UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

Avaliação das técnicas de bioaumento fúngico e bioestímulo em processos de biorremediação utilizando solo contaminado por petróleo

Sabrina Dias de Oliveira

Rio de Janeiro
2008

Avaliação das técnicas de bioaumento fúngico e bioestímulo em processos de biorremediação utilizando solo contaminado por petróleo

Sabrina Dias de Oliveira

Dissertação de Mestrado apresentada à Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadores:

Prof. D. Sc. Selma Gomes Ferreira Leite
D. Sc. Judith Liliana Solórzano Lemos

EQ / UFRJ
Rio de Janeiro
2008

Avaliação das técnicas de bioaumento fúngico e bioestímulo em processos de biorremediação utilizando solo contaminado por petróleo

SABRINA DIAS DE OLIVEIRA

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade do Brasil - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovada por:

_____

Selma Gomes Ferreira Leite, D. Sc.
(orientador – presidente da banca)

_____

Judith Liliana Solórzano Lemos, D. Sc.
(orientador)

_____

Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D. Sc.

_____

Paulo Negrais Carneiro Seabra, D. Sc.

_____

Vicente Paulo de Souza, D. Sc.

Rio de Janeiro
31 de Julho de 2008

Oliveira, Sabrina Dias de.

Avaliação das técnicas de bioaumento fúngico e bioestímulo em processos de biorremediação utilizando solo contaminado por petróleo.

xviii, 140 p.: il.

Orientadores: Selma Gomes Ferreira Leite e Judith Liliana Solórzano Lemos.

(Dissertação) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2008.

1. Biorremediação. 2. Petróleo. 3. Fungos Filamentosos – Tese. I. Título. II. Dissertação (Mestrado – UFRJ/ EQ).

"A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido. Não na vitória propriamente dita".

Mahatma Gandhi.

Dedico esse trabalho a duas grandes mulheres: minha avó Dóris (in memorian) e minha mãe Maria Luiza.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por mostrar e abrir meus caminhos.
- Aos meus pais e irmão, que sempre estiveram ao meu lado e acreditaram no meu empenho.
- Ao Flavio Bittencourt, por compreender minha ausência e ajudar a trilhar minha história.
- A minha avó Dóris (*in memorian*), pela sua lição de força e coragem.
- A toda a minha família, em especial a minha avó Lourdes. Sua ajuda permitiu que eu chegasse até aqui.
- A minha orientadora, D. Sc. Judith Liliana, por ser a mentora desse projeto e por ter me ensinado muito mais do que biorremediação.
- A minha orientadora, D. Sc. Selma Leite, pelas contribuições e pelo carinho demonstrado, principalmente, nos momentos mais difíceis.
- A Claudinha e Bianca, por serem minhas grandes amigas e confidentes, em todos os momentos.
- A Marion, pela colaboração na execução dos experimentos. A sua companhia foi fundamental para prosseguir.
- As minhas grandes companheiras do projeto de biorremediação/fungos: Acácia, Yaci, Juliana, Lílian e Aline.
- A Moniquinha, por toda a ajuda técnica fornecida. Seu auxílio foi fundamental para a formatação desse trabalho.
- Aos amigos do mestrado: Diego, Patrícia, Ricardo, Graziela e Camilo, pela parceria nas disciplinas cursadas e pela amizade.
- A Dani, Gisele, Pedro Félix, Jorge Luiz (JL), Tatiane Moura, Ary e Grace, por todo o auxílio fornecido durante a parte experimental.
- Aos amigos do CETEM, que me fizeram sorrir durante esses dois anos: Juan, Clenilson, Débora Monteiro, Débora Sanchez, Michel, Márcia, Luiz Felipe, Júnior, Jorginho, Hugo Masson, Felipe, Rodrigo, Renata Barreto, Tayra, Rodnei, Gustavo, Michel, Felipe Duarte, Renata da Matta, , Paula Aragão e Paula Batista.
- A todos os meus amigos, que compreenderam minha ausência e me deram forças pra continuar.

- Ao LABFER, em especial, ao Prof. Everaldo Zonta, pelas análises de fertilidade.
- A toda a equipe do LECOMIN, em especial, a pesquisadora Silvia Egler e ao mestrando Ricardo Cezar, pela realização dos ensaios de ecotoxicidade
- Ao Ronaldo Santos, Coordenador de Processos Metalúrgico e Ambientais do CETEM, pelo aporte intelectual e técnico.
- Aos pesquisadores Andréa Rizzo, Cláudia Cunha, Valéria, Vicente, Luiz Sobral e Flávio Lemos, pelas contribuições valiosas.
- A todos dos Serviços Gerais, em especial, ao Raul e Seu Vicente.
- Aos motoristas, em especial ao Márcio, pelas viagens para a UFRRJ e Analytical Solutions.
- A toda a equipe da oficina e da unidade-piloto.
- À Escola de Química, pelo suporte acadêmico e técnico.
- A direção do CETEM, pela infra-estrutura oferecida para a realização da parte experimental da minha dissertação.
- A Petrobrás, por ceder gentilmente o solo e o petróleo para a realização da parte experimental.
- A CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Oliveira, Sabrina Dias de**. Avaliação das técnicas de bioaumento fúngico e bioestímulo em processos de biorremediação utilizando solo contaminado por petróleo.** Orientadores: Selma Gomes Ferreira Leite e Judith Liliana Solórzano Lemos. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências).

O presente trabalho visa determinar as estratégias de biorremediação mais efetivas para um solo nordestino, intencionalmente adicionado de petróleo, e avaliar a contribuição dos fungos filamentosos, nos processos de biodegradação.

Para cumprir os objetivos relatados, os ensaios de biodegradação foram divididos em quatro estágios.

O ensaio preliminar consistiu em um processo de atenuação natural monitorada de um solo contaminado com 5% m/m de petróleo. O principal objetivo, nesta fase, era a determinação de um momento ideal para adição de um inóculo predominantemente fúngico. Foi observado que, na quinta semana do experimento, houve um aumento na população de fungos filamentosos, definindo esse momento como o período adequado para execução de uma inoculação fúngica no solo.

Na segunda etapa, foram avaliadas, principalmente, a contribuição das fontes de nitrogênio e suas respectivas concentrações nos testes de biodegradação de óleo cru em micro-escala, além da CRA (capacidade de retenção de água) mais favorável para o crescimento microbiano. Por meio da análise de hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP), a condição empregando uréia na relação C:N 100/10 e 50% da CRA, mostrou um incremento maior na remoção de petróleo (62,34%) comparada à amostra com mamona na relação C:N 100/20 e 50% da CRA (54,40%).

A terceira etapa do procedimento experimental consistiu no estudo dos microrganismos biodegradadores de óleo em uma escala maior (biorreatores estáticos). A associação bioestímulo-bioaumento se mostrou mais favorável para a biodegradação do petróleo do que as técnicas empregadas individualmente; e o bioaumento realizado no início do processo apresentou resultados mais satisfatórios do que o realizado na quinta semana. Dentre as condições testadas nos ensaios de biodegradação, destaca-se o emprego da uréia, na relação C:N 100:15, e a adição do bioaumento no início do processo para amostras contaminadas, tanto com 1% m/m, quanto com 5% m/m de contaminante, diferenciando-se, apenas, na relação C:N utilizada (100:10) para amostras com 5% de petróleo.

Na última etapa, foi realizada a avaliação da qualidade do solo contaminado por meio de ensaios de toxicidade aguda com minhocas. Os solos contendo 1% e 5% m/m de petróleo não foram considerados tóxicos para os testes de letalidade e perda de biomassa realizados. Contudo, a incorporação das fontes de nitrogênio se mostrou mais agressivas à qualidade do solo do que o próprio contaminante.

ABSTRACT

Oliveira, Sabrina Dias de. **Evaluation of the fungal bioaugmentation and biostimulation tecniques in bioremediation process using contaminated soil with crude oil.** Supervisors: Selma Gomes Ferreira Leite and Judith Liliana Solórzano Lemos. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2008. Dissertation (Master of Science).

This work aims at determining the most effective strategies for bioremediating a northeast oil-bearing soil, being such oil intentionally added, and evaluate the contribution of filamentous fungi in the biodegradation process.

To achieve such goals, tests of biodegradation were divided into four steps.

The preliminary test consisted of monitored natural attenuation process of soil contaminated with 5% w/w of oil. The main goal at this step, was determining an ideal time for adding a predominantly fungal inoculum. It was observed that in the ffth week of the experiment, there was an increase in fungal population. This step defined the fifth week as the right time for implementing a fungal inoculation in the soil.

In the second step, the contribution of the nitrogen sources and their concentrations were evaluated mainly in the tests of biodegradation of crude oil in micro scale, besides the more favorable WRC for microbial growth. The experiment was followed by direct measurements of carbon dioxide, from soil contaminated with 5% w/w of oil. Through analysis of total petroleum hydrocarbons (TPH), the condition employing urea in the 100/10 C: N ratio, and 50% of WRC, showed a higher oil removal (62.34%) compared to the sample with castor bean in the 100/20 C: N ratio, and 50% of the WRC (54.40%).

The third step of the experimental procedure consisted in the study of microorganisms with the ability to degrade oil on a large scale (static bioreactors). The association bio-stimulation-bio-augmentation was more favorable for the biodegradation than the techniques used individually, and bio-augmentation carried out early in the process presented more satisfactory results, than those obtained in the fifth week. Among the conditions tested in the biodegradation assays, the use of urea in the 100:15 C: N ratio, and the early addition of the inoculum in the contaminated samples were evidenced, either with 1% w/w, or with 5% w / w of contaminant. The difference was in the latter condition, accomplished in 100:10 C:N ratio.

At the last step, the quality of contaminated soil was evaluated by acute toxicity tests with earthworms. The soils containing 1% and 5% w/w oil were not considered toxic to the tests of lethality and loss of biomass. However, the incorporation of nitrogen sources was more aggressive on soil quality than the actual contaminant.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fontes de Nitrogênio.....25

Tabela 2. Condições adotadas no Teste de Biodegradação em microcosmos.....55

Tabela 3. Variáveis e Níveis utilizados no Planejamento Experimental 2^3 do teste em microcosmos.....56

Tabela 4: Condições adotadas nos Ensaios em Biorreatores Estáticos.....59

Tabela 5. Descrição das amostras utilizadas na avaliação da qualidade do solo por ensaios de ecotoxicidade…….....61

Tabela 6. Rotina de Fertilidade, Teor de Nitrogênio Total e determinação da CRA no solo virgem.....68

Tabela 7. Relação natural C:N para as amostras de solo virgem e contaminado.....69

Tabela 8. Composição Química da Uréia e da Mamona.....70

Tabela 9. Matriz do planejamento fatorial completo (2^3) 82

Tabela 10. Incremento na remoção de HTP para as condições 1 e 15, em relação aos seus respectivos controles, sem fonte de nitrogênio. 92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Constituição de um solo ideal 9

Figura 2. Classificação granulométrica do solo.....10

Figura 3. Esquema de contaminação no meio ambiente.....12

Figura 4. Construção do *landfarming*.....19

Figura 5. Plantação de mamona (*Ricinus communis* L.) 27

Figura 6. Fluxograma das etapas do processamento das sementes de mamona para a produção do óleo e do subproduto torta.....28

Figura 7. Principais benefícios proporcionados pelos fungos.....39

Figura 8. Homogeneização do solo.....47

Figura 9. Quarteamento do solo.....48

Figura 10. Biorreator estático contendo solo contaminado com petróleo a 5% m/m.....52

Figura 11. Foto do microcosmo utilizado nos Testes de Biodegradação.....54

Figura 12. Ensaio utilizando biorreatores estáticos…….....…….57

Figura 13. Inclusão das minhocas nas réplicas e disposição dos lotes no teste.....63

Figura 14. Contagem de colônias de fungos filamentosos em solo contaminado com 5% m/m de petróleo. 73

Figura 15. Contagem de colônias de microorganismos heterotróficos totais em solo contaminado com 5% m/m de petróleo. …….....…….73

Figura 16. Teor de óleos e graxas para as amostras de solo contaminado com 5% m/m de petróleo e 50, 75 e 90% da CRA. …….....…75

Figura 17. Teste de biodegradação de solo contaminado com 5% de petróleo, utilizando uréia (U) como nutriente: condições 1-12…….....78

Figura 18. Teste de biodegradação de solo contaminado com 5% de petróleo, utilizando torta de mamona (MA) como nutriente: condições 13-24…….....78

Figura 19. Teste de biodegradação de solo contaminado com 5% de petróleo, utilizando uréia: Condições 1, 2, 3, 4, 7 e 8.....79

Figura 20. Teste de biodegradação de solo contaminado com 5% de petróleo, utilizando mamona: Condições 13, 14, 15, 16, 19 e 20.....80

Figura 21. Relação entre os valores experimentais observados e os preditos pelo planejamento fatorial completo 2^3, avaliando os fatores fonte de nitrogênio, concentração do nutriente e CRA.....83

Figura 22. Gráfico de Pareto: visualização dos efeitos estatisticamente relevantes para os resultados de carbono removido do planejamento fatorial completo 2^3, avaliando os fatores fonte de nitrogênio, concentração do nutriente e CRA.....84

Figura 23. Gráfico das médias das interações entre os fatores concentração x CRA das fontes 1 (uréia) e 2 (mamona) do planejamento fatorial completo 2^3.....85

Figura 24. Testes utilizando uréia: Condições 1-4 descontadas.....89

Figura 25. Testes utilizando torta de mamona: Condições 13-16 descontadas.....89

Figura 26. Condições promissoras para a biodegradação de petróleo nos testes em microcosmos: 1 (uréia 100/10 com 50% de CRA) e 15 (mamona 100/20 com 50% de CRA) descontadas.....90

Figura 27. Visualização de microorganismos degradadores para a condição 6, nas semanas 4 e 8, respectivamente. 97

Figura 28. Microorganismos degradadores presentes nos biorreatores estáticos.....98

Figura 29. Remoção de hidrocarbonetos derivados do petróleo para as Bandejas 1-10.....99

Figura 30. Índice de letalidade das minhocas adicionadas aos lotes para avaliação ecotoxicológica.....105

Figura 31. Perda de biomassa das minhocas nos lotes 1, 2 e 4…….....107

LISTA DE REAÇÕES

Reação 1. Reação de redução do nitrato à amônia realizado por fungos.....33

Reação 2. Oxidação do enxofre puro por fungos.....35

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: Introdução e Objetivos

1.1 INTRODUÇÃO.....2

1.2 OBJETIVOS.....5

1.2.1 OBJETIVO GERAL.....5

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....5

CAPÍTULO 2: Revisão Bibliográfica

2.1 SOLO.....8

2.1.1 CONSTITUINTES, PROPRIEDADES QUÍMICAS E FÍSICAS DO SOLO.....8

2.1.2 POLUIÇÃO DO SOLO.....10

2.2 PETRÓLEO.....13

2.3 BIORREMEDIAÇÃO.....14

2.3.1 TECNOLOGIAS DE BIORREMEDIAÇÃO.....16

2.3.2 TÉCNICAS AUXILIARES DE BIORREMEDIAÇÃO.....21

2.3.2.1 BIOAUMENTO.....21

2.3.2.2 BIOESTÍMULO.....22

2.4 EMPREGO DE FUNGOS FILAMENTOSOS NO PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO.....29

2.4.1 FUNGOS FILAMENTOSOS.....29

2.4.2 CULTIVO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS.....36

2.4.3 FUNGOS NO SOLO.....38

2.4.4 APLICAÇÃO DE FUNGOS NA BIORREMEDIAÇÃO.....38

2.5 ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE EM PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO.....43

CAPÍTULO 3: Materiais e Métodos

3.1 SOLO.....47

3.1.1 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO SOLO.....48

3.2 PETRÓLEO.....49

3.3 FONTES DE NITROGÊNIO.....49

3.4 INÓCULO.....50

3.5 TESTES DE BIODEGRADAÇÃO.....50

3.5.1 PRIMEIRA ETAPA: ENSAIO PRELIMINAR.....52

3.5.2 SEGUNDA ETAPA: EXPERIMENTOS EM MICROCOSMOS.....53

3.5.3 TERCEIRA ETAPA: ENSAIOS EM BIORREATORES ESTÁTICOS.....57

3.5.4 QUARTA ETAPA: ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE AGUDA.....60

3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS DE MONITORAMENTO DOS ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO.....63

3.6.1 DEGRADAÇÃO DO CONTAMINANTE.....63

a) Quantificação do Gás Carbônico Gerado.....63

b) Análise do teor de óleos e graxas (OG)..... 64

c)Análise da Concentração de Hidrocarbonetos Totais do Petróleo (HTP).....65

3.6.2 QUANTIFICAÇÃO DOS MICROORGANISMOS.....65

a) Heterotróficos totais.....65

b) Microorganismos degradadores.....65

CAPÍTULO 4: Resultados e Discussão

4.1 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO SOLO.....68

4.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FONTES DE NITROGÊNIO.....70

4.3 TESTES DE BIODEGRADAÇÃO.....71

4.3.1 PRIMEIRA ETAPA: ENSAIO PRELIMINAR PARA REALIZAÇÃO DO BIOAUMENTO.....72

4.3.2 SEGUNDA ETAPA: EXPERIMENTOS EM MICROCOSMOS.....76

4.3.3 TERCEIRA ETAPA: ENSAIOS EM BIORREATORES ESTÁTICOS.....93

4.3.4 QUARTA ETAPA: ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE AGUDA.....104

CAPÍTULO 5: Conclusões e Sugestões

5.1 CONCLUSÕES.....110

5.2 SUGESTÕES.....115

CAPÍTULO 6: Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....117

ANEXOS

ANEXO A – TABELAS.....135

CAPÍTULO 1: Introdução e Objetivos

1.1 INTRODUÇÃO

PEARSON (1995) afirma que a degradação de áreas ambientais já podia ser observada no Oriente Médio e na Índia em 2000 a.C. Segundo ele, a alteração no solo era causada pelo sistema de irrigação com água salobra, que era a fonte de água utilizada na época. O autor refere que as altas concentrações de sal na água causavam a desertificação do solo.

