microbiana, principalmente de microrganismos degradadores específicos, e acelerando a degradação de certos compostos (NAKAGAWA e ANDREA, 2006).

3.6.1 Reaproveitamento da Casca de Coco Verde: Utilização como Material Estruturante

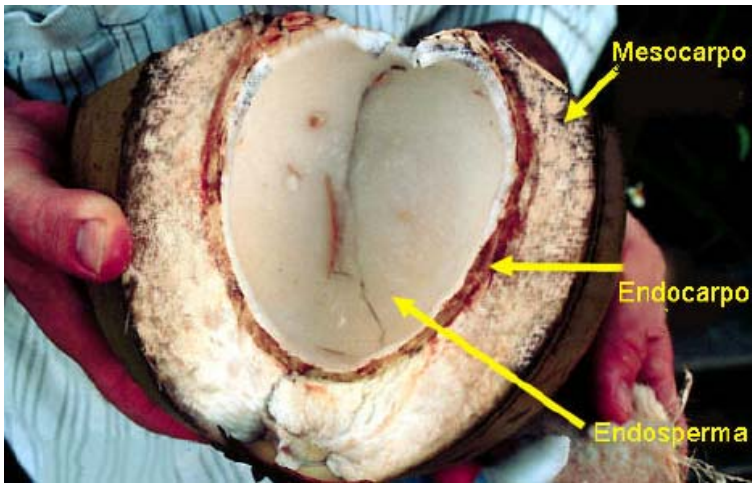
O Coqueiro

O coqueiro, *Cocos nucifera L.*, é uma palmeira nativa de diversas espécies cultivadas no Brasil, podendo ser diferenciadas pelas espécies altas, mais comuns, que chegam a atingir 40 metros de altura, e no coqueiro-anão, uma espécie de frutificação precoce de crescimento lento. Em condições favoráveis de clima e solo a frutificação se dá aos 3 a 4 anos para o coqueiro anão e aos 6 a 8 anos para as demais espécies.

A cultura do coqueiro apresenta algumas vantagens cruciais, principalmente para cultivo na região Nordeste do Brasil, como o fato de ser uma lavoura economicamente viável nas areias salgadas da praia, de fácil cultivo e que apresenta produção durante longo período. O solo para plantio do coqueiro necessita de fonte rica de cálcio e fósforo, o que justifica a sua produção nas areias de praia, ricas em cálcio pela presença de restos de conchas marinhas.

O Coco

O fruto do coqueiro, o coco, é constituído por uma parte externa lisa, o exocarpo; por uma parte fibrosa e espessa que constitui o mesocarpo; e pelo endocarpo, uma casca duríssima e lenhosa (Figura 4).



Fonte: PINO (2005).

Figura 4: Partes do Coco Verde.

O mesocarpo produz fibras que podem ser utilizadas em diversas aplicações industriais. Essa casca fibrosa externa do coco, é formada por densas fibras resistentes às águas salgadas, próprias para cordoaria naval, tapetes, escovas, etc. A fibra no comércio tem o nome de coiro ou cairo. Já o mesocarpo de cocos maduros e secos fornece fibra lenhosa e dura, denominada coiro ordinário.

A composição química da casca de coco verde depende de vários fatores que influenciam o crescimento da planta e a produção do fruto, sendo os principais a fonte de plantio, a época do ano e a quantidade de chuvas. Na Tabela 4 são apresentados os resultados de uma análise química típica da casca de coco verde apresentada por ROSA *et al. apud* PINO (2005).

Tabela 4: Caracterização química típica da casca de coco verde.

Elemento	g/kg	mg/kg
N	6,52	-
P	1,42	-
K	11,5	-
Ca	6,8	-
Mg	1,79	-
Na	12,5	-
Fe	1,97	-
Cu	-	6,6
Zn	-	31,8
Mn	-	23,8
M.O.[1]	-	72,58

Fonte: ROSA *et al. apud* PINO (2005).

A casca do coco é rica em celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é definida como um polímero da glicose, assim elevados conteúdos de glicose representam elevados teores de celulose. De forma similar, elevados conteúdos de xilose indicam elevados teores de hemicelulose. Já a lignina é uma substância polimérica que age como aglutinante mantendo as cadeias de celulose unidas; a combinação de ambas confere as plantas resistência e flexibilidade (PINO, 2005).

A fibra de coco pertence à família das fibras duras, tais como o sisal. A baixa condutividade ao calor, a resistência ao impacto, às bactérias e a água, são algumas de suas características. Além dessas, algumas características técnicas da fibra da casca de coco lhe garante vantagens para a utilização industrial, destacando: inodora, resistência à umidade, não é atacada por roedores e resistência ao desenvolvimento de fungos quando seca (SENHORAS, 2003).

O Reaproveitamento do Coco

Nos últimos anos, especial atenção vem sendo dada para minimização ou reaproveitamento de resíduos sólidos gerados nos diferentes processos industriais, incluindo os resíduos provenientes da indústria de alimentos. Tais resíduos envolvem

quantidades apreciáveis de casca, caroço e outros. Esses materiais, além de fonte de matéria orgânica, servem como fonte de proteínas, enzimas e óleos essenciais, passíveis de recuperação e aproveitamento (COELHO *et al.,* 2001).

O aumento crescente no consumo do coco verde e a vocação natural para a industrialização de sua água vêm aumentando a geração de rejeito (casca de coco), que corresponde a cerca de 85% do peso do fruto. Segundo dados fornecidos pela Companhia de Limpeza Urbana do Rio, COMLURB, o coco corresponde à cerca de 80% de todo o lixo coletado na orla marítima. Paralelamente, as indústrias que processam água de coco geram volumes significativos e crescentes de cascas, que atualmente, são enterradas em lixões e aterros, causando problemas, especialmente em grandes centros urbanos (ROSA *apud* COELHO *et al.*, 2001).

O rejeito da indústria convencional do coco maduro pode ser usado como combustível para caldeiras, ou na manufatura de cordoalha, tapetes, estofamentos e capachos. Já o resíduo da casca de coco verde vem sendo utilizado, em estudos mais recentes, na agricultura intensiva, principalmente no cultivo de plantas ornamentais e hortaliças; na indústria de papel; na engenharia de alimentos para complementação alimentar humana e animal e na produção de enzimas; na indústria de construção civil e em matrizes polimétricas. Embora a alta umidade (85%) e as características da fibra do coco verde reduzam o seu aproveitamento, não descartam a sua utilização e nem a inviabilizam economicamente, mesmo tendo o material que ser previamente tratado (cominuído, lavado etc.).

As características da fibra do coco conferem a esse material a possibilidade de aplicação no mercado de isolamento térmico e acústico, principalmente, face à sua resistência, durabilidade e resiliência.

A produção de fibras vegetais ocupa um papel relevante na economia agrícola mundial, mesmo com a intensa produção de fibras sintéticas. Matérias-primas de origens renováveis, recicláveis e biodegradáveis, apontam como uma das alternativas para a produção de manufaturados ecologicamente corretos, em conseqüência do acúmulo nos descartes de materiais não biodegradáveis, os quais tendem a aumentar com o crescimento populacional nos centros urbanos. Como exemplo, a substituição de materiais derivados do

petróleo na produção de compostos elastoméricos por matéria-prima renovável vem de encontro a estes ideais (ROCHA e GHELER JR., 2000).

As fibras de coco verde e maduro vêm sendo utilizadas na confecção de biomantas e telas, utilizadas para proteger imediatamente o solo de uma erosão, até que a vegetação se estabeleça. O sistema de telas e mantas biodegradáveis tem a vantagem de proporcionar a rápida recuperação do solo a um baixo custo, se comparado com outros sistemas. Tem ainda a vantagem de ser incorporado ao terreno com o passar do tempo, diminuindo o impacto gerado sobre o meio ambiente. O material vegetal (fibra do coco) é agregado por meio de malhas têxteis, adesivos biológicos, ou para casos específicos, associado a malhas metálicas para aumentar sua resistência.

A exemplo do coco maduro, a casca do coco verde pode ser triturada, e o seu pó, rico em potássio, ser adicionado ao solo para reter água e como composto orgânico. Esta é também uma alternativa ecologicamente correta e adequada a um substrato agrícola. Além disso, o pó do coco pode se transformar em alternativa de substituição da turfa – material orgânico fossilizado – cuja sua exploração vem afetando o ecossistema.

Tornar viável o aproveitamento da casca do coco verde, gerado tanto como resíduo industrial quanto como lixo urbano, significaria mais uma alternativa de lucro para os sítios de produção.

Valendo-se dessa ampla gama de possíveis aplicações da fibra e do pó de coco, um grande projeto foi montado envolvendo importantes instituições de pesquisa e ensino brasileiras: EMBRAPA, EQ/UFRJ, PUC/RJ e CETEM/MCT. No referido projeto, diferentes rotas de aproveitamento da casca de coco verde foram propostas. Dentre estas, a rota de aplicação do pó da casca de coco verde como agente estruturante de solos contaminados por petróleo foi desenvolvida durante o trabalho aqui apresentado. Como visto anteriormente, diversos autores recomendam a aplicação de resíduos agroindustriais como material estruturante de solos contaminados, e, freqüentemente, um aumento da degradação e remoção do contaminante têm sido observados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS

4.1 Solo

O solo utilizado na condução dos experimentos foi proveniente de um campo de exploração e produção de petróleo em terra (Unidade de Negócios de Exploração e Produção Sergipe Alagoas – UN-SEAL), localizado no município de Carmópolis, Sergipe (Figura 5). O campo de Carmópolis foi descoberto em 1963, e representa a maior acumulação de óleo em terra da Petrobras (PETROBRAS, 2006). O referido material foi gentilmente cedido pela Petrobras e a coleta foi realizada por equipe da própria empresa, de forma a garantir a representatividade da mesma.

Após a chegada do solo no Centro de Tecnologia Mineral (CETEM/MCT), em dezembro de 2005, foi realizada uma etapa de secagem a temperatura ambiente durante aproximadamente uma semana. Em seguida, o material foi homogeneizado, quarteado e peneirado em uma peneira de malha de 10 mesh (1,68 mm) antes de ser disponibilizado para os experimentos. Até a realização destes, o solo foi estocado em câmara fria a 4ºC.

Fonte: http://www.municipionline.com.br/Application/

Figura 5: Local de coleta do solo - Unidade de Negócios de Exploração e Produção Sergipe Alagoas (UN-SEAL), no município de Carmópolis, Sergipe.

4.1.1 Caracterização Complementar do Solo

Remessas anteriores do solo proveniente de Carmópolis foram utilizadas em outros projetos de pesquisa desenvolvidos no CETEM, nos quais algumas características físicas e químicas desse solo foram determinadas (Tabela 5). No entanto, para a condução da

presente dissertação foi realizada pela Coordenação de Análises Minerais (COAM/CETEM) uma etapa complementar de caracterização, utilizando a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) acoplada a um sistema de dispersão de energia (EDS), e a Difração de Raios-X. Além disso, foi realizada a análise de fertilidade desse solo para a determinação do teor de nitrogênio, fósforo e potássio, nutrientes limitantes no processo de biodegradação (VASUDEVAN e RAJARAM, 2001; ALVAREZ, 2004).

Tabela 5: Caracterização do solo não contaminado.

Caracterização	**Solo não contaminado**
Distribuição Granulométrica (%)	
Areia	75
Silte	14
Argila	11
Densidade de partícula (g/mL)	2,2
Densidade do solo (g/mL)	1,3
Porosidade (%)	43
pH	6,8
Capacidade de Retenção de água (%)	34
Matéria orgânica (%)	1,7

Fonte: MOURA, 2005.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura gera imagens em níveis de cinza, nas quais o contraste decorre basicamente das diferenças de pesos específicos. Quanto mais claras são as imagens, mais pesada é a espécie química. A imagem eletrônica é formada pela incidência de um feixe de elétrons sobre a superfície da amostra promovendo a emissão de elétrons secundários retroespalhados e absorvidos assim como ocorre com os raios X. Um sistema de dispersão de energia (EDS) acoplado ao MEV (Modelo LEICA S440), possibilitou a obtenção de espectros de composição química qualitativa em pontos de áreas selecionados nas imagens. O EDS utilizado foi um OXFORD - Isis System Serie 300.

As amostras de solo, como não são condutoras de corrente elétrica, necessitam ser submetidas a uma etapa prévia de metalização para serem analisadas no MEV/EDS. A metalização consiste na precipitação a vácuo de uma película de um material condutor (ouro, carbono ou prata) sobre a superfície da amostra, possibilitando a condução da corrente elétrica (PINO, 2005). No metalizador BAL-TEC SCD005, o vácuo foi, inicialmente, criado no ambiente interno e, após a adição de Argônio, foi depositada a prata durante 250 s e utilizando 30 mA. Tais condições definem a espessura do filme formado sobre a amostra.

Difração de Raios-X (DRX)

Os difratogramas de raios-X (DRX) das amostras, obtidos pelo método do pó, foram obtidos em um equipamento Bruker-AXS D5005 equipado com espelho de Goeble para feixe paralelo de raios X, nas seguintes condições de operação: radiação Co K alfa (35 kV/40 mA); velocidade do goniômetro de $0{,}02^{o}$ 2Θ por passo com tempo de contagem de 1,0 s por passo e coletados de 5 a 80° 2Θ. As interpretações qualitativas de espectro foram efetuadas por comparação com padrões contidos no banco de dados PDF02 (ICDD, 1996) em software Bruker Diffrac^{Plus}.

Análise de Fertilidade do Solo

A análise química do solo é um dos métodos disponíveis que se tem para avaliar a fertilidade do mesmo, sendo um dos mais baratos e mais rápidos (FARIA e SILVA, 2003). Dentre os principais elementos determinados por essa análise, os macronutrientes como nitrogênio, fósforo e carbono, essenciais na síntese de material celular (ALVAREZ, 2004), foram determinados para o solo em estudo de acordo com metodologias descritas na Tabela 6. Segundo Alvarez (2004), o sucesso da biorremediação intrínseca depende da presença desses nutrientes em quantidades suficientes para manter a atividade microbiana.

Tabela 6: Metodologias utilizadas na análise de fertilidade do solo.

Análise	Metodologia
N	Kjeldahl modificado por Jaramillo (1996)
P	Metodologia descrita por Jaramillo (1996)
Matéria Orgânica	Método Walkley & Black (Alef e Nannipieri, 1995)

O teor de carbono orgânico total foi calculado a partir da matéria orgânica aplicando um fator de 1,724 (EMBRAPA, 1999), desprezando outros componentes quantificados por esta metodologia.

4.2 Petróleo empregado como Contaminante

O petróleo, ou óleo cru, empregado nos experimentos é conhecido como Sergipano Terra, sendo proveniente da UN-SEAL, e foi coletado em dezembro de 2005. Este petróleo é classificado como petróleo de base parafínica, com grau API médio de 24,1. A análise cromatográfica SARA (saturados, aromáticos, resina e asfaltenos), realizada pelo CENPES/PETROBRAS, apresentou a seguinte composição para este óleo: 55,02% de hidrocarbonetos saturados, 20,46% de hidrocarbonetos aromáticos e 24,52% de resinas e asfaltenos, em massa.

De forma a simular em laboratório uma contaminação acidental, foi realizada a adição do óleo cru ao solo de Carmópolis. As amostras de solo sem contaminação foram retiradas do estoque em câmara fria (4ºC), sete dias antes da realização dos experimentos. O solo foi novamente seco a temperatura ambiente, por um período de quatro dias, visto que as amostras encontravam-se úmidas. A contaminação foi simulada no laboratório adicionando-se óleo cru na concentração de 5% p/p de solo seco. Após 72 h da contaminação, o material residual (solo + óleo) foi utilizado para o desenvolvimento dos ensaios de biodegradação.

O solo contaminado passou ainda por uma caracterização simples, tendo em vista que após a contaminação, algumas propriedades do solo são alteradas como, por exemplo, capacidade de retenção de água, pH, densidades do solo e de partícula, porosidade, teor de nitrogênio, fósforo e carbono. Para a determinação da capacidade de retenção de água e de

pH foi seguida a metodologia descrita por Alef e Nannipieri (1995). Já as determinações da densidade do solo, densidade de partícula e porosidade seguiram metodologias descritas por Deuel e Holliday (1997). A análise de fertilidade do solo contaminado seguiu as metodologias descritas anteriormente, no item caracterização complementar, para a referida análise do solo sem contaminação (4.1.1).

4.3 Pó da Casca de Coco Verde empregado como Material Estruturante

O pó da casca de coco verde (*Cocos nucifera*), utilizado como material estruturante ao longo do desenvolvimento do trabalho experimental, foi fornecido pelo Laboratório de Bioprocessos da Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza, CE). O processamento do coco para obtenção do pó envolveu uma seqüência de operações incluindo as etapas de dilaceração, pré-secagem, moagem/trituração, prensagem e classificação, conforme esquema na Figura 6, abaixo (ROSA *et al*., 2001).

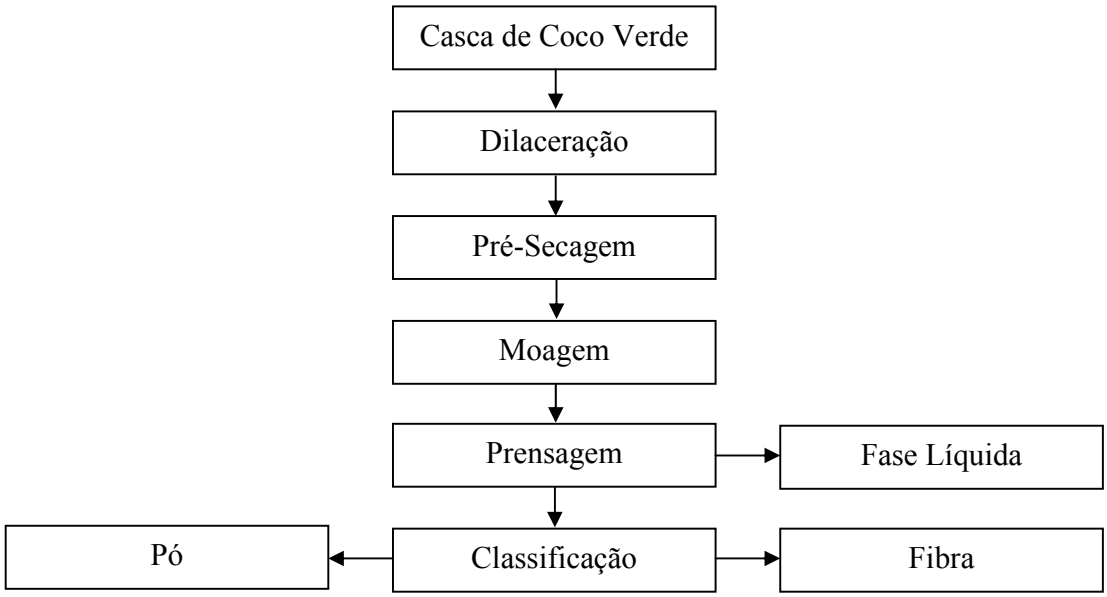


Figura 6: Esquema do Processamento do Coco Verde realizado pela EMBRAPA.

A casca de coco verde, por apresentar uma umidade elevada, em torno de 85%, requer uma etapa de pré-secagem antes da moagem. Assim, após dilaceração, as cascas foram dispostas ao sol e revolvidas diariamente por quatro dias, reduzindo a umidade para

valores em torno de 15 a 20% (PINO, 2005). O material dilacerado e seco foi cominuído em um moinho granulador, onde é produzida uma fração enovelada, a fibra do coco, e uma fração particulada com granulometria heterogênea que é o pó da casca de coco (ROSA *et al.*, 2001). Esse material resultante do processamento da casca do coco verde pode ser observado na Figura 7, a seguir.

(a) **(b)**

Figura 7: Material resultante do processamento da casca do coco verde. (a) Pó (b) Fibra.

A incorporação do pó de coco ao solo contaminado, durante os processos de biodegradação testados, pode causar interferências significativas na estrutura física e química deste solo. Desta forma, foi realizada uma caracterização do pó da casca de coco verde envolvendo etapas de análises físico-químicas, utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV/EDS) e Difração de Raios-X, conforme procedimentos descritos no item 4.1.1. Além disso, foram determinadas a densidade do solo contaminado com a adição do pó de coco como agente estruturante, assim como sua densidade de partícula e porosidade (DEUEL e HOLLIDAY, 1997).

Análises químicas complementares foram realizadas na Coordenação de Análises Minerais (COAM/CETEM) para determinar os teores de carbono orgânico total, nitrogênio, enxofre, fósforo e potássio presentes na amostra. Essas análises foram realizadas tanto para as amostras sólidas, quanto para o solubilizado do pó do coco, tendo em vista que a casca de coco verde pode apresentar altos níveis de cloreto de potássio e de sódio, os quais

poderiam ser solubilizados durante o processo de biodegradação, prejudicando a eficiência do mesmo (CARRIJO *et al.*, 2002). O preparo do solubilizado seguiu a Norma 10.006 de Solubilização de Resíduos (ABNT, 2002).

4.4 Ensaios de Biodegradação

Os ensaios de biodegradação objetivaram determinar as melhores condições para o tratamento de um solo contaminado, haja vista os diversos fatores limitantes a este processo como a presença de microrganismos capazes de degradar o contaminante, nutrientes, pH, temperatura, umidade, oxigênio e o tipo de contaminante (MOLINA-BARAHONA *et al.*, 2004). Os ensaios realizados no desenvolvimento do presente trabalho experimental foram conduzidos em três etapas.

A primeira etapa foi desenvolvida em microcosmos, objetivando definir as melhores condições a serem adotadas nos ensaios seguintes. Nessa fase, alguns fatores limitantes ao processo de biodegradação foram avaliados, a saber: adição de nutrientes, onde foram avaliadas as concentrações e as fontes adequadas; e adição de material estruturante, onde foi avaliado o tipo do estruturante, a concentração e a granulometria do material a serem adotadas.

Na segunda etapa, as melhores condições observadas nos testes em microcosmos foram aplicadas em ensaios de bioremediação com o solo contaminado nos ensaios em biopilhas, ainda em escala de laboratório, porém maior que nos microcosmos.

Na terceira etapa, o ensaio de biodegradação foi desenvolvido em um protótipo de biorreator de fase sólida, aplicando a melhor condição determinada nos ensaios em biopilhas. A partir desses resultados, poder-se-ia estabelecer uma tecnologia de tratamento para o solo contaminado.

A seguir, serão descritos, de forma detalhada, os ensaios realizados em cada uma das etapas citadas anteriormente, assim como as metodologias analíticas de monitoramento adotadas.

4.4.1 Primeira Etapa: Ensaios em microcosmos

Os ensaios foram desenvolvidos em microcosmos que consistiam de um frasco kitazato com rolha de silicone e saída lateral vedada através de um tubo de látex e pinça de Mohr (Figura 8). Nesses frascos foram adicionados 50g do solo contaminado preparado conforme descrito em 4.2.

Figura 8: Foto do microcosmo utilizado nos Testes de Biodegradação.

O teor de umidade foi corrigido individualmente no microcosmo para cada condição testada. Ao solo contaminado, com capacidade de retenção de água igual a 28%, foi adicionada água de forma a se obter um teor de umidade igual a 14%, o que corresponde a 50% da capacidade de retenção de água desse solo.

Os testes foram realizados em duplicata e todos os frascos incubados em estufa a 30°C durante o período de cada teste. Nesse período, os frascos eram retirados periodicamente (diariamente na primeira semana, e a cada 48 h durante o restante do período do teste, exceto finais de semana) para análise cromatográfica do CO_2 gerado no *headspace* do microcosmo (monitoramento da atividade microbiana, cujos maiores detalhes serão fornecidos no item 4.5, de Materiais e Métodos), aeração e correção de umidade, quando necessário.

1º Teste de Biodegradação em microcosmos

O primeiro teste de biodegradação em microcosmos buscou estabelecer a relação nutricional adequada para otimização do processo de biorremediação. Os nutrientes avaliados foram o nitrogênio e o fósforo, os quais foram adicionados ao solo contaminado

na forma dos sais inorgânicos nitrato de sódio ($NaNO_3$) e fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), respectivamente. Os cálculos para adição de nutrientes foram baseados no conteúdo de carbono orgânico total no solo, determinado pelo teor de carbono da matéria orgânica já presente no solo mais o teor de carbono proveniente da contaminação. Adimitiu-se que este último era de 85% da concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo (TRINDADE, 2002).

A descrição das diferentes condições testadas envolvendo a amostra de solo empregada e a relação nutricional adotada são apresentadas na Tabela 7, a seguir.

Tabela 7: Condições adotadas no 1º Teste de Biodegradação em microcosmos.

Condição	**Descrição do Experimento**	
	Amostra de Solo Empregada	**Relação Nutricional Adotada (C:N:P)**
1	SS	100:13:1,5*
2	SC	100:6,86:0,39*
3	SC	100: 6,86:1
4	SC	100:10:0,39
5	SC	100:15:0,39
6	SC	100:20:0,39
7	SC	100:10:1
8	SC	100:15:1
9	SC	100:20:1

SS = solo sem contaminação; SC = solo contaminado
*Relação nutricional natural do solo

As relações nutricionais apresentadas para as condições 1 e 2 foram calculadas conforme citado anteriormente, a partir dos dados de fertilidade desses solos. Na condição 3, foi realizada somente a adição de fósforo. Já as condições 4, 5 e 6, a correção nutricional foi realizada somente pela adição de nitrogênio. As condições 7, 8 e 9 tiveram o teor de nitrogênio e fósforo corrigidos. Todas as relações nutricionais adotadas foram anteriormente testadas para outros solos em projetos de pesquisa no CETEM ou citados por

autores na literatura (SORIANO, 2000; RAIMUNDO e RIZZO, 2004; RAIMUNDO *et al.,* 2004).

O acompanhamento durante os 41 dias de teste foi realizado somente pelo monitoramento da atividade microbiana através da análise do CO_2 gerado, tendo em vista que o objetivo do mesmo foi estabelecer em qual relação nutricional essa atividade microbiana era potencializada.

2º Teste de Biodegradação em microcosmos

O segundo teste de biodegradação em microcosmos visou avaliar o impacto da adição do pó da casca de coco na biodegradação do contaminante e, por isso, somente amostras do solo contaminado foram utilizadas. As frações do pó de coco adotadas foram selecionadas a partir da determinação da densidade do material em diferentes granulometrias, sendo as mesmas agrupadas em dois grupos: *grupo 1*, partículas maiores que 8 mesh (2,38 mm), acima da granulometria do solo e ρ= 0,12 g/mL; *grupo 2*, partículas entre 10 e 20 mesh (1,68 mm e 0,84 mm), abaixo da granulometria do solo e ρ= 0,18 g/mL. A fração abaixo de 20 mesh (0,84 mm) foi descartada, visto que o aumento excessivo da quantidade de material fino nesta proporção poderia prejudicar o tratamento, como, por exemplo, pela absorção da umidade do solo.

A correção de nitrogênio seguiu a melhor condição definida no teste anterior, isto é, a relação C:N:P de 100:10:0,39, na qual a concentração de fósforo é aquela encontrada naturalmente no solo. Além disso, foi também testada como fonte de nitrogênio a adição de uréia comercial (45% de nitrogênio), composto este utilizado como fertilizante agrícola. A adição da uréia como fonte alternativa de nitrogênio busca otimizar a forma de correção deste nutriente em uma escala maior de tratamento (biorreator, biopilha, dentre outros), a fim de reduzir os custos com reagentes. Na Tabela 8, a seguir, são apresentadas as condições adotadas para o segundo teste de biodegradação em microcosmos.

Tabela 8: Condições adotadas no 2º Teste de Biodegradação em microcosmos.

Condições	Fração do pó de coco	Concentração do pó de coco (% p/p)
Controle N	-	-
N1.5	1	5
N2.5	2	5
N1.10	1	10
N2.10	2	10
Controle U	-	-
U1.5	1	5
U2.5	2	5
U1.10	1	10
U2.10	2	10

N - Adição de $NaNO_3$; U - Adição de Uréia; 1 - partículas maiores que 8 mesh (acima da granulometria do solo); 2 - partículas entre 10 e 20 mesh (1,68mm e 0,84mm), abaixo da granulometria do solo.

No acompanhamento durante os 60 dias do segundo teste foi realizado o monitoramento da atividade microbiana pela análise do CO_2 gerado e da contagem de microrganismos heterotróficos totais e degradadores de óleo cru. As análises de contagem foram realizadas nas amostras iniciais e finais, e também em frascos de sacrifício, frascos estes que passaram pelas mesmas condições descritas para as amostras da Tabela 8, até o 20º dia do teste de biodegradabilidade. De forma a complementar a avaliação do segundo teste, foram realizadas análises de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) somente nas condições que apresentaram maior evolução de CO_2.

A avaliação dos fatores descritos anteriormente foi realizada com o auxílio de uma ferramenta estatística cada vez mais aplicada, denominada planejamento experimental. O planejamento é uma técnica bastante utilizada quando se tem duas ou mais variáveis independentes (fatores). Ele permite uma combinação de todas essas variáveis nos níveis testados (Tabela 9), obtendo-se assim a análise de uma variável dependente, sujeita a todas as combinações das demais (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

Tabela 9: Variáveis e níveis estudados no Planejamento Experimental do 2º Teste de Biodegradação em microcosmos.

Variáveis (fatores)	Nível Superior (+1)	Nível Inferior (-1)
Concentração do pó da casca de coco	10%	5%
Granulometria do pó da casca de coco	1	2
Correção de Nitrogênio	Uréia	$NaNO_3$

1 - partículas maiores que 8 mesh (acima da granulometria do solo); 2 - partículas entre 10 e 20 mesh (1,68mm e 0,84mm), abaixo da granulometria do solo.

Esta ferramenta estatística foi utilizada na elaboração dos experimentos, otimizando a variável dependente, no caso a taxa de biodegradação do contaminante, e determinando as variáveis influentes e suas interações sobre essa variável.

3º Teste de Biodegradação em microcosmos

O terceiro teste de biodegradação em microcosmos teve como objetivo comparar o resultado obtido para a adição do pó de coco (segundo teste) com a adição de outros materiais estruturantes passíveis de serem aplicados na biorremediação de solos. Sendo assim, a melhor condição em termos de concentração do pó de coco a ser adicionado ao solo, determinada no segundo teste de biodegradação, foi no terceiro teste reproduzida para outros materiais estruturantes: orgânicos, casca da mamona e serragem, e inorgânico, vermiculita. Desta forma, 10% p/p desses materiais (5 g) com granulometria superior a do solo foram, separadamente, adicionados a 50 g de solo contaminado já com seu teor de umidade ajustado para 50 % da capacidade de retenção de água. Mais uma vez, foi adotada a relação nutricional C:N:P de 100:10:0,39, por meio da correção de nitrogênio utilizando nitrato de sódio ($NaNO_3$) ou uréia comercial (45% de nitrogênio). Um resumo das condições adotadas, incluindo os controles com solo contaminado bioestimulado (apenas correção de nitrogênio), apresenta-se descrito na Tabela 10, a seguir.