Os problemas de poluição e degradação ambiental agravaram-se com a formação dos centros urbanos e, com a Revolução Industrial no final do século XVIII, durante a qual se intensificou a produção de resíduos, devido à mecanização dos processos de produção (LEITE, 1995 *apud* DIAS, 2000). Naquela época, a disposição e o tratamento destes resíduos eram bastante precários. Da mesma forma, a aceleração dos processos industriais, principalmente no século XX, gerou os chamados poluentes ambientais, decorrentes da produção e má administração destes resíduos, que se refletem atualmente nas inúmeras áreas contaminadas em todo o mundo.

Os problemas ambientais que caracterizam os tempos modernos são numerosos e bem documentados. As causas são variadas e envolvem praticamente todas as atividades humanas. O crescimento exacerbado da população, por exemplo, acarretou o estabelecimento de conglomerados de alta densidade populacional, o que colabora, significativamente, para o aumento da quantidade de resíduos produzidos (lixo doméstico, esgoto etc.). Por sua vez, a atividade industrial contribui com grandes volumes de efluentes e resíduos sólidos de natureza diversa, os quais, geralmente, carregam espécies químicas de caráter tóxico (BRITO, 2003).

No âmbito industrial, destaca-se o setor de petróleo. Comercialmente explorado

desde a metade do século XIX, o petróleo tem sido usado por muitas décadas, para iluminação e, em menor escala, como lubrificante. No entanto, a invenção do motor de combustão interna e sua rápida adoção em todas as formas de transporte aumentaram o consumo dessa fonte natural, o que elevou sua demanda, produção, transporte e distribuição, assim como a dos seus derivados. Todas essas atividades envolvem riscos de poluição que podem ser minimizados, mas não totalmente eliminados e, quando ocorrem, causam sérios problemas para o ambiente (PALA, 2006).

Cabe destacar aqui que a manutenção de padrões de produção e consumo não sustentáveis da sociedade atual impõe um desafio em busca de estratégias e medidas para enfrentar os efeitos da contaminação do meio ambiente.

Além disso, soma-se aos problemas supracitados a pressão da opinião pública, que não se coloca mais à margem quando a discussão é o meio ambiente. Documentários alarmantes sobre aquecimento global e as perspectivas sobre o mau uso dos recursos naturais transpassam os muros das universidades e atingem à sociedade. Dessa forma, grupos sociais exigem a implantação de programas ambientalmente sustentáveis como seqüestro de carbono, uso de biocombustíveis e outras fontes de energia renováveis para redução do efeito estufa, só para citar alguns exemplos.

Na conjuntura atual, o uso de *tecnologias verdes*, como as técnicas que utilizam processos biológicos para o tratamento de sítios poluídos, torna-se popular e recebe grande aceitação pública. Sendo assim, a aplicação da biorremediação está bem inserida nesse contexto, já que se trata da incrementação de um processo biológico que já ocorre naturalmente.

O processo de biorremediação pode ser definido como o uso de microorganismos para remover poluentes ambientais do solo, água e sedimentos.

Destacam-se suas numerosas vantagens em relação a outros processos empregados na remoção de poluentes, sendo um dos métodos mais eficientes para tratar ambientes contaminados (PALA, 2006). Os possíveis benefícios e vantagens da biorremediação incluem: baixo custo energético, requerido para as transformações bioquímicas; possibilidade de tratamento no próprio local; redução de custos do transporte; eliminação permanente do resíduo, reduzindo os riscos em longo prazo; redução dos riscos de contaminação de outras áreas; além da positiva aceitação pública, já enfatizada anteriormente. Deve-se salientar que a biorremediação já foi aprovada pela Agência de Proteção Ambiental Americana (US-EPA) como uma tecnologia de limpeza de locais contaminados com resíduos perigosos (DEL'ARCO, 1999).

Sendo assim, as alternativas, que utilizam soluções mais naturais e com menores impactos no subsolo, vem ganhando maior destaque nos últimos anos. Porém, vale lembrar que essas soluções, devido ao maior tempo requerido na remediação, nem sempre são suficientes para atingir os objetivos do projeto e, muitas vezes, devem ser aplicadas em complemento a outras tecnologias convencionais existentes, como os processos de tratamentos químicos e físicos (NOBRE & NOBRE, 2004).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visa determinar as estratégias de biorremediação mais efetivas para um solo nordestino, intencionalmente adicionado de petróleo, por meio da contribuição dos fungos filamentosos nos processos de biodegradação.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

i. Avaliar o comportamento microbiano, no processo de atenuação natural, para determinação do momento de decréscimo da população de heterotróficos totais a fim de se realizar uma inoculação fúngica no solo contaminado;
ii. Comparar duas fontes de nitrogênio, uréia e mamona, em diferentes concentrações, para fins de bioestimulação do processo de biorremediação;
iii. Agregar valor a um resíduo agroindustrial da produção do biodiesel – a torta de mamona – por meio da sua inserção, como nutriente, no processo da biorremediação.
iv. Determinar a melhor relação nutricional C/N a ser empregada nos testes de biorremediação;
v. Analisar as condições mais influentes nos ensaios de biodegradação em microcosmos, utilizando o planejamento experimental como ferramenta estatística;
vi. Confrontar os dois diferentes momentos de adição (tempo zero ou durante o

experimento) de um inóculo predominantemente fúngico no solo contaminado e verificar a real influência desse parâmetro no emprego do bioaumento.

vii. Analisar a eficácia do emprego das técnicas de bioaumento e bioestímulo, em conjunto ou separadas, nos testes de biodegradação.

viii. Avaliar qual das concentrações de contaminante presente no solo, 1% e 5% m/m, produzem o maior percentual de remoção efetiva de hidrocarbonetos totais de petróleo, frente ao uso de técnicas auxiliares de bioaumento fúngico e bioestímulo.

ix. Estudar a toxicidade do solo contaminado com petróleo, nas concentrações de 1% e 5% m/m.

x. Avaliar o impacto toxicológico das fontes de nitrogênio, nas amostras de solo contaminado, no início do tratamento biológico.

CAPÍTULO 2: Revisão Bibliográfica

2.1 SOLO

O solo pode ser considerado como um conjunto de diversos ciclos naturais, em que participam fragmentos de rochas, minerais, água, ar, seres vivos e seus detritos em decomposição. Esses resultam de fatores climáticos no decorrer do tempo e da atividade combinada de microorganismos decompondo restos de animais/vegetação, respectivamente. Dessa forma, o solo é considerado resultado das interações da litosfera, hidrosfera, atmosfera e biosfera (ROCHA *et al*., 2004).

A seguir, serão discutidos os constituintes e as propriedades do solo.

2.1.1 CONSTITUINTES, PROPRIEDADES QUÍMICAS E FÍSICAS DO SOLO

O solo, nosso local de contaminação e, por isso, motivo de estudo, é definido como a camada superficial da crosta terrestre, que é transformada por fatores climáticos, biológicos e, em grande parte, pelas atividades antropogênicas, sendo composto de fases sólida, líquida e gasosa, intensamente misturadas. As proporções relativas de cada fase variam de solo para solo e, em um mesmo solo, com as condições climáticas, a presença de plantas e manejo (ROCHA *et al*., 2004). Em geral, a fase sólida, constituída de formações minerais e de fração orgânica, ocupa em média 50% do volume total do solo, sendo que 45% são representados por minerais e 5% por matéria orgânica. O restante do volume do solo é ocupado por fases líquida e gasosa, representando cada uma 25% do volume total do solo, como mostra Figura 1 (ROCHA *et al*., 2004).

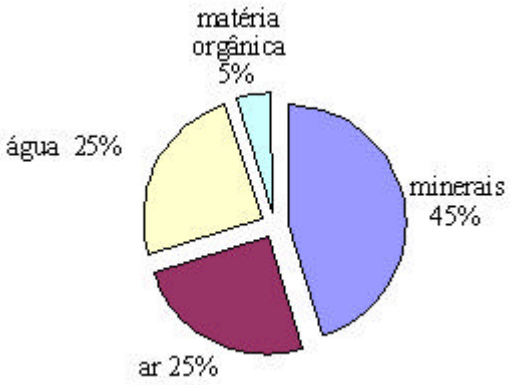

Figura 1. Constituição de um solo ideal (CETESB, 2007).

Dentre os constituintes do solo, a matéria orgânica inclui uma grande variedade de seres vivos, desde bactérias e fungos até protozoários etc. Os organismos do solo, em especial os microorganismos, são responsáveis pela decomposição de resíduos orgânicos, bem como, pela síntese de moléculas orgânicas de elevada estabilidade – as substâncias húmicas – com propriedades importantes como a capacidade de retenção de água, poder tamponante do solo e uma fonte de nutrientes para a microbiota (BARROS, 2007).

Os horizontes dos solos, ou seja, as camadas que se diferenciam entre si, são formadas por meio dos processos de intemperismo. O perfil do solo é então, o conjunto dos horizontes e/ou camadas que abrangem, verticalmente, desde a superfície até o material originário. As propriedades físicas do solo (textura, estrutura, densidade, porosidade, permeabilidade, fluxo de água, ar e calor) são responsáveis pelos mecanismos de atenuação física de poluentes, como filtração e lixiviação, possibilitando ainda condições para que os processos de atenuação química e biológica possam ocorrer (CETESB, 2007).

A Figura 2 mostra a classificação granulométrica do solo.

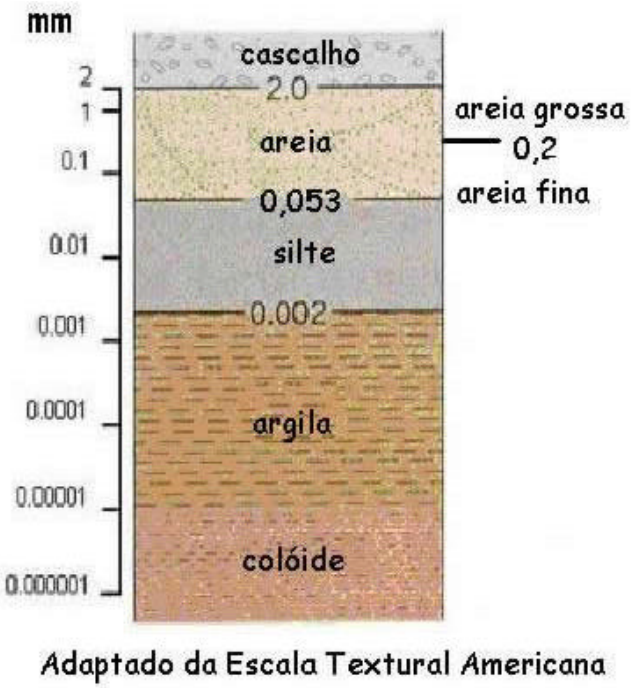

Figura 2. Classificação granulométrica do solo (CETESB, 2007).

Por outro lado, as propriedades químicas dos solos – pH, teor de nutrientes, capacidade de troca iônica e condutividade elétrica – são, junto com a matéria orgânica e a atividade biológica, responsáveis pelos mecanismos de atenuação de poluentes nesse meio. Dentre os mecanismos envolvidos, podem ser destacadas a adsorção, a fixação química, precipitação, oxidação, troca iônica e a neutralização que, invariavelmente, ocorrem no solo e que por meio do manejo de suas propriedades, podem ser modificados de acordo com a conveniência (CETESB, 2007).

2.1.2 POLUIÇÃO DO SOLO

Na atualidade, o tema poluição do solo tem despertado, a um só tempo, interesse e preocupação dos especialistas e das autoridades. São importantes, não apenas, os

aspectos ambientais e de saúde pública, como também e, principalmente, a ocorrência de episódios críticos de poluição de âmbito mundial, tais como a questão das áreas contaminadas (GÜNTHER, 2005).

Segundo BRASIL (1981), o termo poluição é definido como toda alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas que possa constituir prejuízo à saúde, à segurança e ao bem-estar das populações e, ainda, possa comprometer a biota e a utilização dos recursos para fins comerciais, industriais e recreativos. Desta forma, a poluição do solo denota a presença significativa de algum elemento ou substância que pode afetar componentes bióticos do ecossistema, comprometendo sua funcionalidade e sustentabilidade. Assim, a poluição do solo está ligada à concentração, ou quantidade de resíduos, incorporados acidentalmente ou intencionalmente. De acordo com a legislação ambiental, para o controle dessa poluição, certos padrões e indicadores de qualidade do solo (taxa de erosão etc.) devem ser respeitados num determinado ambiente (BRAGA *et al*., 2002). Conseqüentemente, a introdução de contaminantes no solo pode resultar na perda de algumas ou várias de suas funções e ainda provocar contaminação de água subterrânea. A ocorrência de contaminantes no solo, originados por várias fontes, acima de certos níveis, provoca múltiplas conseqüências negativas para a cadeia alimentar, para a saúde pública e para os diversos ecossistemas e recursos naturais (RODRIGUES e DUARTE, 2003).

Embora a poluição do solo, geralmente, não seja tão visível ou imediatamente perceptível, seus efeitos podem ser muito nocivos, uma vez que o solo é um compartimento ambiental que não se renova rapidamente, ao contrário do ar e da água (BRASIL, 1983 *apud* DIAS, 2000). As complexas reações químicas que acontecem no solo são realizadas pela presença de milhares de espécies de microorganismos, como

bactérias, fungos e algas, entre outros. A grande maioria destes organismos vive no primeiro horizonte do solo, até uma profundidade de cerca de 40 cm. É dessa estreita camada que os vegetais retiram nutrientes necessários ao seu desenvolvimento, garantindo alimento para os animais que habitam sobre ela. Entretanto, esta é a primeira a ser atingida pelos compostos tóxicos. Desta forma, quando estas substâncias são descartadas, os organismos morrem, comprometendo diretamente todo o sistema de respiração do solo (DIAS, 2000).

A poluição dos solos, por metais pesados e substâncias tóxicas orgânicas e inorgânicas, tem sido relatada em muitos contextos diferentes, sendo essencial sua detecção para evitar problemas relacionados à saúde, bem como às degradações ambientais (BERNARD, 1997; ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000). Um dos poluentes que merece destaque é o petróleo, pelo seu alto teor de contaminantes, com drásticos efeitos no meio ambiente e na saúde.

Na Figura 3, observamos um esboço das formas de contaminação que ocorrem no meio ambiente.

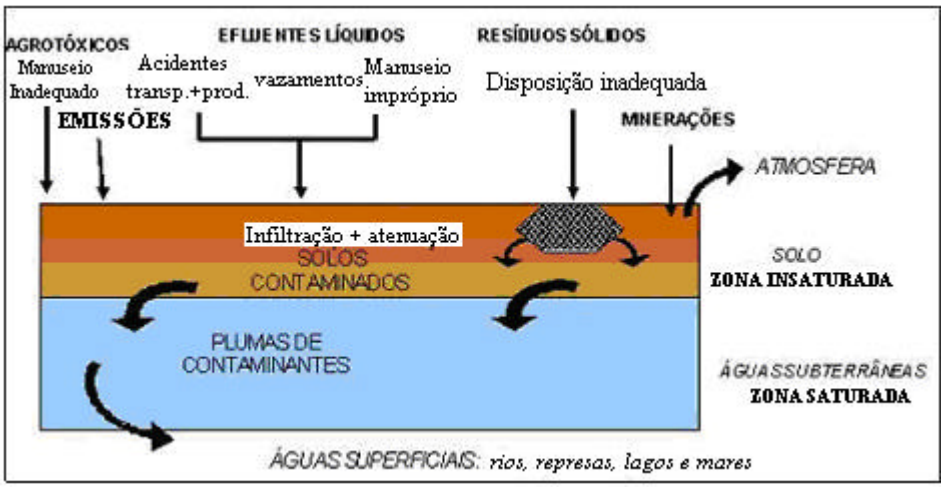

Figura 3. Esquema de contaminação no meio ambiente (CETESB, 2007)

2.2 PETRÓLEO

Petróleo significa óleo da pedra, por ser encontrado, normalmente, impregnado em determinadas rochas porosas denominadas de arenito, dispostas em camadas geológicas sedimentares. Formou-se na Terra há milhões de anos, a partir da decomposição de pequenos animais marinhos, plâncton e vegetação típica de regiões alagadiças e é encontrado junto ao gás de petróleo, formando bolsões entre rochas impermeáveis ou impregnando rochas de origem sedimentar (FONSECA, 1992).

O petróleo é constituído, essencialmente, de carbono e hidrogênio (90% dos óleos crus), com quantidades relativamente pequenas de compostos orgânicos sulfurados, nitrogenados, oxigenados e organometálicos. Predominam os hidrocarbonetos como os acíclicos saturados (alcanos), de cadeia normal e ramificada, bem como os cíclicos, também de cadeia normal ou ramificada (cicloalcanos) e os aromáticos. Os demais compostos, por figurarem na composição com teores minoritários, são classificados como impurezas oleofílicas. No petróleo bruto, não ocorrem hidrocarbonetos olefínicos. Quando esses compostos aparecem nos derivados do petróleo é porque foram incorporados durante o seu processamento (www.maxwell.lambda.ele.puc-rio.br/cgi-bin/PRG_0599.EXE/4333_3.PDF?).

A composição química do petróleo varia com a sua origem e, conseqüentemente, afeta a susceptibilidade ao ataque microbiano. A maioria dos hidrocarbonetos possui baixa solubilidade em água o que acarreta baixas taxas de metabolização do poluente (WIDDEL e RABUS, 2001).

A introdução de óleo cru no solo, seja esta acidental ou intencional, provoca aumento do número de microrganismos com capacidade de degradação de petróleo e,

conseqüentemente, a elevação da atividade microbiana nesse ambiente. Isso ocorre, porque os microrganismos oriundos do solo podem adaptar-se ao petróleo, sofrer enriquecimento seletivo e mudanças genéticas, que possibilitam esse aumento. Em solos não contaminados, menos de 1% da população microbiana nativa apresenta capacidade para degradar hidrocarbonetos de petróleo, enquanto esse valor pode atingir de 1 a 10% do total de microrganismos nativos presentes em ambientes terrestres contaminados por óleo cru (ATLAS, 1991).

2.3 BIORREMEDIAÇÃO

Atualmente, existe uma preocupação mundial em torno dos impactos ambientais ocasionados pelos resíduos sólidos. Essa inquietação é resultado das contaminações ambientais que afetam a saúde pública e a biodiversidade, e foram geradas pela má administração dos resíduos anteriormente produzidos (DIAS, 2000).

A aplicação de processos biotecnológicos envolvendo, individualmente ou conjuntamente, microorganismos e/ou enzimas e surfactantes, com o objetivo de solucionar ou minorar problemas de poluição ambiental, tem se tornado crescente.

Dessa forma, a microbiologia de degradação de hidrocarbonetos constitui um campo de pesquisa em pleno desenvolvimento (BONAVENTURA & JOHNSON, 1997). E como destaque, surge a biorremediação como prática atrativa de remoção de hidrocarbonetos de petróleo, por causa da simplicidade da manutenção, aplicação em grandes áreas, baixo custo, além da possibilidade de ocasionar a destruição completa do contaminante (BENTO *et al.*, 2005).

A biorremediação pode ser definida como um conjunto de tecnologias, que utilizam processo(s) biológico(s), aplicadas à recuperação ou remediação de áreas contaminadas, ou ao tratamento de compostos orgânicos voláteis tóxicos ou efluentes, contendo resíduos tóxicos, que devam ser eliminados antes da descarga no ambiente. Para isto, em geral, utilizam-se microorganismos, plantas ou produtos biológicos, como enzimas e componentes celulares, com a finalidade de realizar uma mineralização, a qual, possivelmente, resulta em gás carbônico e água como produtos finais (DIAS, 2000).

O objetivo da biorremediação, quando usada como técnica de tratamento em áreas contaminadas, é induzir ou acelerar os processos biológicos naturais de reciclagem de compostos de interesse, incluindo compostos orgânicos ou inorgânicos. Assim, o desafio principal é utilizar a capacidade intrínseca dos microorganismos de degradar matéria orgânica para degradar compostos orgânicos tóxicos, tanto de origem natural como compostos sintéticos (DIAS, 2000).

Os processos de biorremediação, há muitas décadas, já vêm sendo usados com sucesso no tratamento de efluentes industriais e esgotos domésticos. Também podem observar-se processos biológicos de tratamento em aterros industriais de resíduos perigosos e aterros de resíduos urbanos, em geral. Atualmente, tem crescido o interesse em relação a biorremediação, como objeto da sua aplicação em áreas contaminadas pela descarga inadequada (intencional ou acidental) de resíduos sólidos (DIAS, 2000).

O uso da técnica de biorremediação, embora apresente inúmeras vantagens – tais como aplicação em grandes áreas, baixo custo e eliminação expressiva do contaminante – depende de muitos fatores para alcançar as condições ótimas de biodegradação, entre os quais, podem ser citados: o tipo, concentração e biodisponiblidade dos poluentes,

suprimentos de nutrientes e histórico do local contaminado (BENTO *et al.*, 2005). Dentre os parâmetros interferentes, destacam-se ainda, propriedades físico-químicas do solo e histórico do local contaminado, ecologia microbiana (com ênfase para a competição interespécies) e metodologia do processo, tendo, como exemplo, método e concentração do inóculo. O sucesso da biodegradação também é influenciado pelas fontes de energia (doadores de elétrons), aceptores de elétrons, nutrientes, pH, temperatura e substratos inibidores ou metabólitos, além do conhecimento da densidade da população de microorganismos degradadores de óleo e o seu potencial de biodegradação para a biorremediação de locais contaminados (HAMDI *et al.*, 2007; BENTO *et al.*, 2005; VOGEL, 1996; BOOPATHY, 2000).

Dentre os fatores interferentes mencionados, serão destacadas a composição e as propriedades físico-químicas do poluente – o petróleo, neste caso específico – e do solo, local de contaminação e razão de estudo. Fatores estes que já foram discutidos anteriormente.

2.3.1 TECNOLOGIAS DE BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação é uma prática que vem alcançando importância mundial, uma vez que o aumento da atividade industrial está degradando, cada vez mais, os ecossistemas naturais. O emprego de microorganismos conhecidos para o tratamento de rejeitos potencialmente tóxicos é uma prática habitual em alguns países desenvolvidos (LEMOS, 2003).

De acordo com o tipo de tratamento, as técnicas de biorremediação são denominadas *in situ* e *ex situ*, adotadas considerando não só os poluentes, mas o custo

dos processos e, principalmente, a concentração final do contaminante, no término do tratamento, como aceitável para o tipo de resíduo e para o uso futuro da área.

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

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

As funções naturais do solo são perturbadas em conseqüência da estratégia utilizada no seu tratamento. No caso do uso de técnicas *in-situ*, as funções do solo podem sofrer mudanças em sua estrutura ou modificações no balanço hídrico. Já as técnicas *ex-situ* podem modificar as características do solo de modo mais intenso. Neste caso, o solo tratado pode ter diminuição das quantidades de matéria orgânica, de nutrientes e da capacidade de troca catiônica, com conseqüente redução de suas propriedades filtrantes, de tamponamento e de depuração (SEABRA, 2005).

SKIPPER (1999) *apud* BENTO *et al.* (2005) menciona estratégias para um tratamento de biorremediação barato e natural que incluem uso de tecnologias como

atenuação natural, bioventilação, *landfarming*, compostagem, fitorremediação, além de técnicas auxiliares como **bioaumento** e **bioestímulo,** que serão discutidas com maior profundidade em um próximo item.

Atenuação natural monitorada

O termo **atenuação natural** parece ser o mais adequado para descrever todos os processos que ocorrem sem a intervenção humana, sendo uma forma passiva de remediação (NYER,1998 *apud* ROSADO, 2005). SANCHEZ *et al*. (2000) *apud* SARKAR *et al*. (2005) descreve a atenuação natural como uma sucessão de processos biológicos, químicos e físicos que ocorrem naturalmente, resultando na contenção, transformação ou destruição de produtos químicos indesejáveis no ambiente.

Bioventilação

A **bioventilação** é uma técnica geralmente usada para remediar solos contaminados com hidrocarbonetos do petróleo, que aumenta a capacidade da microbiota do solo para degradar compostos naturais e xenobióticos. O ar injetado na zona não saturada do solo fornece, aos microorganismos aeróbios, condições de transporte de oxigênio adequadas, de forma que a degradação possa continuar de forma eficiente por períodos mais longos (ÖSTERREICHER-CUNHA *et al*., 2004).

Landfarming

Atualmente, uma das técnicas preferidas para a remediação de solos contaminados por derramamento de combustíveis é o ***landfarming***. Esta técnica é muito utilizada em locais remotos, porque o método requer o uso reduzido de equipamentos, sendo a opção de mais baixo custo, principalmente se comparada à incineração. O termo *landfarming*, geralmente, refere-se a um processo em que o solo contaminado com hidrocarbonetos é distribuído em uma camada de meio metro de espessura, com adição de nutriente, devendo ser periodicamente revolvido. Essa última etapa deve permitir a mistura dos resíduos à camada fértil do solo, a fim de que a própria microbiota do solo atue como agente de degradação. A homogeneização e a aragem do solo, geralmente, são realizadas por meio de tratores utilizados na agricultura (JORGENSEN *et al*., 2000), conforme mostra a Figura 4. Por outro lado, durante o tratamento, podem ser perdidos hidrocarbonetos por volatilização, bem como pela ação da biorremediação e, assim, conclui-se que o *landfarming* recorre à combinação dos dois processos (PAUDYN *et al.*, 2008).

Figura 4. Construção do *landfarming*.

Compostagem

A **compostagem** é uma ação biológica de decomposição da matéria orgânica presente em restos de origem animal ou vegetal. Ocorre por ação de agentes microbianos e, portanto, precisa de condições físicas e químicas adequadas para que o composto orgânico final seja de boa qualidade (PERES e NAUMOFF, 1998). A presente estratégia, diferente da técnica de *landfarming*, requer a adição de material que favoreça o aumento da porosidade e a transferência de oxigênio, bem como forneça, ao sistema, uma fonte de energia capaz de beneficiar um rápido crescimento microbiano. Os materiais, comumente, adicionados na compostagem são: palha, grama, folhas, bagaço de cana, serragem ou esterco. Uma das características do processo é que o calor, gerado metabolicamente, se mantém preso ao sistema, provocando o aumento de temperatura e mudanças na sua população microbiana (POTTER *et al*., 1999; SEMPLE *et al.*, 2001).

O produto resultante da compostagem pode ser considerado como um enriquecedor do solo, ou seja, poderá ser aplicado para melhorar as características do mesmo, sem que haja uma contaminação do meio ambiente (BRITO *et al.*, 2003). É importante salientar que a técnica pode ser utilizada para a degradação de derivados de petróleo. Nesse caso, o processo denomina-se biopilha, sendo o produto final não necessariamente empregado na agricultura, a não ser no caso da comprovação da ausência de toxidez do resíduo. Na pesquisa de SEABRA (2005), o autor constatou que é viável a aplicação de biopilha, na biodegradação de petróleo de solos com altos teores de argila e silte, podendo eliminar os risco do óleo residual, a curto e médio prazo. No trabalho, o autor ainda menciona que o tratamento em biopilha também contribuiu para

recuperar a qualidade dos solos em termos de ecotoxicidade.

Fitorremediação

A **fitorremediação** utiliza sistemas vegetais (árvores, arbustos, plantas rasteiras e aquáticas) e a sua microbiota com o fim de remover, degradar ou isolar substâncias tóxicas do ambiente. O termo "dissipação" é comumente usado para essa tecnologia, já que o desaparecimento de hidrocarbonetos policílicos aromáticos (HPA) pode ser devido aos processos físico-químicos como volatilização, foto-oxidação, sorção e lixiviação (NORTHCOTT e JONES, 2000). A fitorremediação, como qualquer outra tecnologia, apresenta várias vantagens e desvantagens. Se o baixo custo é uma vantagem, o tempo para que se observem os resultados pode ser longo, pois depende do ciclo vital da planta. Além disso, a concentração do poluente e a presença de outras toxinas devem estar dentro dos limites de tolerância da planta. Outra limitação é que as plantas, usadas com o propósito de minimizar a poluição ambiental, podem entrar na cadeia alimentar e resultar em conseqüências indesejáveis. Apesar dos problemas ainda não resolvidos, o mercado para a exploração dessa tecnologia é promissor (PLETSCH, 1999).

2.3.2 TÉCNICAS AUXILIARES DE BIORREMEDIAÇÃO

2.3.2.1 BIOAUMENTO

O processo de bioaumento envolve a introdução de microorganismos que têm

sido cultivados para degradar várias cadeias de hidrocarbonetos dentro de um sistema contaminado. As culturas podem ser derivadas de um solo contaminado ou obtidas de uma cultura estoque que tenha demonstrado, previamente, capacidade para degradar esses hidrocarbonetos (SARKAR *et al*., 2005).

Para que a aplicação do bioaumento tenha sucesso, é necessário que os microorganismos selecionados apresentem algumas características, como: capacidade para degradar a maior parte dos contaminantes, estabilidade genética, alto nível de atividade enzimática, além da capacidade de competir com a população intrínseca do solo. Deve ser lembrado que os agentes microbianos não podem ser patogênicos e não devem produzir substâncias tóxicas durante o processo de biodegradação (LEAHY & COLWELL, 1990).

Sabe-se que os fungos são microorganismos produtores de um sistema enzimático complexo, capazes de degradar substâncias químicas de estrutura complexa, de maneira a produzir moléculas mais simples e mais facilmente assimiláveis. Em função desses mecanismos de degradação, a utilização de fungos e enzimas, obtidas a partir desses microorganismos, é uma alternativa biológica viável para a remediação de solos contaminados por petróleo (BRITO, 2004; LEMOS, 2001).

Sendo assim, faz-se necessária uma discussão mais aprofundada sobre fisiologia dos fungos e utilização desses microorganismos em processos de biorremediação, objeto do trabalho, abordado num item subseqüente.