Tabela 10: Condições adotadas no 3º Teste de Biodegradação em microcosmos.

Condições	Material Estruturante (10% p/p)		
	Mamona	Serragem	Vermiculita
Controle N	-	-	-
NM	X	-	-
NS	-	X	-
NV	-	-	X
Controle U	-	-	-
UM	X	-	-
US	-	X	-
UV	-	-	X

N = Adição de $NaNO_3$, U = Adição de Uréia

O acompanhamento analítico adotado durante, aproximadamente, 60 dias do terceiro teste envolveu o monitoramento da atividade microbiana pela análise do CO_2 gerado, da contagem de microrganismos heterotróficos totais e degradadores de óleo cru e da concentração de hidorcarbonetos totais de petróleo (HTP). A contagem de microrganismos foi realizada nas amostras iniciais, finais e em frascos de sacrifício, frascos estes que passaram pelas mesmas condições descritas para as amostras da Tabela 10, até o 20º dia do teste de biodegradabilidade. Já as análises de HTP foram realizadas somente nas amostras iniciais e finais.

Neste terceiro teste de biodegradação foi avaliada também a adição dos diferentes materiais estruturantes (pó de coco, mamona, vermiculita e serragem) ao solo sem o óleo contaminante. O objetivo de avaliar estas condições foi quantificar o CO_2 evoluído e, a partir deste, calcular o carbono removido referente somente à atividade microbiana de degradação do material estruturante. Com este resultado, seria possível calcular o carbono removido referente somente a degradação do óleo nas condições descritas na Tabela 10 (adição da mamona, serragem e vermiculita), assim como nas condições com adição do pó de coco (segundo teste). A correção de nitrogênio e fósforo do solo sem contaminação não foi necessária visto que a relação nutricional C:N:P de 100:13:1,5, já é uma relação acima da que vem sendo testada de 100:10:0,39. O acompanhamento foi realizado pela análise de

CO_2 gerado e pela contagem inicial e final de microrganismos heterotróficos totais e degradadores de óleo cru.

4.4.2 Segunda Etapa: Ensaio em Biopilhas

O ensaio em biopilhas visou estudar, em uma escala ampliada, as melhores condições testadas no segundo teste de biodegradação em microcosmos, no qual o pó de coco foi adicionado como material estruturante do solo contaminado. As amostras de solo empregadas foram preparadas conforme descrito no item 4.2 (ensaios em microcosmos) e o pó de coco foi adicionado nas concentrações de 5 e 10% p/p. A correção de nitrogênio foi realizada pela adição de nitrato de sódio e uréia. As condições adotadas são apresentadas na Tabela 11, a seguir.

Tabela 11: Condições adotadas no Ensaio em Biopilhas.

Condições	Correção de Nitrogênio	Concentração do pó de coco
Biopilha 1	-	-
Biopilha 2	$NaNO_3$	5% p/p
Biopilha 3	$NaNO_3$	10% p/p
Biopilha 4	Uréia	5% p/p
Biopilha 5	Uréia	10% p/p

O teste foi realizado em biopilhas de bancada que consistiam de cinco bandejas de polietileno (30 x 20 x 5 cm) de aproximadamente 2,5 L de capacidade total, nas quais, 1500 g do solo contaminado homogeneizado foram adicionados após 72 h da contaminação. A granulometria do pó de coco empregado, acima de 10 mesh (1,68 mm), foi determinada como sendo a mais adequada após os resultados obtidos no segundo teste de biodegradação (item 4.1.1). Na biopilha 1, condição controle, houve somente a correção da umidade do solo contaminado. Na Figura 9, abaixo, segue um registro fotográfico das biopilhas de bancada montadas no laboratório 2 da CPMA do CETEM.

Figura 9: Foto das biopilhas instaladas no Laboratório 2, da CPMA/CETEM.

As biopilhas foram dispostas sob uma coifa, equipada com um sistema de exaustão e com filtro de carvão ativado, para captar os gases possivelmente liberados durante o processo. A temperatura média registrada nas biopilhas foi de 22ºC, visto que as mesmas foram instaladas no interior do laboratório climatizado. Semanalmente, o conteúdo das bandejas era arado manualmente com o auxílio de um ancinho, simulando desta forma a aeração por revolvimento mecânico. A cada quinze dias, o teor de umidade era ajustado pela diferença de massa com relação a massa total inicial.

Durante os 180 dias do ensaio, foram retiradas mensalmente amostras das biopilhas para o acompanhamento do processo de biodegradação através da determinação da concentração de óleos e graxas, da contagem de microrganismos heterotróficos totais e degradadores de óleo e da concentração de hidorcarbonetos totais de petróleo (HTP), conforme metodologia a ser descrita. Até a realização das referidas análises, as amostras foram estocadas em câmara fria a 4ºC.

4.4.3 Terceira Etapa: Ensaio em Biorreator

A aeração do sistema solo/contaminante/microrganismos/aditivos é um dos fatores que mais interferem na taxa de degradação do contaminante. Assim, esse ensaio objetivou comparar diferentes formas de promover a aeração e a homogeneização do sistema, empregando a melhor condição determinada no ensaio em biopilhas, a qual também foi avaliada em microcosmos (segundo teste).

O teste foi conduzido em um protótipo de biorreator (Figura 10) no qual o solo contaminado era mantido sob agitação através do movimento rotacional do eixo central (4 rpm). A taxa de ocupação de 40%, correspondente a 8 Kg de material seco, foi determinada

como carga máxima aplicável, durante a avaliação da resistência do corpo do tambor fixo, confeccionado em acrílico para a melhor visualização do comportamento do solo durante a realização dos testes (RAIMUNDO e RIZZO, 2002). Desta forma, foram adicionados ao reator 7,3 Kg de solo contaminado preparado conforme descrito no item 4.2, além de 700 g de pó de coco verde, chegando a uma concentração de 10% p/p de material estruturante. A baixa densidade do pó de coco elevou o volume do material no interior do reator, tornando menos efetivo o revolvimento promovido pelo eixo central do mesmo. Com isso, fez-se necessária a retirada de aproximadamente 2 kg do material no interior do biorreator.

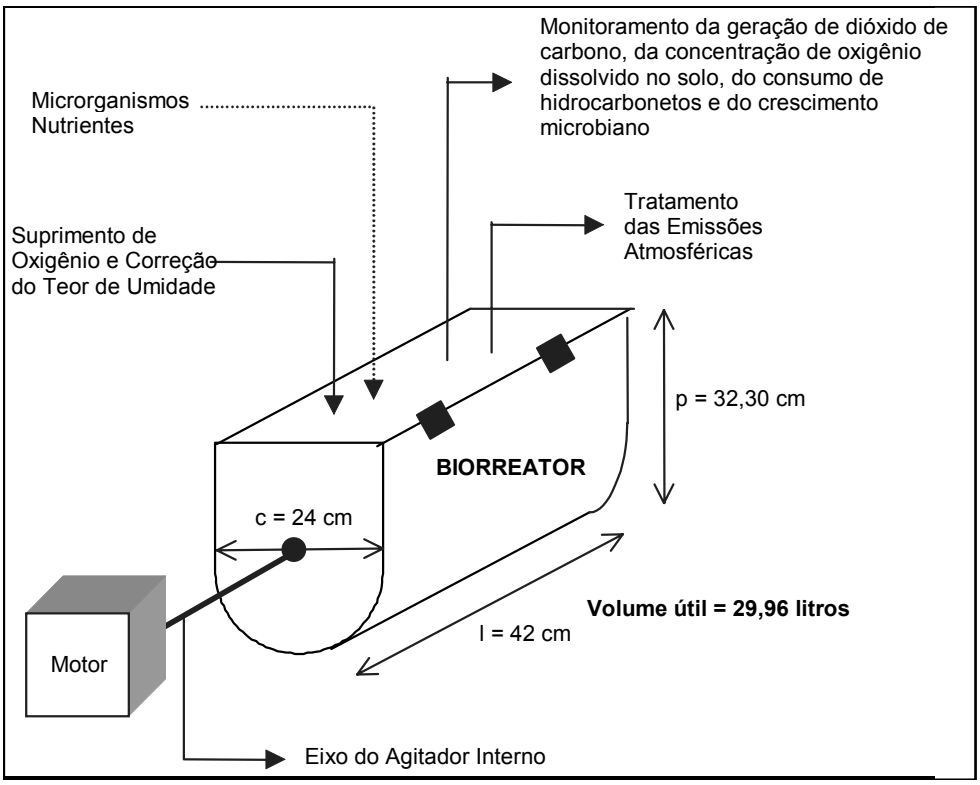


Figura 10: Esquema representativo do protótipo de biorreator de fase sólida empregado no Ensaio de Biodegradação.

Durante os 80 dias do ensaio em biorreator, o acompanhamento foi realizado retirando-se amostras semanais, nas quais foram determinadas a concentração de óleos e graxas, a contagem de microrganismos heterotróficos totais e degradadores de óleo e a concentração de hidorcarbonetos totais de petróleo (HTP).

Maiores detalhes sobre o protótipo de biorreator de fase sólida não podem ser fornecidos, pois o desenvolvimento do mesmo faz parte de uma dissertação de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Tecnologias de Processos Químicos e Bioquímicos, da Escola de Química, a qual se encontra em fase final de redação.

4.5 Metodologias Analíticas de Monitoramento dos Ensaios de Biodegradação

A seguir, são apresentadas as metodologias analíticas utilizadas no monitoramento dos ensaios de biodegradação.

Análise Cromatográfica do CO_2 gerado

Com o auxílio de uma seringa para análise cromatográfica, foram injetadas, no cromatógrafo a gás (CG) com detector de condutividade térmica (TCD), 0,5 ml dos *headspaces* dos sistemas de microcosmos testados. Todas as injeções foram realizadas em duplicata, e os resultados foram avaliados em termos de evolução de CO_2 ao longo do tempo. As condições gerais empregadas durante o ensaio encontram-se listadas abaixo.

- Equipamento: Cromatógrafo HP 5890
- Vazão do gás de arraste (He): 17,5 mL/min
- Vazão do gás de referência (He): 29,0 mL/min
- Temperatura do forno: 105°C
- Temperatura do injetor: 160°C
- Temperatura do detector: 220°C
- Coluna de aço inox (3m/3mm) recheada com Chromosorb 102

Como os valores de CO_2 quantificados são fornecidos pelo equipamento pela porcentagem de área do pico em função do tempo de retenção, foi necessária a calibração do aparelho com uma curva de calibração (0 a 5000 μmol CO_2). Essa curva estabelece a conversão da % de área de CO_2 evoluído, e quantificado em CG, em μmoles de CO_2. Por estequiometria, é possível calcular o teor de carbono removido.

A reação entre o carbonato de sódio ($CaCO_3$) e o ácido clorídrico (HCl) foi aplicada na referida padronização, utilizando o sistema de microcosmo, no qual uma massa inicial conhecida do sal diluída em 50 mL de água destilada foi adicionada. No sistema já vedado, com o auxílio de uma seringa comum, foram adicionados volumes do acido clorídrico suficientes para garantir a reação total com o sal permitindo por cálculo estequiométrico determinar a massa de CO_2 liberada.

Quantificação dos Microrganismos Heterotróficos Totais e Microrganismos Degradadores

O estudo da diversidade microbiana nos solos é essencial tanto para a definição de estratégias para preservação de biomassa quanto para o desenvolvimento de sistemas indicadores de alterações ambientais associadas a distúrbios, como a presença de poluentes (LAMBAIS *et al.*, 2005). Desta forma, utilizou-se a quantificação de microrganismos heterotróficos totais e degradadores de petróleo como indicativo do processo de biorremediação e de possíveis alterações da população microbiana, decorrente deste processo. Ambas as análises foram realizadas a partir da extração do solo e posterior cultivo dos microrganismos em meios específicos.

A quantificação de microrganismos heterotróficos totais seguiu metodologia adotada por Trindade (2002). A primeira etapa desta análise consiste na extração da microbiota do solo, realizada pela adição de 5 g de solo a 50 mL de solução salina (NaCl 0,9%). Após agitação em shaker por 1 hora, à 25ºC e 150rpm, o extrato obtido foi diluído através de diluições decimais sucessivas, na razão extrato:solução salina de 1:9. Em seguida, realizou-se o plaqueamento em meio orgânico sólido (Tabela 12) pela técnica de *pour-plate*, adicionando 0,1 mL das diluições em placas de Petri. As placas foram incubadas em estufa a 30ºC por 48 horas, quando então foi contado o número de unidades formadoras de colônias (resultados expressos em UFC/g solo).

Tabela 12: Composição do meio orgânico sólido

Componente	Concentração (g/L)
Glicose	10,0
Peptona de Carne	5,0
Extrato de Lêvedo	2,0
NaCl	5,0
Agar-Agar	20,0

A contagem dos microrganismos degradadores de hidrocarbonetos no solo contaminado foi realizada pelo método de número mais provável (NMP) com cinco replicatas, em placas de cultura de células – TPP (TRINDADE, 2002). O meio mineral líquido (Tabela 13) foi o diluente e o óleo cru serviu como única fonte de carbono.

Tabela 13: Composição do meio mineral líquido

Componente	Concentração (g/L)
NaCl	5,0
K_2HPO_4	1,0
$NH_4H_2PO_4$	1,0
$(NH_4)_2SO_4$	1,0
$MgSO_4.\ 7H_2O$	0,2
KNO_3	3,0

As etapas de extração e diluição foram idênticas às descritas para a contagem de microrganismos heterotróficos totais. Em seguida, 0,1 mL das diluições foram adicionados nos poços das placas de NMP contendo 1,8 mL de meio mineral cada. Então, foram adicionados 10 μL de óleo cru. As placas de NMP foram incubadas a 30°C por 7 dias e examinadas, sendo o teste considerado positivo para a presença de microorganismos degradadores de óleo pelo desaparecimento do óleo ou crescimento microbiano. Essa avaliação utilizava a comparação visual com o controle sem inóculo.

Análise do teor de óleos e graxas

O teor de óleos e graxas nas amostras de solo foi determinado através do método gravimétrico. Para tanto, 2 g de solo contaminado foram extraídos três vezes no ultrassom, utilizando aproximadamente 25 mL de n-hexano como solvente em cada vez. O extrato orgânico obtido foi passado em um sistema de filtração contendo sulfato de sódio anidro. Em seguida, este extrato foi concentrado em rotoevaporador até 10 mL e, em seguida, levado à secura em concentrador de amostras com purga de nitrogênio. O teor de OG foi determinado por diferença de massa. Essa metodologia foi adaptada do método USEPA3550B e registrada na biblioteca do CETEM (método IT2003-001-00).

Análise da Concentração de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo

A análise dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) nas amostras de solo foi realizada no extrato obtido com equipamento ASE (*Accelerated Solvent Extractor*), modelo 200 da Dionex. Após eliminar a umidade da amostra de solo através da adição de sulfato de sódio anidro, 2 g da amostra desidratada foram colocados na célula de aço inox com capacidade de 33 mL. Em seguida, foram adicionados 4 mL de diclorometano na célula iniciando-se o processo automático de extração. O extrato é transferido para o copo concentrador do equipamento Turbovap Modelo II, no qual é concentrado até o volume de 1 mL (SEABRA, 2005). Esse concentrado foi então levado ao cromatógrafo a gás HP5890 (com coluna cromatográfica HP-5), para a determinação dos HTP, seguindo metodologia USEPA8015B (USEPA, 1996). As referidas análises foram realizadas pelo laboratório de Resíduos e Áreas Impactadas da Gerência de Biotecnologia e Tratamentos Ambientais do CENPES/PETROBRAS.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A prática de remediação de solos e águas subterrâneas é normalmente uma tarefa complexa e exige o envolvimento de profissionais qualificados e experientes na elaboração de diagnósticos precisos para definir a alternativa mais adequada para cumprimento dos padrões pré-estabelecidos em projeto. Assim, o conhecimento das atuais tecnologias de remediação, suas limitações, relações custo-benefício e aplicabilidade, quanto às questões hidrogeológicas e da natureza dos contaminantes, são determinantes para o sucesso do programa de remediação (NOBRE *et al*. *apud* ANTONIO, 2005). Por exemplo, na biorremediação de solos contaminados por compostos orgânicos, como os derivados de petróleo, a escolha e a eficácia do tratamento estão diretamente ligadas ao conhecimento de informações a respeito da concentração residual do óleo, características físico-químicas e microbiológicas (densidade populacional de microrganismos degradadores e seu potencial para a biodegradação) do solo e, quando utilizado um material estruturante como auxiliar no processo de biorremediação, faz-se necessária também a caracterização físico-química desse material (CHOI *et al.*, 2003; BENTO *et al.*, 2005).

5.1. Caracterização do solo

A interação solo/contaminante, em geral, é bastante complexa, já que são muitos os fenômenos físicos, químicos e biológicos que podem ocorrer simultaneamente. A qualidade do solo pode ser alterada devido a fatores como acúmulo de defensivos agrícolas e fertilizantes, disposição de resíduos sólidos (urbanos, industriais, materiais tóxicos e radioativos) e vazamentos de produtos químicos, como o petróleo (ANTONIO, 2005).

Todas as etapas que compõem a cadeia produtiva do petróleo, desde a prospecção até o consumo final, a produção em terra e o refino são as que potencialmente podem vir a contaminar os solos. Essa contaminação pode ocorrer, principalmente, pela disponibilização de resíduos oleosos como a lama dos separadores água óleo, sedimentos do fundo dos tanques de armazenamento do óleo cru e derivados, borras oleosas, argilas de tratamento e sólidos emulsionados em óleo, além do possível vazamento originado acidentalmente (TRINDADE, 2002). Por esse motivo, o solo, proveniente do campo de

Carmópolis (SE), maior acumulação em terra da PETROBRAS (PETROBRAS, 2006), foi escolhido para aplicação no presente trabalho.

A caracterização do solo através de análises químicas, granulométricas e mineralógicas auxilia muito no entendimento da interação solo/contaminante. Assim, na presente dissertação, essa caracterização foi realizada de forma a complementar os dados já obtidos em trabalhos anteriores realizados por pesquisadores do CETEM, nos quais foram definidas as distribuições granulométricas, densidades de partículas e do solo, porosidade, pH, capacidade de retenção de água e matéria orgânica do solo sem contaminação (dados apresentados na Tabela 5, do item 4.1.1 de Materiais e Métodos).

A partir dos dados de distribuição granulométrica do solo sem contaminação (73% de areia, 14% de silte e 11% de argila) e utilizando o Diagrama Triangular adotado pela Sociedade Brasileira do Solo (item 3.5 da Revisão Bibliográfica), onde as diferentes classes texturais estão delimitadas, foi possível determinar a textura do solo, classificando-o como FRANCO-ARENOSO. Sabe-se que a textura de um solo influencia bastante na forma de tratamento do mesmo, pois é fator preponderante na interação solo/contaminante. A exemplo disso, Antonio (2005) observou no seu estudo que a migração de um contaminante foi maior em um meio poroso saturado constituído por três camadas homogêneas de areia do que em outro de mesma constituição, com uma camada adicional de argila. Para isso o autor realizou os experimento com os dois diferentes meios, coletando amostras de diferentes profundidades, e observou que no meio constituído somente com areia, maiores concentrações do contaminante foram observadas em pontos mais profundos. Isto acontece porque a alta capacidade de retenção da camada de argila faz com que a concentração do contaminante seja menor em maiores profundidades comparado com o solo sem argila.

A caracterização complementar envolveu a determinação dos mesmos parâmetros já determinados para o solo sem contaminação, determinados agora para o solo contaminado, com exceção da distribuição granulométrica. Isto porque durante o ensaio para a determinação da distribuição granulométrica de um solo, o mesmo é passado por diversas peneiras e realizar esse procedimento com um solo contaminado por petróleo alteraria o resultado real, tendo em vista o efeito aglomerante do óleo sobre as partículas do solo, principalmente sobre as frações silte e argila (TRINDADE, 2002). Foram realizadas também análises químicas do solo contaminado para determinar a sua fertilidade, quanto à

concentração dos macronutrientes nitrogênio, fósforo e carbono. A Tabela 14, a seguir, apresenta os resultados da caracterização do solo contaminado.

Tabela 14: Caracterização do solo de Carmópolis contaminado em laboratório com 5% p/p de óleo Sergipano Terra.

Caracterização	**Solo Contaminado**
Densidade da Partícula (g/mL)	1,4
Densidade do solo (g/mL)	1,2
Porosidade (%)	16
pH	6,4
Capacidade de Retenção de água (%)	28
Matéria orgânica (%)	5,8
Nitrogênio (g/Kg)	2,3
Fósforo (g/Kg)	0,13

Os resultados observados demonstram uma notável alteração na densidade de partícula, porosidade, capacidade de retenção de água e matéria orgânica, quando comparados com os resultados obtidos para o solo sem contaminação (2,2 g/mL; 43%; 34% e 1,7%; respectivamente). Essa alteração das características do solo é devida principalmente à presença do óleo cru que altera a porosidade preenchendo os poros vazios do solo, o que também interfere diretamente na capacidade de retenção de água tendo em vista que reduz a sua permeabilidade e aumenta a sua hidrofobicidade. A porosidade é a capacidade que o solo tem de armazenar água, dependendo diretamente dos poros vazios e se estes estão interconectados para permitir que a água flua livremente. Isto porque, uma vez penetrado no solo, o contaminante impede a adesão e/ou coesão entre as moléculas de água e os poros capilares da superfície das partículas sólidas, que são formadas na determinação da capacidade de retenção de água (LUCHESE *et al.,* 2001; ANTONIO, 2005).

Uma análise mineralógica foi realizada a fim de obter informações a respeito do tipo de minerais presentes no solo, principalmente os argilo-minerais. A estrutura e arranjo dos

argilominerais presentes em um solo conferem a este maior ou menor forças de atração e repulsão, influenciando no grau de coesão, principalmente quando este é umedecido (TRINDADE, 2002). Todavia, algumas técnicas de caracterização mineralógica apresentam limitações quanto à presença dos contaminantes, a exemplo da microscopia eletrônica de varredura (MEV) onde a amostra de solo experimenta pressões muito baixas (alto vácuo) podendo levar a volatilização dos compostos orgânicos, quando da contaminação por petróleo, por exemplo.

Desta forma, o solo sem contaminação foi empregado na caracterização mineralógica por microscopia eletrônica de varredura e por difração de raios X, já que a utilização do material contaminado poderia causar danos aos equipamentos. Tal observação é considerada satisfatória por Soriano (2000), já que o objetivo é a determinação das características elementares da matriz do solo, e não do óleo cru, utilizado como contaminante.

Difração de Raios X (DRX)

A técnica de difração de raios X é a mais indicada na determinação das fases cristalinas de solos. Ela se baseia na ordenação dos átomos dos sólidos presentes no solo em planos cristalinos separados entre si por distâncias da mesma ordem de grandeza dos comprimentos de onda dos raios X. Assim, ao incidir um feixe desses raios em um cristal, o mesmo interage com os átomos presentes, originando o fenômeno de difração (ALBERS, 2002). A metodologia é simples e o resultados obtidos (o perfil de difração) são característicos para cada fase cristalina, definindo o mineral presente. A seguir, são apresentados os difratogramas obtidos da amostra sem fracionamento e não orientada (amostra bruta) e da amostra de solo orientada após remoção da matéria orgânica (MO) (Figuras 11 e 12, respectivamente).

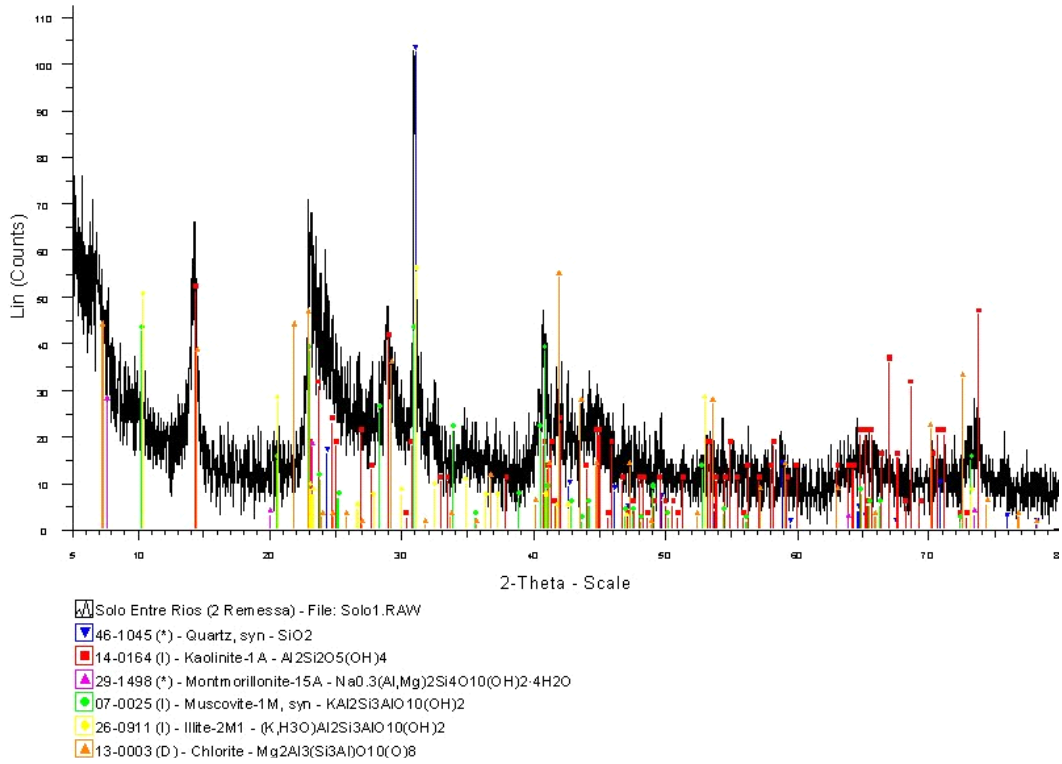


Figura 11: Difratograma de raios X da amostra de solo bruta.

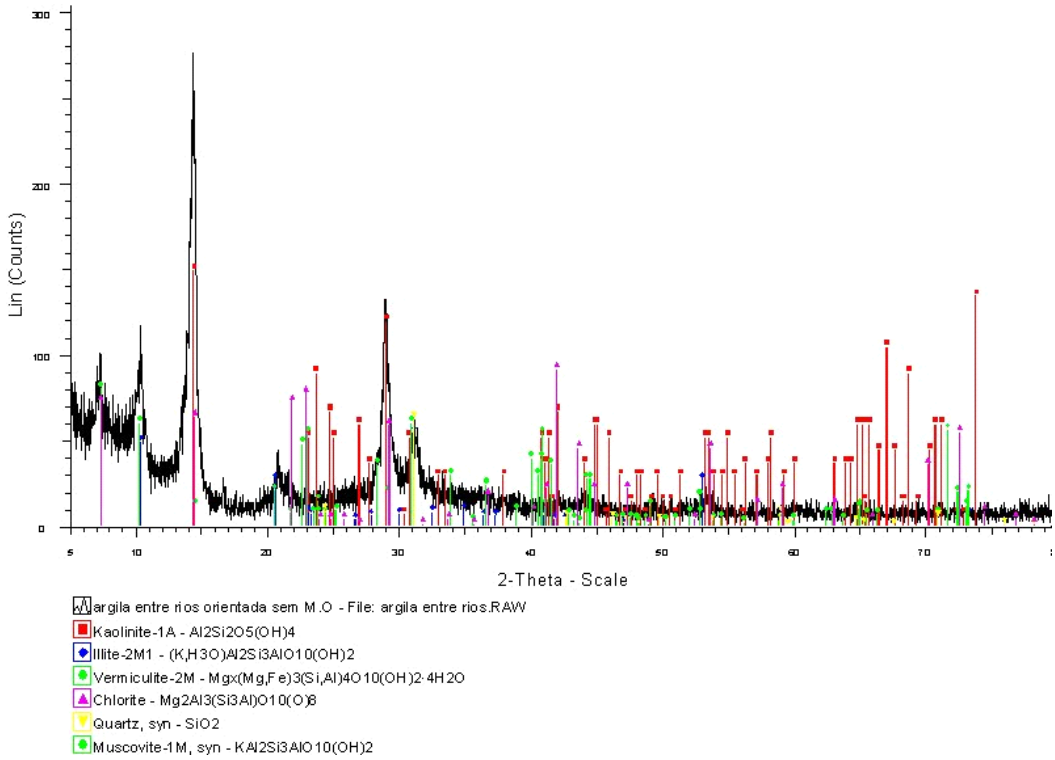


Figura 12: Difratograma de raios X da amostra solo orientada sem matéria orgânica.

Foram identificados na amostra bruta do solo os minerais quartzo, caulinita, muscovita e illita, além de pelo menos uma fase com pico em aproximadamente 14 Å, que poderia ser dos grupos da clorita, vermiculita ou esmectita. O elevado teor de quartzo da amostra e sua facilidade de orientar-se resultam em picos bem definidos e de grande intensidade na fase cristalina de argilo-minerais, prejudicando muitas vezes a identificação e caracterização das demais fases (ALBERS, 2002). Por isso, foi realizada a análise do material fino orientado, preparado pela sedimentação dos argilo-minerais seguida da remoção da matéria orgânica, possibilitando uma melhor caracterização da amostra na região de baixo ângulo, evidenciando picos em 14,38 e 9,94 Å. O primeiro pico pode estar relacionado à vermiculita, esmectita ou clorita, e o segundo à muscovita ou illita. A identificação entre essas fases minerais coincidentes seria possível por meio de tratamentos mais específicos como glicolação e aquecimento, no entanto estes não foram realizados.

Os componentes inorgânicos da fase sólida do solo podem ser divididos em minerais primários, que não sofrem alterações após a cristalização do magma, e secundários, que são resultantes da decomposição dos minerais primários e da precipitação dos produtos de decomposição. Assim, de acordo com os resultados apresentados os minerais primários identificados foram o quartzo e a muscovita, esta última representante principal das micas.

A muscovita apresenta altas quantidades de potássio (aproximadamente 13,9% em K_2O), porém esse mineral não se constitui em uma reserva desse elemento nos solos, pois é altamente resistente ao intemperismo químico. Apesar do fácil plano de clivagem a muscovita é influenciada fundamentalmente por agentes físicos, dificultando a liberação do potássio, devido às fortes ligações entre as lâminas tetraédricas e octaédricas.