2.3.2.2 BIOESTÍMULO

O processo de bioestímulo é uma das estratégias mais adotadas em tratamentos

de recuperação de áreas impactadas. Esta técnica consiste na correção das condições ambientais, tais como nutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio), oxigênio e umidade para aumentar a atividade da população microbiana existente nas áreas contaminadas (ATLAS, 1981; LIN *et al.*, 1999; PANKRANTZ, 2001 *apud* SARKAR *et al*., 2005). Os microorganismos podem ou não, inicialmente, ter como alvo os hidrocarbonetos como fonte de alimento. Contudo, os hidrocarbonetos são, supostamente, degradados mais rapidamente do que no processo de degradação natural, devido à elevação da população de microorganismos, causada pelo implemento dos níveis de nutrientes (SARKAR *et al*., 2005). A suplementação de nutrientes para a degradação de hidrocarbonetos tem sido, tradicionalmente, focada na adição de fontes de N e P, tanto orgânicas quanto inorgânicas. Devido ao fato do carbono ser o principal constituinte dos combustíveis de petróleo, a sua dosagem tem sido considerada como um índice para a determinação das quantidades de N e P que necessitam ser adicionadas para atingir a ótima relação C:N:P (RISER-ROBERTS, 1998 *apud* SARKAR *et al*., 2005). Várias fontes de nutrientes, tais como fertilizantes inorgânicos, uréia, serragem, húmus, estrume e biosólidos têm sido usados no bioestímulo (CHO *et al.*, 1997;; NAMKOONG *et al.*, 2002 *apud* SARKAR *et al*., 2005).

Segundo ANTUNES (1997), o extrato de levedura estimula o crescimento de diversos microorganismos, em virtude deste nutriente ser uma fonte de aminoácidos e vitaminas, especialmente do complexo B. Porém, apesar da importância do extrato de levedura como fonte de nitrogênio e de outros nutrientes, seu custo elevado afetaria a viabilidade do processo. Para tal, torna-se indispensável a procura por outras fontes de nitrogênio para diminuir os custos de produção. As fontes inorgânicas seriam, neste caso, as mais recomendáveis, uma vez que são as mais baratas e muito utilizadas nos

processos industriais.

Técnicas auxiliares de bioaumento e bioestímulo, em conjunto, são citadas em diversos trabalhos da literatura que empregam a biorremediação. TRINDADE e colaboradores (2005) relataram sobre amostras do solo (intemperizadas e recentemente contaminadas) que foram submetidas às técnicas mencionadas acima, e que mostraram eficiência de biodegradação, aproximadamente, duas vezes maior do que aquelas sem tratamento, como a atenuação natural monitorada, por exemplo. Da mesma forma, HAMDI e colaboradores (2007) investigaram os efeitos do bioestímulo e/ou bioaumento na degradação dos HPAs, concluindo do estudo em microcosmo, que a degradação de HPAs foi favorecida em amostras de solos contaminados, carentes de correções.

Além disso, trabalhos que utilizam o bioaumento fúngico, já mencionado, como estratégia para a aceleração da biodegradação de hidrocarbonetos têm tido cada vez de maior relevância.

A partir desse pressuposto, foram utilizadas duas fontes de nitrogênio comerciais, empregadas como fertilizantes, para a correção das relações nutricionais para a microbiota nativa do solo contaminado: a uréia e a torta de mamona.

URÉIA

A uréia fertilizante, produzida industrialmente, é um sólido que se apresenta na forma de grânulos brancos e é utilizada na agricultura, pecuária e indústria. Geralmente, é vendida pelos fabricantes a empresas misturadoras, que por sua vez, produzem compostos agrícolas para finalidades diversas, de acordo com a necessidade do solo. É um subproduto do petróleo e destaca-se entre as fontes comerciais de nitrogênio (N)

pela facilidade de acesso no mercado, menor custo por unidade de nitrogênio, elevada solubilidade e compatibilidade para uso em mistura com outros fertilizantes. Cabe ressaltar que, toda a uréia consumida no país é produzida nacionalmente.

Além disso, é o composto que mais apresenta nitrogênio em sua composição, percentualmente. A Tabela 1 mostra a porcentagem de nitrogênio em massa presente na uréia fertilizante (http://sbrtv1.ibict.br/upload/sbrt5926.pdf?PHPSESSID=e3b8397659a63ceddd4a88291601ea95).

TABELA 1. Fontes de Nitrogênio.

Adubos químicos	**Porcentagem de nitrogênio em massa**
Uréia	45%
Sulfato de Amônio	20%
Nitrato de Cálcio	33%
Nitrato de Amônio	35,5% (½ NH_4^+ e ½ NO_3^-)

(Fonte: Universidade Federal de Maringá. Disponível em: www.dzo.uem.br/disciplinas/Solos/nutrientes.doc>).

De acordo com a Associação Nacional para Difusão de Adubos – ANDA, cerca de 60% do total do nitrogênio comercializado está na forma de uréia (http://sbrtv1.ibict.br/upload/sbrt5926.pdf?PHPSESSID=e3b8397659a63ceddd4a88291601ea95).

MAMONA

A cultura da mamona sempre foi considerada uma atividade de pequenos

produtores, especialmente na região de clima semi-árido do Brasil. Entretanto, ações do governo brasileiro para fomentar o desenvolvimento regional, priorizando, em princípio, a cultura da mamona como fonte potencial para o desenvolvimento do setor de biocombustíveis, vem mudando esse panorama.

Com o advento do biodiesel, a cultura da mamona teve um aumento na produção em todo país, por ser considerada uma das espécies mais promissoras para produção de óleo diesel vegetal (OLIVEIRA *et al*., 2006). O Brasil destaca-se como o terceiro produtor mundial de mamona tendo produzido, aproximadamente, 210 mil toneladas na safra 2004/2005. A produção concentra-se na região Nordeste, destacando-se o Estado da Bahia como responsável por cerca de 90% do volume total (LIMA *et al*., 2006).

A mamoneira (*Ricinus communis* L.), pertencente à família Euphorbiaceae, é uma planta de origem tropical, resistente à seca e exigente em calor e luminosidade (Figura 5). É considerada uma oleaginosa de alto valor econômico em razão de suas inúmeras possibilidades de aplicação na área industrial. Esta oleaginosa, possivelmente originária da África, segundo BELTRÃO (2004), está disseminada em quase todo o território brasileiro e é cultivada, principalmente, na região nordeste, cujas condições climáticas são adequadas ao seu desenvolvimento. Tem uma baixa exigência hídrica (400-600 mm/ano) e pode ser cultivada em ampla faixa de temperatura (20 – 34°C) (MONTEIRO, 2007).

Figura 5. Plantação de mamona (*Ricinus communis* L.). Fonte: Wikipédia (2008)

O fruto da mamoneira apresenta aproveitamento integral, obtendo-se como produto principal o óleo, estável sob variadas condições de pressão e temperatura, e como subproduto a torta, a qual pode ser utilizada como adubo orgânico (COSTA *et al.*, 2004), conforme fluxograma da Figura 6.

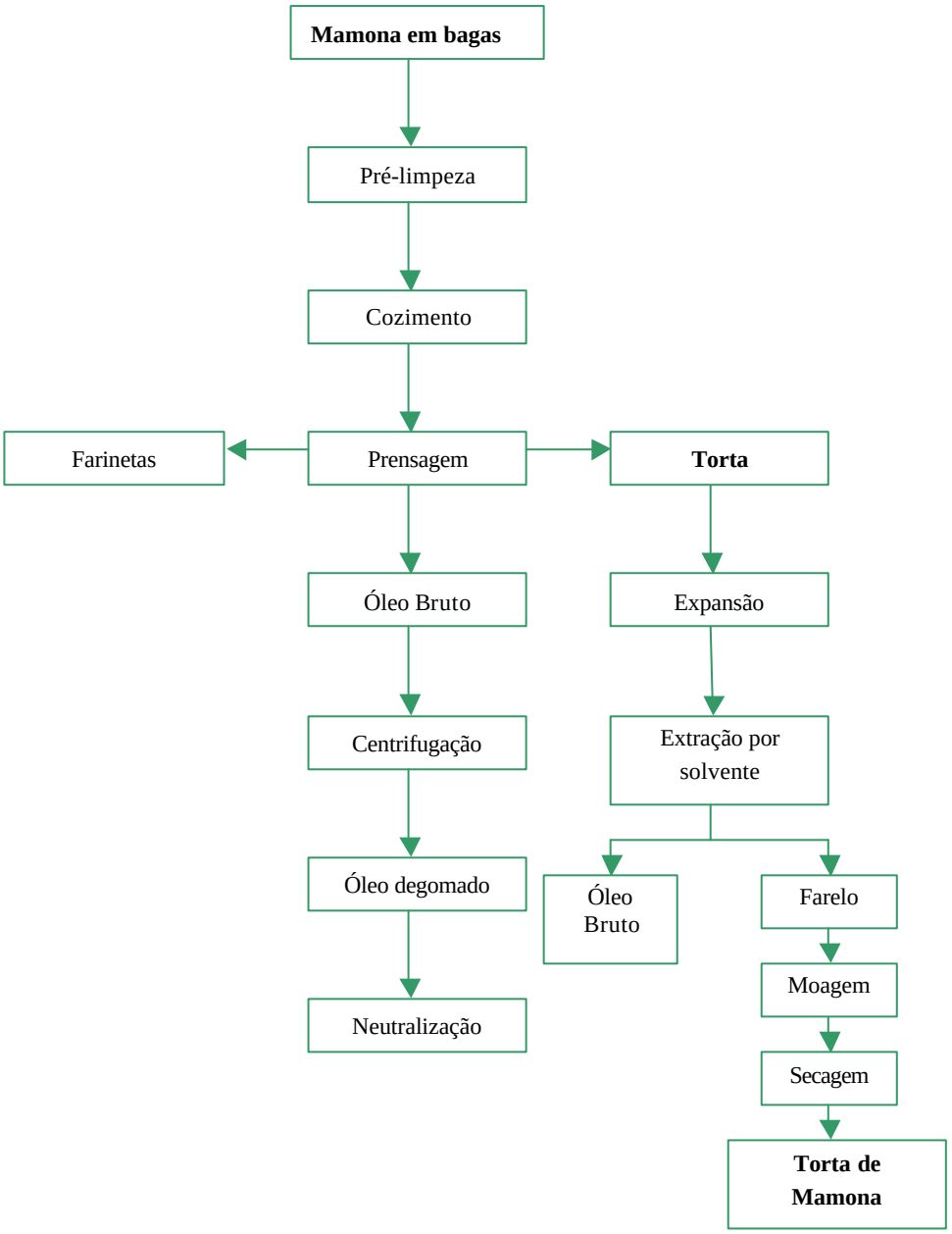

Figura 6. Fluxograma do processamento das sementes de mamona para a produção do óleo e do subproduto torta. Fonte: Embrapa Algodão (2005).

O processo de descascamento e extração do óleo de mamona produz dois importantes resíduos: a casca do futo e a torta, já comentada anteriormente. Para cada tonelada de semente de mamona processada, são gerados 620 kg de casca e 530 kg de torta de mamona (SEVERINO, 2005 *apud* LIMA *et al.*, 2006). Como a produção brasileira de mamona foi de 210 mil toneladas em 2005, estima-se que tenham sido

produzidas aproximadamente 130 mil toneladas de cascas e 111 mil toneladas de torta.

Tradicionalmente, estes dois produtos têm sido utilizados como adubo orgânico, sendo a torta comercializada por conter alto teor de nitrogênio, aproximadamente 5%, e as cascas apenas levadas de volta para dentro da lavoura ou aproveitada na própria fazenda (LIMA *et al*., 2006).

2.4 EMPREGO DE FUNGOS FILAMENTOSOS NO PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO

2.4.1 FUNGOS FILAMENTOSOS

Os fungos estão amplamente distribuídos na natureza, assim, eles são encontrados na água, no ar atmosférico, no solo, sobre os animais e vegetais vivos parasitando-os, na matéria orgânica em decomposição, nos produtos alimentícios e produtos industriais (SILVEIRA, 1995).

Constituem um conjunto de seres vivos que inclui desde organismos unicelulares a organismos pluricelulares macroscópicos. São formados por células eucariotas, com uma parede rígida, e se caracterizam por serem imóveis, apresentarem nutrição heterotrófica por absorção e reprodução assexuada e sexuada (SILVEIRA, 1995).

Os fungos unicelulares são microscópicos, possuem forma arredondada e se denominam leveduras. Porém, a maioria dos fungos é pluricelular, formada por células cilíndricas aumentadas, que se dispõem linearmente para constituir grandes filamentos, que se denominam hifas. Ao conjunto de hifas dá-se o nome de micélio. As hifas podem

apresentar separação entre as células – espécies septadas – ou não – denominadas, então, de espécies cenocíticas. Normalmente, qualquer fragmento hifálico pode dar origem à outra formação micelial quando destacado e colocado em meio apropriado (PUTZKE, 2004).

Na vida livre ou nos cultivos, o micélio se diferencia em duas partes, a que penetra nos substratos nutritivos, denominada micélio vegetativo, e a que se dispõe em superfície e contém as estruturas reprodutoras, que constituem o micélio aéreo ou reprodutor (uab-gtip.uab.es/Apuntsmicro/**hongos**.pdf).

Como biodegradadores naturais, os fungos encontram as substâncias necessárias para o seu desenvolvimento na natureza, principalmente, macromoléculas insolúveis, que precisam ser primeiramente degradadas em unidades monoméricas solúveis antes de sua assimilação. Polissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos, lignina, lipídios e outros compostos de grande peso molecular, ou insolúveis, não podem ser incorporados diretamente sem antes terem sido reduzidos. Os fungos absorvem nutrientes através da membrana plasmática, como compostos de baixo peso molecular dissolvidos em água, o que justifica essa necessidade. Para isso, esses organismos secretam enzimas específicas para o meio exterior, conseguindo reduzir o tamanho das moléculas e aumentar a sua solubilidade. Assim, essas substâncias passam pela membrana, que tem grande poder seletivo para moléculas pequenas, apesar de algumas enzimas, que fazem parte de sua composição, poderem incorporar, ativamente, determinados nutrientes por seleção. Desse modo, moléculas simples terão preferência na sua utilização como nutrientes, sendo, então, reprimida a síntese de enzimas para moléculas mais complexas. Por exemplo, se houver glicose no meio, a qual é preferida pelo fungo, não serão formadas as enzimas para degradar substratos complexos, como amido e celulose, nem enzimas

para degradar dissacarídeos, como galactose, maltose e sacarose (PUTZKE, 2002).

Tal como nas plantas, em geral, os fungos também necessitam de duas classes de nutrientes de acordo com a quantidade necessária em suas dietas: os macronutrientes (exigidos em quantidades por volta de 10^{-3} M) e os micronutrientes (requeridos em quantidades por volta de 10^{-6} M ou menos). Os macronutrientes são: carbono, hidrogênio, oxigênio, fósforo, potássio, nitrogênio, enxofre e magnésio, dos quais o primeiro é mais exigido, por ser um elemento estrutural, associado ao hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. Entre os micronutrientes, são citados: ferro, cobre, manganês, zinco e molibdênio (PUTZKE, 2002).

A literatura descreve, em geral, a necessidade de incorporação de macroelementos como requisito nutricional para o crescimento de fungos em laboratório. Portanto, destacam-se, dentre os macronutrientes, os seguintes elementos:

CARBONO

É amplamente utilizado por ser um dos componentes estruturais dos fungos, pois sabemos que os microorganismos apresentam 50% de carbono na sua massa celular. Dependendo do tipo de metabolismo, os microorganismos incorporam à célula proporções diferentes de substrato de carbono, o que para os anaeróbicos é de 10%, para os aeróbios representa de 50 a 55% (ROITMAM *et al*., 1988). A glicose é a fonte de carbono mais amplamente utilizada, sendo os estudos realizados principalmente com esse ou outro carboidrato, como frutose, manose e galactose (PUTZKE, 2002).