O quartzo nada mais é que o dióxido de silício em estado cristalino, apresentando-se na natureza como parte constituinte de numerosos minerais e na fração grosseira dos solos (areia e silte). Este não se apresenta como fornecedor de qualquer nutriente e sua presença caracterizam solos normalmente de pouca fertilidade, com baixa capacidade de retenção de cátions e facilmente laváveis pela água de percolação.

Segundo Polivanov (2006), os argilo-minerais (minerais secundários) mais freqüentes no solo são a caulinita, a montmorilonita e as ilitas. Esses três minerais foram

identificados na análise mineralógica apresentada, além de uma possível ocorrência de vermiculita, esmectita e/ou clorita.

A caulinita é constituída por lâminas tetraédricas e octaédricas contendo, respectivamente, o silício e o alumínio no centro. Essas lâminas são unidas por pontes de hidrogênio, formando uma estrutura rígida e não expansível, sofrendo alterações somente na sua superfície externa, com reduzida importância em solos agrícolas.

Já os minerais vermiculita, esmectita, montmorilonita (esmectita rica em magnésio) e ilita são formados pela união de 2 lâminas tetraédricas de silício, intercaladas por uma lâmina octaédrica de alumínio, unidas por ligações entre oxigênios. Esses minerais possuem capacidade de expandir-se, de modo diferente da caulinita, apresentando faces ativas entre as camadas, aumentando a superfície de contato, sendo essas partículas mais participantes nos processos que ocorrem no solo. As cloritas são minerais tetralaminares, onde o silício é substituído pelo alumínio nos tetraedros (LUCHESE *et al.*, 2001).

A realização da análise por difração de raios X auxilia muito na identificação dos minerais presentes no solo, sendo de grande importância para interpretar o comportamento deste. A presença de minerais argilosos confere ao solo um comportamento agregante, devido à alta atividade eletrolítica desses minerais, além de dificultar a passagem de água em conseqüência do reduzido tamanho e grande aproximação das partículas. Já a presença de elevados teores de quartzo e outros minerais primários, constituintes da fração arenosa, confere ao solo uma maior plasticidade, porosidade (maior aeração) e permeabilidade. Embora as propriedades físico-químicas do silte sejam intermediárias entre as propriedades da argila e da areia, sob o prisma mineralógico o silte assemelha-se à areia (KITAMURA, 2004; ANTONIO, 2005).

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é utilizada em várias áreas do conhecimento, incluindo a mineralogia. O uso desta técnica vem se tornando mais freqüente por fornecer informações de detalhe, com aumentos de até 300.000 vezes. A imagem eletrônica de varredura é formada pela incidência de um feixe de elétrons no mineral, sob condições de vácuo.

A Figura 13, a seguir, apresenta as micrografias obtidas para o solo sem contaminação, variando o aumento utilizado, aumentos esses na faixa de 50 a 1500 vezes.

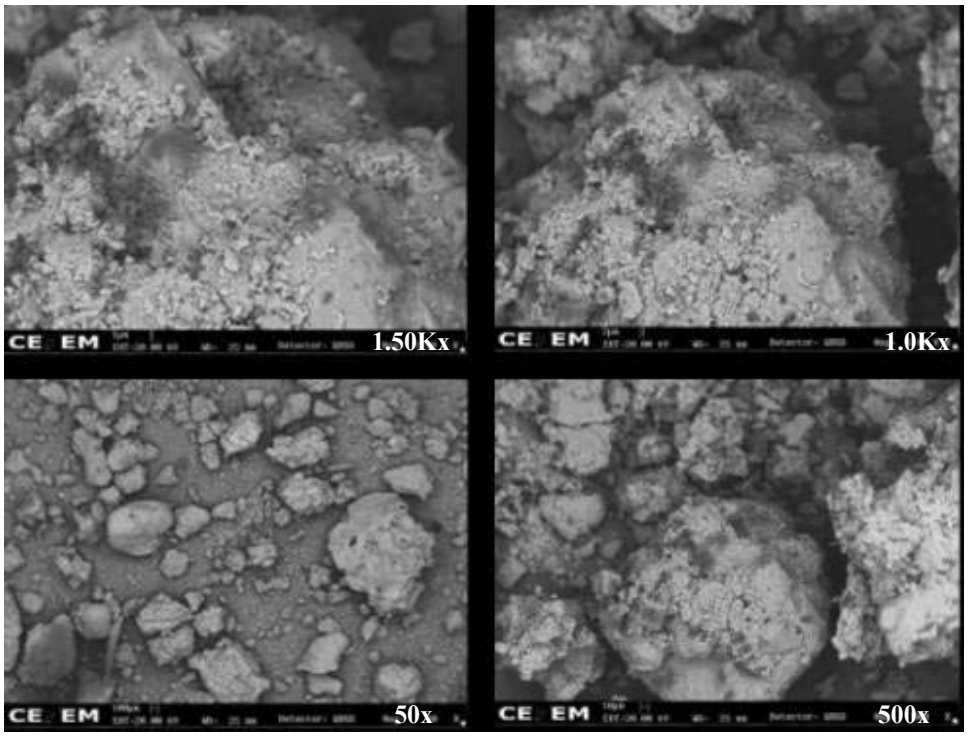


Figura 13: Micrografia obtida pelo MEV de partículas do solo sem contaminação.

O MEV pode ser acoplado ao EDS (*Energy Dispersive System*), o qual possibilita a determinação da composição qualitativa e semiquantitativa das amostras, a partir da emissão de raios X característicos. Os minerais não condutores de corrente elétrica para serem analisados no MEV/EDS devem ser previamente metalizados. A metalização consiste na precipitação, a vácuo, de uma película micrométrica de material condutor (ouro, prata ou carbono) sobre a superfície do mineral, possibilitando a condução da corrente elétrica. Foram obtidos espectros de composição química qualitativa por dispersão de energia (Figura 14), em pontos de áreas de aproximadamente 2 μm, selecionados nas imagens apresentadas na Figura 13, anterior.

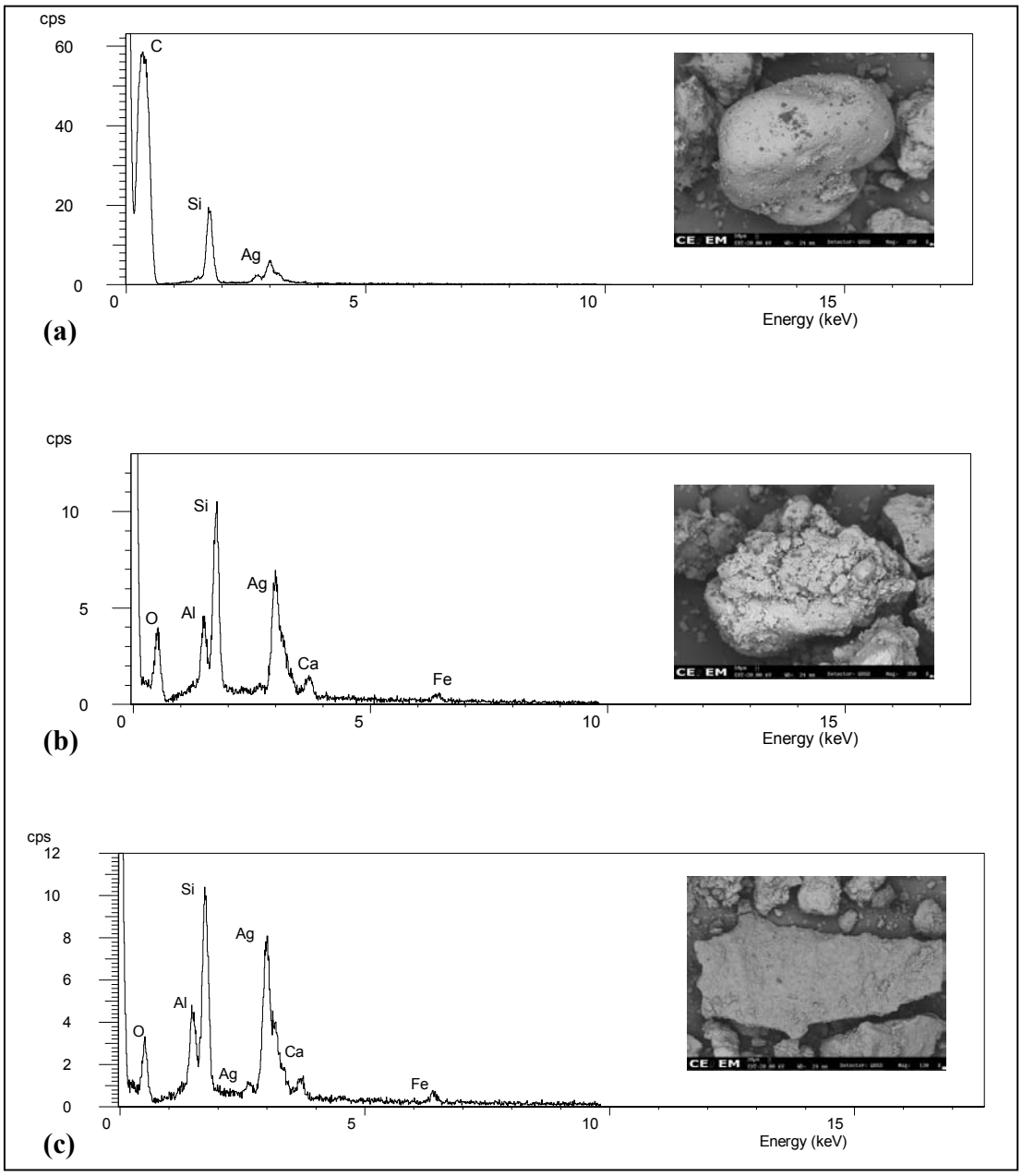


Figura 14: EDS de partículas do solo sem contaminação (a) 250x; (b) 350x; (c) 120x.

Nas observações ao MEV para o solo sem contaminação, observa-se a predominância de elementos como Si, C, O, Al, Ca e Fe (em menor proporção). Não foram detectados minerais pesados, tais como Zr, Ti e Terras Raras o que, segundo Soriano (2000), aponta para um solo originário do horizonte A.

A Figura 14a representa a matéria orgânica provavelmente agregada a uma partícula mineral do solo, tendo em vista a presença de carbono na análise de EDS. As Figuras 14b e 14c representam argilo-minerais presentes no solo, em específico aluminossilicatos como vermiculita, montmorilonita, ilita, vermiculita, esmectita e/ou clorita. A ilita é considerada o argilo-mineral com considerável substituição do Al^{3+} da camada octaédrica por Fe^{3+} e do K^{+} interlaminar por Ca^{2+}, logo a presença deste mineral é incontestável. Porém, a confirmação da presença dos demais minerais identificados por difração de raios X não foi possível devido à presença destes na forma de aglomerados, não apresentando características reconhecíveis ao microscópio eletrônico (ARCHELA, 2007). Segundo Soriano (2000), uma discussão mais detalhada para avaliar os minerais que compõe o solo requer a determinação da composição química do mesmo, a qual não foi realizada.

A realização de uma caracterização mineralógica do solo é importante, pois, como já dito anteriormente, elucida, principalmente, os minerais presentes na fração argila, fração determinante no comportamento mecânico dos solos, bem como nas interações solo/contaminante (SORIANO, 2000).

Como o MEV utilizado foi um modelo convencional, o qual requer condições de alto vácuo no interior da câmara de amostras e a metalização de materiais como solo, rocha, concreto ou cerâmica, pode mascarar informações e eventualmente destruir feições estruturais delicadas, incapazes de resistirem a condições de alto vácuo. Esta característica do MEV convencional impede ainda a observação de amostras úmidas, bem como de quaisquer fenômenos ou reações que ocorram na presença de uma fase líquida ou gasosa, objetivo secundário desta determinação na presente dissertação que era observar em MEV a interação solo/contaminante. No entanto, tal análise poderia ser realizada em um MEV ambiental cujo sistema de vácuo especial utiliza pequenas câmaras intermediárias entre a câmara de amostras e detectores projetados especialmente para operarem com pressões de vapor d'água (ou de outros gases) no interior da câmara de amostras entre 1,0 e 10 Torr (RODRIGUES, 2003).

Com a finalidade de investigar a influência do esgoto doméstico no comportamento colapsível de um solo arenoso do interior do Estado de São Paulo, Rodrigues (2003) utilizou, dentre diversos outros ensaios, o programa experimental apoiado em ensaios de caracterização dos solos pela microscopia eletrônica de varredura em MEV ambiental, no

solo antes e depois do experimento de compressão confinada (ensaio endométrico). Com isso o autor conseguiu observar as alterações nas microestruturas dos solos antes e depois de terem sofrido o colapso cuja causa foi associada à dissolução do cimento aglutinante ou ainda a redução na resistência ao cisalhamento das argilas. Tais fatores dificilmente poderiam ser observados em um MEV convencional.

Os resultados observados indicaram que o solo em estudo apresenta características que propiciam uma elevação da aglomeração do mesmo, o que seria agravado após a contaminação artificial do mesmo, reduzindo a eficiência do processo de biodegradação. Por difração de raios X, tal efeito foi observado devido a presença de minerais argilosos identificados no solo sem contaminação, sendo agravado pela presença de matéria orgânica nos aglomerados minerais conforme observado pelo MEV. O resultado dessa caracterização justifica a adição de agentes estruturantes durante o processo de biorremediação de um solo contaminado por petróleo, com o objetivo de reduzir a aglomeração do sistema solo/contaminante.

5.2 Caracterização do pó da casca de coco verde

O emprego do resíduo de cascas de coco é muito freqüente devido as suas excelentes propriedades estruturais naturais. Esse resíduo vem sendo aplicado em diversos processos que consideram a reutilização tanto na forma de fibra, quanto na forma de pó, o qual é obtido no processo de separação das fibras da casca de coco verde.

Macedo *et al.* (2004) empregou o pó da casca de coco verde na produção de carvão ativado. O carvão obtido possuía elevada área superficial e estrutura mesoporosa uniforme, resultantes da capacidade de adsorção e resistência mecânica do pó da casca de coco. O autor destacou como grande importância no seu estudo a etapa de caracterização do resíduo antes e depois da pirólise para obtenção do carvão ativado. Tal caracterização foi realizada por microscopia eletrônica de varredura, análise termogravimétrica, porosimetria e capacidade de adsorção de corantes orgânicos.

A caracterização do pó de coco, a ser utilizado como material estruturante objetivou determinar possíveis interferentes no processo de biorremediação. Desta forma, foi realizada uma análise química do material sólido, mas também da fase líquida proveniente

da lavagem desse material (material solubilizado), pois a simples correção de umidade do solo, essencial para o processo, poderia vir a aumentar o teor dos íons presentes no mesmo quando adicionado o pó de coco como estruturante. A presença desses íons poderia interferir no metabolismo microbiano, ora pelo aumento da força iônica, ora pela inibição por excesso de nutrientes. Alguns autores recomendam uma lavagem, no pré-tratamento do pó de coco, para utilização em alguns processos, indicando que a lavagem reduziria os íons hidrossolúveis presentes no material (BISMARCK *et al.*, 2001; PINO, 2005; GOMES *et al.*, 2004). Os resultados das análises realizadas pela Coordenação de Análises Minerais (COAM) do CETEM são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Caracterização química do pó de coco e do seu solubilizado.

Amostra	COT Tratada*	C Não tratada	S	N Total	K	P
S1**	0,20%	0,30%	0,015%	24,5 mgL^{-1}	418 mgL^{-1}	23,2 mgL^{-1}
S2**	0,15%	0,20%	0,02%	20,2 mgL^{-1}	430 mgL^{-1}	22,4 mgL^{-1}
Pó	32,3%	38,9%	0,06%	0,46%	0,74%	0,50%

*Análise de Carbono Orgânico Total (COT) foi realizada na amostra após tratamento ácido com HCl 50%.
** Fase líquida do processo de lavagem do pó de coco (material Solubilizado).

O elevado teor de carbono orgânico total é devido ao elevado teor de matéria orgânica presente no resíduo do coco, o qual é composto principalmente por lignina, cerca de 35 a 45%, e celulose, cerca de 23 a 43% (PINO, 2005). Na natureza, as longas cadeias poliméricas da celulose compõem as fibras que dão resistência às plantas. Essas fibras, por sua vez, são mantidas unidas pela lignina, que age como um agente aglutinante. A combinação das duas confere às plantas flexibilidade e resistência (GOMES *et al.*, 2004). Segundo Coelho *et al.* (2001), a maioria dos rejeitos agroindustriais possuem grandes quantidades de celulose, hemicelulose, pectina e outros biopolímeros.

Na caracterização da fibra do coco realizada por Bismark *et al.* (2001) foram destacadas diversas propriedades mecânicas desta fibra (tensão de cisalhamento, elongação, etc.), além da composição química em comparação com o sisal que pode ser verificada na Tabela 16, a seguir.

Tabela 16: Composição química de fibras de coco e sisal.

Fibra	Celulose (%)	Lignina (%)	Hemicelulose (%)
Sisal	67-78	8-11	10-14
Coco	36-43	41-45	0,15-0,25

Adaptado de BISMARCK *et al.,* 2001.

O material fibroso do coco, que dá origem ao pó, é uma fibra lignocelulósica que pela sua dureza, durabilidade e outras vantagens, é utilizada na produção de materiais de cobertura de solos, para reduzir a erosão. No entanto, esses produtos da fibra do coco consomem somente uma porcentagem pequena da produção mundial total de casca de coco. Um grande incentivo à utilização da fibra do coco é a reutilização e conseqüente minimização de disposição de um resíduo, além do fator econômico, pois esta fibra é mais barata que o sisal e a juta, fibras naturais muito empregadas em diversos setores, sendo a relação de custo coco:sisal:juta = 1:1,5:2 (BISMACK *et al.,* 2001).

Savastano Jr. e Pimentel (2000) testaram o pó do coco na fabricação de telhas produzidas a partir de compósitos reforçados com essas fibras residuais, reforçando matrizes frágeis, à base de cimento Portland, para aumentar a sua ductilidade. A vantagem da utilização do pó de coco, destacada pelo autor, está no reduzido valor de mercado desse resíduo (US$ 90 t^{-1}) quando comparado a fibras de polipropileno (US$ 900 t^{-1}), por exemplo, e significativo potencial de produção (alta relação resíduo/produção). Além disso, características microestruturais justificaram a superioridade da fibra de coco, no que se refere à durabilidade em meios alcalinos. Porém, o autor destaca como um ponto fraco a etapa de pré-tratamento que envolve a separação do pó e secagem. As telhas originadas do compósito formado pela matriz e o pó de coco ficaram dentro das especificações de normas técnicas, apesar do maior suporte de carga e menor absorção de água apresentada pelo padrão sem fibra.

Uma forma de acompanhar as alterações do pó ou fibra de coco utilizados em programas de transferência tecnológica, como incorporação formando fibrocimentos (SAVASTANO JR. e PIMENTEL, 2000) é através da análise por microscopia eletrônica de varredura, a qual identificará as possíveis alterações estruturais antes e depois da incorporação do resíduo do coco. O MEV auxiliou na escolha de um melhor pré-

tratamento, como no estudo das alterações estruturais da fibra do coco sofridas pela adição de diferentes concentrações de NaOH, lavagem com uma mistura 1:2 de etanol e benzeno e reação de polimerização com metilmetacrilato (BISMARCK *et al.,* 2001); ou, ainda, na avaliação da adsorção de metais no pó do coco, identificando os metais adsorvidos na biomassa, após o experimento (PINO, 2005).

O MEV é uma ferramenta muito utilizada para inspeção e análise em diversas áreas de pesquisa desde a área de materiais até a área biológica. É uma ferramenta eficiente, levando a confirmação visual de previsões teóricas, ou auxiliando no desenvolvimento de novas teorias. Essa técnica vem sendo utilizada para determinar formas e relevos de estruturas microscópicas, além de fornecer, quando acoplada a um sistema de EDS (*Energy Dispersive System*), uma análise qualitativa e semiquantitativa da composição química dessa estrutura. Assim, buscando complementar os resultados obtidos na análise química, foi realizada a análise em microscópio eletrônico de varredura acoplado ao EDS cujas micrografias são apresentadas nas Figuras 15 e 16, abaixo.

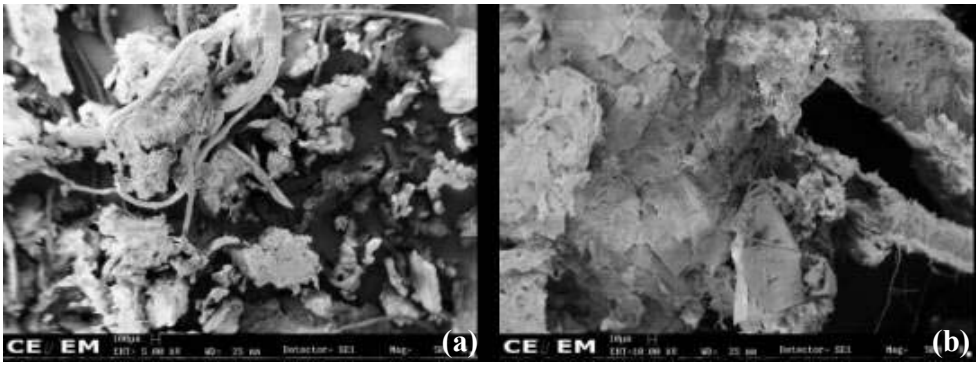


Figura 15: Micrografia de partículas do pó da casca de coco (a)50x e (b)500x.

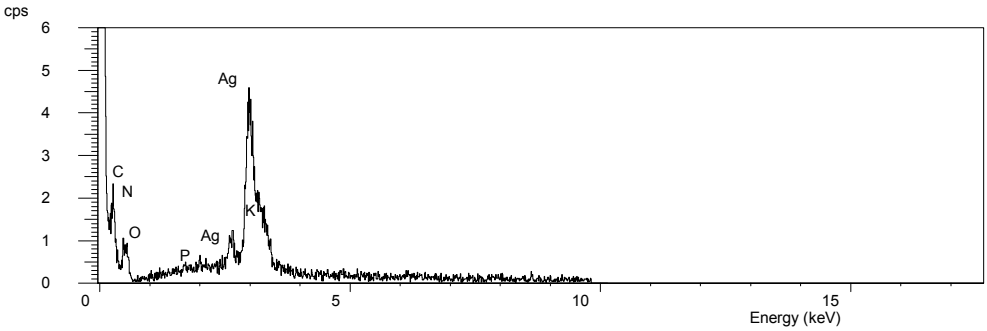


Figura 16: EDS de partículas do pó da casca de coco.

A análise do EDS (Figura 16) apresentou bandas características dos elementos C, N,O, P e K, não sendo observados elementos como Ca, Na, Fe, Mg e traços de Cu, Zn e Mn, elementos encontrados na análise química típica da casca de coco verde proveniente do Estado do Ceará (PINO, 2005). Não há justificativa plausível para tais elementos não aparecerem no espectro de EDS das partículas do pó, porém Pino (2005) destacou que a composição química da casca de coco depende de vários fatores que influenciam o crescimento da planta e a produção do fruto, a saber: a fonte, a época do ano, a quantidade de chuvas etc. A banda de prata que aparece nos resultados de EDS é resultante da metalização das amostras que foi realizada com esse elemento.

A análise da micrografia é interessante quando é possível observar a alteração estrutural, comparando o estado inicial com o final. Porém, como dito anteriormente para o solo contaminado, não foi possível realizar a análise do sistema solo/contaminante/material estruturante (pó de coco), devido à limitação encontrada para a análise *in natura* no MEV convencional. Comparando com os elementos observados na análise química, a presença dos elementos C, N, O, P e K foi confirmada, com exceção do enxofre, devido a sua baixa concentração (média de 0,018%). Finalizando a caracterização mineralógica do pó de coco, obteve-se o difratograma de raios X dessa amostra (Figura 17).

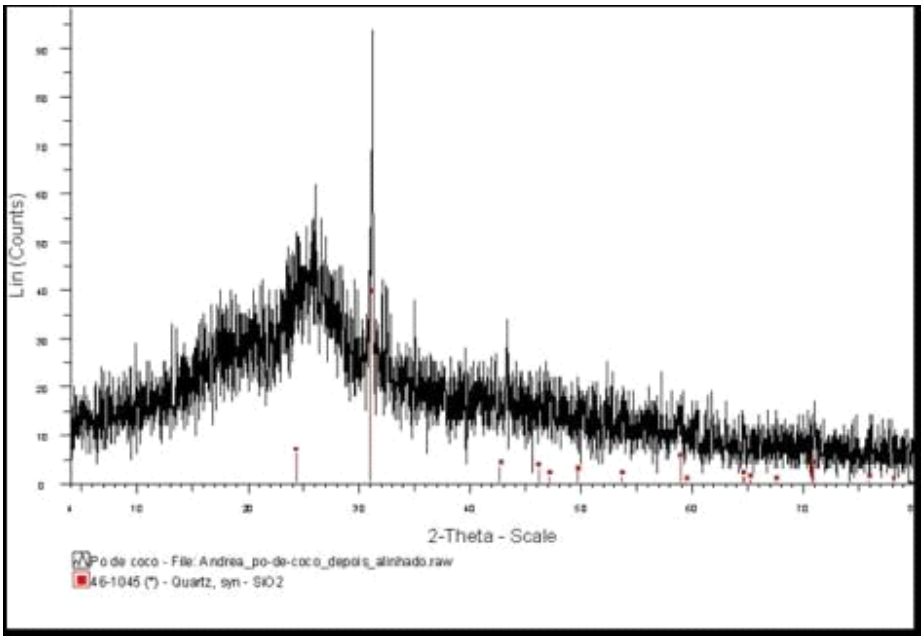


Figura 17: Difratograma do pó da casca de coco.

O difratograma do pó do coco não apresentou um resultado satisfatório, tendo em vista que os picos de celulose não foram identificados, provavelmente porque esta não se apresentou na forma de estruturas cristalinas capazes de serem identificadas por difração de raios X.

5.3 Ensaios de Biodegradação

5.3.1 Primeira Etapa: Ensaios em Microcosmos

O acompanhamento microbiológico de um resíduo em tratamento é um importante indicativo da ocorrência do processo de biorremediação (ALARSA, 2004). Em laboratório, tais parâmetros podem ser avaliados nos ensaios em microcosmos, sob condições controladas, pela quantificação das taxas de degradação natural dos poluentes pela microbiota do solo e dos fatores limitantes à biodegradação (ELLERT *et al.,* 2004). Durante esses ensaios a atividade biológica pode ser estudada pelos métodos respirométricos, através do monitoramento da taxa de consumo de oxigênio (O_2) ou da taxa de produção de dióxido de carbono (CO_2), e pela avaliação do crescimento da biomassa microbiana.

Diferentes métodos respirométricos são usados para avaliar a biodegradação da matéria orgânica em efluentes líquidos e estudar o tempo de maturidade ou índice de estabilidade de resíduos orgânicos sólidos (TREMIER *et al.,* 2005). Tanto na compostagem de matéria orgânica, quanto na biorremediação de contaminantes de natureza orgânica, os testes respirométricos são aplicados para auxiliar o estudo da cinética de biodegradação como uma função de parâmetros ambientais como temperatura, relação nutricional, umidade, dentre diversos outros.

Tremier e colaboradores (2005), desenvolveram um método respirométrico para estudar a cinética das reações biológicas envolvidas no tratamento de resíduos orgânicos por compostagem. O resíduo, um lodo de esgoto misturado a pedaços de madeira, foi tratado em uma célula respirométrica e as taxas de consumo de oxigênio foram monitoradas durante 20 dias. O autor modelou a cinética do consumo de oxigênio nessa célula utilizando diferentes misturas dos resíduos, possibilitando desta forma caracterizar a composição da matéria orgânica a ser compostada em: facilmente biodegradada, lentamente biodegradada e não biodegradada.

No estudo da biodegradação de compostos orgânicos, o método respirométrico de Bartha é amplamente utilizado (SCHROEDER *et al.,* 2002; MORAIS, 2005). O respirômetro de Bartha é um sistema fechado utilizado para quantificar a evolução do CO_2 produzido a partir da degradação da matéria orgânica por microrganismos. Esse CO_2 é coletado do frasco teste contendo o material contaminado, por adsorção, em solução de hidróxido de sódio e, em seguida, é titulado com ácido clorídrico. Outra forma de quantificar a produção de CO_2 é através da análise do *headspace* dos microcosmos por cromatografia gasosa (MOLINA-BARAHONA *et al.*, 2004), a qual foi aplicada na avaliação dos testes que serão apresentados mais adiante.

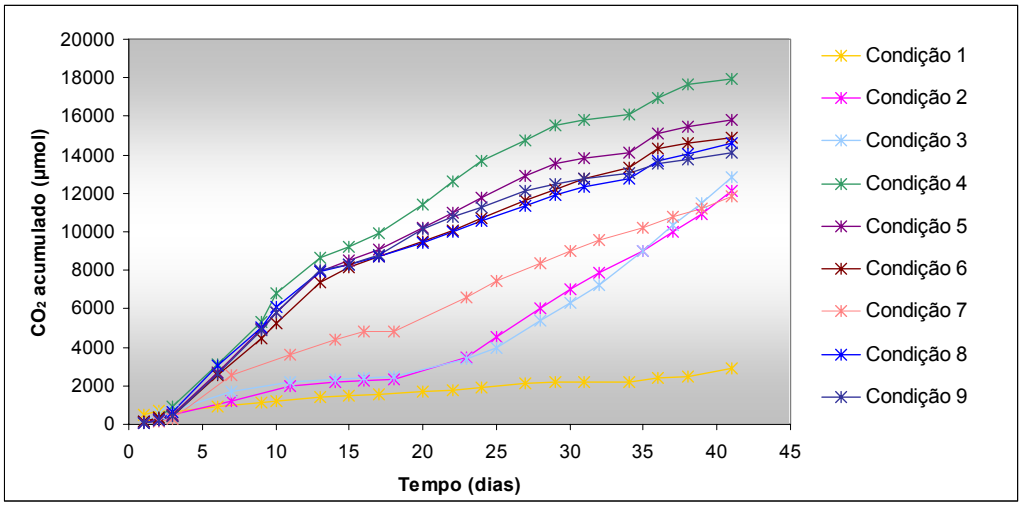
Os resultados dos testes em microcosmos desenvolvidos na presente dissertação são apresentados a seguir. Cabe destacar que o primeiro teste realizado em microcosmos foi somente avaliado em termos do CO_2 produzido a partir da atividade microbiana em função de diferentes relações nutricionais. O melhor resultado deste teste foi utilizado no segundo, no qual foi avaliado a granulometria e a concentração do pó de coco utilizado como material estruturante, além de duas fontes diferentes para correção de nitrogênio. A melhor concentração de material estruturante observada foi reproduzida no terceiro teste para outros agentes estruturantes, utilizando novamente distintas fontes de nitrogênio.