NITROGÊNIO

O nitrogênio é encontrado no solo, em maior quantidade na forma de nitrato, sendo amplamente utilizável por fungos, mas nem todas as espécies têm essa capacidade. Dentre as demais formas de nitrogênio que podem ser encontradas no solo, somente a amônia tem ampla utilização, apesar de ser tóxica. Mas isso é facilmente contornável em função de ser encontrada na forma de seu íon NH_4^+, o que leva a um pH levemente básico, que permite o crescimento dos fungos. Nitrito e hidroxilamina, apesar de serem tóxicos também, são empregados como fonte de N para por muitas espécies, tal como uréia, aminoácidos e outros compostos nitrogenados. Misturas de aminoácidos parecem ser mais apropriadas, pois aceleram o crescimento em relação a culturas onde um único componente é adicionado (PUTZKE, 2002).

Dentro desse contexto, PEREIRA e LEMOS (2003) estudaram o efeito das fontes de nitrogênio na degradação de petróleo por *A. versicolor*, realizando um experimento que possibilitou a comparação de quatro diferentes fontes de nitrogênio: extrato de levedura (EL), uréia ($(NH)_2CO$), sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$) e nitrato de sódio ($NaNO_3$). O resultado mostrou que a maior eficiência de degradação foi alcançada quando se fez uso de EL (39,5%). O emprego de $(NH)_2CO$, $(NH_4)_2SO_4$ e $NaNO_3$ proporcionou um resultado decrescente em relação à fonte anterior, com percentuais na ordem de 17,41 %; 6,8 % e 4,8 %, respectivamente.

No trabalho de SANTOS (2007), foi avaliado o efeito da adição de duas fontes de nitrogênio, uréia e nitrato de sódio, em amostras contaminadas por petróleo e adicionadas de pó da casca de coco verde, como material estruturante. O experimento, no qual o solo foi corrigido com uréia, foi responsável por uma remoção de carbono

66% maior do que a amostra controle.

PUTZKE (2002) descreve as formas de utilização das diferentes fontes de nitrogênio por espécies de fungos, discutidas a seguir.

A assimilação de **nitrato** (NO_3^-) ou de **nitrito** (NO_2^-) pelos microrganismos conduz à redução de ambas fontes de N a amônia, por meio de vias metabólicas específicas. A redução de nitrato a amônia envolve duas enzimas: nitrato redutase e nitrito redutase, como mostra a **Reação 1** (WIAME *et al*., 1985; GRIFFIN, 1994). Experiências, com relação à síntese dessas enzimas por *Aspergillus nidulans*, indicam que a sua formação é controlada tanto pela indução por nitrato, como pela repressão por amônia. Além disso, admite-se a possibilidade de que nitrato redutase desempenhe um papel regulador autógeno que controla a sua própria síntese e a de nitrito redutase (MARZLUF, 1981).

O íon nitrato pode ser incorporado ao meio de cultivo, utilizando-se nitrato de amônio, nitrato de potássio, nitrato de sódio e nitrato de cálcio. Os passos da redução que permitem ao fungo a utilização do nitrato são apresentados, esquematicamente, na Reação 1, a seguir:

$$\text{Nitrato}(NO_3^-) \xrightarrow{\text{Nitrato redutase}} \text{Nitrito}(NO_2^-) \xrightarrow{\text{Nitrito redutase}} amônia + H_2O$$

Reação 1.Reação de redução do nitrato à amônia realizado por fungos (PUTZKE, 2002)

Porém, muitos fungos não têm a capacidade de utilizar outra fonte de nitrogênio, que não seja a **amônia**. O íon amônia e o nitrogênio orgânico apresentam o mesmo nível de oxidação, dispensando a necessidade de produção das enzimas redutoras. A

utilização preferencial da amônia, evidentemente, também representa um gasto energético menor para o fungo (PUTZKE, 2002).

As evidências sugerem que os fungos assimilam amônia e a transformam em aminoácidos, por meio das vias do glutamato e da glutamina. O grupamento α-amino, da maioria dos aminoácidos, é proveniente do grupamento α-amino do glutamato, obtido por transaminação. O glutamato é sintetizado a partir do íon amônio (NH_4^+) e de α-cetoglutarato, um intermediário do ciclo do ácido cítrico, graças à ação da glutamato dehidrogenase. Por sua vez, a glutamina contribui com a sua cadeia lateral para a biossíntese de variados compostos, e forma-se pela incorporação de íons amônio na molécula de glutamato, por ação da glutamina sintetase. Esta enzima é considerada um elemento controle-chave no metabolismo intermediário, devido à regulação do fluxo metabólico do nitrogênio (SLAUGHTER, 1988).

A outra forma assimilável do nitrogênio é na forma orgânica. O **nitrogênio orgânico** pode ser adicionado aos meios de cultura, por meio da utilização de aminoácidos, peptídios ou peptonas. Estes últimos por hidrólise, resultam em aminoácidos. Em geral, a maioria dos fungos utiliza nitrogênio orgânico (PUTZKE, 2002).

Sabe-se que, o extrato de levedura estimula o crescimento de diversos microrganismos, por ser uma fonte de aminoácidos e vitaminas, especialmente do complexo B. Porém, apesar da importância do extrato de levedura como fonte de N e de outros nutrientes, deve-se ter, também, um compromisso com a viabilidade econômica do processo em desenvolvimento, devido ao custo elevado do nutriente. Para tal, torna-se indispensável a procura por outras fontes de N, visando substituir o extrato de levedura e diminuir os custos de produção. As fontes inorgânicas seriam, neste caso, as

mais recomendáveis, uma vez que são as mais baratas e muito utilizadas nos processos industriais (ANTUNES, 1997).

ENXOFRE

Em culturas de fungos, normalmente utiliza-se o sulfato de magnésio como fonte de enxofre, no qual o íon sulfato entra facilmente na célula, por transporte ativo. Muitos fungos podem reduzir o íon enxofre e, ainda, oxidar enxofre puro ou formas reduzidas de enxofre a partir dos meios onde ocorram. A seqüência da reação é mostrada na Reação 2:

$$\underset{\text{Enxofre elementar}}{S^0} \rightarrow \underset{\text{Tiossulfato}}{S_2O_3^{2-}} \rightarrow \underset{\text{Tetrationato}}{S_4O_6^{2-}} \rightarrow \underset{\text{Sulfato}}{SO_4^{2-}}$$

Reação 2. Oxidação do enxofre puro por fungos (PUTZKE, 2002)

FÓSFORO

O fósforo é assimilado pelos fungos sob a forma de ânion fosfato. Esse ânion é importante para o metabolismo da célula fúngica por fazer parte da molécula de DNA, RNA, além de fosfolipídios, NAD, FAD, coenzima A e de algumas vitaminas. Em meios de cultura, a inclusão de fósforo é feita com a adição de sais de fosfato inorgânico ao mesmo (PUTZKE, 2002).

Geralmente, o teor de fósforo encontra-se em baixa concentração nos ambientes contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, onde as relações carbono/nitrogênio e

carbono/fósforo são elevadas e desfavorecem o crescimento microbiano (ATLAS, 1981).

Cabe salientar, que a fonte de fósforo pode ser tóxica para os microrganismos envolvidos na biorremediação, e pode inviabilizar o referido processo, como comprovado para o ácido metilfosfônico, que causa destruição da membrana celular devido à sua natureza lipofílica (DEL'ARCO, 1999).

POTÁSSIO

O potássio é, geralmente, empregado em sua forma inorgânica K^+. É importante nos processos de transporte celular e na regulação do potencial osmótico da célula (PUTZKE, 2002).

MAGNÉSIO

O magnésio é, da mesma forma que o potássio, empregado em sua forma inorgânica Mg^{+2}, tendo ação importante na estruturação da membrana celular (PUTZKE, 2002).

2.4.2 CULTIVO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS

Os fungos crescem facilmente nos meios de cultivo convencionais dando lugar a colônias visíveis macroscopicamente, com morfologia bem diferenciada para leveduras ou fungos filamentosos. A identificação das leveduras ocorre pelo estudo de suas

características metabólicas, mas a identificação dos fungos filamentosos de baseia nas características morfológicas (uab-gtip.uab.es/Apuntsmicro/**hongos**.pdf). Há mais de uma década, a técnica de seqüenciamento de DNA auxilia a identificação desses microorganismos em países europeus e nos Estados Unidos. Porém, no Brasil, a técnica de identificação por meio das características morfológicas ainda é amplamente aplicada.

A adsorção de nutrientes pelos fungos é auxiliada por enzimas secretadas no meio, que hidrolisam as moléculas orgânicas em porções menores e, conseqüentemente, podem ser transportadas mais facilmente para dentro da célula. Todos os fungos são heterotróficos e podem crescer no laboratório em uma mistura simples, contendo uma fonte de carbono orgânico – geralmente, um açúcar –, uma fonte de nitrogênio inorgânico ou orgânico e alguns minerais. Por outro lado, outros têm a capacidade de crescer em meios complexos, que contém uma variedade de compostos orgânicos, providos de peptona e de extrato de carne, bem como fontes complexas de carbono como celulose e hemicelulose (LEMOS, 2001).

Além das fontes de carbono e nitrogênio, um suporte sólido, como o agar, permite aos fungos filamentosos o desenvolvimento do micélio aéreo - onde se localizam as estruturas reprodutoras - e o aumento do número de colônias, no caso das leveduras. O meio de cultivo mais utilizado para os fungos é o meio glicosado de Saboraud, que possui uma concentração maior de açúcar que o meio de cultivo para as bactérias (4%), e um pH de 5,6, características que dificultam o crescimento bacteriano (uab-gtip.uab.es/Apuntsmicro/**hongos**.pdf).

2.4.3 FUNGOS NO SOLO

Na biosfera, o habitat mais rico em fungos é o solo. O solo é um meio ótimo e favorável à vida dos fungos, pois a grande quantidade de detritos orgânicos animais e vegetais constitui uma fonte inesgotável de alimentos para os mesmos (SILVEIRA, 1995; ROITMAN *et al*., 1991).

No solo, estes organismos são encontrados desde a superfície até uma profundidade que varia de 15 a 20 cm. Junto às bactérias constituem a maioria da microflora e, principalmente, nos solos ácidos e ricos em matéria orgânica chegam a sobrepujar estas últimas (SILVEIRA, 1995).

PUTZKE (2002) apresenta uma estimativa dos números de microorganismos por grama de solo fértil: as unidades formadoras de colônias para fungos estariam numa faixa de 10^5 a 10^6 e para as bactérias de 10^8 a 10^9.

Em 1957, foram catalogados como fungos do solo 690 espécies, pertencentes a 170 gêneros (GILMAN, 1957 *apud* ROITMAN *et al*., 1991). Desde esta data, muitas novas espécies fúngicas foram isoladas do solo, sendo os gêneros mais freqüentemente encontrados: *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Aspergillus*, seguidos por *Rhizopus*, *Zygorhynchus*, *Fusarium*, *Cephalosporium* e *Verticillium* (SILVEIRA, 1995; ROITMAN *et al*., 1991).

2.4.4 APLICAÇÃO DE FUNGOS NA BIORREMEDIAÇÃO

Os fungos apresentam uma série de características econômicas e ecológicas que os transformaram em organismos indispensáveis para todo e qualquer ecossistema. O

impacto da descoberta da penicilina, das substâncias que evitam rejeição de órgãos transplantados, das micotoxinas e de tantos outros produtos e subprodutos de origem fúngica marcou a humanidade. A Figura 7 destaca a presença dos fungos em nossa vida cotidiana – contribuição para a fabricação de pães, queijos e bebidas – e na degradação e reciclagem de nutrientes (PUTZKE, 2002).

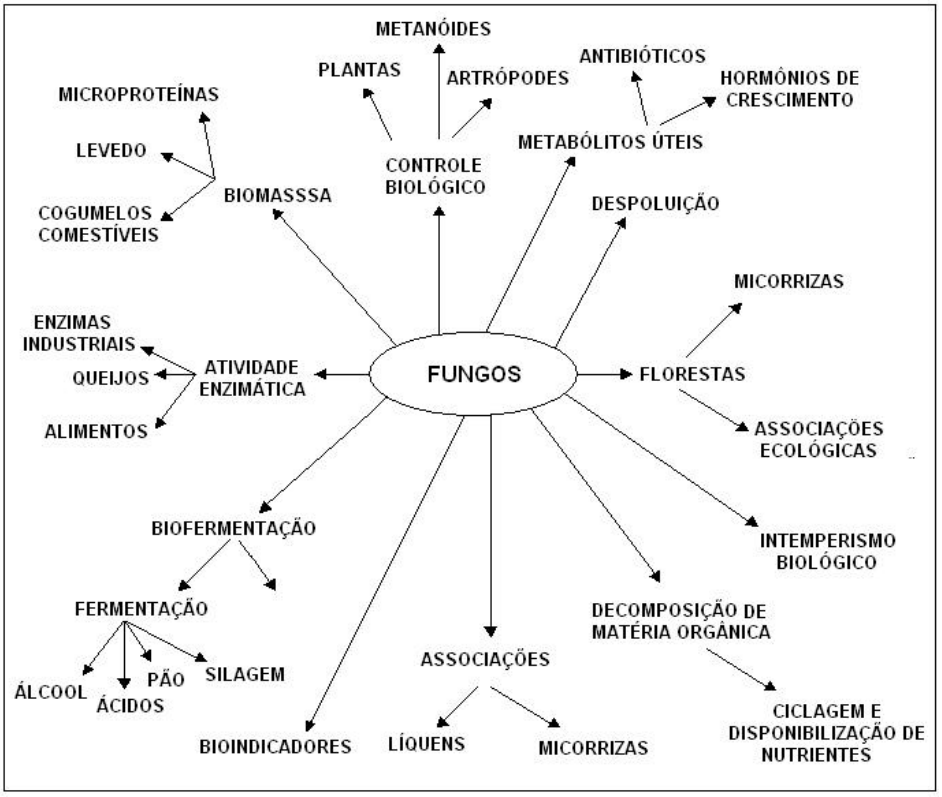

Figura 7. Principais benefícios proporcionados pelos fungos (PUTZKE, 2002).

As tecnologias de biorremediação contam, comumente, com a atividade das bactérias para descontaminar o ambiente. Entretanto, menos atenção tem sido dada a biorremediação de ambientes contaminados efetuada por fungos. Por outro lado, avaliações de fungos, em escala de laboratório, apresentam um potencial adequado para degradar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de alto peso molecular (HPAs) e

outros compostos orgânicos recalcitrantes, por meio de sistemas enzimáticos extracelulares e outros. Portanto, os fungos se constituem num grupo de microrganismos atrativos e promissores para a sua investigação como agentes degradadores (ATAGANA, 2006).

Na última década, têm sido identificadas e caracterizadas diferentes espécies de bactérias e fungos filamentosos, utilizados nos processos de biorremediação. Os fungos são conhecidos pela sua diversidade e habilidade notável para degradar materiais naturais complexos e persistentes, tais como lignina, quitina e celulose microcristalina. Portanto, algumas características dos fungos filamentosos, como a bioatividade e o crescimento morfológico, os tornam potencialmente melhores degradadores do que as bactérias. Além disso, os fungos são capazes de crescer sob condições ambientais de estresse como meios com baixos valores de pH, pobres em nutrientes e com baixa atividade de água, favorecendo o seu desenvolvimento diante de outros microorganismos (MOLLEA *et al*., 2005; DAVIS & WESTLAKE, 1978 *apud* ATAGANA, 2006).

Na pesquisa de ARAÚJO e LEMOS (2002), foram realizados o isolamento e identificação de fungos filamentosos com capacidade de degradação do petróleo. A partir de um solo contaminado com 5% m/m de petróleo, foram obtidas oitenta linhagens, das quais sessenta apresentaram capacidade para degradar hidrocarbonetos de petróleo. A identificação dos microrganismos as agrupou em 4 gêneros fúngicos (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Fusarium*) subdivididos nas seguintes espécies: *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niveus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium corylophilum*, *Parcilomyces variotti*, *Paecilomyces niveus* e *Fusarium sp.*

ATLAS (1981) destacou onze gêneros de fungos e seis gêneros de bactérias responsáveis pela oxidação de hidrocarbonetos em solo. Em outro estudo, realizado por DAVID & WESTLAKE *apud* ATLAS (1981), foram isoladas sessenta espécies de fungos, capazes de crescer em n-tetradecano, tolueno, naftaleno e sete tipos de óleo cru. Os fungos encontrados com maior freqüência no solo foram aqueles que produziram pequenos conídios, tais como *Penicillium* e *Verticillium ssp*.

RAVELET *et al*. (2000) identificaram várias espécies de fungos com capacidade para degradar pireno, um hidrocarboneto policíclico aromático que possui quatro anéis aromáticos. Os microrganismos isolados foram: *Mucor racemosus*, *Mucor racemosus var. sphaerosporus, Gliocadium virens, Penicillium simplicissimum, Penicillium janthinellion, Phialophora alba, Phialophora hoffmannii, Trichoderma hazianum, Scopulariopsis brumptii e Coniothyrium fuckelii.*

MOLLEA *et al.* (2005) também utilizaram linhagens fúngicas puras na otimização da biodegradação de HPA. Os resultados apresentados nesse artigo mostraram que *T. harzianum* não foi capaz de biodegradar naftaleno, diretamente no microcosmo contendo solo, enquanto *P. Chrysosporium*, nas mesmas condições de teste, degradou o poluente até atingir uma concentração residual de 150 mg/kg de solo, após 80 dias, em condições corrigidas com nitrogênio. Porém, no trabalho de BAHERI & MEYSAMI (2002), o bioaumento, com linhagens de fungo da podridão branca, não teve um efeito significativo na biorremediação do solo. Isso foi devido, segundo o próprio artigo, à presença de linhagens naturais de fungos da podridão branca no solo e no material estruturante que continha a madeira. Porém, é conhecido que os microorganismos podem não degradar o contaminante numa exposição inicial, mas fazê-lo após uma exposição duradoura. Essas adaptações metabólicas têm sido objeto de

estudo quanto aos mecanismos que as causam, dentre elas a de adaptação de enzimas de crescimento das populações biodegradantes e mutações genéticas (BRITO, 2004).

ATAGANA *et al.* (2006) avaliaram a capacidade de linhagens fúngicas (*Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Pleorotus*), isoladas do solo contaminado com creosoto, na degradação de HPAs. O estudo foi realizado com bioestímulo, sob a forma de adição de nutrientes. Os pesquisadores apontaram *Pleurotus*, um fungo da podridão branca, como o microrganismo com maior potencial degradador. Embora todas as culturas puras tenham degradado ativamente o creosoto (máximo de remoção de 80%), a mistura de culturas fúngicas foi mais efetiva, com remoção igual a 94,1% no tratamento do solo com adição de nutrientes.

OLIVEIRA e LEMOS (2005) também analisaram o benefício do tratamento ex-situ de amostras contaminadas por petróleo, empregando, conjuntamente, o bioestímulo, com fontes de nitrogênio, e o bioaumento, com *Aspergillus versicolor*. O tratamento proporcionou um aumento de 57,4% na atenuação de hidrocarbonetos do petróleo em relação à amostra controle.

BARROS *et al*. (2007) avaliaram o desempenho da associação de inoculo fúngico e pó de coco como material estruturante. Os autores relataram que, nas amostras sem inóculo fúngico, a evolução de CO_2 foi inferior, demonstrando a importância dos fungos no processo.

Dessa forma, o uso de microorganismos, especialmente fungos filamentosos, em processos de produção em grande escala é altamente conveniente, principalmente em função da dispensa de reagentes químicos adicionais, da freqüente auto-sustentabilidade do processo e da natureza pouco poluente dos processos biológicos (BRITO *et al.*, 2004).

2.5 ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE EM PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO

Os testes de toxicidade são amplamente empregados para a avaliação dos efeitos adversos de agentes químicos sobre a biota terrestre e aquática e possibilitam a avaliação dos impactos de poluentes para organismos do solo e dos corpos receptores. Sendo assim, os testes de toxicidade podem ser realizados para avaliar o potencial de bioacumulação do contaminante fornecendo informações de toxicidade e biodisponibilidade, podendo ser uma importante ferramenta no auxílio do monitoramento de áreas degradadas (RAMOS *et al*., 2007).

Nos testes de ecotoxicidade, são utilizados organismos-teste terrestres, de águas continentais, estuarinas e marinhas que ficam expostos aos contaminantes sob condições controladas (CETESB, 2005).

A toxicologia é o estudo dos efeitos nocivos dos agentes químicos ou físicos sobre os organismos vivos, tendo como objetivo principal estabelecer o uso seguro dos agentes químicos. As substâncias químicas de interesse incluem tanto os produtos químicos sintéticos, quanto aqueles que existem naturalmente no ambiente. Na toxicologia, os efeitos são determinados, em geral, pela injeção ou administração oral de substâncias de interesse em animais, observando-se como a saúde desses é afetada, por meio da relação dose-resposta (BAIRD, 2002).

Estes estudos têm possibilitado o estabelecimento de limites permissíveis de várias substâncias químicas e na avaliação dos impactos de poluentes para organismos do solo e dos corpos receptores, já que é analítica e economicamente inviável identificar

todas as substâncias tóxicas em compartimentos ambientais e criar padrões para cada uma delas (CETESB, 2005). Normalmente, tais estudos envolvem testes de toxicidade simples, realizados em curto espaço de tempo. Entretanto, de acordo com a complexidade do estudo, testes de longa duração também podem ser realizados (RAMOS *et al*.).

Porém, segundo SISINNO *et al*. (2006), os testes de ecotoxicidade são, geralmente, desenvolvidos para determinar a toxicidade de substâncias adicionadas a um solo artificial, a fim de que vários interferentes sejam eliminados. O grande desafio na adaptação desses métodos para a complementação da avaliação de áreas contaminadas é a substituição do substrato artificial pelas amostras de solos trazidas dessas áreas, a avaliação dos possíveis interferentes nos resultados, bem como a escolha dos organismos-teste para amostras com determinadas características (SISINNO *et al*., 2006). A partir desse pressuposto, os autores realizaram ensaios de toxicidade com minhocas em amostras naturais provenientes de áreas contaminadas por hidrocarbonetos, como complementação no processo de avaliação de áreas contaminadas.

DORN *et al*. (1998) também avaliaram a qualidade do solo, resultante de um derramamento de óleo após o processo de remediação, pela análise da toxicidade de organismos do solo. Para aumentar o entendimento da qualidade do solo resultante de um processo de remedição, os autores utilizaram três métodos para testes de toxicidade, dentre eles, o ensaio de letalidade de 14 dias para as minhocas.

DORN e SALANITRO (2000) ressaltam que poucos dados existem para efeitos específicos de contaminação de hidrocarbonetos para tipos de solo, tipos de óleo e outros produtos químicos presentes em solos. A maioria dos dados sobre os efeitos dos

hidrocarbonetos é derivada das informações sobre ambientes aquáticos, sendo estes extrapolados para solos. Isso ressalta a importância da realização de testes de ecotoxicidade para solos contaminados, antes e após o processo de biorremediação. No nosso estudo, porém, o objetivo maior era avaliar a toxicidade do petróleo, nas concentrações empregadas e, principalmente, a das fontes de nitrogênio sobre o sistema contaminado, sem necessariamente, avaliar a qualidade das amostras de solo após o tratamento biológico.

CAPÍTULO 3: Materiais e Métodos

3.1 SOLO

O solo utilizado neste trabalho, do tipo franco-arenoso, é proveniente de um campo de exploração e produção de petróleo em terra, localizada em Carmópolis, município do Sergipe. O material em questão foi gentilmente cedido pela Petrobrás e a coleta foi executada por equipe da própria empresa a fim de garantir a representatividade do sistema.

Após a chegada do solo no Centro de Tecnologia Mineral (CETEM/MCT), em dezembro de 2005, foi realizado o procedimento de secagem a temperatura ambiente durante, aproximadamente, três dias. Posteriormente, o material foi peneirado em uma peneira de malha de 10 mesh (1,68 mm), homogeneizado e quarteado em 1,5 kg. Em seguida, o solo foi estocado em câmara fria a 4°C até a sua utilização nos experimentos. As Figuras 8 e 9 mostram o solo após homogeneização e quarteamento, respectivamente, nas dependências do CETEM.

Figura 8. Homogeneização do solo.

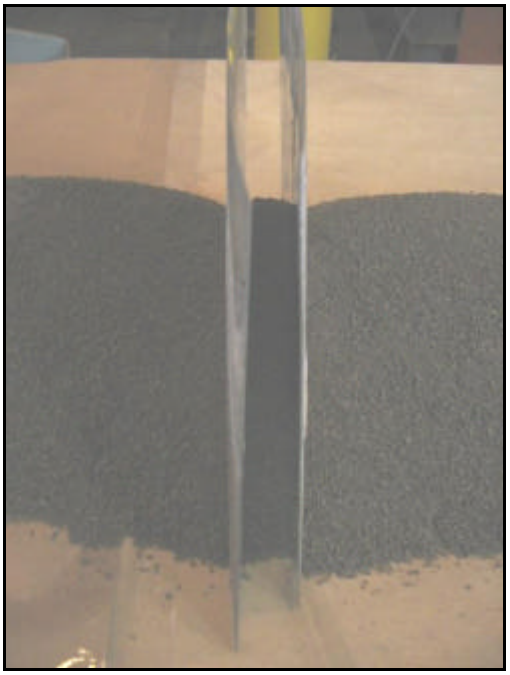

Figura 9. Quarteamento do solo.

3.1.1 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO SOLO

As características químicas do solo, proveniente de Sergipe, foram determinadas por meio de análises de fertilidade e teor total de nitrogênio, no Departamento de Solos (LABFER) da UFRRJ.

A rotina de fertilidade do solo e a análise física foram realizadas de acordo com as metodologias descritas no Manual de Métodos de Análise de Solos (EMBRAPA, 1997). O teor de nitrogênio total foi executado conforme metodologia descrita por TEDESCO *et al*. (1995).

A determinação da capacidade de retenção de água (CRA) no solo foi realizada conforme adaptação do procedimento descrito em ALEF e NANNIPIERI (1995).

3.2 PETRÓLEO

O petróleo, utilizado nos trabalhos experimentais, é proveniente do mesmo campo de exploração e produção de petróleo em terra, do qual o solo também é originado.

A contaminação intencional do solo foi realizada nas dependências do CETEM. Para isso, o solo foi retirado da câmara fria (4ºC) e exposto à temperatura ambiente, do laboratório (24ºC) para secagem durante sete dias. A contaminação foi feita adicionando-se 5% m/m de óleo cru ao solo seco. Somente na terceira etapa experimental, foi acrescentado 1% m/m de petróleo ao solo seco. Isso se deve ao fato da utilização de dois níveis de concentração do poluente – 1 e 5% – na terceira etapa do trabalho.

Três dias após a contaminação, o sistema (solo+óleo) foi empregado nos testes de biodegradação. Esse período foi destinado para evaporação dos compostos voláteis presentes no petróleo.

A determinação da capacidade de retenção de água (CRA) no solo contaminado – para ambos os níveis de contaminação empregados – foi realizada conforme adaptação do procedimento descrito em ALEF e NANNIPIERI (1995).

3.3 FONTES DE NITROGÊNIO

As rotinas de fertilidade e a análise de teores totais de nitrogênio, fósforo e potássio para as amostras comerciais de uréia e mamona foram realizadas pelo Departamento de Solos (LABFER) da UFRRJ, de acordo com as metodologias descritas em 3.1.1.

3.4 INÓCULO

O preparo do inóculo predominante fúngico foi realizado pela extração da microbiota nativa presente no solo, e seu posterior cultivo, com intenção de propagar a biomassa. Para isso, foi utilizada solução salina 0,9% m/v (45 mL) com 0,1g de cloranfenicol por litro de solução, ajustada em pH 4. Tanto o antibiótico, como o ajuste de pH, serviram para inibir o aparecimento excessivo das bactérias. Foi acrescentado 5g de solo virgem à solução e a suspensão foi agitada em *shaker* a 150rpm e 30ºC por 1h e, em seguida, deixada em repouso por 24h. Retirou-se 5 mL de inóculo dessa suspensão e adicionou-se em 200mL de caldo Saboraud – meio de cultivo específico para fungos filamentosos – contendo 0,1g de cloranfenicol por litro de solução. O frasco foi agitado por 48h, de acordo com as condições mencionadas anteriormente, e a seguir, a suspensão contendo a biomassa foi adicionada aos sistemas na proporção de 50% do volume utilizado para umedecer as amostras de solo, nos dois momentos distintos, determinados na primeira etapa.

3.5 TESTES DE BIODEGRADAÇÃO

Os ensaios de biodegradação foram conduzidos usando solo contaminado com 5% e 1% m/m de petróleo – sendo a última concentração aplicada somente na terceira etapa experimental. O presente trabalho experimental foi conduzido em quatro etapas, tendo como meta definir as estratégias mais efetivas para a degradação do óleo cru.

A primeira etapa do trabalho, considerada como ensaio preliminar, foi realizada em biorreatores estáticos (bandejas), durante um período de 10 semanas. O objetivo foi

avaliar o comportamento microbiano no solo contaminado, durante o processo de atenuação natural, para determinação do momento de decréscimo da população de heterotróficos totais a fim de se realizar, a seguir, uma inoculação fúngica no solo contaminado. Além disso, também foi realizado um estudo das CRA's mais promissoras para os testes da próxima fase.

A segunda etapa foi desenvolvida em microcosmos, durante 44 dias, aproximadamente. Nosso alvo era definir as melhores condições de cultivo a serem adotadas no solo contaminado com óleo cru para a etapa seguinte. Assim, alguns fatores limitantes ao processo de biodegradação foram avaliados, como: a adição de fontes de nitrogênio e as relações nutricionais adequadas, bem como a capacidade de retenção de água (CRA) mais favorável para a propagação da microbiota nativa.

Na terceira etapa, as melhores condições determinadas nos testes em microcosmos foram aplicadas em ensaios de biorremediação utilizando os biorreatores estáticos, novamente, durante 8 semanas. Dando seqüência aos experimentos, foi realizado um bioaumento predominantemente fúngico, em dois diferentes momentos: na primeira semana e na semana determinada na etapa preliminar.

A quarta etapa teve como objetivo comparar o impacto toxicológico do emprego das fontes de nitrogênio, empregadas na segunda e terceira etapas do trabalho, sobre organismos do solo, no nosso caso, as minhocas.

A seguir, serão narrados, de forma detalhada, os ensaios realizados em cada uma das etapas supracitadas, assim como as metodologias analíticas de monitoramento incorporadas.

3.5.1 PRIMEIRA ETAPA: ENSAIO PRELIMINAR

Foi realizado o monitoramento microbiológico do processo de atenuação natural por meio da quantificação de fungos e dos heterotróficos totais, presentes no solo contaminado com 5% m/m de petróleo, durante um período de dez semanas. Nesta etapa, foi feito exclusivamente o controle da umidade do solo, por diferença de peso.

O objetivo foi identificar o momento no qual ocorreu a diminuição da população de heterotróficos totais e crescimento da população fúngica no solo contaminado, utilizando técnicas microbiológicas convencionais, além de definir a(s) CRA(s) mais favorável(is) para o crescimento dos fungos filamentosos em solo contaminado.

O experimento foi realizado em biorreatores estáticos de bancada (Figura 10), que consistiam de três bandejas de polietileno de aproximadamente 7,0 L de capacidade total, nos quais foram dispostos 1000g de solo nordestino contaminado e homogeneizado. As amostras de solo foram submetidas à intempérie, contabilizando três dias, até a adição de água para atingir 50, 75 e 90% de capacidade de retenção de água (CRA), respectivamente. Os biorreatores estáticos foram acondicionados no interior do laboratório climatizado, sendo a temperatura média de 24°C.

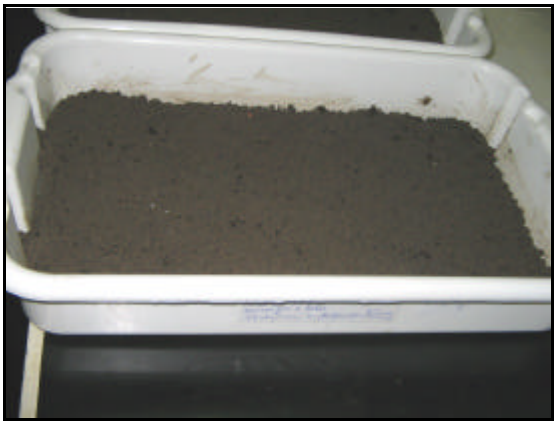

Figura 10. Biorreator estático contendo solo contaminado com petróleo a 5% m/m.