1º Teste de Biodegradação em microcosmos

No primeiro teste realizado em microcosmos foi avaliada a correção dos nutrientes, nitrogênio e fósforo, e como esta influenciou na degradação do óleo cru, visto que os microrganismos necessitam desses macronutrientes para sintetizar seus componentes celulares. O ambiente quando contaminado pode não conter nutrientes em quantidades suficientes para manter a atividade microbiana, devido ao aumento da concentração de carbono proveniente da contaminação por óleo cru. Desta forma, faz-se necessária a determinação da relação nutricional natural do solo para posterior correções nutricionais. Sendo assim, foi realizada a análise de fertilidade do solo contaminado determinando a relação nutricional C:N:P de 100:6,86:0,39 como sendo a encontrada naturalmente no solo. A partir desta relação, correções do solo contaminado pela adição de sais inorgânicos foram realizadas para atingir diferentes relações nutricionais nas condições testadas, a saber: C:P de 100:1; C:N de 100:10, 100:15 e 100:20; e C:N:P de 100:10:1, 100:15:1 e 100:20:1.

Além disso, duas condições foram testadas como controles: solo sem contaminação e solo contaminado sem correção nutricional.

Os resultados obtidos para o primeiro teste de biodegradação em microcosmos são apresentados na Figura 18, a seguir, no qual estão expressos os valores da concentração de CO_2 acumulado quantificado a partir da análise do *headspace* dos microcosmos.



Relação C:N:P - Condição 1=100:13:1,5 (solo sem contaminação); Condição 2 = 100:6,86:0,39 (solo contaminado sem correção nutricional); Condição 3 = 100:6,86:1; Condição 4 = 100:10:0,39; Condição 5 =100:15:0,39; Condição 6 =100:20:0,39; Condição 7 = 100:10:1; Condição 8 = 100:15:1; Condição 9 = 100:20:1

Figura 18: Evolução de CO_2 do 1º Teste de Biodegradação em microcosmos.

Verifica-se que todas as condições apresentaram uma fase inicial de adaptação ao contaminante (fase *lag*) de cerca de três dias, com exceção da condição 1, controle com solo sem contaminação que não apresentou fase *lag*. Segundo Trindade (2002), a exposição prévia de uma comunidade microbiana ao contaminante reduz ou extingue esse período de adaptação, como foi observado pelo autor durante a execução de testes com um solo contaminado há três anos e um solo contaminado recentemente. O teste respirométrico utilizando o solo contaminado há 3 anos, no qual a microbiota já se encontrava adaptada ao contaminante, não apresentou a fase *lag*. O mesmo teste utilizando o solo contaminado recentemente, apresentou a referida fase de adaptação da microbiota. A eficiência de biodegradação de 0,98% obtida para o solo contaminado recentemente foi significativamente menor do que a encontrada para o outro solo que foi de 3,70%, sendo um dos motivos da discrepância o tempo de adaptação da microbiota do solo ao

contaminante. Assim, esse período de adaptação apresenta-se como um fator importante para determinar o tempo necessário de tratamento para a degradação dos hidrocarbonetos presentes em um solo contaminado.

A condição 1 apresentou a menor evolução de CO_2, logo menor valor acumulado de CO_2 ao final dos 42 dias de experimento. Tal fato era esperado tendo em vista que a única fonte de carbono presente no solo sem contaminação era proveniente da matéria orgânica natural do mesmo. Já na condição 2 (solo contaminado sem correção de nutrientes), além da matéria orgânica inerente ao solo, deve-se considerar também o carbono proveniente dos hidrocarbonetos de petróleo. Por isso, a condição 2 apresentou a concentração final de aproximadamente $12x10^3$ μmol de CO_2 acumulados, valor este relativamente superior ao observado para a condição 1, cuja concentração foi de $2x10^3$ μmol de CO_2 acumulados.

Schroeder *et al.* (2002) observaram o mesmo nos seus experimentos. Os autores quantificaram a respiração microbiana de oito tipos de solos sem contaminação e contaminados por diversos resíduos da indústria de petróleo, dentre estes as lamas de perfuração. Em quase todos os pares de solos contaminados/não contaminados investigados, a taxa de biodegradação foi de 1 a 28% maior nas amostras contaminadas, provavelmente devido ao aumento de carbono orgânico, como conseqüência dos hidrocarbonetos de petróleo presentes na amostra.

Observa-se na Figura 18 que a correção de fósforo para uma relação nutricional C:P de 100:1 (condição 3) não interferiu na degradação do contaminante, tendo em vista que o perfil de evolução de CO_2 foi semelhante ao observado para a condição 2, controle com solo contaminado. Para Seabra (2005), a adição de potássio e fósforo a um solo contaminado com 5% p/p de óleo cru, na relação mássica C:P:K igual a 100:1:1, também não mostrou qualquer efeito significativo na biodegradação do óleo.

Além disso, comparando a evolução de CO_2 das três condições cuja relação nutricional C:N:P foi corrigida (condições 7, 8 e 9) com as condições correspondentes onde somente a relação C:N foi corrigida (condições 4, 5 e 6), pode ser verificado que concentrações finais de CO_2 acumulado foram ligeiramente menores naquelas amostras cuja correção de fósforo foi adotada. Porém, esta diferença não é significativa, tendo em vista a sensibilidade do método.

Já a correção de nitrogênio mostrou-se como fundamental para o aumento da degradação do contaminante. Todas as condições com correção de nitrogênio (condições de 4 a 9), com exceção da condição 7, obtiveram uma fase exponencial de crescimento da atividade microbiana significativa. Do 5º dia ao 10º dia de teste, esse crescimento foi coincidente para todas essas condições, obtendo-se uma evolução, no período, de aproximadamente $6x10^3$µmol de CO_2 acumulado.

Na Tabela 17, a seguir, são apresentados os valores de remoção de carbono calculados a partir do CO_2 acumulado (valores de µmoles de CO_2 somados após cada dia de análise), conforme descrito no item 4.5 de Materiais e Métodos.

Tabela 17: Remoção de carbono para o 1º Teste de Biodegradação.

Condição	Relação Nutricional (C:N:P) Adotada	$C_{Removido}$ (mg)
1	100:13:1,5*	35
2	100:6,86:0,39**	146
3	100: 6,86:1	154
4	100:10:0,39	215
5	100:15:0,39	190
6	100:20:0,39	179
7	100:10:1	142
8	100:15:1	175
9	100:20:1	169

*Relação nutricional natural do solo sem contaminação.
** Relação nutricional natural do solo contaminado.

De acordo com o que já foi verificado pela Figura 18, e agora confirmado na remoção de carbono apresentada na Tabela 17, a correção de fósforo juntamente com a correção de nitrogênio forneceu menores concentrações de CO_2 acumulado e, conseqüentemente, menores remoções de carbono de 142, 175 e 169 mg (condições 7, 8 e 9, respectivamente), quando comparados às condições onde somente a correção de nitrogênio foi adotada (condições 4, 5 e 6).

A melhor remoção de carbono de 215 mg foi observada para a condição 4, na qual somente a concentração de nitrogênio foi corrigida na relação C:N=100:10, representando uma remoção 48% maior do que no solo contaminado sem correção de nutrientes (condição

2). As demais condições cuja relação C:N foram corrigidas para valores superiores a este, condição 5 e 6 com a relação C:N de 100:15 e 100:20, respectivamente, obtiveram remoções inversamente proporcionais ao aumento da concentração de nitrogênio de 190 e 179 mg de C. Esse fato demonstra que a correção de nutrientes como o nitrogênio é importante, mas há um limite para que essa concentração seja benéfica, acima do qual passa a ocorrer a inibição da ação dos microrganismos.

Resultados semelhantes foram observados por Lee *et al.* (2007) no estudo da biorremediação de um solo contaminado por lubrificantes. A adição de nutrientes aumentou significativamente a taxa de degradação de lubrificantes na faixa de 42 a 51%, quando comparado aos 18% obtidos para o solo não fertilizado. Porém, a atividade degradadora de hidrocarbonetos foi maior no microcosmo com menor nível de nutrientes (C:N:P = 500:10:1) do que com alto nível de nutrientes (C:N:P = 100:10:1), devido a uma inibição dessa atividade.

Para os testes seguintes, foi adotada a relação nutricional C:N de 100:10 (condição 4), descartando a correção de fósforo. Essa razão C/N estaria na faixa recomendada na literatura que é de 9/1 a 200/1 (MORGAN E WATKINSON *apud* LEE, 2007). Destaca-se que essa faixa depende muito da natureza do contaminante, da cinética de biodegradação, do nível de nutrientes no solo e das condições experimentais. Assim, o sucesso do bioestímulo aplicado na biorremediação depende exatamente da realização de ensaios preliminares, como o de biodegradação em microcosmos, buscando um maior conhecimento da interferência da adição de nutrientes em diferentes concentrações no material contaminado em específico.

2º Teste de Biodegradação em microcosmos

O segundo teste de biodegradação pode ser considerado o mais importante e conclusivo para a realização dos testes posteriores em biopilhas e biorreatores, pois nesse teste foram avaliadas a concentração e granulometria do pó de coco mais adequadas para a aplicação deste material como agente estruturante do solo contaminado. A correção de nitrogênio seguiu a melhor condição definida no teste anterior, isto é, a relação C:N (100:10). Além da correção de nitrogênio, pela adição de nitrato de sódio, foi também

testada como fonte de nitrogênio a adição de uréia comercial (45% de nitrogênio), composto este utilizado como fertilizante agrícola.

A concentração de material estruturante é um fator muito importante devendo ser avaliado. Valores superiores a 30% p/p de material estruturante não têm apresentado bons resultados. Além disso, não é interessante utilizar relações solo e material estruturante elevadas (acima de 30%), pois neste caso o solo estaria sendo "diluído", condição normalmente não aceita pelos órgãos de controle ambiental (SEABRA, 2005). A correção da concentração na faixa de 2 a 12% tem sido o mais recomendado e aplicado por diversos autores (BAHERI e MEYSAMI, 2002; MOLINA-BARAHONA *et al.,* 2004; SEABRA, 2005).

A importância da correção de nitrogênio, macronutriente utilizado pelos microrganismos no seu metabolismo, já foi citado anteriormente. Porém, a relevância da adição da uréia, como fonte alternativa de nitrogênio, é que essa forma de correção permite um menor custo com reagentes quando amplia-se a escala de tratamento (biorreator, biopilha, dentre outros).

Neste teste, uma avaliação mais completa dos dados pôde ser realizada utilizando a análise estatística a partir do Planejamento Experimental que foi desenvolvido utilizando o software comercial *Statistica* 6.0, criado pela *Statsoft*, conforme descrito no item 4.4.1 de Materiais e Métodos (descrição do 2º Teste de Biodegradação em microcosmos).

Dentre os vários tipos de planejamento experimental, o fatorial é um dos mais eficientes, utilizados e aplicados em pesquisas básicas e tecnológicas e é classificado como um método do tipo simultâneo, onde as variáveis de interesse que realmente apresentam influências significativas na resposta são avaliadas ao mesmo tempo (CALADO e MONTGOMERY, 2003). No estudo desenvolvido por Molina-Barahona *et al.* (2004), os efeitos da adição de nutrientes e de resíduos comuns de colheita, para bioestimular a microbiota nativa para a biodegradação de hidrocarbonetos, foram investigados em microcosmos contendo solos contaminados com diesel (40 $g.kg^{-1}$). O desenvolvimento de um planejamento fatorial foi utilizado para avaliar os efeitos da relação de C:N (100:10 ou 100:30), teor de umidade (20% ou 30% p/p), concentração de resíduos de colheita (2% ou 3% p/p) e tipo de resíduo (milho ou cana-de-açúcar) na remoção de diesel.

O planejamento fatorial no 2º Teste em microcosmos envolveu a avaliação de três fatores: concentração e granulometria do pó de coco, e fonte de nitrogênio. Considerando esses fatores e seus níveis, foi possível gerar no software a matriz abaixo (Figura 19). A variável reposta foi o resultado do carbono removido ao final dos 60 dias de teste e calculado a partir do CO_2 acumulado que foi quantificado do *headspace* dos microcosmos.

	Design: 2**(3-0) design (Spreadsheet1)				
Standard Run	Replicat	Fonte de N	Concentração de ME	**Granulometria do ME**	C removido
1	1	-1	-1	-1	126,7212
2	1	1	-1	-1	371,3537
3	1	-1	1	-1	321,7453
4	1	1	1	-1	460,3123
5	1	-1	-1	1	317,3143
6	1	1	-1	1	402,9619
7	1	-1	1	1	375,5288
8	1	1	1	1	485,2636
9	2	-1	-1	-1	280,1886
10	2	1	-1	-1	388,5764
11	2	-1	1	-1	406,0645
12	2	1	1	-1	446,6289
13	2	-1	-1	1	338,3831
14	2	1	-1	1	426,8134
15	2	-1	1	1	482,4204
16	2	1	1	1	517,0759

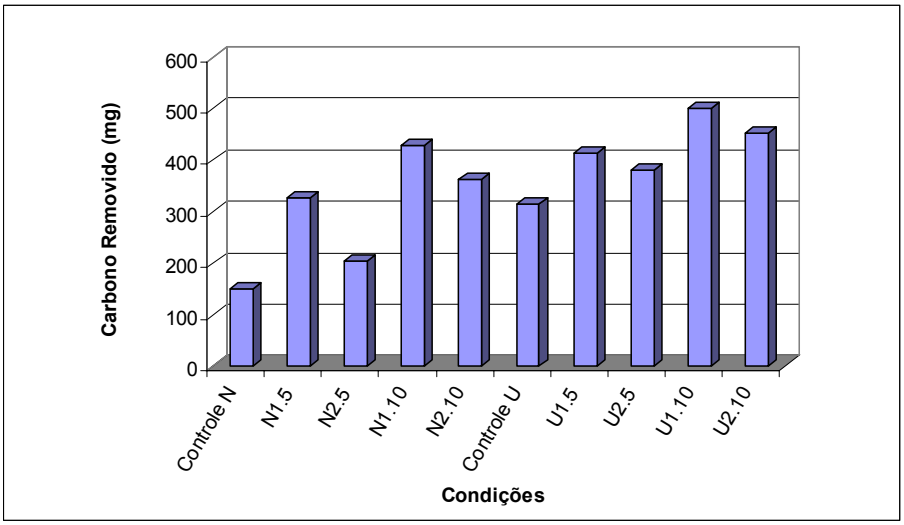
Concentração do pó de coco: 5% (-1) e 10% (+1); Granulometria do pó de coco: menor que a do solo (-1) e maior que a do solo (+1); Correção de nitrogênio: $NaNO_3$ (-1) e Uréia (+1).

Figura 19: Matriz do Planejamento Fatorial Completo (2^3) do 2º Teste de Biodegradação em microcosmos, gerada pelo software *Statistica* 6.0.

Alguns cuidados devem ser observados para que se possa obter o máximo de informação na realização do planejamento fatorial. Dentre estes se encontra a necessidade de realizar repetições de alguns ensaios para que se possa estimar o erro experimental. Esse cuidado foi tomado quando da realização deste teste com uma replicata. As replicatas são repetições autênticas, pois devem representar adequadamente o espaço experimental no qual o planejamento fatorial foi desenvolvido. Outro cuidado a ser observado refere-se à realização dos experimentos. É importante que todos os ensaios e replicatas previstos no desenvolvimento fatorial sejam realizados de forma aleatória, o que foi feito durante as quantificações do CO_2 amostrado do *headspace* dos microcosmos.

Na Figura 19, a matriz do planejamento fatorial apresenta os resultados de carbono removido para todas as condições e suas replicatas adotadas no 2º Teste, com exceção às

condições controle, nos quais somente as adições de nitrato de sódio ou uréia foram aplicadas. Desta forma, buscando comparar os resultados médios de todas as condições com seus referidos controles, o gráfico abaixo (Figura 20) foi gerado. As condições identificadas por N e U foram, respectivamente, corrigidas com nitrato de sódio e uréia. A numeração seguinte representa a granulometria do pó de coco, sendo 1 adotado para granulometria acima da do solo, e 2 para granulometria abaixo da do solo. 5 e 10 representam as concentrações do pó de coco, em % p/p.



N – adição de $NaNO_3$; U – adição de uréia; 1- fração de pó de coco de granulometria acima da o solo; 2 - fração de pó de coco de granulometria abaixo da o solo; 5 – 5% p/p de pó de coco; 10 - 10% p/p de pó de coco.

Figura 20: Carbono removido no 2º Teste de Biodegradação em microcosmos.

Analisando-se a Figura 20 é possível observar uma nítida influência da fonte de nitrogênio na degradação do óleo cru, sendo os melhores resultados observados para as condições cuja a concentração de nitrogênio foi corrigida pela adição de uréia. A adição do mateiral estruturante foi responsável pelo aumento da remoção do contaminante em todas as condições testadas. As melhores condições foram N.1.10, para condições corrigidas com nitrato de sódio, e U.1.10, para condições corrigidas com uréia, responsáveis pela remoção de 428mg e 501mg de carbono (por 50g solo em 60 dias de teste).

Após a realização dos experimentos seguindo o planejamento experimental, os dados obtidos devem ser interpretados estatisticamente seguindo vários critérios estatísticos

e de significância, dentre os quais destacam-se: o cálculo dos efeitos das variáveis independentes sobre a variável dependente, o Teste p, a análise de variância e o ajuste do modelo matemático aos dados experimentais através do coeficiente de determinação. No entanto, este último não faz muito sentido quando se trabalha com um modelo das variáveis escalonadas (nível superior representado por +1 e inferior por –1, descritos em Materiais e Métodos) (TRINDADE, 2002). Tais critérios estatísticos podem ser observados na Figura 21, a seguir.

Factor	ANOVA; Var.:C removido; R-sqr=,82863; Adj: 2**(3-0) design; MS Residual=2621,984 DV: C removido				
	SS	df	MS	F	**p**
(1)Fonte de N	45222,1	1	45222,14	17,24730	0,002473
(2)Concentração de ME	44386,8	1	44386,81	16,92871	0,002620
(3)Granulometria do ME	18507,6	1	18507,60	7,05862	0,026182
1 by 2	2590,2	1	2590,21	0,98788	0,346230
1 by 3	2853,8	1	2853,79	1,08841	0,324036
2 by 3	541,7	1	541,67	0,20659	0,660219
Error	23597,9	9	2621,98		
Total SS	137700,1	15			

Figura 21: Análise de Variância (ANOVA) gerada pelo software *Statistica* 6.0, para o 2º Teste de Biodegradação em microcosmos.

Na análise de variância pela ANOVA existe um parâmetro estatístico denominado *p-level*, que permite avaliar quais fatores e suas interações são estatisticamente relevantes. Quando os valores do *p-level* para cada um dos fatores e interações são menores ou iguais a 0,05, estes apresentam significância ou relevância estatística, quando são maiores que 0,05, os fatores e interações não apresentam relevância estatística (NETO *et al.*, 1995; MONTGOMERY, 1999).

Os fatores principais analisados no 2º Teste de Biodegradação em microcosmos foram a fonte de nitrogênio, a concentração de material estruturante e a granulometria deste. Como os valores de *p-level* observados para os fatores na Figura 21 são todos menores que 0,05, e por isso aparecem em vermelho, significa que os efeitos de cada fator são relevantes. Porém o mesmo não foi observado para as interações destes fatores, isto é, a variação de um fator do seu nível baixo (-1) para o seu nível alto (+1) não depende do nível de outro fator.

Chaîneau *et al.* (2005) utilizou a ANOVA para avaliar a significância estatística da adição de nutrientes no bioestímulo de um solo contaminado com óleo cru (7300 µg de hidrocarbonetos/g de solo seco). Duas concentrações distintas de nutrientes foram testadas, a saber: alta fertilização, 3000 µg N, 450 µg P e 1500 µg K por g de solo seco; e baixa fertilização, 850 µg N, 85 µg P e 240 µg K por g de solo seco. Após 105 dias de teste, o solo com baixa fertilização foi responsável por 62% de biodegradação e o solo com alta fertilização por 49% de biodegradação. Apesar da alta degradação de ambos, o solo com baixa fertilização não obteve uma degradação estatisticamente diferente da condição controle (atenuação natural), cuja degradação foi de 47%.

O diagrama de Pareto, Figura 22, é uma outra forma de apresentar a relevância estatística, mostrando, de forma rápida e clara, os efeitos que são estatisticamente importantes.

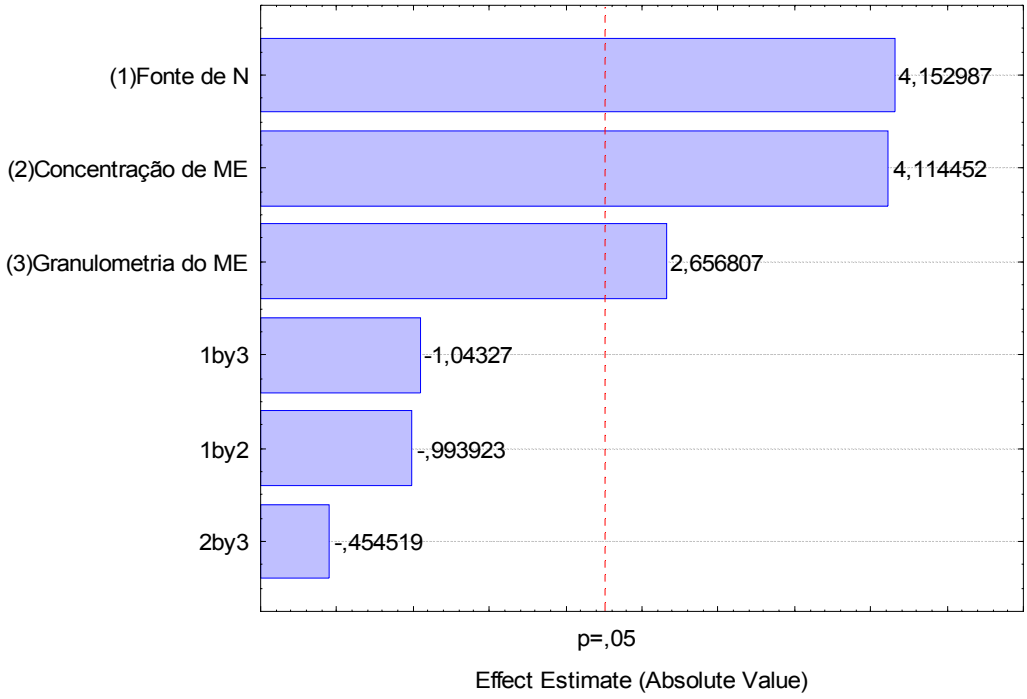


Figura 22: Gráfico de Pareto, gerado pelo software *Statistica* 6.0, para o 2º Teste de Biodegradação em microcosmos.

Segundo Calado e Montgomery (2003), os efeitos cujos os valores (retângulos) estiverem à direita da linha divisória (p=0,05) apresentam relevância estatística. Este gráfico confirma, então, o que foi observado anteriormente pela ANOVA, que somente os fatores estudados (fonte de nitrogênio, concentração e granulometria do material estruturante) influenciam estatisticamente nos resultados obtidos de carbono removido. Além disso, essas influências são maiores nos fatores fonte de nitrogênio e concentração do material estruturante, confirmando o que foi observado pelo gráfico de remoção de carbono. Os valores ao lado do retângulo representam os valores da estatística de teste *t student*, obtidos para os efeitos principais (não avaliados). A não interação observada para os fatores estudados pode ainda ser verificada no gráfico das médias (Figura 23).

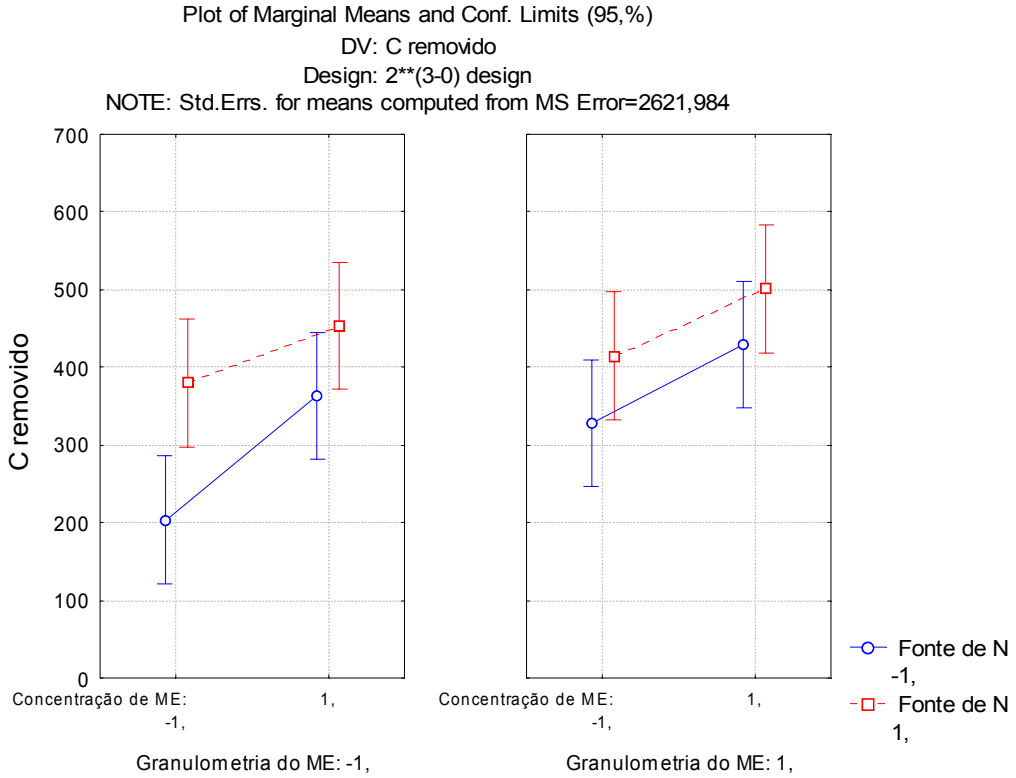


Figura 23: Gráfico das Médias dos Tratamentos, gerado pelo software *Statistica* 6.0, para o 2º Teste de Biodegradação em microcosmos.

O gráfico acima (Figura 23) mais uma vez confirma que o efeito de interação dos fatores não é importante, tendo em vista que as linhas não se cruzam. Porém, a partir deste gráfico, é possível observar-se também que tanto para granulometria inferior a do solo (-1),

quanto para a maior que a do solo (+1), os melhores resultados de remoção de carbono foram obtidos nos níveis superiores de concentração do material estruturante (10% p/p) e de correção de nitrogênio (uréia).

Comparando os valores de remoção das condições controle, nas quais somente corrigiu-se a relação nutricional C:N (essas condições não entram na análise estatística), é possível observar um aumento de 151 mg para 316 mg de C removido para nitrato de sódio e uréia, respectivamente. Esse aumento de mais de 100% na remoção do contaminante indica ser a uréia a melhor fonte de nitrogênio para a correção nutricional do solo.

Com o objetivo de melhor observar a tendência de como os fatores estudados influenciam na remoção do contaminante, foram obtidas as Superfícies de Resposta e Curvas de Nível para os resultados apresentados anteriormente. Nas Figuras 24 e 25, as variações da granulometria e concentração do pó de coco foram observadas para as condições corrigidas com uréia. Já nas Figuras 26 e 27, essas variações foram observadas para as condições corrigidas com nitrato de sódio.

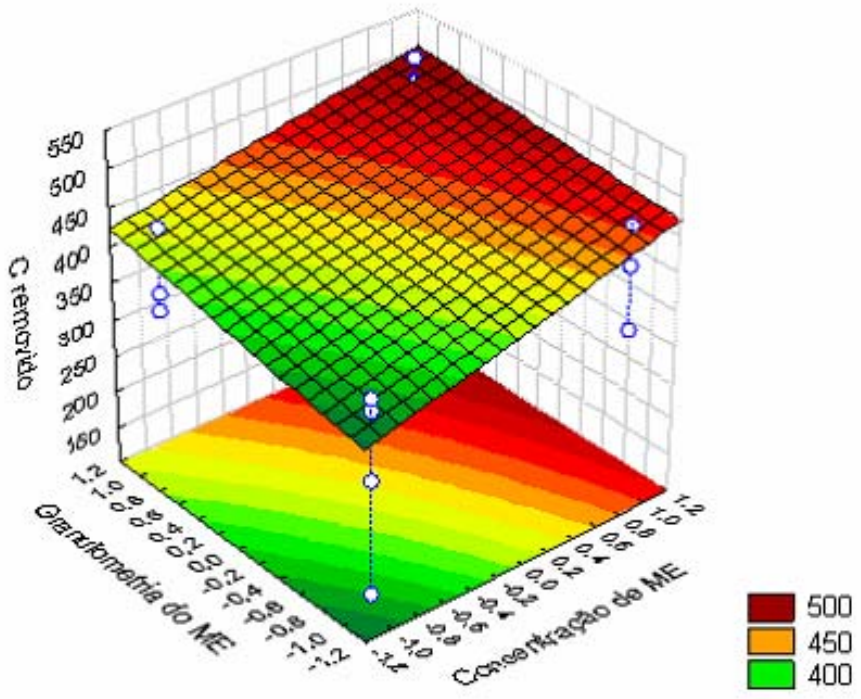


Figura 24: Superfície de Resposta – Condições Corrigidas com Uréia.

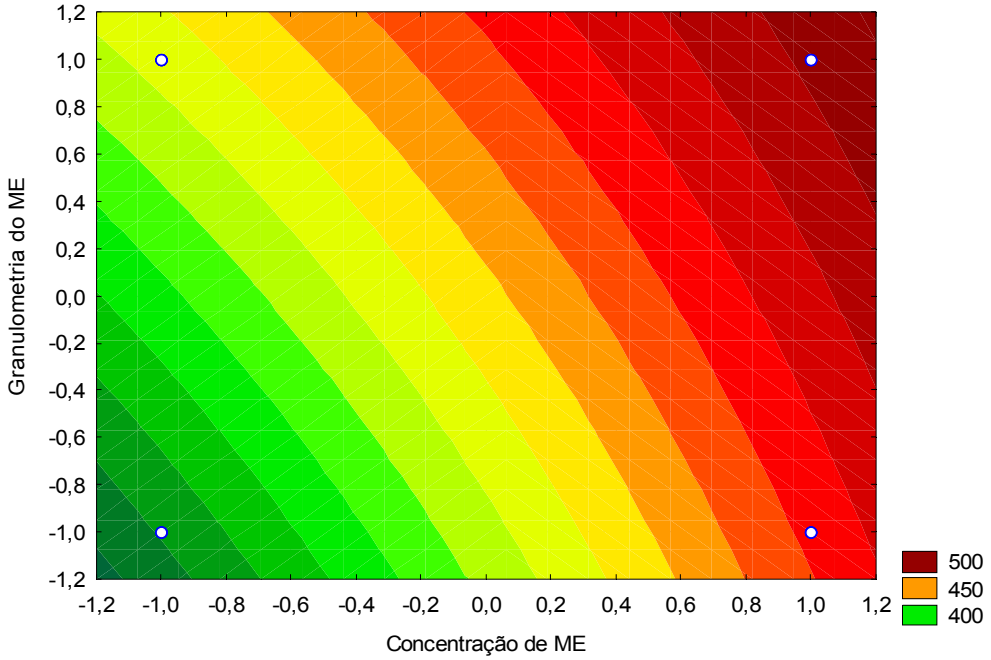


Figura 25: Curva de Nível – Condições Corrigidas com Uréia.

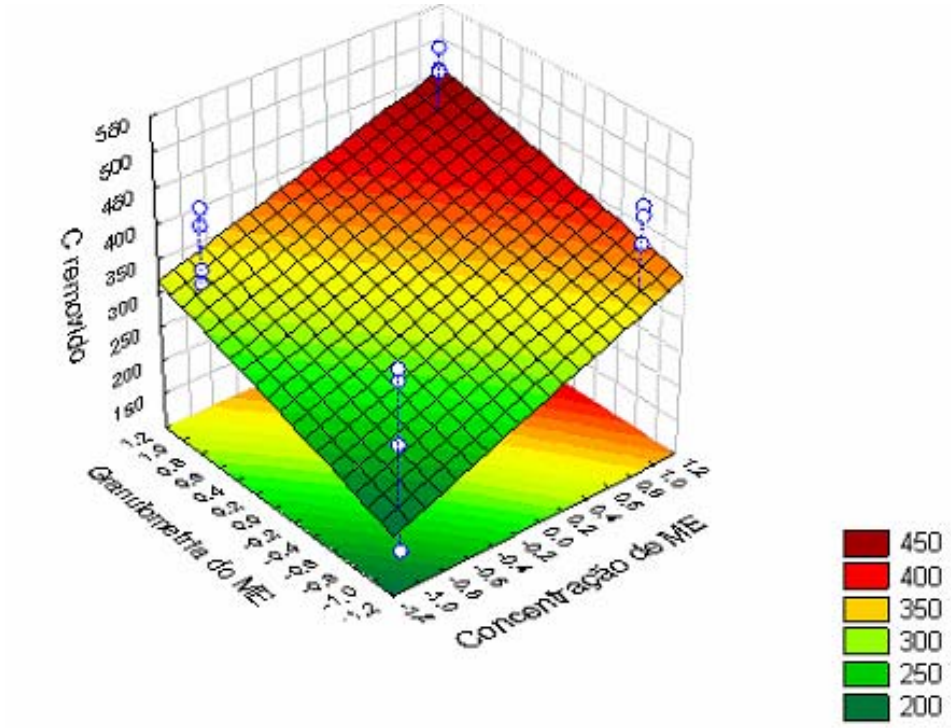


Figura 26: Superfície de Resposta – Condições Corrigidas com Nitrato de Sódio.

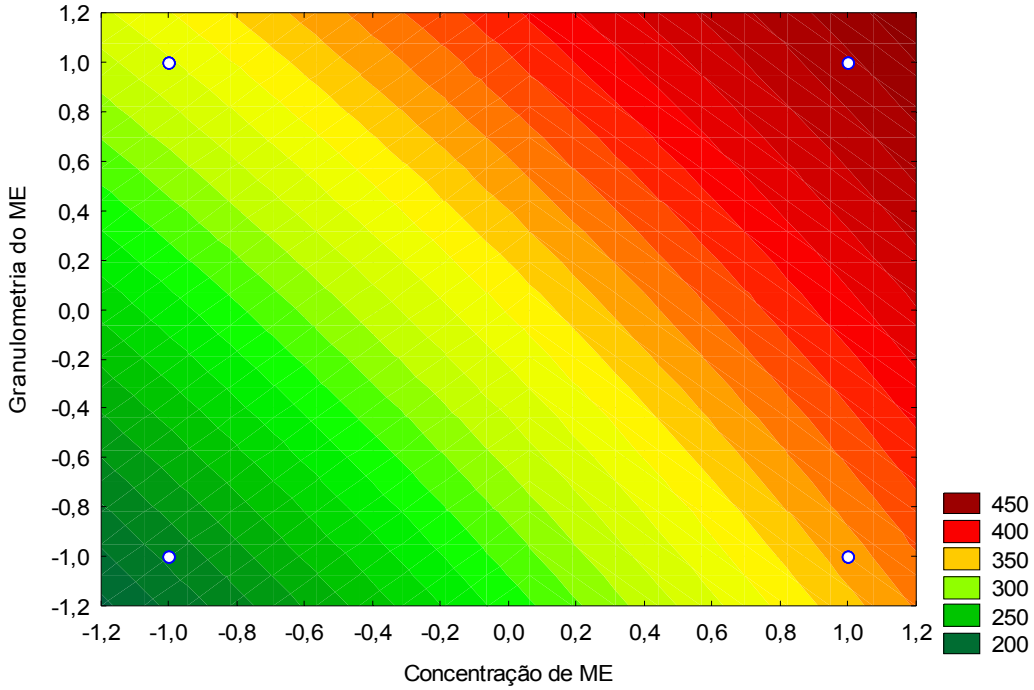


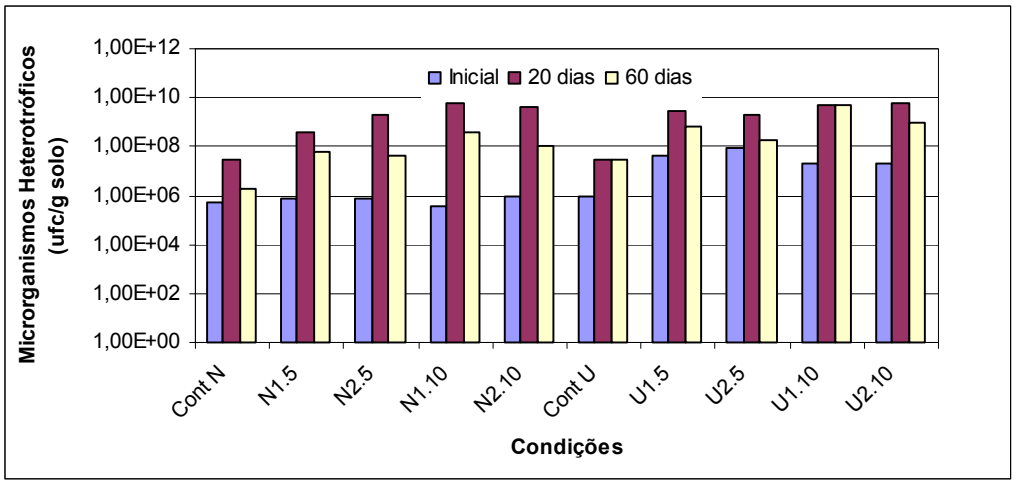
Figura 27: Curva de Nível – Condições Corrigidas com Nitrato de Sódio.

As superfícies de resposta (Figuras 24 e 26) confirmam que os níveis superiores de granulometria e concentração do pó de coco forneceram maiores remoções de carbono. Assim, a granulometria maior que a do solo e a concentração de material estruturante de 10% p/p são as condições que devem ser adotadas nos testes seguintes.

A partir destes gráficos pode-se ainda observar que para as condições com correção de nitrogênio, uma pequena alteração desses fatores é responsável por uma variação maior de remoção de carbono do que nas condições com correção de uréia. Tal observação é possível devido a maior inclinação do plano, superfície de resposta normalmente encontrada para um planejamento fatorial comum.

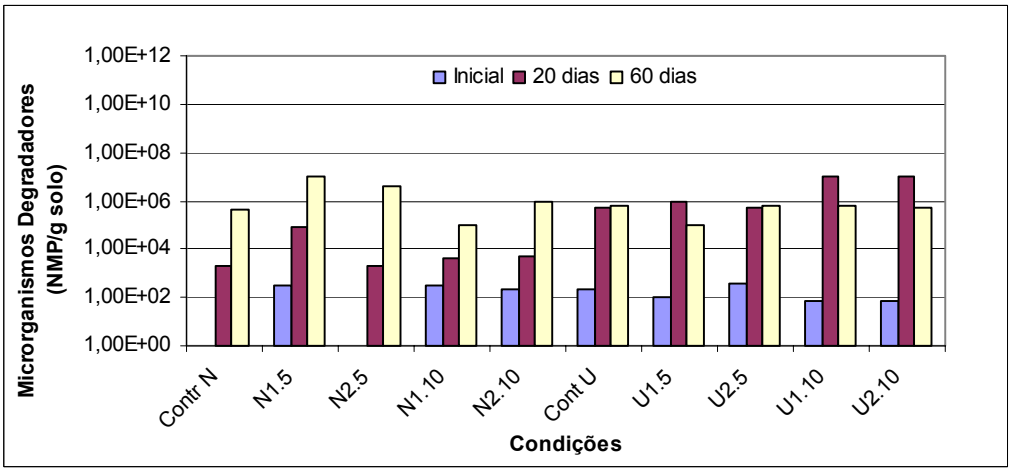
Ao longo de cada linha das curvas de nível (Figuras 25 e 27) tem-se o mesmo valor da variável resposta, isto é, cada faixa representa um valor de remoção de carbono. Além disso, a cor vermelha escura está associada a maiores valores de remoção do contaminante, de acordo com a legenda ao lado dos gráficos. De acordo com Calado e Montgomery (2003), quando essas linhas forem paralelas, o efeito de interação não será importante.

Outra forma de acompanhamento da atividade microbiana foi através da contagem de microrganismos heterotróficos totais e degradadores de óleo cru, cujos resultados são apresentados a seguir (Figura 28 e 29).



N – adição de $NaNO_3$; U – adição de uréia; 1- fração de pó de coco de granulometria acima da o solo; 2 - fração de pó de coco de granulometria abaixo da o solo; 5 – 5% p/p de pó de coco; 10 - 10% p/p de pó de coco.

Figura 28: Resultados de contagem dos microrganismos Heterotróficos Totais do 2º Teste de Biodegradação em microcosmos.



N – adição de $NaNO_3$; U – adição de uréia; 1- fração de pó de coco de granulometria acima da o solo; 2 - fração de pó de coco de granulometria abaixo da o solo; 5 – 5% p/p de pó de coco; 10 - 10% p/p de pó de coco.

Figura 29: Resultados de contagem dos microrganismos Degradadores de óleo cru do 2º Teste de Biodegradação em microcosmos.

Observa-se na Figura 28 que a contagem dos microrganismos heterotróficos totais mostrou uma tendência de crescimento dos mesmos, para todas as condições testadas, até

os primeiros 20 dias de teste, como resultado, possivelmente, da maior disponibilização de nutrientes nesse período, assim como da presença de fonte de carbono do contaminante mais suscetíveis à ação microbiana. Esse crescimento variou na ordem de 10^2 a 10^4 ufc/g de solo, em relação à população inicial para as condições corrigidas com nitrogênio. Uma menor amplitude no crescimento foi observada para as condições corrigidas com uréia, porém, para essas condições uma maior concentração populacional inicial foi verificada. Os maiores crescimentos de microrganismos heterotróficos totais foram obtidos para as condições com adição do pó de coco, na faixa de 10^8 a 10^{10} ufc/ g de solo seco, o que pode estar diretamente relacionado com a maior aeração proporcionada por esse material quando adicionado ao solo contaminado, favorecendo o crescimento dos microrganismos aeróbios nos primeiros 20 dias de teste. Nas condições controles, nas quais não houve a adição desse material, esse crescimento não ultrapassou a concentração de 10^7 ufc/g de solo.

Comparando os resultados da contagem de microrganismos heterotróficos totais em 20 dias de experimento e após 60 dias, uma queda na concentração microbiana foi observada para todas as condições, com exceção do controle com uréia e da condição U.1.10. Essa queda no número de microrganismo foi relatada por Trindade (2002), que chegou ao final de seu experimento com concentração igual ou pouco superior à população inicial. A redução da população microbiana pode estar relacionada à redução da concentração dos nutrientes inorgânicos, resultante do consumo de grandes quantidades de carbono orgânico, o que afetaria a população heterotrófica em geral (MOLINA-BARAHONA *et al*., 2004). Schenk (2004) observou, durante o processo de biorremediação de um solo contaminado por diferentes substâncias químicas orgânicas, que o desenvolvimento das bactérias está correlacionado com a degradação dos contaminantes, cuja elevação da biomassa ocorreu nos primeiros 10 dias. No entanto, com a utilização destas substâncias como fonte de carbono foi observada a diminuição da população bacteriana nos dias que se seguiram, quando nenhum substrato para o crescimento estava disponível.

Comportamento diferente foi observado para os microrganismos degradadores de óleo cru (Figura 29), nas condições corrigidas com nitrato de sódio e identificadas por N. Um aumento crescente da população microbiana tanto após 20 dias, quanto ao final do teste, indica uma atividade degradadora intensa. Assim, a redução da população

heterotrófica detectada após 20 dias de teste não afetaria a degradação do contaminante, já que o crescimento da população degradadora de óleo cru foi mantido até o final do teste.

Os melhores resultados de remoção de carbono e toda a avaliação estatística indicaram como melhores condições àquelas corrigidas com uréia. Porém, a contagem de microrganismos degradadores de óleo cru dessas condições mostrou uma ligeira queda no crescimento, comparando a contagem nos primeiros 20 dias com a contagem final, o que indicaria uma menor atividade degradadora e, conseqüentemente, uma menor remoção do contaminante. Por outro lado, nem sempre a melhor remoção de carbono pode estar relacionada com o maior crescimento de microrganismos degradadores, sendo necessárias análises complementares da concentração do contaminante para tal afirmação.

A adição de materiais ligno-celulósicos ao solo, como o pó de coco, pode estimular o crescimento de fungos no mesmo, os quais são potenciais na degradação do óleo (BAHERI e MEYSAMI, 2002). Talvez a esse fato pode ser associado o maior crescimento de microrganismos degradadores nas condições corrigidas com nitrato de sódio. Já para as condições corrigidas com uréia, a redução dos microrganismos degradadores poderia ser associada à toxicidade da amônia, produto da degradação da uréia, a esses fungos. Chaillan *et al.* (2006), detectaram esse efeito fungicida da amônia nos primeiros 6 meses do processo de biorremediação de um solo contaminado com óleo cru intemperizado e outros resíduos de óleo pesado. A principal causa foi associada à elevação do pH de 7,3 para 9,1, em um dos tratamentos, passando de 10^5 a 10^2 ufc/g de solo, em 15 dias, chegando a níveis não detectados após 3 meses. Porém, houve um crescimento da população bacteriana de 10^6 para 10^8 nos mesmos 6 meses.

Nos próximos testes, por essa dúvida com relação ao efeito positivo ou negativo da adição de uréia na população microbiana, ambas fontes de nitrogênio continuaram a ser testadas, e as amostras destes testes foram analisadas também quanto à concentração do contaminante por extração seguida de quantificação do mesmo. As condições adotadas nesses testes foram as melhores condições obtidas pela quantificação de CO_2 e por contagem de heterotróficos totais, nas quais o material estruturante foi adicionado na granulometria acima da do solo e na concentração de 10% p/p.

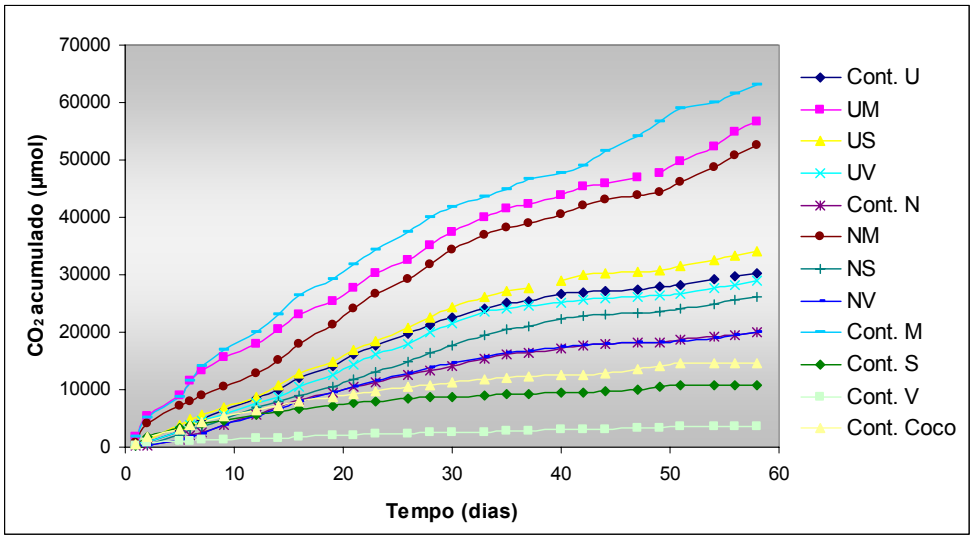
3º Teste de Biodegradação em microcosmos

Para aumentar a degradação de resíduos, principalmente de natureza orgânica, nos sistemas de biorremediação, diferentes agentes estruturantes vêm sendo comumente adicionados. Por exemplo, a adição de materiais como feno de capim cortado, serragem e vermiculita, como agentes estruturantes, aumentaram a biodegradação de um solo contaminado com 10% (p/p) de hidrocarbonetos totais de petróleo (RHYKERD *et al.*, 1999). Turfa, cavacos de madeira e farelo de trigo, e misturas destes foram utilizados como agentes estruturantes na compostagem de um solo contaminado com 15,9% (p/p) de hidrocarbonetos (BAHERI e MEYSAMI, 2002). Agentes estruturantes como cavacos de madeira, feno de grama e palha de trigo também foram testados por Barrington *et al.* (2002) na compostagem de resíduos suínos.

Essa diversidade de agentes estruturantes citados na literatura incentivou a aplicação de outros materiais como mamona, serragem e vermiculita, no 3º Teste de Biodegradação em microcosmos, com o objetivo de comparar os resultados com aqueles obtidos, anteriormente, para o pó de coco. Esses materiais foram adicionados ao solo na concentração igual a 10% p/p e na granulometria superior a do solo, melhores condições definidas no 2º Teste. Além disso, a relação nutricional C:N de 100:10, determinada como sendo a melhor relação no 1º Teste, foi adotada para a correção do solo contaminado. A correção de nitrogênio foi novamente realizada através da adição de nitrato de sódio e uréia.

Nesse teste foi avaliada também a adição dos diferentes materiais estruturantes (pó de coco, mamona, vermiculita e serragem) ao solo sem contaminação. Assim, os resultados obtidos seriam referentes somente à degradação dos agentes estruturantes, possibilitando calcular a degradação real do óleo cru nas condições testadas com adição desses materiais. De forma a aproximar essas condições controles com as outras condições testadas com o solo contaminado, a correção de umidade do solo sem contaminação foi ajustado para 50% da capacidade de retenção de água, correspondendo a 17% de umidade do solo. Porém, a correção de nitrogênio não foi necessária visto que a relação nutricional C:N do solo sem contaminação é de 100:13, valor este acima do que vem sendo testado de 100:10.

Na Figura 30, a seguir, são apresentados os resultados obtidos para o terceiro teste de biodegradação em microcosmos, no qual estão expressos os valores da concentração de CO_2 acumulado quantificado a partir da análise do *headspace* dos microcosmos.



Cont.U- adição de uréia; UM- uréia+mamona; US- Uréia+serragem; UV- Uréia+vermiculita; Cont.N- adição de $NaNO_3$; NM- $NaNO_3$+mamona; NS- $NaNO_3$+serragem; NV- $NaNO_3$+vermiculita; Cont.M- solo sem contaminação+mamona; Cont.S- solo sem contaminação+serragem; Cont.V- solo sem contaminação+vermiculita; Cont. Coco- solo sem contaminação+pó de coco

Figura 30: Evolução de CO_2 do 3º Teste de Biodegradação em microcosmos.

Analisando a Figura 30, é possível observar que a degradação do contaminante utilizando agentes estruturantes varia muito com a natureza do material utilizado. As condições utilizando a vermiculita (NV e UV), por exemplo, obtiveram resultados semelhantes ou inferiores de concentração de CO_2 observados para os controles somente com a adição de nutrientes (Controle N e U), indicando que, a princípio, a utilização desse material como agente estruturante não seria eficiente, visto que não alterou a degradação do contaminante. Tal fato pode ter ocorrido devido a vermiculita encontrar-se na forma expandida, com isso parte do óleo pode ter impregnado os poros desse material, reduzindo a disponibilidade do contaminante aos microrganismos. Essa afirmação pode ser sustendada pelos estudo da utilização da vermiculita no tratamento de águas poluídas por rejeitos industriais, pois depois de expandida, ela torna-se um mineral hidrofóbico com alta capacidade de troca catiônica capaz de adsorver compostos orgânicos (FIGUEIRA, 2000).

A condição controle utilizando a vermiculita (Cont. V) obteve uma concentração de CO_2 acumulado de $3,5x10^3$ μmol, valor este muito próximo do obtido para o solo sem contaminação no primeiro teste de biodegradação que foi de $2,9\ x10^3$ μmol de CO_2. Isto era esperado tendo em vista que por ser a vermiculita um silicato composto principalmente de ferro, alumínio e cálcio, sofre pouca ou nenhuma degradação pela ação microbiana (RHYKERD *et al.,* 1999). Além disso, a condição controle N e a condição NV, ambos com $1,9x10^4$μmol CO_2 acumulado, são praticamente coincidentes durante todo teste, confirmando a ausência de degradação desse material. Fato semelhante foi observado para controle U e condição UV, com $30x10^3$ e $29x10^3$μmol CO_2 acumulado, respectivamente.

Nas condições NS e US, utilizando a serragem como agente estruturante, foram obtidas concentrações finais de CO_2 de 2,6 e $2,7x10^4$ μmol, respectivamente. Essas concentrações foram superiores aos correspondentes controles, indicando que a utilização da serragem seria potencialmente favorável na remoção do contaminante. O mesmo foi observado no trabalho desenvolvido por Raimundo *et al.* (2004) onde a serragem foi utilizada como agente estruturante no tratamento de um solo contaminado por petróleo, e a condição na qual foi aplicada foi responsável por uma remoção de 20% do contaminante, enquanto a condição somente bioestimulada, foi responsável por cerca de 10% de remoção.

Nas condições controle, onde foi realizada somente a adição dos materiais estruturantes ao solo sem contaminação, pode ser observado que dentre todos os materiais testados, a mamona apresentou comportamento discrepante. A princípio, seria plausível afirmar que este material foi o mais degradado pela microbiota do solo e por isso apresentou concentrações de CO_2 acumulado de aproximadamente $6,3x10^4$μmol, valor este muito superior aos demais observados ($3,5x10^3$ a $3,4x10^4$ μmol CO_2). Porém, essa grande evolução de CO_2 pode ter sido causada também pela presença na mamona de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia* e *Rhizopus*, como foi identificado por Oliveira *et al.* (2006) em cultivares Nordestina e Paraguaçu. O crescimento desses fungos aumenta, principalmente, quando eles estão presentes em um meio com alto teor de nitrogênio disponível, proveniente tanto da fertilização, quanto, nesse caso, pelo nitrogênio disponibilizado pelo próprio resíduo da mamona. Assim, em detrimento de baixos teores de carbono como fonte de energia, os fungos poderiam ter utilizado todo carbono disponível, no caso a matéria orgânica do solo, o que pode ter

gerado essa maior concentração de CO_2 ao final do teste (KIEHL *apud* SANNAZZARO *et al.*, 2001).

Por outro lado, era de se esperar que nas condições UM e NM (adição de mamona como agente estruturante), utilizando o solo contaminado com óleo, maiores evoluções de CO_2 fossem observadas, pois estas teriam mais carbono biodisponível proveniente do contaminante. Tal fato não foi observado, pois a concentração de CO_2 acumulado para as condições UM e NM (adição de mamona como agente estruturante) foi menor que para o seu controle (Cont. M), indicando que, possivelmente, os fungos ou outros microrganismos que degradaram a mamona foram inibidos com a adição de óleo.

As condições UM e NM, porém, obtiveram uma maior evolução de CO_2, quando comparadas às condições com adição dos outros agentes estruturantes, indicando que esse aumento poderia ter sido causado pelo aumento de fungos no meio contaminado, o que corroboraria com o que foi observado anteriormente. Um estudo mais específico da utilização da mamona como agente estruturante de solos contaminados seria necessário para elucidar todas as dúvidas com relação à natureza e ao comportamento dos microrganismos presentes na mamona, o que não faz parte do escopo da presente dissertação.

Neste terceiro teste, os melhores resultados foram obtidos para as condições corrigidas com uréia, concordando com o que foi observado nos resultados de evolução de CO_2 apresentados no segundo teste de biodegradação. A Tabela 18, a seguir, apresenta um resumo dos resultados de carbono removido total e corrigidos, descontando a degradação dos materiais estruturantes, ambos calculados a partir do CO_2 acumulado, no final do terceiro teste, assim como os melhores resultados obtidos no segundo teste utilizando o pó de coco.

Tabela 18: Remoção de carbono total e referente ao óleo cru.

Condições	$C_{Removido}$ (mg)	$C^{*}_{Removido}$ (mg)
NM	629	0
NS	315	186
NV	238	196
N.1.10**	429	256
UM	678	0
US	408	279
UV	346	304
U.1.10**	501	328

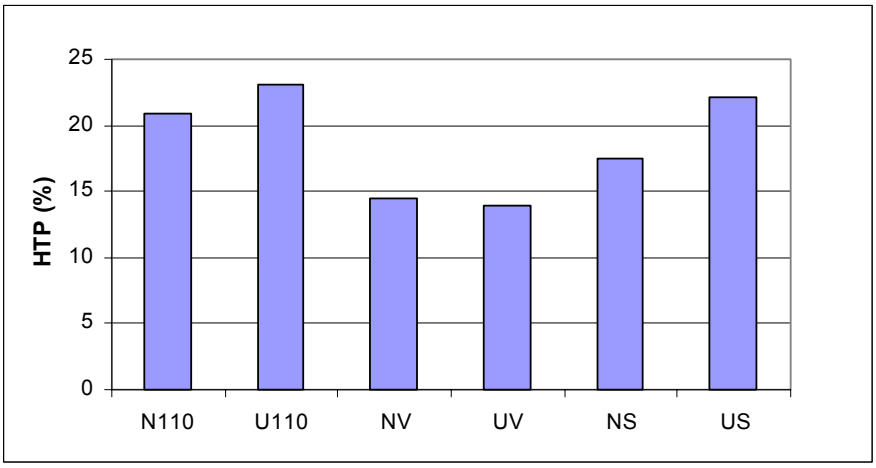
*Carbono removido referente somente a degradação do óleo
**Melhores condições do 2º Teste com adição de pó de coco

Observando a Tabela 18, verifica-se que todas as condições corrigidas com uréia foram responsáveis pela maior remoção de carbono, confirmando que essa fonte de nitrogênio foi mais eficiente no bioestímulo do solo contaminado. Comparando as condições corrigidas tanto com uréia, quanto com nitrato de sódio, a adição do pó de coco como agente estruturante foi responsável pela maior remoção de carbono de 328 mg e 256 mg. A adição da vermiculita teve um efeito mais pronunciado na remoção de carbono do que a serragem, o que pode estar relacionado com a adsorção do óleo pela vermiculita expandida, citada na discussão dos resultados pela análise de CO_2, ao invés da biodegradação do mesmo.

Através da análise dos resultados de carbono removido pode-se concluir que a adição do pó de coco foi o material estruturante adicionado que melhor resultado apresentou. A adição do pó de coco foi responsável por uma remoção 22% maior que a adição da serragem e 45% maior que a adição da vermiculita.

A avaliação da remoção do contaminante pode ser realizada também pela quantificação de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) nas amostras iniciais e finais, conforme pode ser observado na Figura 31, a seguir, onde são apresentadas as eficiências de remoção de HTP para as melhores condições do segundo teste de biodegradação (N1.10 e U1.10), onde foi testada a adição do pó de coco, e para as condições do terceiro teste de biodegradação, onde foram testadas a adição da vermiculita e da serragem. A condição na qual foi testada a adição da mamona não foi enviada para a referida análise tendo em vista

que os resultados observados pela quantificação de CO_2 acumulado (Figura 30) não motivaram a utilização desse material como agente estruturante do solo.



N110- $NaNO_3$+pó de coco; U110- Uréia+pó de coco; NV- $NaNO_3$+vermiculita; UV- Uréia+vermiculita; NS- $NaNO_3$+serragem; US- Uréia+serragem.

Figura 31: Remoção de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP).

A análise da Figura 31 confirma o pó de coco como melhor agente estruturante, posto que foi obtido 23% de remoção de HTP para a condição corrigida com uréia. Esse resultado foi aproximadamente 77% superior aos obtidos com a adição da vermiculita (UV) e 4% superior aos obtidos com a adição da serragem (US). De forma idêntica, o mesmo foi observado para a serragem cuja remoção de HTP foi de 22%, valor este superior ao observado para a vermiculita que foi de 14%, ambos resultados para as condições corrigidas com uréia.