O ensaio foi acompanhado por meio de amostragens semanais. Posteriormente, foram executadas análises microbiológicas, utilizando diluições sucessivas, plaqueamento e contagem de colônias. Um controle abiótico também foi realizado, no qual o solo contaminado com 5% m/m de petróleo foi acrescido de 2% de azida de sódio. O biocida foi adicionado a cada duas semanas para inibir o crescimento microbiano no processo abiótico. O objetivo do controle era avaliar a possibilidade de perdas de hidrocarbonetos totais presentes no petróleo por volatilização e, dessa forma, constatar se a redução do contaminante no final do processo era devida, unicamente, à ação microbiana.

Análises complementares de Óleos e Graxas (OG) foram feitas, semanalmente, durante o processo de biorremediação para todas as amostras de solo contaminado. As amostras foram estocadas em câmara fria a 4°C até a realização das análises.

3.5.2 SEGUNDA ETAPA: EXPERIMENTOS EM MICROCOSMOS

Os ensaios de biodegradação em microcosmos buscaram estabelecer as melhores condições de teste, tais como: a melhor fonte de nitrogênio, a relação nutricional adequada e a CRA mais favorável para otimização do processo de biorremediação de um solo contaminado com 5% m/m de petróleo.

Os microcosmos consistiam de frascos kitasatos, de 250 mL, vedados com rolha de borracha no topo, e uma mangueira de látex na saída lateral, comprimida com pinça de Hoffman, conforme mostra a Figura 11. Nesses frascos, foram adicionados 50g de solo, acrescidos da respectiva fonte de nitrogênio e ajustados com a correspondente CRA. Foi incorporado um frasco controle em todos os experimentos e todas as amostras

foram feitas em duplicata.

Figura 11. Foto do microcosmo utilizado nos Testes de Biodegradação.

Os cálculos para adição de nutrientes foram baseados no conteúdo de carbono orgânico total do solo, determinado pelo teor de carbono orgânico já presente no solo mais o teor de carbono proveniente da contaminação. Dos valores de nitrogênio calculados a partir da relação C/N, foi descontada a parcela de nitrogênio – obtida nas análises de teores totais para nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) – e calculada a quantidade de uréia ou mamona a ser adicionada.

As duas CRA's utilizadas nessa fase foram determinadas na primeira etapa dos testes.

A correção nutricional foi realizada unicamente pela adição de nitrogênio, pois, segundo SANTOS (2007), que utilizou o mesmo solo nordestino, a correção de fósforo não teve contribuição significativa. As duas relações nutricionais empregadas durante o teste, razão carbono/nitrogênio 100:10 e 100:20, já foram aplicadas em projetos de pesquisa desenvolvidos no CETEM e referenciadas por outros autores (OLIVEIRA & LEMOS, 2005; MOLINA-BARAHONA *et al*., 2004; BORRESEN & RIKE, 2006).

Na Tabela 2, estão especificadas as condições adotadas no teste de biodegradação em microcosmos para definir a fonte de nitrogênio e a relação C/N

adequadas ao processo. As doze primeiras condições referem-se aos testes com uréia comercial (U), e as doze últimas, aos testes com torta de mamona comercial marca A (MA). Foram incluídos controles, sem correção de nitrogênio.

Tabela 2. Condições adotadas no Teste de Biodegradação em microcosmos.

	Descrição do Teste			
	Amostra de Solo	**Fonte de Nitrogênio**	**Relação Nutricional (C:N)**	**CRA (%m/m)**
1	SC	U	100:10	50
2	SC	U	100:10	75
3	SC	U	100:20	50
4	SC	U	100:20	75
5	SV	----	----	50
6	SV	----	----	75
7	SC	----	----	50
8	SC	----	----	75
9	SV	U	100:10	50
10	SV	U	100:10	75
11	SV	U	100:20	50
12	SV	U	100:20	75
13	SC	MA	100:10	50
14	SC	MA	100:10	75
15	SC	MA	100:20	50
16	SC	MA	100:20	75
17	SV	----	----	50
18	SV	----	----	75
19	SC	----	----	50
20	SC	----	----	75
21	SV	MA	100:10	50
22	SV	MA	100:10	75
23	SV	MA	100:20	50
24	SV	MA	100:20	75

SC = solo contaminado; SV = solo virgem; U= uréia; M = mamona marca A

O experimento foi acompanhado por meio de medições diretas de gás carbônico, em cromatógrafo a gás, durante 44 dias, sendo o monitoramento feito diariamente, na

primeira semana, e a cada 48h, nas semanas seguintes de teste. A aeração dos frascos era executada após as injeções de evolução de gás carbônico e a correção de umidade, realizada por método gravimétrico, que ocorria somente quando necessário.

Os resultados gerados pela evolução de CO_2 (Condições 1-4 e 13-16) foram correlacionados por meio de um planejamento experimental 2^3, utilizando o *Statistica* 7.0.

O planejamento experimental vem sendo usado largamente. Por meio dele, pode-se determinar as variáveis que exercem maior influência num determinado processo, tendo como resultados a redução do tempo do experimento e a melhoria no rendimento do processo, dentre outros (CALADO e MONTGOMERY, 2003). O planejamento fatorial completo consistiu em oito experimentos em duplicata. A Tabela 3 mostra os fatores e os níveis avaliados no planejamento.

Tabela 3. Variáveis e Níveis utilizados no Planejamento Experimental 2^3 do teste em microcosmos

Níveis	FATORES		
	CRA	**Concentração do Nitrogênio**	**Fonte de Nitrogênio**
+1	75%	20	2
-1	50%	10	1

10 = relação C:N 100/10; 20 = relação C:N 100/20;
1 = uréia comercial; 2 = torta de mamona comercial.

O planejamento estatístico foi utilizado na elaboração dos experimentos, otimizando a variável dependente (carbono removido), e determinando as variáveis influentes e as possíveis interações entre as respectivas variáveis.

As análises de Hidrocarbonetos Totais do Petróleo (HTP) foram feitas apenas no final do processo de biorremediação para as melhores condições testadas e para os

controles (ANM). Essas condições foram identificadas a partir dos resultados do planejamento estatístico e da análise propriamente dita, descontando os controles das respectivas condições bioestimuladas, ambos oriundos do monitoramento do CO_2 produzido nos sistemas em microcosmos.

3.5.3 TERCEIRA ETAPA: ENSAIOS EM BIORREATORES ESTÁTICOS

A terceira etapa do procedimento experimental consistiu no estudo dos microorganismos biodegradadores de petróleo por meio da técnica NMP (número mais provável), priorizando a detecção de fungos filamentosos degradadores.

O objetivo desta fase foi avaliar a degradação do óleo em um sistema mais "real" e em maiores proporções. Para tal, foram empregados biorreatores estáticos com 1,5 kg de solo contaminado com petróleo (Figura 12), as condições definidas como as mais favoráveis para o processo de biorremediação no estágio em microcosmos.

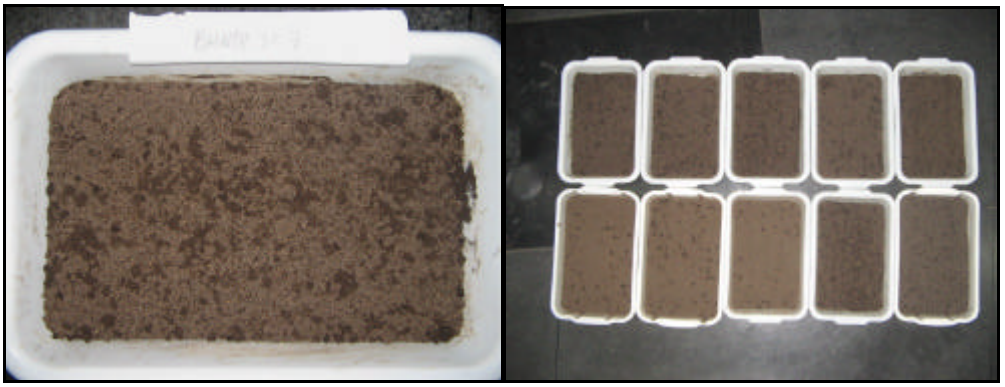

Figura 12. Ensaio utilizando biorreatores estáticos.

O teste foi realizado em biorreatores estáticos de bancada, como descrito no item 3.5.1, referente à primeira etapa do trabalho, durante um período de oito semanas.

O experimento teve como meta estimar o possível benefício relacionado ao

bioaumento fúngico e à incorporação das fontes de nitrogênio, em conjunto ou não, nos processos de biodegradação. As condições utilizadas, relativas à fonte de nitrogênio, relação nutricional e CRA foram aquelas determinadas nas etapas anteriores.

A adição de nutrientes foi executada conforme descrição no item 3.5.2. Admitiu-se, nessa terceira etapa, que o teor de carbono presente no contaminante era de 85% da concentração de hidrocarbonetos totais do petróleo.

A correção de nitrogênio foi feita utilizando a fonte de nitrogênio e relação nutricional determinada na segunda etapa do trabalho. A fonte de nitrogênio escolhida foi a uréia na relação C/N 100:10, que produziu maior remoção de hidrocarbonetos totais do petróleo, pela análise de HTP. Além do bioestímulo com uréia, nesta terceira etapa, foi incorporado um experimento empregando torta de mamona, na relação 100/20, para correção de nitrogênio, de um solo contaminado com 5% m/m de petróleo. Embora essa condição não tenha apresentado resultados satisfatórios no teste em microcosmos (segunda etapa), foi mantida para estudar o comportamento microbiano em uma escala maior (biorreator estático).

A CRA utilizada também foi determinada no ensaio em microcosmos pela análise de HTP.

O bioaumento foi realizado em dois momentos diferentes: na primeira semana de tratamento, após um período de adaptação da microbiota nativa à adição do contaminante, que ocorreu no tempo zero; e na quinta semana, momento identificado como promissor para adição do inóculo, determinado na etapa preliminar. O inóculo predominantemente fúngico foi quantificado por plaqueamento, nos dois momentos distintos (primeira e quinta semanas).

Em resumo, as condições definidas para o ensaio estão apresentadas na Tabela 4:

Tabela 4: Condições adotadas nos Ensaios em Biorreatores Estáticos.

	Descrição do Teste				
	Concentração do contaminante (%m/m)	**Fonte de Nitrogênio**	**Relação Nutricional (C:N)**	**CRA (%v/v)**	**Adição de Inóculo fúngico (50%v/v)**
1	5	U	100:10	50	----
2	5	U	100:10	50	1ª semana
3	5	U	100:10	50	5ª semana
4	5	----	----	50	1ª semana
5	5	----	----	50	5ª semana
6	5	MB	100:20	75	5ª semana
7	5	----	----	50	----
8	1	U	100:15	50	1ª semana
9	1	U	100:15	50	5ª semana
10	1	----	----	50	----

SC = solo contaminado; U= uréia; MB = mamona marca B

Nessa etapa do trabalho, foram testados dois níveis de contaminação: 5 % m/m – condições 1-7 – e 1% m/m de petróleo – condições 8, 9 e 10. O objetivo foi avaliar a influência de dois diferentes níveis de concentração do contaminante sobre a população microbiana e o inóculo predominantemente fúngico, em especial.

Nas condições 1, 2, 3, 6, 8 e 9, o nitrogênio foi adicionado no início do tratamento, sendo a fonte e a relação C/N correspondentes apresentadas na Tabela 4. Quanto ao bioaumento, o mesmo foi efetuado na primeira semana para as condições 2, 4 e 8, e na quinta semana para as condições 3, 5, 6 e 9. Na condição 1 foi feita apenas a correção de nitrogênio com uréia, sem adição de inóculo. Já na condição 6, em particular, foi utilizada a torta de mamona, como fonte de nitrogênio, com relação C/N e CRA diferentes das adotadas para uréia.

As condições 4 e 5 não tiveram correção de nitrogênio. Foi usada a relação nutricional natural do solo contaminado C:N igual a 100: 8,43. Em ambas as condições,

foi realizado o bioaumento, porém, em momentos distintos, como já mencionado.

Por fim, as condições 7 e 10, contendo 5 e 1% m/m de petróleo, respectivamente, representaram o processo de atenuação natural do solo contaminado. O único ajuste realizado foi a correção da CRA, adequação efetivada em todas as bandejas.

O ensaio foi acompanhado por meio de amostragens no tempo zero e, a cada duas semanas, até o final do processo de biodegradação. Para obter amostras mais representativas, foram retiradas porções de solo, de diferentes pontos de cada bandeja, para compor cada uma das amostras, obtidas em duplicata. As análises realizadas, a seguir, foram a contagem de microorganismos degradadores de óleo por NMP (número mais provável), efetuadas a cada duas semanas; e HTP (Hidrocarbonetos Totais do Petróleo) feitas no início e no final do tratamento.

3.5.4 QUARTA ETAPA: ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE AGUDA

A avaliação da qualidade do solo contaminado foi realizada utilizando testes de toxicidade com oligoquetas da espécie *Eisenia andrei* (Minhoca Vermelha da Califórnia). O objetivo maior dessa etapa era avaliar o impacto toxicológico das diferentes concentrações de petróleo no solo (1 e 5% m/m), além do comportamento das fontes de nitrogênio, empregadas no tratamento biológico do sistema contaminado, sobre os organismos terrestres.

O teste de ecotoxicidade foi realizado para condições com diferentes níveis de contaminação – 5 e 1% m/m de petróleo (lotes 2 e 4), conforme mostra a Tabela 5. Esses dois níveis de concentração de óleo cru foram empregados, unicamente, nas

amostras de solo da terceira etapa do trabalho. Isso vai nos fornecer o impacto do petróleo sobre a qualidade do solo e seus organismos.

O outro parâmetro avaliado foi a adição das duas fontes de nitrogênio – uréia e torta de mamona (lotes 3 e 5) – nas amostras de solo contaminado no início do processo de biodegradação. O objetivo foi avaliar se as estratégias adotadas para promover a degradação do petróleo – no início do processo biológico – eram mais agressivas à qualidade do solo do que o próprio contaminante.

Tabela 5. Descrição das amostras utilizadas na avaliação da qualidade do solo por ensaios de ecotoxicidade.

LOTES	Concentração do contaminante no solo (% m/m)	Fonte de Nitrogênio	Relação nutricional (C:N)
1	----	----	----
2	5	----	----
3	5	U	100:10
4	1	----	----
5	5	MB	100:20
Solo Artificial	----	----	----

U = uréia; MB = torta de mamona marca B

A execução dos ensaios se iniciou com a cultura dos organismos-teste. Na cultura, as minhocas foram separadas por idade (jovens – até 150 mg, sub-adultas – entre 150 e 300 mg; e adultas – acima de 300 mg) e mantidas em bandejas plásticas, com aproximadamente 10.000 cm^3 de esterco curtido. A quantidade de minhocas por bandeja variou de acordo com o volume desta e com o peso das minhocas, no máximo 300 g, ou seja, 0,03 g de minhocas/cm^3. As minhocas foram depositadas na superfície da cama de esterco e deixadas para escavar. As culturas foram mantidas no

LECOMIN/CETEM, com temperatura variando de 22 ± 2°C, pH próximo de 7, umidade entre 60-70 % e iluminação constante (RAMOS *et al*., 2007).

O teste de ecotoxicidade foi realizado de acordo com as recomendações da ASTM (2004). Para tal, foram utilizadas as amostras de solo contaminadas e um solo controle, artificial ou de referência, não contaminado.

Para o ensaio, o solo foi preparado em lotes de 600g, quantidade necessária para as triplicatas. Após o preparo do lote, uma alíquota do solo foi retirada para análise da umidade e do pH. A umidade foi corrigida com adição de água destilada até a umidade de 45% e o pH ajustado com carbonato de cálcio ($CaCO_3$) até a neutralidade (RAMOS *et al*., 2007).

Para o controle, foi utilizado solo artificial modificado de OECD (1984), composto por 70% de areia, 20% de caulim e 10% de pó de casca de coco (em substituição à turfa de musgo *Sphagnum*).