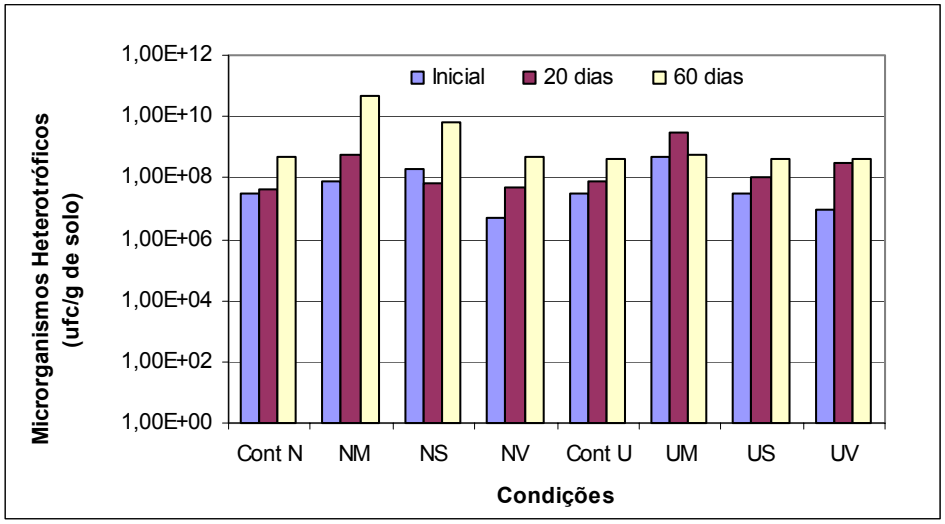
Os melhores resultados obtidos para o pó de coco e para serragem podem estar associados ao fato destes materiais serem degradados por fungos, o que não ocorre com a vermiculita. Essa degradação, ao contrário daquela observada para as condições corrigidas com mamona, pode ter aumentado a atividade de fungos que ao degradarem materiais ligno-celulósicos liberam enzimas que degradam o óleo.

Cabe destacar que o resultado de remoção de carbono por HTP indica o pó de coco e a serragem como melhores agentes estruturantes, com resultados de remoções muito próximos, sendo contraditório ao resultado observado comparando a remoção de carbono calculada a partir do CO_2 acumulado, no qual os melhores agentes estruturantes seriam o pó

de coco e a vermiculita (Tabela 18). Uma importante consideração estaria relacionada à metodologia analítica de HTP. Como a análise destes compostos envolve uma etapa de extração dos mesmos do solo em amostras iniciais e após o teste, essa metodologia analítica seria mais adequada pois a remoção do óleo é quantificada de forma direta, quando a remoção de carbono quantificada pelo CO_2 acumulado é uma forma indireta.

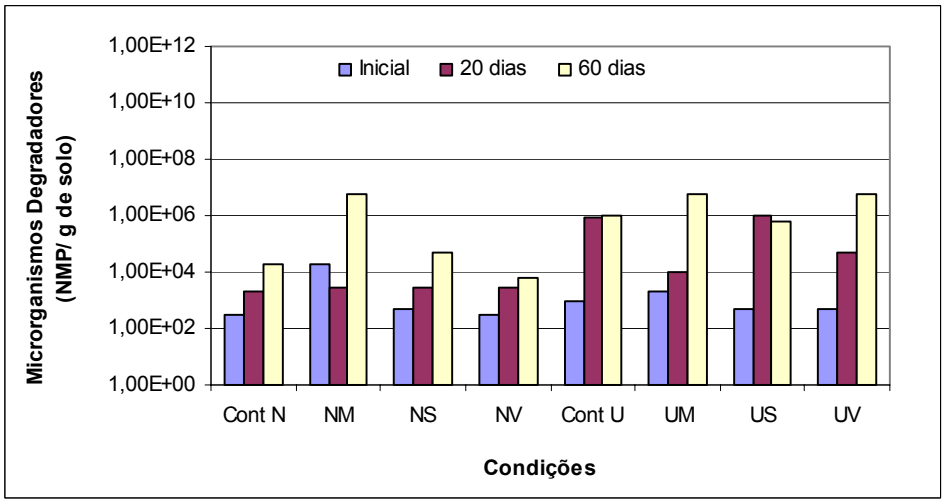
Rhykerd *et al.* (1999) realizaram um estudo avaliando a atividade microbiana do solo contaminado com óleo (10% de HTP), pelo consumo de oxigênio, em condições com e sem óleo, correção nutricional pela adição de uréia e adição de vermiculita, serragem e feno como agentes estruturantes. A adição de feno no solo contaminado com óleo resultou em maior consumo de 0_2 que poderia ser atribuído à decomposição somente do feno, aparentemente devido a um primeiro efeito. A adição da vermiculita não resultou neste efeito, pois por não aumentar a fonte de carbono, não aumenta o consumo de 0_2. Os autores esperavam que a adição do feno e da serragem estimulasse o consumo de 0_2. Porém, a serragem não promoveu um aumento do consumo de 0_2 na presença de óleo. Já o feno foi mais prontamente degradado e o aumento da atividade microbiana provavelmente intensificou a degradação do óleo.

A seguir, nas Figuras de 32 e 33, são apresentados os resultados da contagem dos microrganismos heterotróficos totais e degradadores de óleo cru. Para as condições com óleo, esse acompanhamento foi realizado em amostras iniciais, com 20 dias de teste e finais, após 60 dias de teste. Já para as condições controle com solo sem contaminação e adição dos materiais estruturantes, essas análises foram realizadas somente nas amostras iniciais e finais (Figuras 34 e 35).



Cont.U- adição de uréia; UM- uréia+mamona; US- Uréia+serragem; UV- Uréia+vermiculita; Cont.N-adição de $NaNO_3$; NM- $NaNO_3$+mamona; NS- $NaNO_3$+serragem; NV- $NaNO_3$+vermiculita; Cont.M-solo sem contaminação+mamona; Cont.S- solo sem contaminação+serragem; Cont.V- solo sem contaminação+vermiculita; Cont. Coco- solo sem contaminação+pó de coco

Figura 32: Microrganismos Heterotróficos Totais do 3º Teste de Biodegradação em microcosmos.



Cont.U- adição de uréia; UM- uréia+mamona; US- Uréia+serragem; UV- Uréia+vermiculita; Cont.N-adição de $NaNO_3$; NM- $NaNO_3$+mamona; NS- $NaNO_3$+serragem; NV- $NaNO_3$+vermiculita; Cont.M-solo sem contaminação+mamona; Cont.S- solo sem contaminação+serragem; Cont.V- solo sem contaminação+vermiculita; Cont. Coco- solo sem contaminação+pó de coco

Figura 33: Microrganismos Degradadores do 3º Teste de Biodegradação em microcosmos.

Como pode ser observado na Figura 32, um crescimento proporcional da população heterotrófica durante todo o teste foi verificado, indicativo da atividade microbiana intensa durante o teste. Segundo Rhykerd *et al.* (1999) as condições adotadas são favoráveis a essa

intensa atividade microbiana, devido principalmente a correção nutricional realizada pela adição de nitrogênio. Além disso, nas condições onde houve a adição de materiais estruturantes, um maior crescimento desses microrganismos pôde ser observado tendo em vista a maior aeração promovida por esses materiais. Alarsa (2004) cita em seu trabalho que o aumento das colônias microbianas e a existência de condições favoráveis a biotransformação dos compostos orgânicos ocorre à medida que há uma diminuição da massa do poluente, indicando redução da toxicidade do substrato aos microrganismos.

Nas condições corrigidas com nitrato de sódio, um crescimento acima de 10^{10} ufc/g de solo dos microrganismos heterotróficos foi observado para a condição com adição da mamona, confirmando que o próprio material já devia conter microrganismos cujo crescimento é favorecido pela correção de nitrogênio. O mesmo foi observado para os microrganismos degradadores de óleo (Figura 33). As duas condições, NM e UM, ambas com adição da mamona, foram responsáveis pelo maior crescimento de microrganismos após 60 dias de teste na ordem de 10^6NMP/g de solo. Isoladamente, a condição na qual foi adicionada a vermiculita obteve um crescimento semelhante, mas este pode estar associado à correção de nitrogênio pela uréia, que correspondeu a um crescimento de microrganismos na ordem de 10^6NMP/g de solo na condição controle, somente com a correção desse nutriente.

Comparando os resultados observados nas Figuras 32 e 33 com o segundo teste, cujo material estruturante empregado foi o pó de coco, um crescimento microbiano menor tanto para heterotróficos totais, quanto para degradadores de óleo foi observado nas condições com adição de vermiculita e serragem. Como por exemplo, a condição com concentração de pó de coco de 10%p/p e adição de uréia (U1.10), que forneceu a maior remoção de carbono de 500 mg, apresentou o maior crescimento de microrganismos heterotróficos e degradadores de aproximadamente 10^9 ufc e 10^7 NMP g^{-1} solo seco, respectivamente. A condição com adição de serragem e uréia apresentou concentração de heterotróficos de $4x10^8$ ufc/g solo e de degradadores de $6x10^5$ NMP/g solo. Já a condição com adição de vermiculita, a concentração de heterotróficos foi de $4x10^8$ ufc/g solo e $6x10^6$ NMP/g solo.

A contagem inicial de microrganismos heterotróficos totais nas condições controle (Figura 34) apresentou concentrações iniciais semelhantes variando de 2 a $4x10^7$ ufc/g de

solo. O mesmo não foi observado no final do teste. A condição com a mamona adicionada como agente estruturante apresentou um crescimento da população heterotrófica de 10 ordens de grandeza, crescimento esse idêntico ao observado na condição NM apresentada na Figura 32. De forma semelhante, a concentração de microrganismos degradadores de 10^6 NMP/g de solo na condição controle (Figura 35) foi igual ao observado para as condições NM e UM (Figura 33). Com isso, pode-se concluir que tal aumento não foi devido à degradação do óleo, onde os microrganismos utilizam o contaminante como fonte de carbono, mas devido à degradação da mamona, confirmando o que foi observado na quantificação de CO_2 acumulado (Figura 30).

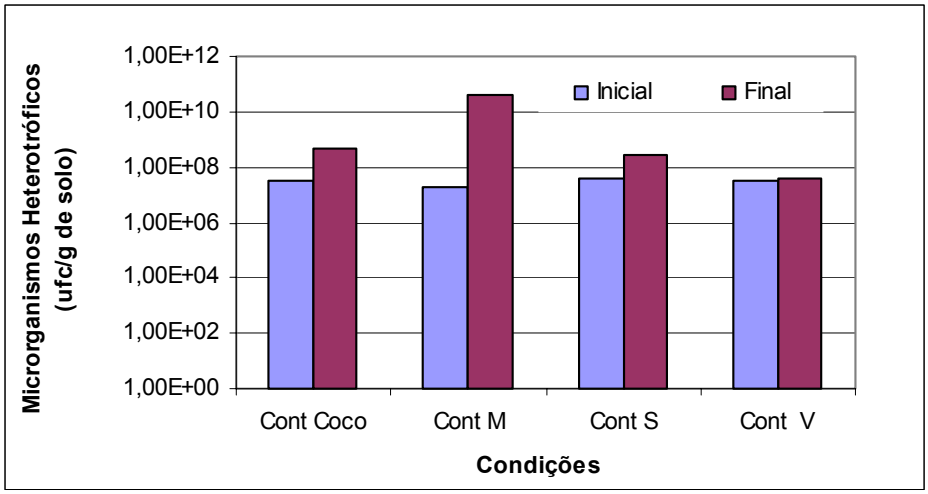


Figura 34: Microrganismos Heterotróficos Totais do 3º Teste de Biodegradação em microcosmos – Controles

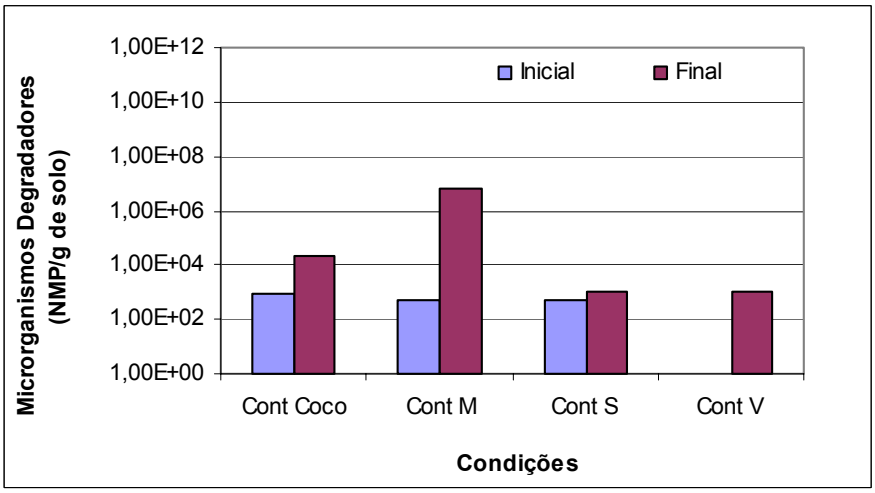


Figura 35: Microrganismos Degradadores do 3º Ensaio de Biodegradação – Controles

Nas Figuras 34 e 35 pôde ser verificado também que a condição na qual foi adicionado o pó de coco foi observado um aumento de microrganismos heterotróficos de $3x10^7$ para $5x10^8$ ufc/g de solo e de microrganismos degradadores de $9x10^2$ para $2x10^4$ NMP/g de solo. Esse crescimento é possivelmente um indicativo de que os microrganismos presentes nesse material são capazes de acelerar a degradação do contaminante.

Para a serragem, material orgânico também passível de degradação microbiana, foi observado um pequeno aumento de $4x10^7$ para $3x10^8$ ufc/ g de solo e de $5x10^2$ para $1x10^3$ NMP/g de solo de heterotróficos totais e degradadores, respectivamente. Porém, para a condição cujo material estruturante adicionado foi a vermiculita, tal aumento não foi observado confirmando que esse material não sofre degradação microbiana, conforme discutido na avaliação do CO_2 acumulado, no qual a concentração final do controle foi semelhante à obtida para o solo sem contaminação no primeiro teste de biodegradação. Pode-se afirmar ainda que as concentrações iniciais de microrganismos heterotróficos de 10^7 ufc/g de solo e de microrganismos degradadores de 10^2 NMP/g de solo encontradas para todas as condições controle poderiam ser as concentrações microbianas presentes naturalmente no solo sem contaminação, sendo estas concentrações próximas às observadas por MOURA (2005) na atenuação natural desse mesmo solo contaminado com 5% p/p de óleo cru.

No trabalho desenvolvido por Nakagawa e Andréa (2006), a incorporação de bagaço de cana-de-açúcar estimulou a comunidade microbiana como um co-substrato, mas não resultou na degradação do hexaclorobenzeno no solo testado. As alterações no solo através da adição de bagaço de cana-de-açúcar e vermicomposto, adição de cal ou alagamento das amostras, em laboratório, buscaram observar os efeitos sobre a comunidade microbiana e sobre a degradação do composto hexaclorobenzeno. A atividade microbiana foi maior nas amostras com adição de bagaço de cana-de-açúcar, assim como a densidade de bactérias (máximo de 152 x 10^3 ufc/g de solo) e de fungos (máximo de 167 x 10^3 ufc/g de solo), porém, a incorporação desse aditivo não foi positiva na degradação do contaminante.

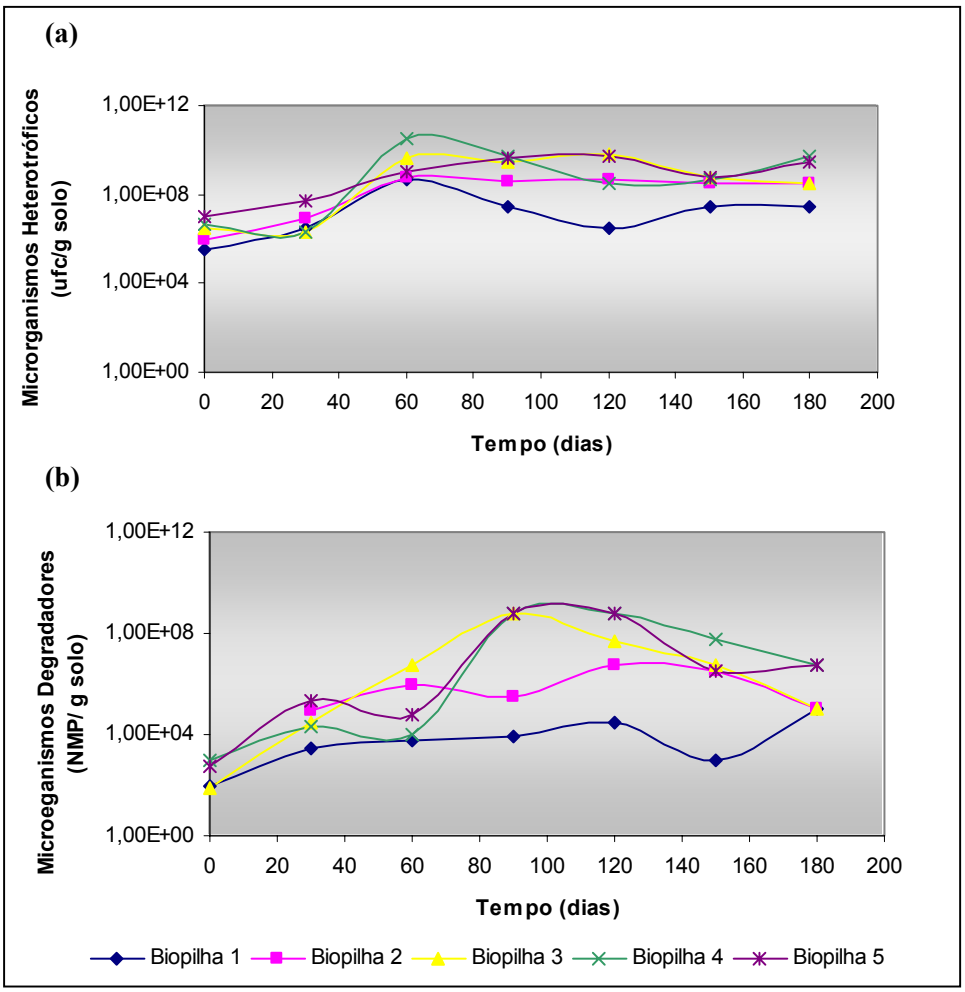
5.3.2 Segunda Etapa: Ensaios em Biopilhas

O tratamento de solos contaminados por petróleo em biopilhas, de uma forma geral, objetiva simular a atividade microbiana aeróbia acelerando a degradação do contaminante pela aeração, adição de nutrientes e correção de umidade (KHAN *et al.*, 2004; LI *et al.,* 2004; MORAIS, 2005). Assim, o ensaio desenvolvido objetivou aplicar em maior escala os melhores resultados obtidos no primeiro e segundo testes de biodegradação em microcosmos na primeira etapa, nos quais foram determinadas a melhor relação nutricional C:N de 100:10 e a granulometria do pó de coco, material estruturante aplicado com o objetivo de promover maior aeração ao sistema. Além disso, a aeração pelo revolvimento semanal das biopilhas foi aplicada, tendo em vista que esta forma de aeração em conjunto com a adição de agentes estruturantes foi citada na literatura como sendo positiva na degradação do contaminante (SEABRA, 2005; MORAIS, 2005). O revolvimento é uma manipulação mecânica do solo para melhorar suas condições de tratamento, já que estimula a atividade microbiana pela sua mistura física, separando agregados do mesmo e expondo as fontes de carbono orgânico e nutrientes aos microrganismos (RHYCKERD *et al.*, 1999).

O acompanhamento das biopilhas foi realizado pela determinação da população microbiana heterotrófica e degradadora de óleo cru e pela taxa de biodegradação, através da quantificação de óleos e graxas (OG) e de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP), determinadas mensalmente durante os 6 meses de ensaio.

O crescimento microbiano de heterotróficos totais e degradadores, observados na Figura 36, a seguir, indica que a adição do pó de coco e a correção de nitrogênio incentivaram a atividade microbiana, visto que a densidade populacional manteve-se sempre superior à biopilha 1, condição controle. Esse comportamento da microbiota autóctona foi observado também por Morais (2005), pela adição de palha de arroz ao tratamento em biopilha de um solo contaminado com resíduos oleosos de refinaria de petróleo. Os ensaios em biopilhas buscaram comparar a adição de palha combinada com o bioaumento do solo, a adição de palha combinada com bioestímulo, somente o bioaumento do solo e este combinado ao bioestímulo. Nas biopilhas onde não houve a adição da palha, foram obtidas concentrações microbianas semelhantes àquelas observadas na biopilha controle, indicando um baixo crescimento dos microrganismos adicionados como inóculo

para o bioaumento. Já as condições com adição da palha, a concentração desses microrganismos se mantiveram superiores aos valores encontrados para a biopilha controle durante todo o experimento. A adição da palha de arroz criou condições favoráveis ao desenvolvimento da microbiota autóctona, pois estes materiais impediram a compactação do solo aumentando a concentração de oxigênio. O mesmo pode ser estabelecido para o pó de coco, utilizado nesta dissertação.



Biopilha 1-Controle solo contaminado; Biopilha 2 – $NaNO_3$+5% de pó de coco; Biopilha 3 - $NaNO_3$+10% de pó de coco; Biopilha 4 - Uréia+5% de pó de coco; Biopilha 5 - Uréia+10% de pó de coco.

Figura 36: Resultados da Contagem de Microrganismos Heterotróficos Totais (a) e Degradadores (b) para o ensaio em biopilhas.

Avaliando as amostras corrigidas com uréia, a biopilha 4, com adição do pó de coco na concentração de 5% p/p, verifica-se uma população inicial de microrganismos heterotróficos de $5x10^6$ ufc/g de solo, passando por um pico de crescimento microbiano de $3x10^{10}$ ufc/g de solo em 60 dias de teste, respectivamente, terminando ao final dos 180 dias de teste com $5x10^9$ ufc/g de solo. Já na condição 5, com adição do pó de coco na concentração de 10% p/p, a população inicial de microrganismos heterotróficos de $1x10^7$ ufc/g de solo, manteve uma concentração microbiana na ordem de 10^9 ufc/g de solo durante três meses (60, 90 e 120 dias de teste), tendo uma ligeira queda aos 150 dias, chegando ao final do teste com $3x10^9$ ufc/g de solo.

Analisando as condições corrigidas com nitrato (Figura 36a), na biopilha 2 com uma concentração de 5% p/p de pó de coco verificou-se uma população inicial de microrganismos heterotróficos de $1x10^6$ ufc/g de solo, passando a uma concentração na ordem de 10^8 em 60 dias de ensaio, mantendo-se assim até o final. A biopilha 3, com 10% p/p de pó de coco, teve um comportamento semelhante ao da biopilha 5, corrigida com uréia. No início do teste a população de microrganismos heterotróficos era de $3x10^6$ ufc/g de solo, manteve-se na ordem de 10^9 ufc/g de solo durante três meses (60, 90 e 120 dias de teste), terminando o ensaio com uma concentração na faixa de 10^8 ufc/g de solo. Assim, poder-se-ia considerar que as condições com maior atividade microbiana seriam as biopilhas 3 e 5, ambas com 10% de pó de coco, tendo em vista que estas condições mantiveram por mais tempo uma alta concentração de microrganismos heterotróficos totais. Cabe destacar que a quantificação dessa população microbiana envolve tanto microrganismos degradadores de óleo cru, quanto todos presentes no sistema solo/contaminante/agente estruturante. Com isso, o aumento desses microrganismos pode ser devido não somente a maior degradação do óleo cru, mas também o aumento de microrganismos responsáveis pela degradação do pó de coco, conforme verificado na condição Controle Coco do terceiro teste de biodegradação.

A concentração de microrganismos degradadores de óleo cru, verificada na Figura 36b, foi mantida para todas as condições testadas, exceto o controle, em concentrações acima da recomendada para um eficiente processo de remoção de petróleo por biopilhas. Normalmente, a densidade de população microbiana média de um solo está na faixa de 10^3 a 10^7 ufc/g de solo. Para a biopilha ser efetiva, uma densidade mínima de microrganismos

heterotróficos deveria ser de 10^3 ufc/g de solo ou maior, pois, quando menor, indicaria a presença de concentrações tóxicas de compostos orgânico ou inorgânico (por exemplo, metais). Nesta situação, as biopilhas podem ser ainda efetivas se o solo for corrigido de forma a reduzir as concentrações tóxicas e aumentar a densidade de população microbiana (USEPA, 2004). Tais aditivos foram adotados como a correção de nitrogênio e incorporação do pó de coco como agente estruturante, mas a própria densidade microbiana de microrganismos heterotróficos da condição controle (biopilha 1), variando de 10^5 a 10^8 ufc/g solo, já seria suficiente para a dita eficiência do processo de biopilhas. No entanto, essa população heterotrófica na condição controle não era específica para a degradação de petróleo, como pôde ser observado, sendo menor a concentração de microrganismos degradadores de óleo de 10^2 NMP/g de solo na amostra inicial, na faixa de 10^3 NMP/g de solo nos meses seguintes, chegando ao final do ensaio numa concentração de 10^5 NMP/g de solo. No entanto, esse crescimento foi estimulado pelos aditivos pó de coco e correção de nitrogênio nas demais condições, chegando a uma faixa de microrganismos degradadores de óleo de 10^6 a 10^8 NMP/g de solo.

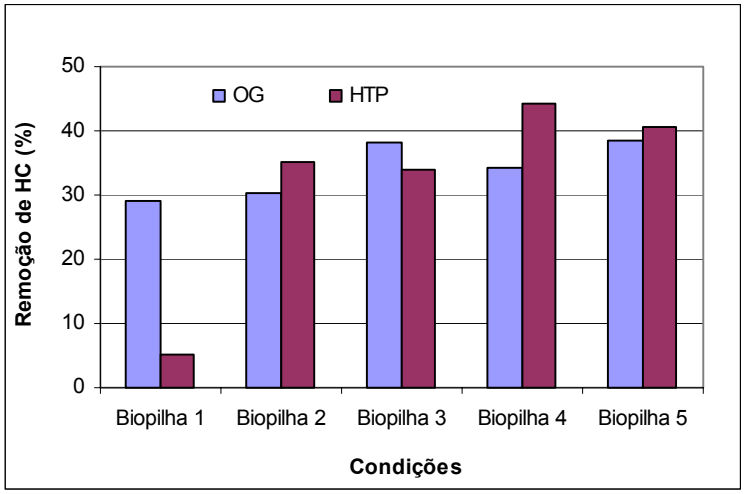
Comparando-se os resultados das biopilhas com as condições correspondentes nos ensaios em microcosmos (segundo teste em microcosmos), verifica-se que novamente as condições onde houve maior crescimento da população degradadora foram as corrigidas com uréia. Em específico, observando o comportamento das biopilhas 4 e 5, houve um crescimento da população degradadora nos primeiros 30 dias de teste e uma queda até os 60 dias. Tal fato corrobora com o observado nas condições U1.5 e U1.10 do segundo teste de biodegradação em microcosmos, correspondentes as biopilhas 4 e 5, respectivamente. Nessas biopilhas, no entanto, após 60 dias de experimento, a população microbiana degradadora voltou a crescer atingindo 10^8 NMP/g de solo. Assim, poder-se-ia esperar que se os testes em microcosmos fossem conduzidos por um maior tempo, uma maior remoção do poluente seria obtida.

Uma outra forma de observar nesse ensaio a eficiência na degradação do óleo cru da adição do pó de coco combinada à correção de nitrogênio poderia ser através da comparação com os resultados obtidos para o mesmo solo contaminado durante a simulação de um processo de atenuação natural (MOURA, 2005). A atenuação natural é a combinação de processos naturais biológicos, químicos e físicos que agem sem intervenção

humana de forma a reduzir a massa, toxicidade, volume ou concentração dos contaminantes (ex. biorremediação intrínseca, disperção, diluição, sorção ou volatilização) (ALVAREZ, 2004).

No trabalho desenvolvido com o mesmo solo utilizado nesta dissertação (dados não mostrados), um sistema foi montado em uma caixa de acrílico com camadas alternadas de areia e cascalho no fundo, para escoamento da água, já que o referido sistema foi deixado sob intempéries naturais. Nesta simulação, a população de heterotróficos totais se manteve semelhante às biopilhas, na ordem de 10^6 a 10^8 ufc/g de solo. Já a população degradadora, foi maior nas biopilhas, na ordem de 10^7 e 10^8, três ordens acima do observado na atenuação natural que ficou na faixa de 10^3 a 10^5 NMP/g de solo, verificando assim a influência das condições adotadas nas biopilhas no aumento desta população, responsável pela remoção do contaminante.

O ensaio em biopilhas foi acompanhado também pela remoção do contaminante calculado a partir da quantificação das concentrações destes compostos no tempo inicial e final de processo. Tal quantificação foi realizada pela determinação do teor de óleos e graxas (OG) e da concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP). A Figura 37, a seguir, apresenta uma comparação dos resultados de remoção de carbono obtidos para os ensaios realizados em biopilhas.



Biopilha 1-Controle solo contaminado; Biopilha 2 – $NaNO_3$+5% de pó de coco; Biopilha 3 - $NaNO_3$+10% de pó de coco; Biopilha 4 - Uréia+5% de pó de coco; Biopilha 5 - Uréia+10% de pó de coco.

Figura 37: Remoção de hidrocarbonetos por cromatografia (HTP) e gravimetria (OG) para 6 meses de ensaio, em Biopilhas.

A partir dos resultados de remoção de hidrocarbonetos de petróleo, foi possível observar que as melhores condições, seja por HTP com uma remoção para a biopilha 4 de 44%, ou por OG com uma remoção de 38% para a biopilha 5, foram as biopilhas cuja correção de nitrogênio foi realizada pela adição de uréia comercial. A biopilha 5, com adição de 10% de pó de coco obteve uma remoção 32% maior que a biopilha 1 (controle sem aditivos), considerando os resultados de remoção de carbono por OG. O resultado discrepante observado para a remoção de carbono da biopilha 1, comparando os métodos de OG e HTP, não permitiram uma melhor comparação do efeito dos aditivos nas biopilhas com correção de nitrogênio e adição de pó de coco levando em consideração os resultados para HTP.

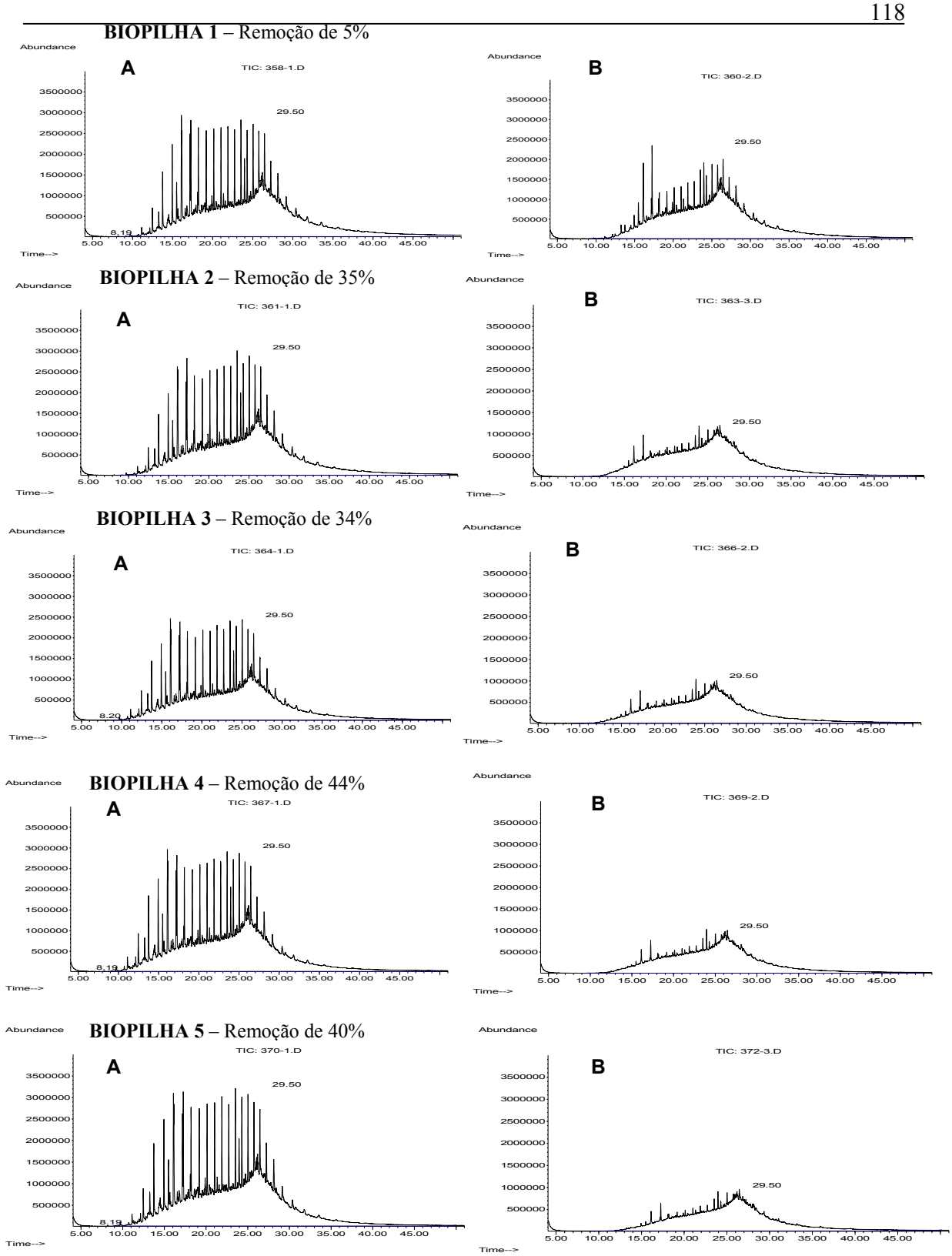
Os resultados apresentados para as biopilhas 1 e 3, mostraram uma divergência no que tange à remoção de hidrocarbonetos, pois era esperado um melhor resultado de HTP para todas as condições. Tal fato se deve principalmente aos diferentes procedimentos adotados em cada análise, sendo mais eficiente o processo de extração utilizado na quantificação de HTP, o que sugeriria que essa análise seria mais adequada.

O método de quantificação por cromatografia gasosa é, atualmente, o mais usado para a determinação de HTP, porque além do alto grau de sensibilidade e seletividade, ele pode ser usado para a identificação individual dos hidrocarbonetos. O método que utiliza a gravimetria baseia-se na pesagem de amostra após a extração do analito e evaporação do solvente. Esta quantidade é chamada HTP gravimétrico ou OG, o qual é fornecido em porcentagem do peso seco da amostra total do solo (TPH *Criteria Working Group apud* NASCIMENTO *et al.,* 2003). A vantagem do método gravimétrico é que ele é simples e de baixo custo, porém é mais suscetível a erros do analisador. Além disso, este método não é apropriado para a medida de hidrocarbonetos de baixo peso molecular que volatilizam em temperaturas abaixo de 70-85°C, muitas vezes encontrados em amostras recém contaminadas, como é o caso das amostras utilizadas no ensaio em biopilhas. Desta forma, era esperado um resultado sub-estimado de remoção de óleos e graxas, tendo em vista que nas amostras iniciais seriam quantificados valores menores que os reais com a volatilização de alguns compostos. Esse resultado foi observado para as biopilhas 2, 4 e 5. Entretanto uma ligeira inversão foi observada na biopilha 3 e um resultado extremamente incoerente foi observado para a biopilha 1, controle sem qualquer aditivo. Na simulação do processo

de atenuação natural, citado anteriormente, em 6 meses de teste com o mesmo solo contaminado, 20% do contaminante foi removido por quantificação de HTP. Assim, o resultado para a biopilha controle de 5% de remoção por HTP estaria incoerente, visto que pelas condições otimizadas na biopilha, esse teor deveria ser superior ao obtido na atenuação natural. De forma coerente, a remoção de hidrocarbonetos de petróleo por óleos e graxas foi de 29%, como esperado, superior aos 20% obtidos pela atenuação natural.

Na Figura 38, são apresentados os cromatogramas de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo, determinados para as amostras iniciais e finais para os ensaios realizados em biopilhas. Analisando a referida Figura, é possível observar uma notável redução de todos os picos referentes aos compostos mais facilmente degradados (tempo de retenção abaixo de 30 minutos) em todas as biopilhas com adição de pó de coco (Biopilha 2, 3, 4 e 5), principalmente quando compara-se os cromatogramas finais dessas condições com a biopilha 1 (controle). Segundo Franco *et al.* (2004) a fração de óleo residual extraída de um solo abaixo do tempo de retenção de 28 min é mais suscetível a degradação microbiana, indicando que possivelmente acima desse tempo de retenção estão os compostos mais difíceis de serem degradados com alto peso molecular, como as olefinas.

A remoção de hidrocarbonetos nas biopilhas 2 e 3 (correção com nitrato de sódio) se restringiu aos compostos de natureza menos complexas, encontrados nos picos e chamados nos cromatogramas de fração resolvida. Já as biopilhas 4 e 5, corrigidas com uréia, além de degradar estes, foram mais eficientes na degradação dos compostos mais recalcitrantes, os quais normalmente não aparecem no cromatograma na forma de picos, mas sim na fração não resolvida do cromatograma como pode ser visualizado. Essas biopilhas foram responsáveis pela maior remoção de HTP de 44 e 40% para a adição de 5 e 10% p/p de pó de coco. Comparando essa remoção com a obtida por OG para a biopilha 1 (controle) de 29%, um aumento de 50%, em média, foi devido a adição do pó de coco combinada com a correção de nitrogênio com uréia comercial.



Biopilha 1-Controle solo contaminado; Biopilha 2 – $NaNO_3$+5% de pó de coco; Biopilha 3 - $NaNO_3$+10% de pó de coco; Biopilha 4 - Uréia+5% de pó de coco; Biopilha 5 - Uréia+10% de pó de coco.

Figura 38: Cromatogramas de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo: A – Inicial; B – Final.

Jørgensen *et al.* (2000), por exemplo, estudaram a interferência da adição de pedaços de madeira, espécies microbianas em associação e correção de nutrientes no tratamento de um solo contaminado por óleo lubrificante e óleo díesel. Após 5 meses de teste, a remoção do contaminante nas pilhas com óleo lubrificante foi de 70%, a partir da concentração inicial do contaminante de 2400 para 700 mg/ kg de solo seco. Na pilha com solo contaminado com óleo diesel uma remoção de 71% foi observada, devido a redução da concetração do contaminante de 700 a 200 mg/kg de solo seco. A contagem de microrganismos heterotróficos ficou na faixa de 0,8 a $8,2x10^8$ ufc/g de solo e de microrganismos degradadores de óleo cru ficou na faixa de $5,3x10^7$ e $1,5x10^8$ ufc/g de solo. Comparando com os resultados obtidos nesta dissertação, a contagem microbiana ficou na faixa da encontrada para as biopilhas testadas com adição do pó de coco, porém, uma menor eficiência de remoção do contaminante foi observada. Isto se deve ao fato de que os contaminante avaliados por Jorgensen *et al.* (2000) são mais facilmente biodegradados do que o óleo cru utilizado para contaminar o solo tratado nas biopilhas acrescidas de pó de coco.

Chaîneau *et al*. (2005) observou também a degradação de diferentes frações do óleo residual extraído de um solo contaminado por petróleo, de acordo com as condições nutricionais adotadas. Na ausência de nutrientes minerais, 47% de biodegradação foi observada, e a análise qualitativa por cromatografia gasosa mostrou que alcanos foram somente parcialmente degradados considerando que a biodegradação foi total em solos fertilizados. Adicionalmente, a correção de nutrientes propiciou um aumento de 15% na assimilação de hidrocarbonetos. O efeito da adição de nutrientes foi mais pronunciado na assimilação de alcanos lineares e ramificados do que em alcanos cíclico indicando que a adição de nutrientes estimula preferencialmente a assimilação de hidrocarbonetos parafínicos.

Outro estudo que verificou a eficiência da adição de agentes estruturantes a um solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo foi desenvolvido por Morais (2005). Cinco biopilhas foram construídas contendo solo contaminado por borra de óleo, para avaliar a adição de microrganismos isolados do próprio local contaminado, a adição de fertilizante para plantas e adição da palha de arroz como agente estruturante. Os resultados após 350 dias demonstraram uma redução da quantidade de resíduo de 67% na biopilha controle, na

faixa de 70% nas biopilhas sem adição de palha de arroz e 80% nas biopilhas com palha de arroz. As biopilhas contendo palha de arroz demonstraram degradação mais rápida do resíduo, principalmente nos dois primeiros meses deste estudo, provavelmente devido ao estímulo da microbiota natural.

Segundo Khan *et al.* (2004), algumas características dos solos apresentam um papel principal no sucesso de biopilhas incluindo: textura, permeabilidade, quantidade de umidade, e densidade *bulk*. Solos com uma baixa permeabilidade são difíceis de aerar, mas retém água melhor que os solos com uma alta permeabilidade. Solos com baixa permeabilidade freqüentemente formam aglomerados, tornando difícil a distribuição de umidade, ar e nutrientes. Por causa da distribuição não uniforme destas características no solo, pode ser requerido o revolvimento ou a aragem para promover ótimas condições para a biodegradação, elevando a aeração do sistema.

Nas biopilhas desenvolvidas para avaliação da adição do pó de coco, esse revolvimento foi realizado, semanalmente, com o auxílio de um ancinho de jardinagem. Esta forma de revolvimento não é a mais eficiente comparada à aeração forçada por dutos nas biopilhas em escala industrial, porém, em escala de laboratório apresenta-se como uma forma adequada de reduzir a heterogeneidade do sistema solo/contaminante/microbiota. Desta forma, eleva-se a atividade microbiana pela maior disponibilização de nutrientes e do próprio contaminante. Em biorreatores, porém, essa heterogeneidade é muito reduzida, tendo em vista que o sistema de homogeneização deste é mais eficiente permitindo a melhor incorporação de aditivos.

Com isso, um ensaio foi desenvolvido utilizando um protótipo de biorreator de fase sólida desenvolvido no projeto que envolve o CETEM, o CENPES/PETROBRAS e a Escola de Química/UFRJ, aplicando os mesmos parâmetros avaliados na biopilha 5, tendo em vista que esta condição foi a melhor em microcosmos (segundo teste) e, por quantificação de óleos e graxas, foi responsável pela maior remoção do contaminante. Destaca-se que o ensaio que será apresentado a seguir foi iniciado antes do término das análises de remoção do contaminante pela quantificação de hidrocarbonetos totais de petróleo.

5.3.3 Terceira Etapa: Ensaio em Biorreator

Na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, pode-se aplicar tanto reatores de fase semi-sólida (ou reatores de lama), quanto reatores de fase sólida. No tratamento em biorreatores de fase semi-sólida, após a escavação e peneiramento do solo contaminado, este é misturado a água em um reator geralmente vertical. A lama gerada poderá conter mais ou menos sólidos (de 10 a 40% p/p) em função do tipo de solo, sendo mais indicado para solos que contenham partículas finas, dos equipamentos de agitação e aeração disponíveis e da taxa de remoção dos contaminantes a ser atingida. Os reatores de lama apresentam como vantagem altas taxas de degradação, mas há a necessidade do tratamento posterior dos efluentes, o que eleva o custo da aplicação desta tecnologia. Já nos biorreatores de fase sólida, adiciona-se ao solo apenas quantidade de água suficiente para manter a atividade microbiana (50 a 75% da capacidade de retenção de água) e o equipamento, geralmente, é disposto horizontalmente e apresenta como sub-configurações os reatores do tipo tambor rotativo e do tipo tambor fixo. Os reatores de fase sólida são mais adequados ao solo com alto teor de sólidos (RAIMUNDO e RIZZO, 2002).

O teste foi realizado em um protótipo de biorreator de fase sólida com o objetivo de determinar a influência do sistema de aeração na degradação de petróleo em solo, adicionando o pó de coco como agente estruturante e bioestimulando este solo pela correção de nitrogênio. Desta forma, foram reproduzidas as melhores condições obtidas nos ensaios de biodegradação em microcosmos e em biopilhas, a saber: adição do pó de coco na granulometria acima da granulometria do solo, concentração do pó de coco de 10% p/p e correção nutricional para a relação C:N de 100:10 pela adição de uréia. O biorreator é do tipo tambor fixo, no qual a agitação do material no interior do mesmo é realizada pela movimentação de um eixo interno, o qual proporciona uma eficiente homogeneização através da melhor incorporação de oxigênio e de nutrientes.

A Figura 39, a seguir, apresenta o decaimento do teor de óleos e graxas durante o tempo de ensaio. Cabe destacar, que por motivos operacionais, não foi possível analisar a amostra final (amostra de 80 dias).

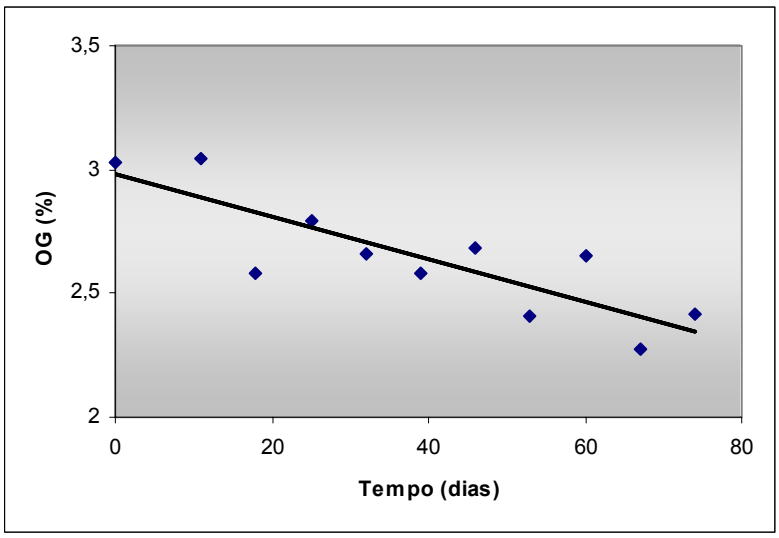


Figura 39: Resultados do teor de óleos e graxas (OG) do ensaio em biorreator.

A partir da análise do teor de óleos e graxas é possível calcular a remoção do contaminante pelas concentrações determinadas nas amostras inicial e com 74 dias de teste, sendo esta remoção de aproximadamente 25%. Resultado semelhante foi observado pela quantificação de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP), cujos cromatogramas são apresentados na Figura 40, a seguir.

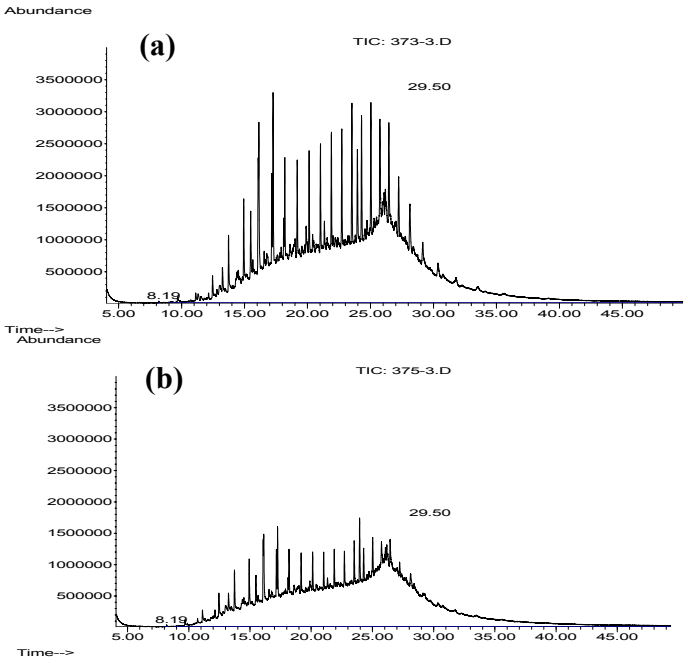


Figura 40: Cromatogramas de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo do Ensaio em Biorreator (a) amostra inicial e (b) amostra final.

A análise qualitativa pela visualização dos cromatogramas já permite observar a eficiência do processo de remoção do contaminante no teste em biorreator, tendo em vista a sensível diferença nas alturas do picos, alturas estas que são proporcionais a concentração de compostos presentes na contaminação. Em 80 dias de teste no biorreator, a remoção de HTP foi de 26%.

Comparando os cromatogramas da Figura 40, com os obtidos para as biopilhas, as amostras iniciais apresentaram um mesmo perfil. Já a amostra final apresentou uma remoção da fração não resolvida, compostos mais complexos, conforme observado para as biopilhas 4 e 5. Porém, foi observada uma menor degradação dos compostos mais suscetíveis a ação microbiana (picos resolvidos). Deve-se levar em consideração que o tempo de cada ensaio foi distinto, sendo muito superior para as biopilhas (180 dias). Por isso, foram calculadas as taxas mensais de remoção do contaminante para os três sistemas testados, microcosmo, biopilha e biorreator, conforme apresentado na Figura 41, a seguir.

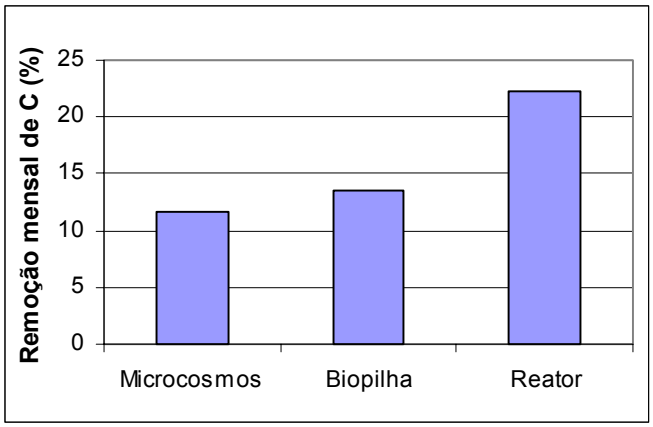


Figura 41: Taxa mensal de remoção de HTP para os três sistemas testados: microcosmos, biopilhas e biorreator.

A condução do processo no biorreator teve como conseqüência uma taxa mensal de remoção do contaminante 93% maior que no ensaio em microcosmo e 64% maior que no ensaio em biopilhas (Figura 41). A maior eficiência de remoção no biorreator, seguido da biopilha, comprova que a maior degradação do contaminante depende do sistema de aeração adotado. O sistema de aeração permite o maior suprimento de oxigênio, aceptor final da degradação aeróbia e por isso tão importante. Além disso, quando foi realizado

pelo revolvimento ou aragem do material proporcionou melhor incorporação dos nutrientes e/ou aditivos, melhor distribuição da umidade e, conseqüentemente, uma maior atividade microbiana degradadora. Essa atividade pode ser observada nas Figuras 42 e 43, onde são apresentados os resultados de contagem dos microrganimos heterotróficos totais e degradadores de óleo realizada durante o monitoramento do ensaio de biodegradação em biorreator.

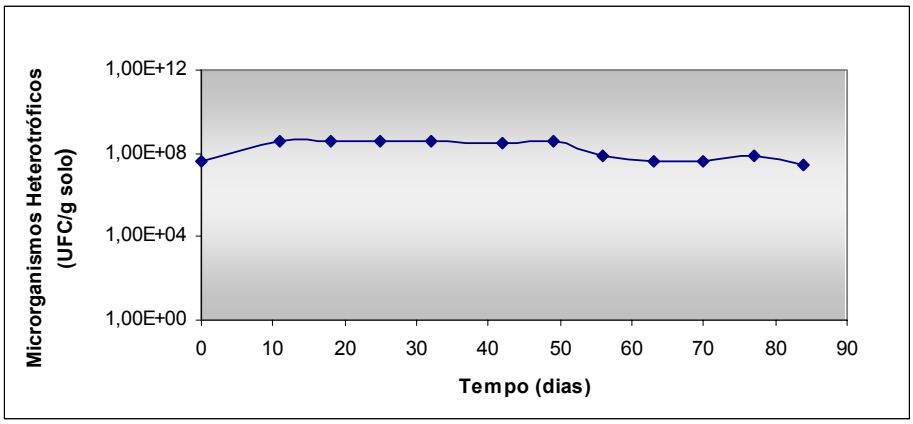


Figura 42: Resultado da Contagem de Microrganismos Heterotróficos Totais do Ensaio de Biodegradação em Biorreator.

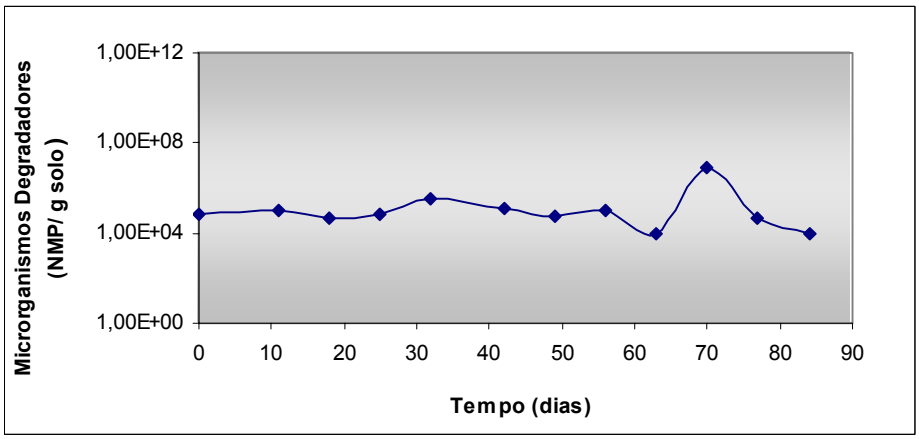


Figura 43: Resultado da Contagem de Microrganismos Degradadores do Ensaio de Biodegradação em Biorreator.

A partir da Figura 42, pode-se observar que a concentração de microrganismos heterotróficos totais no tratamento no biorreator manteve-se na faixa de $4x10^7$ a $4x10^8$ ufc/g

de solo, faixa esta ligeiramente inferior a observada para a biopilha 5, no mesmo período, que variou de $1x10^7$ a $5x10^9$ ufc/g de solo e para o ensaio em microcosmos essa faixa variou de $2x10^7$ a $5x10^9$ ufc/g de solo. Essa faixa menos ampla, porém mais constante da concentração de microrganismos heterotróficos totais no biorreator pode ser resultado da melhor homogeneização do sistema, mantendo essa população mais tempo sobre condições ótimas para a atividade degradadora com fornecimento de nutrientes, umidade, disponibilidade do contaminante e de oxigênio.

Já a contagem de microrganismos degradadores de óleo foi mantida na mesma faixa observada para a biopilha 5, na ordem de 10^5 a 10^6 NMP/g de solo, sendo esta muito distinta da faixa encontrada em microcosmo que variou de $7x10^1$ NMP/g de solo inicialmente, para $1x10^7$ NMP/g de solo em 20 dias, chegando ao final de 60 dias de teste com $6x10^5$ NMP/g de solo.

De acordo com KHAN *et al.* (2004), os reatores apresentam um sistema mais eficiente de homogeneização do sistema solo/contaminante/microrganismos/aditivos, conseqüentemente, apresentam maiores eficiências na degradação de compostos orgânicos. Dentre outras vantagens da aplicação de biorreatores na remediação de um solo contaminado, Ward *et al.* (2003) citam a possibilidade de monitoramento contínuo da *performance* do sistema, incluindo as emissões gasosas. Além disso, essa tecnologia de biorremediação permite o controle das condições de processo e a aplicação de estratégias para otimizar a atividade microbiana, como o bioestímulo, bioaumento, adição de agentes estruturantes, entre outros. Em termos de custo-benefício, apesar do maior custo associado a implantação de um biorreator, o reduzido tempo de remediação é um fator preponderante na escolha dessa tecnologia.

Os biorreatores quando comparados com o processo mais comum de tratamento de resíduos oleosos de refinarias, o *Landfarmig*, costumam ter remoções do contaminante muito superiores, além de favorecerem o processo de biodegradação, ao invés da volatilização (WARD *et al.*, 2003). Em um reator de fase semi-sólida, com menor porcentagem de sólidos do que em um reator de fase sólida, por exemplo, as reações biológicas são aceleradas por causa do maior contato entre contaminantes e microrganismos no meio aquoso, de uma mistura efetiva e manutenção de alta concentração de microrganismos aumentando a taxa de degradação (USEPA, 2004).

6 CONCLUSÕES

Caracterização do Solo e do Pó da Casca de Coco Verde

- A partir dos dados de distribuição granulométrica do solo sem contaminação (73% de areia, 14% de silte e 11% de argila) e utilizando o Diagrama Triangular adotado pela Sociedade Brasileira do Solo foi possível determinar a textura do solo, classificando-o como FRANCO-ARENOSO.

- Os resultados da caracterização complementar do solo contaminado demonstraram uma notável alteração na densidade de partícula (1,4 g/mL), porosidade (16%), capacidade de retenção de água (28%) e matéria orgânica (5,8%), quando comparados com os resultados obtidos para o solo sem contaminação (2,2 g/mL; 43%; 34% e 1,7%; respectivamente). Essa alteração das características do solo é devida principalmente à presença do óleo cru que altera a porosidade preenchendo os poros vazios do solo, o que também interfere diretamente na capacidade de retenção de água tendo em vista que reduz a sua permeabilidade.

- A análise mineralógica do solo por Difração de Raios-X, realizada a fim de obter informações a respeito do tipo de minerais presentes no solo, identificou na amostra bruta do solo os minerais quartzo, caulinita, muscovita e illita, além de pelo menos uma fase com pico em aproximadamente 14 Å, que poderia ser relativo aos grupos da clorita, vermiculita ou esmectita.

- A análise do material fino orientado por DRX, preparado pela sedimentação dos argilo-minerais seguida da remoção da matéria orgânica, possibilitou uma melhor caracterização da amostra na região de baixo ângulo, evidenciando picos em 14,38 e 9,94 Å. O primeiro pico pode estar relacionado à vermiculita, esmectita ou clorita, e o segundo à muscovita ou illita.

➢ Nas observações ao MEV para o solo sem contaminação, foi observada a predominância de elementos como Si, C, O, Al, Ca e Fe (em menor proporção). Não foram detectados minerais pesados, tais como Zr, Ti e Terras Raras.

➢ A confirmação da presença dos minerais identificados por DRX não foi possível por MEV devido à presença destes na forma de aglomerados, não apresentando características reconhecíveis ao microscópio eletrônico. Porém, a presença de argilo-minerais, sugeridas em ambas análises, aponta para um solo com elevada capacidade de retenção de água, o que poderia interferir no comportamento do mesmo.

➢ A análise do EDS (Figura 16), apresentou bandas características dos elementos C, N,O, P e K, não sendo observados elementos como Ca, Na, Fe, Mg e traços de Cu, Zn e Mn, elementos encontrados na análise química típica da casca de coco verde proveniente do Estado do Ceará.

<u>Ensaio em Microcosmos</u>: Primeiro Teste

➢ A condição 2 (solo contaminado) apresentou a concentração final de aproximadamente $12x10^3$ μmol de CO_2 acumulados, valor este muito superior ao observado para a condição 1 (solo sem contaminação), cuja concentração foi de $2x10^3$ μmol de CO_2 acumulados, devido a presença da matéria orgânica proveniente do óleo.

➢ Nos ensaios realizados com o solo contaminado com 5% p/p de óleo cru, adicionando-se NaNO3, a melhor remoção de carbono de 215 mg foi observada para a relação C:N de 100:10, seguida de 100:15 e 100:20 com remoções de carbono de 189 e 179 mg, respectivamente. Essas remoções foram inversamente proporcionais ao aumento da concentração de nitrogênio.

➢ A correção de fósforo para uma relação nutricional C:P de 100:1 não interferiu na degradação do contaminante.

<u>Ensaio em Microcosmos</u>: Segundo Teste

- No segundo teste em microcosmos, foi observado um aumento de 151mg para 316mg de C removido da condição com nitrato de sódio para a condição com uréia, respectivamente, ambas sem adição do pó de coco como material estruturante (condições controles). Isto indica que a fonte de nitrogênio influenciou na degradação do óleo cru, sendo os melhores resultados observados para as condições corrigidas com uréia.

- A adição do pó de coco como material estruturante resultou no aumento da remoção do contaminante nas diferentes condições testadas. As melhores condições, N.1.10 e U.1.10 (correção com nitrato de sódio e uréia, respectivamente, e adição de 10% p/p de pó de coco na granulometria acima da granulometria do solo), foram responsáveis pela remoção de 428 mg e 501 mg de carbono.

- A análise estatística indicou que somente os fatores estudados individualmente (fonte de nitrogênio, concentração e granulometria do material estruturante) influenciam estatisticamente na remoção de carbono.

- Os níveis superiores de granulometria (acima de 10#, granulometria do solo) e a concentração do pó de coco (10% p/p) promoveram maiores remoções de carbono pela análise estatística.

- A contagem dos microrganismos heterotróficos totais apresentou maior concentração desses microrganismos nas condições com adição do pó de coco, na faixa de 10^8 a 10^{10} ufc/g de solo, o que pode estar diretamente relacionado com a maior aeração proporcionada por esse material quando adicionado ao solo contaminado, favorecendo o crescimento dos microrganismos.

- O aumento crescente da população microbiana degradadora foi observado para todas as condições até os 20 dias de teste, principalmente para as condições corrigidas com nitrato de sódio, o que pode ser devido ao fato de que, por ser o pó de coco um material ligno-

celulósico, pode estimular o crescimento de fungos com alto potencial na degradação do óleo.

Ensaio em Microcosmos: Terceiro Teste

- Nas condições somente com a adição dos materiais estruturantes ao solo sem contaminação, pode ser observado que dentre todos os materiais testados, a mamona foi o mais biodegradado, seguida do pó de coco e da serragem. A vermiculita sofreu pouca ou nenhuma degradação pela ação microbiana, o que era esperado por ser esse um silicato composto principalmente de ferro, alumínio e cálcio.

- A maior remoção de óleo de 328 mg foi observada para a condição com o pó de coco corrigida com uréia, seguida 304mg de C para vermiculita e 279mg de C para serragem. A mamona não apresentou degradação relativa ao óleo.

- A análise de remoção de HTP confirmou o pó de coco como melhor agente estruturante, pois foi obtido um resultado de 23% de remoção nos testes bioestimulados com uréia, resultado este 77% superior ao obtido com a adição da vermiculita, porém somente 4% superior ao obtido com a adição da serragem, não sendo essa diferença muito significativa.

- A condição com concentração de pó de coco de 10%p/p e adição de uréia, propiciou a maior remoção de carbono (500 mg), apresentando as maiores concentrações de microrganismos heterotróficos e degradadores de aproximadamente 10^9 ufc e 10^7 NMP por g de solo, respectivamente.

Ensaio em Biopilhas

- O crescimento microbiano de heterotróficos totais e degradadores, indicou ser a adição do pó de coco e a correção de nitrogênio fundamentais para a atividade microbiana.

- O maior crescimento microbiano foi observado na biopilha com adição do pó de coco (10% p/p) e adição de uréia. A população inicial de microrganismos heterotróficos de $1x10^7$ ufc/g de solo, alcançou a ordem de 10^9 UFC/g de solo e se manteve praticamente inalterada durante os dias de tratamento.

- Os resultados de remoção de carbono por hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) e por óleos e graxas (OG) indicaram que as melhores condições foram aquelas cuja correção de nitrogênio foi realizada pela adição de uréia. A biopilha com 10% p/p de pó de coco obteve uma remoção de carbono 31% maior que a biopilha controle sem aditivos, por OG.

- Comparando os cromatogramas finais obtidos para as biopilha com adição de pó de coco, com o cromatograma obtido para a amostra final da biopilha sem aditivos (controle), observa-se uma notável redução dos picos referentes aos compostos mais facilmente degradados (tempo de retenção abaixo de 30 minutos). Destas, as que sofreram correção com uréia foram inclusive eficientes na degradação dos compostos mais recalcitrantes.

Ensaio em Biorreator

- As taxas mensais de remoção de HTP para os três sistemas testados, microcosmo, biopilha e biorreator, foi de 11, 13 e 22%, respectivamente. A condução do processo no biorreator teve como conseqüência uma taxa mensal de remoção do contaminante 93% maior que no ensaio em microcosmo e 64% maior que no ensaio em biopilhas, demonstrando que a maior degradação do contaminante depende do sistema de aeração adotado.

- A concentração de microrganismos heterotróficos totais foi mais constante durante o ensaio em biorreator comparativamente ao observado em microcosmos e biopilhas, possivelmente resultante da melhor homogeneização do sistema.

7 SUGESTÕES

- Sabe-se que a textura de um solo influencia bastante na forma de tratamento do mesmo, pois é fator preponderante na interação solo/contaminante, por isso, seria interessante empregar a adição do pó de coco no processo de remediação de um solo com características argilosas. É esperado que nesse tipo de solo a adição de uma material estruturante aumente ainda mais a eficiência do processo, tendo em vista que a maior concentração das frações silte e argila nesses solos pode prejudicar o comportamento mecânico e, conseqüentemente, a biodegradação do contaminante.

- Na caracterização de outros solos recomenda-se a determinação da composição química do mesmo para uma discussão mais detalhada na avaliação dos minerais que compõe o solo.

- É interessante realizar a análise da interação solo/contaminante e solo/contaminante/material estruturante (pó de coco) em um MEV ambiental cujo sistema de vácuo especial utiliza pequenas câmaras intermediárias entre a câmara de amostras e detectores projetados especialmente para operarem com pressões de vapor d'água (ou de outros gases) no interior da câmara de amostras.

- Um estudo mais específico da utilização da mamona como agente estruturante de solos contaminados seria necessário para elucidar todas as dúvidas com relação à natureza e ao comportamento dos microrganismos presentes na mamona.

- Há a necessidade de um estudo mais aprofundado da ação degradadora de óleo pelos fungos presentes no solo, quando estes são estimulados pela adição de materiais ligno-celulósicos.

- Para testes futuros, recomenda-se monitorar a perda de nitrogênio durante o teste, a fim de verificar a necessecidade de complementar a correção inicial desse nutriente.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT NBR 10.006 (2002) **Norma Técnica de Solubilização de Resíduos**.

ALARSA, M. (2004) Avaliação da aplicação de tecnologias de remediação in situ em planta petroquímica – um estudo de caso. **Remediação e Revitalização de Áreas Contaminadas**: Aspectos Técnicos, Legais e Financeiros – Experiências Nacionais e Internacionais Instituto Ekos Brasil. São Paulo: Signus Editora.

ALBERS, A. P. F.; MELCHIADES, F. G.; MACHADO, R.; BALDO, J. B.; BOSCHI, A. O. (2002) Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X. **Cerâmica**, 48: 305.

ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (1995) **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1st ed., 576 p.

ALEXANDER, M. (1999) **Biodegradation and Bioremediation**. San Diego: Academic Press, 2nd ed., U.S.A., 453p.

ALEXANDER, M. (1977) **Introduction to soil microbiology**. New York, John Wiley & Sons,. p.16-72. *apud* NAKAGAWA, L. E.; ANDRÉA, M.M. (2006) Efeito de Alterações nas Características do Solo sobre a Degradação de Hexaclorobenzeno. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 30, 575-582.

ALVAREZ, P. J. (2004) Princípios e aplicações da biorremediação do BTEX. **Remediação e Revitalização de Áreas Contaminadas:** Aspectos Técnicos, Legais e Financeiros – Experiências Nacionais e Internacionais Instituto Ekos Brasil, São Paulo: Signus Editora.

ANTONIO, R.N. (2005) **Soluções Híbridas para Problemas de Migração de Contaminantes no Solo.** Tese Submetida ao Corpo Docente da COPPE/UFRJ como parte dos Requisitos Necessários para a Obtenção do Grau de Mestre em Ciências em Engenharia Civil. 122 p.

ARCHELA, E (2007) **Minerais de Argila.** Texto Didático, Departamento de Geociências, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina. Disponível em: http://www.geo.uel.br/edison/argila.pdf Pesquisado em: janeiro de 2007.

BAHERI, H.; MEYSAMI, P. (2002) Feasibility of fungi bioaugmentation in composting a flare pit soil. **Journal of Hazardous Materials**, B89: 279–286.

BAPTISTA, S.J.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.D.C. (2005) Production of CO_2 in Crude Oil Bioremediation in Clay Soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 48: 249-255.

BARRINGTON, S.; CHOINIÉRE, D.; TRIGUI, M.; KNIGHT, W. (2002) Effect of carbon source on compost nitrogen and carbon losses. **Bioresource Technology**, 83: 189–194.

BAYARDINO, R.A. (2004) **Petrobras e o Desafio da Sustentabilidade Ambiental**. Monografia de bacharelado apresentada ao Instituto de Economia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Disponível em: http://www.ie.ufrj.br/gema/. Acesso em: novembro 2006.

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

BISMARCK, A.; MOHANTY, A. K.; ARANBERRI-ASKARGORTA, I.; CZAPLA, S.; MISRA, M.; HINRICHSENB, G.; SPRINGERA, J. (2001) Surface characterization of natural fibers; surface properties and the water up-take behavior of modified sisal and coir fibers. **Green Chemistry**, 3: 100–107.

BOOPATHY, R. (2003) Use of anaerobic soil slurry reactors for the removal of petroleum hydrocarbons in soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 52: 161 – 166.

BRITO, N.N.; ZAMORA, P.P.; NETO, A.L.O.; DE BATTISTI, A.; PATERNIANI, J.E.S.; PELEGRINI, R.T. (2004) **Biorremediação e Controle Ambiental**. IV Fórum de Estudos Contábeis, Faculdades Integradas Claretianas, Rio Claro, SP. Disponível em: www.ceset.unicamp.br/lte/artigos/4fec02_2004 Pesquisado em 16/08/2006 as 11:45.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. (2003) **Planejamento de Experimentos usando *Statistica.*** Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais. 260p.

CARRIJO, O.A.; LIZ, R.S.; MAKISHIMA, N. (2002) Fibra da casca do coco verde como substrato agrícola. **Horticultura Brasileira**, v. 20, 4: 533-535.

CHAILLAN, F.; CHAYNEAU, C.H; A. SALIOT, A.; OUDOT, J. (2006) Factors inhibiting bioremediation of soil contaminated with weathered oils and drill cuttings. **Environmental Pollution**, 144: 255-265.

CHAÎNEAU, C.H.; ROUGEUX, G.; YEPREMIAN, C.; OUDOT, J. (2005) Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil. **Soil Biology & Biochemistry** (37), 8: 1490-1497.

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. Disponível em: www.ceset.unicamp.br/lte/artigos/3fec2401 Pesquisado em 16/08/2006 as 11:46.

CHO, B. H.; CHINO, H.; TSUJI, H.; KUNITO, T.; MAKISHIMA, H.; UCHIDA, H.; MATSUMOTO, S.; OYAIZU, H. (1997) Analysis of oil components and hydrocarbonsutilizing microorganisms during laboratory-scale bioremediation of oil-contaminated soil of Kuwait. **Chemosphere** (35), 7: 1613-1621. *apud* MORAIS, E. B. (2005) **Biodegradação de Resíduos Oleosos Provenientes de Refinaria de Petróleo Através do Sistema de Biopilhas**. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.

CHOI, S., LEE, Y., OH, Y. (2003) Treatability Tests for the Bioremediation of Unsanitary Landfill Waste Soils. **The Journal of Microbiology** (41), 2:169-173.

COELHO, M.A.Z.; LEITE, S. G. F.; ROSA, M. F.; FURTADO, A. A. L. (2001) Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais: Produção de Enzimas a partir da Casca de Coco Verde. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 3342. Disponível em: http://calvados.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/alimentos/ Pesquisado em: abril de 2005.

CRAPEZ, M. A. C., BORGES, A. L. N., BISPO, M. G. S., PEREIRA, D. C. (2002) Biorremediação- Tratamento para derrame de Petróleo. **Ciência Hoje**, 179 (30), 32-37.

CURTIS, T.P.; SLOAN, W.T. & SCANNEL, J.W. (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. **Proc. Nat. Acad. Sci.** , 99:10494-10499. *apud* LAMBAIS, M. R.; CURY, J. C.; MALUCHE-BARETTA, C. R.; BÜLL, R. C. (2005) Diversidade Microbiana de Solos. **Tópicos de Ciência do Solo**, 4:43-84. Disponível em: http://sbcs.org.br/ Pesquisado em: novembro 2006.

D'ANNIBALE, A.; ROSETTO, F.; LEONARDI, V.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI M. (2006) Role of Autochthonous Filamentous Fungi in Bioremediation of a Soil Historically Contaminated with Aromatic Hydrocarbons. **Applied and Environmental Microbiology** (72), 1: 28–36.

DEUEL, L.E. e HOLLIDAY, G. H. (1997) **Soil Remediation for The Petroleum Extraction Industry**. Tulsa: PennWell, 2nd ed., U.S.A., 242p.

ELLERT, N.; ANDERSON, B. N.; KATAOKA, K. (2004) Biorremediação de compostos aromáticos – BTEX – Estudo de caso. **Remediação e Revitalização de Áreas Contaminadas**: Aspectos Técnicos, Legais e Financeiros – Experiências Nacionais e Internacionais Instituto Ekos Brasil. São Paulo: Signus Editora.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA (1997) **Manual de Métodos de Análise de Solo**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 212p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA (1999). Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema Brasileiro de classificação de solos.** Rio de Janeiro: Embrapa.

FARIA, C.M. B., SILVA, D. J. (2003) **Amostragem para Análise de Fertilidade do Solo em Cultivo Irrigado de Fruteiras.** Disponível em: http://www.agronline.com.br/artigos/ Pesquisado em: janeiro 2007.

FIGUEIRA, M. (2000) Vermiculita é transformada em mineral hidrofóbico - material é capaz de retirar compostos cancerígenos e óleo da água. **Revista Ciência Hoje**. Disponível em: http://cienciahoje.uol.com.br/controlPanel/materia/view/2747. Pesquisado em: dezembro 2006.

FIUZA, A. M. A.; VILA; M. C. C. (2005) An insight into soil bioremediation through respirometry. **Environment International**, 31: 179–183.

FRANCO, I.; CONTIN, M.; BRAGATO, G.; DE NOBILI, M. (2004) Microbiological resilience of soils contaminated with crude oil. **Geoderma**, 121: 17–30.

GLOSSÁRIO ILUSTRADO DE TERMOS GEOLÓGICOS. **A Geologia do Parque Nacional da Peneda-Gêres, Universidade do Minho**. Disponível em:

http://www.dct.uminho.pt/pnpg/gloss/horizontes.html. Pesquisado em: 10 de novembro de 2005.

GOMES, J. B. V.; CURI, N.; MOTTA, P. E. F.; KER, J. C.; MARQUES, J. J. G. S. M.; SCHULZE, D. G. (2004) Análise de Componentes Principais de Atributos Físicos, Químicos e Mineralógicos de Solos do Bioma Cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 28:137-153.

HIGGINS, I. J.; BURNS, R. G. (1975) The chemistry and microbiology of pollution. London: Academic Press Inc, 248p. *apud* MORAIS, E. B. (2005) **Biodegradação de Resíduos Oleosos Provenientes de Refinaria de Petróleo Através do Sistema de Biopilhas**. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.

JOHNSTON, C.D.; DAVIS, G.B. (1997) **An Overview os Current Research on Remediation of Soils and Aquifers Contaminated by Organic Compounds**. Technical Report, nº4/97, Centre for Groundwater Studies, CSIRO Land and Water. Disponível em: http://www.clw.csiro.au/publications/technical97/ Pesquisado em: julho 2006.

ICDD – International Centre for Diffraction Data. (1996) **Software Bruker Diffrac**.

ITAMURA, A. E. (2004) **Inter-relações da variabilidade espacial da granulometria do solo e a produtividade do feijoeiro sob plantio direto.** Dissertação (Mestrado em Sistema de Produção) – Faculdade de Engenharia de Iha Solteira, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira. 109p.

JARAMILLO, I. R. (1996) **Fundamentos teóricos-práticos de temas selectos de la ciência del suelo.** Parte 1. Universidad Autónoma Metropolitana, México.

JØRGENSEN, K.S.; PUUSTINEN, J.; SUORTTI, A.-M. (2000) Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. **Environmental Pollution**, 107: 245-254.

KHAN, F. I.; HUSAIN, T.; HEJAZI, R. (2004) An overview and analysis of site remediation technologies. **Journal of Environmental Management**, 71: 95–122

KIRK, J.L., BEAUDETTE, L.A., HART, M., MOUTOGLIS, P., KLIRONOMOS, J. N., LEE, H., TREVORS, J. T. (2004) Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, 58: 169– 188.

KITAMURA, A.E. (2004) **Inter-relações da variabilidade espacial da granulometria do solo e a produtividade do feijoeiro sob plantio direto**. Dissertação de Mestrado em Sistemas de Produção. Faculdades de Engenharia da Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira. 109 p.

LAMBAIS, M. R.; CURY, J. C.; MALUCHE-BARETTA, C. R.; BÜLL, R. C. (2005) Diversidade Microbiana de Solos. **Tópicos de Ciência do Solo**, 4:43-84. Disponível em: http://sbcs.org.br/ Pesquisado em: novembro 2006.

LEE, S.; LEE, S., KIM, D., KIM, J. (2007) Degradation characteristics of waste lubricants under different nutrient conditions. **Journal of Hazardous Materials**, 143: 65-72.

LEPSCH, I.F. (2002) **Formação e Conservação dos solos**. São Paulo: Oficina de Textos.

LI, L.; CUNNINGHAM, C.J.; PAS, V.; PHILP, J.C.; BARRY, D.A.; ANDERSON, P. (2004) Field trial of a new aeration system for enhancing biodegradation in a biopile. **Waste Management**, 24: 127–137.

LUCHESE, E. B.; FÁVERO, L.O.B.; LENZI, E. (2001) **Fundamentos da Química do solo**. Rio de Janeiro: Freitas Bastos.

MACEDO, J. S.; MOREIRA, F. K. V.; CARVALHO, P. H.V.; CARREÑO, N. L. V.; GIMENEZ, I. F.; BARRETO, L. S. (2004) **Obtenção de carbono mesoporoso do pó das fibras da casca de coco.** In. II Seminário de Pesquisa FAP-SE, Aracaju.

MARGENSIN, R.; ZIMMERBAUER, A.; SCHINER, F. (2000) Monitoring of bioremediation by soil biological activities. **Chemosphere**, 40: 339-346. *apud* MORAIS, E. B. (2005) **Biodegradação de Resíduos Oleosos Provenientes de Refinaria de Petróleo Através do Sistema de Biopilhas**. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.

MARIANO, J. B. (2005) **Impactos Ambientais do Refino de Petróleo**. Rio de Janeiro: Interciência.

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/lte/artigos/3fec2401 Pesquisado em 16/08/2006 as 11:46.

MORGAN, P. WATKINSON R.J. (1989) Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment, **Crit. Rev. Biotechnol**. 8: 305–333. *apud* LEE, S.; LEE, S., KIM, D., KIM, J. (2007) Degradation characteristics of waste lubricants under different nutrient conditions. **Journal of Hazardous Materials**, 143: 65-72.

MEYSAMI, P. e BAHERI, H. (2003) Pre-screening of fungi and bulking agents for contaminated soil bioremediation. **Advances in Environmental Research**, 7:881-887.

MOLINA-BARAHONA, L.; RODRÝGUEZ-VÁZQUEZ, R.; HERNÁNDEZ-VELASCO, M.; VEGA-JARQUÝN, C.; ZAPATA-PÉREZ, O.; MENDOZA-CANTÚ, A.; ALBORES, A. (2004) Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. **Applied Soil Ecology**, 27: 165–175.

MONTGOMERY, D. C. (1999). **Design and Analysis of Experiments**. New York: John Wiley & Sons, 4th ed, 704p.

MOORE, D. M.; REYNOLDS JR, R. C. (1989) **X-Ray Diffraction and the Identification and analysis of clay minerals**. New York: Oxford University Press.

MORAIS, E. B. (2005) **Biodegradação de Resíduos Oleosos Provenientes de Refinaria de Petróleo Através do Sistema de Biopilhas**. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.

MORENO, C. M., BECERRA, A. G., SANTOS, M. J. B. (2004) Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos: Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. **Revista Iberoamericana de Micologia**, 21: 103-120.

MOURA, T.S.; SANTOS, R. M.; RIZZO, A. C. L. (2005) **Simulação de um Processo de Atenuação Natural de Solo Contaminado por Petróleo**. In: I Ufrj Ambientável. Rio de Janeiro, RJ.

NAKAGAWA, L. E.; ANDRÉA, M.M. (2006) Efeito de Alterações nas Características do Solo sobre a Degradação de Hexaclorobenzeno. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 30, 575-582.

NASCIMENTO, A.R.; ARARUNA JUNIOR, J.; ZIOLLI, R.L. (2003) **Otimização e Avaliação do Desempenho de um Método de Determinação de TPH (*Total Petroleum Hydrocarbons*) em Areia por Detecção no Infravermelho.** In: METROLOGIA-2003 – Metrologia para a Vida Sociedade Brasileira de Metrologia (SBM), Recife, Pernambuco.

NETO, B. B., SCARMÍNIO, I. e BRUNS, R. E. (1995). **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Editora UNICAMP, Campinas, Brasil, 299p.

NOBRE *et al.*, 2005, Remediação de Solos. **Revista Química e Derivados**. Disponível em: http://www.quimica.com.br/quimicaederivados.htm acessada em maio de 2005. *apud* ANTONIO, R.N. (2005) **Soluções Híbridas para Problemas de Migração de Contaminantes no Solo.** Tese Submetida ao Corpo Docente da COPPE/UFRJ como parte dos Requisitos Necessários para a Obtenção do Grau de Mestre em Ciências em Engenharia Civil. 122 p.

NRCS Soils. **Natural Resources Conservation Service, Soil Survey Manual** - Examination and Description of Soils. Disponivel em: http://soils.usda.gov/technical/manual/contents/ Pesquisado em: fevereiro de 2007.

OLANIRAN, A. O., PILLAY, D., PILLAY, B. (2006) Biostimulation and bioaugmentation enhances aerobic biodegradation of dichloroethenes. **Chemosphere**, 63: 600–608.

OLIVEIRA, A. S.; SILVA-MANN, R.; SANTOS, H. O.; ANDRADE, T. M.; SANTOS JÚNIOR, J. B.; MACEDO, F. L. (2006) **Qualidade Sanitária de Sementes de Mamona, Cultivares Nordestina e Paraguaçu**. In: Segundo Congresso Brasileiro de Mamona, Aracaju, Sergipe. Disponível em: http://www.rbb.ba.gov.br/arquivo/311.pdf

ORTIZ, I., VELASCO, A., REVAH, S. (2006) Effect of toluene as gaseous cosubstrate in bioremediation of hydrocarbon-polluted soil. **Journal of Hazardous Materials,** B131: 112–117.

PETROBRÁS (2006) **Petrobras vai investir US$ 724 milhões no Nordeste**. Gerência de Imprensa. Disponível em: http://www2.petrobras.com.br/ri/port/noticias/noticias/ Pesquisado em: janeiro de 2007.

PINO, G. A. H. (2005) **Biossorção de Metais Pesados Utilizando Pó da Casca de Coco Verde (*cocos nucifera*)**. Tese M.Sc. Pontifícia Universidade Católica, Departamento de Ciência dos Materiais e Metalurgia, Rio de Janeiro, Brasil.

POLIVANOV, H. (2006) **Apostila de Pedologia**. Departamento de Geologia, Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

RAIMUNDO, R. S. e RIZZO, A. C. L. (2002). **Utilização de Biorreatores no Tratamento de Solos Contaminados por Hidrocarbonetos de Petróleo**. In: X Jornada de Iniciação Científica, Centro de Tecnologia Mineral - CETEM/MCT.

RAIMUNDO, R. S., MACEDO, R. C. e RIZZO, A. C. L. (2004) **Tratamento de solo contaminado por petróleo empregando material estruturante.** In: Anais do 44º Congresso Brasileiro de Química realizado pela Associação Brasileira de Química (ABQ), de 20 a 24 de Setembro de 2004, Fortaleza, Ceará.

RAIMUNDO, R. S. e RIZZO, A. C. L. (2004) **Estudo do emprego de biorreator no tratamento de solo contaminado por petróleo**. In: XII Jornada de Iniciação Científica, Centro de Tecnologia Mineral – CETEM/MCT.

RIKE, A.G.; HAUGEN, K.B.; BØRRESEN, M.; ENGENE, B.; KOLSTAD, P. (2003) In situ biodegradation of petroleum hydrocarbons in frozen arctic soils. **Cold Regions Science and Technology**, 37: 97– 120.

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

ROCCA, A. C. C. (1993) **Resíduos Sólidos Industriais**. São Paulo: CETESB, 233 p.

ROCHA, E. C.; GHELER Jr., J. **Aproveitamento de resíduos gerados na aglomeração de fibra de coco com látex natural.** Matéria Técnica SENAI, Rio de Janeiro, 2000. Disponível em: http://sbrt.ibict.br/upload/sbrt738.pdf. Pesquisado em: outubro de 2006.

RODRIGUES, R.A. (2003) **A Influência do Esgoto Doméstico como Fluido de Saturação no Colapso de um Solo Arenoso.** Dissertação apresentada a Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira da Universidade Estadual Paulista (Unesp), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil. Disponível em: http://www.biblioteca.unesp.br/bibliotecadigital Pesquisado em: novembro de 2005.

ROSA, M. F.; ABREU, F. A. P.; FURTADO, A.A.L.; BRÍGIDO, A.K.L.; NORÕES, E.R.V. (2001) **Processo agroindustrial: obtenção de pó de casca de coco verde**. Comunicado Ténico, nº61, EMBRAPA Agroindustrial Tropical. Disponível em: http://www.cnpat.embrapa.br/ Pesquisado em: novembro de 2005.

SALANITRO, J.P., WISNIEWSKI, H.L., BAYERS, D.L., NEAVILLE, C.C., SCHRODER, R.A. (1997) Use of aerobic and anaerobic microcosms to assess BTEX biodegradation in aquifers. **Ground Water Monit. Rem.** 17 (3), 210– 221. *apud* RIKE, A.G.; HAUGEN, K.B.; BØRRESEN, M.; ENGENE, B.; KOLSTAD, P. (2003) In situ

biodegradation of petroleum hydrocarbons in frozen arctic soils. **Cold Regions Science and Technology**, 37: 97– 120.

SANNAZZARO, A. M.; FENILLE, R. C.; SOUZA, N. L. (2001) Saprofitismo e patogenicidade de *Rhizoctonia solani* Kühn AG-4 em solo incorporado com farelo de mamona. **Acta Scientiarum** (23), 5: 1211-1214. Disponível em: http://www.ppg.uem.br/docs/ctf/Agronomia/2001/ Pesquisado em: janeiro de 2007.

SAVASTANO JUNIOR, H.; PIMENTE, L.L. (2000) Viabilidade do Aproveitamento de Resíduos de Fibras Vegetais para fins de Obtenção de Material de Construção. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** (4), 1: 103-110. Disponível em: http://www.agriambi.com.br/revista/v4n1/103.pdf Pesquisado em: novembro de 2005.

SCHENK, T. (2004) Desenvolvimento e aplicações de técnicas microbiológicas progressivas para a remediação de contaminantes orgânicos no solo e nas águas subterrâneas. **Remediação e Revitalização de Áreas Contaminadas**: Aspectos Técnicos, Legais e Financeiros – Experiências Nacionais e Internacionais Instituto Ekos Brasil. São Paulo: Signus Editora.

SCHROEDER, R. H. A.; RODRÍGUEZ, V. I. D.; CARRILLO, L.V. (2002) Evaluation of Microbial Respiration and Ecotoxicity in Contaminated Soils Representative of the Petroleum producing Region of Southeastern Mexico. **Terra**, 20: 3.

SEABRA, P.N.C. (2005) **Aplicação de biopilha na biorremediação de solos contaminados com petróleo.** Tese Dsc submetida ao Programa de Engenharia Química da COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

SENHORAS, E. M. (2003) **Estratégias de uma Agenda para a Cadeia Agroindustrial do Coco: Transformando a Ameaça dos Resíduos em Oportunidades Eco-Eficientes**. Monografia apresentada ao Instituto de Economia da Universidade Estadual de Campinas. Disponível em: http://www.cocoverderj.com.br/CocoMonografia.pdf Pesquisado em: outubro de 2006.

SILVA, R. F.; CAMARGO, N. H. A. (2003) **Microscopia Eletrônica de Varredura**. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Tecnológicas PPGCEM - Ciência e Engenharia de Materiais, TEX - Técnicas Experimentais. Disponível em: http://www.ppgcem.ufscar.br/dissertacoes_e_teses/ Pesquisado em: janeiro de 2007.

STIER, T. (2004) Seguindo as Tendências das Tecnologias de Remediação. Será que às vezes não escolhemos a abordagem errada? **Remediação e Revitalização de Áreas Contaminadas:** Aspectos Técnicos, Legais e Financeiros – Experiências Nacionais e Internacionais Instituto Ekos Brasil. São Paulo: Signus Editora.

SORIANO, A.U. (2000) **Tratamento de Solos Argilosos Contaminados por Hidrocarbonetos de Petróleo.** Relatório de Atividades Apresentado ao CNPq, Processo nº 300479/99-9, Área – Engenharia Química (cadastrado na biblioteca do CETEM/MCT como Relatório Técnico).

TREMIER, A.; DE GUARDIÃ, A.; MASSIANI, C.; PAUL, E.; MARTEL, J.L. (2005) A respirometric method for characterising the organic composition and biodegradation kinetics and the temperature influence on the biodegradation kinetics, for a mixture of sludge and bulking agent to be co-composted. **Bioresource Technology**, 96: 169 a180.

TRINDADE, P.V.O. (2002). **Avaliação das técnicas de bioaumentaçào e bioestimulação no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo.** Tese M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 127p.

TPH CRITERIA WORKING GROUP (1998) **Analysis of Petroleum Hydrocarbons in Envirronmental Media**. Disponível em: < http://www.aehs.com >. Acesso e Download em 10 de setembro de 2002. *apud* NASCIMENTO, A.R.; ARARUNA JUNIOR, J.; ZIOLLI, R.L. (2003) **Otimização e Avaliação do Desempenho de um Método de Determinação de TPH (*Total Petroleum Hydrocarbons*) em Areia por Detecção no Infravermelho.** In: METROLOGIA-2003 – Metrologia para a Vida Sociedade Brasileira de Metrologia (SBM), Recife, Pernambuco.

USEPA – U. S. Enveronmental Protection Agency (2004). **How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers.** (EPA 510-B-94-003, EPA 510-B-95-007, and EPA 510-R-04-002). Disponível em: http://www.epa.gov/oust/pubs/tums.htm. Pesquisado em: maio de 2005.

USEPA 3550B (1996) **Ultrasonic Extraction**. EPA, Revision 2, 14p.

USEPA 8015B (1996) **Nonhalogenated Organics Using GC/FID**. Enviromental Protection Agency, Revision 2, 28p.

VAN DORT, H.M.; SMULLEN, L. A.; MAY, J. R.; BEDARD, O.L. (1997) Priming microbial metadechlorination of polychlorinated biphenyls that have persisted in housatonic river sediments for decades. **Environmental Science Technoogy,** 31:3300-3307. *apud* BRITO, N.N.; ZAMORA, P.P.; NETO, A.L.O.; DE BATTISTI, A.; PATERNIANI, J.E.S.; PELEGRINI, R.T. (2004) **Biorremediação e Controle Ambiental**. IV Fórum de Estudos Contábeis, Faculdades Integradas Claretianas, Rio Claro, SP. Disponível em: www.ceset.unicamp.br/lte/artigos/4fec02_2004 Pesquisado em 16/08/2006 as 11:45.

VASUDEVAN, N.; RAJARAM, P. (2001) Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. **Environment International**, 26: 409 – 411.

VOGEL, T. M. (1996) Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. **Current Opinion in Biotechnology**, 7:311-316

WARD, O., SINGH, A. e VAN HAMME, J. (2003) Accelerated Biodegradation of Petroleum Hydrocarbon Waste. **J. Ind. Microbiol Biotechnol***,* 30:260 – 270.

http://www.geocities.com/reciclagem2000/biorremediacao.htm Pesquisado em: agosto de 2006.