As réplicas foram cobertas com papel filme perfurado e colocadas na sala de teste, distribuídas de modo aleatório, nas mesmas condições da sala de cultura (temperatura de 22 ± 2 °C e iluminação constante) por 24 h, para equilíbrio. Para cada réplica, utilizou-se 10 minhocas adultas que, depois de lavadas e secas, foram acondicionadas em recipientes, para purgar o conteúdo intestinal, durante 24 h. Esse procedimento foi utilizado porque a perda da biomassa é usada como um dos parâmetros a ser avaliado (RAMOS *et al*., 2007).

Ao término das 24 h, as minhocas foram novamente lavadas, secas e pesadas em grupos, contendo 10 indivíduos cada, e inseridas mo recipiente-teste, conforme mostra a Figura 13.

Figura 13. Inclusão das minhocas nas réplicas e disposição dos lotes no teste.

Durante os 14 dias do ensaio, as minhocas foram mantidas sem alimentação. Ao final dos 14 dias, as minhocas foram retiradas do recipiente-teste e colocadas novamente para purgar o conteúdo intestinal, durante 24 h, sendo novamente pesadas.

De acordo com RAMOS *et al*. (2007), o teste só pode ser aceito se a mortalidade no controle for inferior a 10%.

3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS DE MONITORAMENTO DOS ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO

As metodologias analíticas utilizadas no acompanhamento dos testes de biodegradação são apresentadas a seguir.

3.6.1 DEGRADAÇÃO DO CONTAMINANTE

a) Quantificação do Gás Carbônico Gerado

O monitoramento da biodegradação foi feito mediante a dosagem de gás carbônico (CO_2), em cromatógrafo a gás (CG), com detector de condutividade térmica (TCD). O CO_2 gerado é produto do metabolismo celular da própria microbiota nativa. O gás foi confinado em frasco kitasato de 250 mL, contendo as amostras de solo contaminado, conforme descrito em 3.5.2. O CO_2 foi coletado da atmosfera interna do recipiente ("headspace"), com auxilio de uma seringa de 500 µL. O aparelho empregado nesta determinação foi o cromatógrafo HP5890 série II, nas condições operacionais:

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

b) Análise do Teor de Óleos e Graxas (OG)

Amostras de 2 g de solo seco contaminado (exposto à temperatura de 60ºC por 16 h) foram extraídas em ultrassom, utilizando n-hexano como solvente, conforme descrito no método IT2003-001-00, registrado na biblioteca do CETEM. O extrato orgânico obtido foi primeiramente concentrado em rotaevaporador até cerca de 10 mL e, em seguida, levado à secura em concentrador de amostras com purga de nitrogênio. O teor de óleos e graxas foi determinado por gravimetria.

c) Análise da Concentração de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP)

As análises de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) e HTP *Fingerprint* foram realizadas pela *Analytical Solution* por cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chamas (DIC), conforme o método USEPA 8015B.

3.6.2 QUANTIFICAÇÃO DOS MICROORGANISMOS

a) Heterotróficos Totais

Para quantificação de microrganismos heterotróficos totais, alíquotas previamente diluídas com solução salina, 0,9 % (m/v) de NaCl, foram plaqueadas pela técnica em superfície, em meio agar soja triptona (TSA) sólido e em agar Saboraud, acrescido de cloranfenicol, para a quantificação de heterotróficos totais e fungos filamentosos, respectivamente. As placas foram incubadas a 30^0C até o aparecimento de colônias características para a realização da contagem do número de unidades formadoras de colônias por grama de solo (UFC/g solo).

b) Microorganismos Degradadores

A contagem dos microorganismos degradadores de petróleo foi realizada pelo método de número mais provável (NMP), utilizando três réplicas, em placas de cultura de células, empregando o meio mineral líquido, acrescido de óleo cru, como única fonte de carbono. A análise de degradação foi feita na presença e ausência de antibiótico

(cloranfenicol). A adição de cloranfenicol (0,1 g/L de solução) visou privilegiar a predominância dos fungos degradadores de hidrocarbonetos, presentes no solo contaminado.

As placas para determinação do NMP foram incubadas a 30°C por sete dias.

CAPÍTULO 4: Resultados e Discussão

4.1CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO SOLO

Na Tabela 6, são apresentados os resultados da caracterização química do solo nordestino, utilizado na presente dissertação.

Tabela 6. Rotina de Fertilidade, Teor de Nitrogênio Total e determinação da CRA no solo virgem

Rotina de Fertilidade		**SV**
Na^+	($cmol_c/dm^3$)	0,043
Ca^{2+}		27,8
Mg^{2+}		21,0
K^+		0,03
$(H^+ + Al^{3+})^A$		10,0
Al^{3+}		0,00
S^B		48,87
T^C		58,87
V^D	(%)	83
pH H_2O	1: 2,5	5,6
C_{org}	(%)	6,12
CRA		34
N	(g/kg)	8,75

SV= solo virgen; C_{org} = carbono orgânico

Segundo ALEXANDER (1999), os nutrientes essenciais ao crescimento celular, além do carbono, são o nitrogênio e o fósforo. Logo, se o ambiente não contiver formas utilizáveis destes elementos ou se a quantidade destes for insuficiente, haverá a necessidade de adicionar fontes exógenas. Geralmente, em ambientes contaminados por hidrocarbonetos, estes nutrientes se encontram em quantidades inadequadas para o crescimento ótimo microbiano, tendo em vista o aumento da quantidade de carbono

[A] $H^+ + Al^{3+}$ = acidez trocável
[B] S= soma de cátions trocáveis
[C] T = capacidade de troca de cátions
[D] V= porcentagem de saturação de bases

disponível para degradação, ocasionado pela presença do contaminante.

Sendo assim, com o auxílio da Tabela 6, foi possível encontrar a relação carbono-nitrogênio natural do solo (100:14,29), a partir do conteúdo de carbono orgânico presente no solo. Vale ressaltar que a quantidade de matéria orgânica presente no solo (em torno de 11%) pode incentivar a microbiota ao seu consumo preferencial.

Porém, ao adicionarmos o petróleo, ocorreu um acréscimo na quantidade de carbono total presente no sistema. Dessa forma, foram calculadas as relações naturais carbono-nitrogênio presentes nas amostras de solo contaminado com 1 e 5% m/m, conforme mostra a Tabela 7.

Tabela 7. Relação natural C:N para as amostras de solo virgem e contaminado.

Amostras	**Relação C:N natural**
Solo não contaminado	100: 14,29
Solo 1% m/m petróleo	100:12,55
Solo 5% m/m petróleo	100:8,43

As relações apresentadas na Tabela 7 serviram como base para os cálculos de correção de nitrogênio nas amostras estudadas.

Vale lembrar que a correção nutricional do solo foi realizada unicamente pela adição de nitrogênio, como citado no item 3.5.2.

As CRA's obtidas para os solos contaminados com 1% e 5% m/m de petróleo foram equivalentes a 32,5% e 28% .

4.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FONTES DE NITROGÊNIO

Na Tabela 8, estão especificados os teores totais de nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) das amostras de uréia e de mamona, empregadas no tratamento do solo estudado neste trabalho.

Tabela 8. Composição Química da Uréia e da Mamona

TEORES TOTAIS	Uréia (g/kg)	Torta de Mamona A (g/kg)	Torta de Mamona B (g/kg)
N	376,8	14,18	25,45
P_2O_5	0,3	13,7	10,8
P	0,1	6,0	4,7
K_20	3,3	19,8	13,2
K	2,8	16,5	11,0
Ca	1,75	27,68	27,96
Mg	0,4	4,4	3,8

A= marca A; B = marca B

De acordo com a composição química das fontes de nitrogênio, foi considerado um teor de 1,5 a 2,5% (m/m) nas tortas de mamona utilizadas (marcas A e B) e de 38% (m/m) na uréia, conforme apresentado na Tabela 8.

Vale ressaltar que, apesar de não ter havido a correção intencional das amostras de solo com fósforo e potássio, aquelas que foram tratadas, especialmente, com torta de mamona, tiveram um acréscimo expressivo na sua proporção (Tabela 8). Diferentemente, as amostras de solo tratadas com uréia não sofreram uma influência tão significativa, por conta da quantidade reduzida desses elementos na composição da mesma.

Dentre os parâmetros analisados na rotina de fertilidade da torta de mamona (Tabela 1A em Anexo A), destacam-se os valores obtidos para carbono orgânico (em

torno de 15%).

Fontes de nitrogênio, ricas em matéria orgânica (aproximadamente 25%), geralmente, tendem a promover a preferência assimilativa da microbiota, em detrimento do petróleo, no processo de biodegradação. Isso é devido ao fato da microbiota nativa escolher, quando possível, fontes de energia mais facilmente metabolizáveis. No caso da adição da torta de mamona, há, também, a probabilidade da degradação preferencial do nutriente, inviabilizando o processo de biorremediação.

4.3 TESTES DE BIODEGRADAÇÃO

O princípio da biorremediação se baseia na utilização de populações microbianas que possuam a capacidade de modificar ou decompor determinados poluentes. Pode-se utilizar a ação e/ou adição de microorganismos indígenas, assim como, a adição de microorganismos provenientes de outros sítios ou estirpes geneticamente modificadas. A principal finalidade é obter níveis de degradação até o limite de detecção do poluente ou abaixo dos valores aceitáveis ou estabelecidos pelas agências reguladoras. (PRINCE *et al*., 1993; CUNHA e LEITE, 2000; LANGWALDT & PUHAKKA, 2000).

A partir desse pressuposto, quatro etapas seqüenciais de trabalho experimental foram conduzidas para obtenção de níveis expressivos de degradação do contaminante presente no solo, objeto de estudo.

4.3.1 PRIMEIRA ETAPA: ENSAIO PRELIMINAR PARA REALIZAÇÃO DO BIOAUMENTO

O ensaio preliminar consistiu em um processo de atenuação natural monitorada de um solo contaminado com 5% m/m de petróleo. O principal objetivo, nesta fase, era a determinação de um momento ideal para adição de um inóculo predominantemente fúngico. Assim, o bioaumento – procedimento a ser realizado na última etapa do trabalho experimental – seria realizado na semana em que houvesse maior aparecimento da microbiota nativa fúngica e decréscimo dos heterotróficos totais. A sugestão da introdução de um consórcio fúngico em um segundo momento, diferente da primeira semana, teve como finalidade fortalecer a população fúngica adaptada ao derramamento de petróleo intencional e já presente no solo, a fim de promover uma maior degradação do contaminante.

Para isso, foi feito um acompanhamento das unidades formadoras de colônias (UFC) dos fungos filamentosos e dos microorganismos heterotróficos totais nas amostras com solo contaminado e CRA's de 50, 75 e 90% .

Um controle abiótico contendo solo contaminado com 5% m/m de petróleo e 75% da CRA, mais 2% de azida de sódio, foi utilizado. O objetivo do controle era avaliar a possibilidade de perdas de hidrocarbonetos totais presentes no petróleo por volatilização e, dessa forma, constatar se a redução do contaminante no final do processo se devia, unicamente, à ação microbiana. Infelizmente, o controle com o biocida não se mostrou funcional, visto que, o monitoramento microbiano apresentou números de UFC's equivalentes ao dos sistemas contaminados. Isso pode ser explicado pelo fato da bandeja ser um sistema aberto e possibilitar a contaminação pelos

microorganismos presentes no laboratório. Assim, o controle abiótico foi desconsiderado, nessa etapa, e os processos de ANM foram eleitos como sistemas controles para as etapas seguintes.

As Figuras 14 e 15 apresentam o número de UFC para fungos filamentosos e heterotróficos totais, respectivamente, no solo contaminado com 5% m/m de petróleo, nas três CRA's testadas – 50, 75 e 90%, ao longo de dez semanas de tratamento.

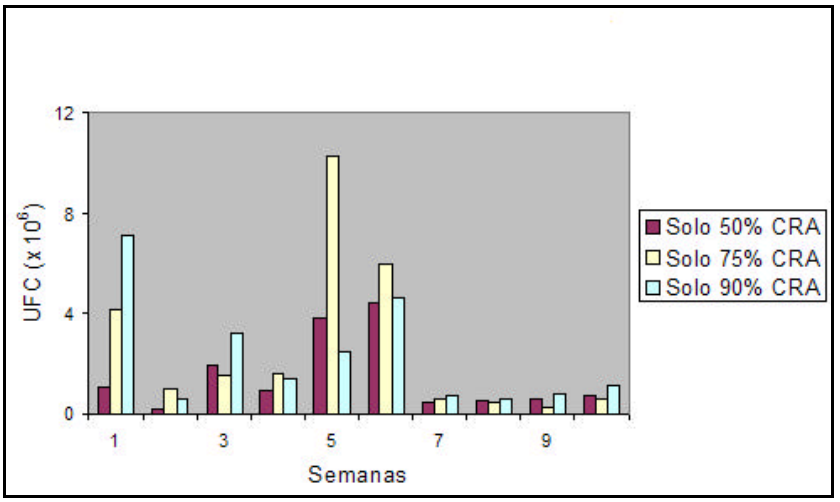

Figura 14. Contagem de colônias de fungos filamentosos em solo contaminado com 5% m/m de petróleo.

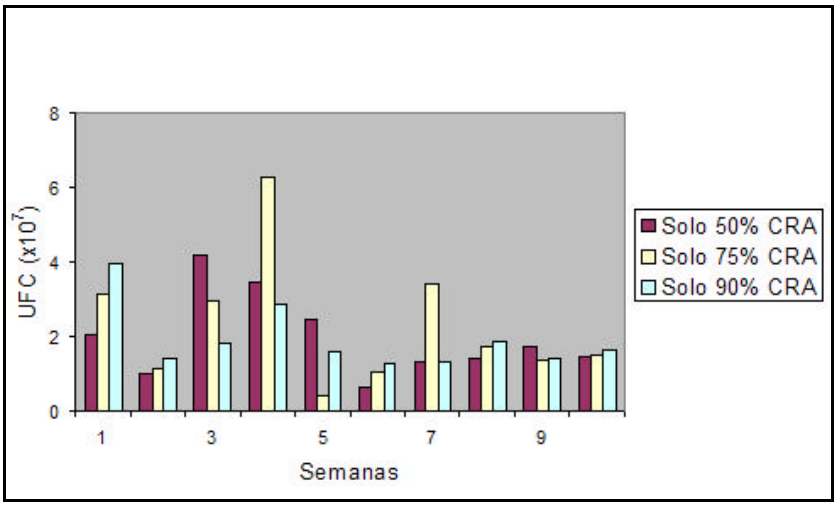

Figura 15. Contagem de colônias de microorganismos heterotróficos totais em solo contaminado com 5% m/m de petróleo.

Com auxílio dos gráficos anteriores, foi possível notar que, na quinta e sexta semanas do experimento, houve um aumento na população fúngica (Figura 14) e um decréscimo no número de microorganismos heterotróficos totais (Figura 15), possivelmente, ocasionado pela competição fungos-bactérias. Isso nos permite sugerir a quinta semana como o momento adequado para execução de uma inoculação fúngica no solo, na terceira etapa do trabalho.

Outro ponto importante a ser destacado, conforme mostram as Figuras 14 e 15**,** é o decréscimo abrupto da microbiota presente no solo, especialmente dos fungos, a partir da sétima semana de experimento. Isso se deve, possivelmente, a competição fungos-bactérias, visto que ocorreu uma estabilização da população de heterotróficos totais, a partir também da sétima semana, mesmo com uma diminuição significativa da população fúngica.

Outro parâmetro avaliado para as fases seguintes foi a CRA, pois, buscava-se aquela que propiciasse um maior crescimento microbiano. Foram selecionadas as CRA's de 50% e 75%, por promoverem o aumento da microbiota fúngica, especialmente, na quinta e sexta semanas. Embora, as contagens obtidas para o solo contaminado com petróleo e 90% da CRA tenham sido significativas, levou-se em conta o consumo de um menor volume de água e, consequentemente, menor geração de resíduo.

Deve-se ressaltar que os resultados, nesse ensaio preliminar, criam apenas uma expectativa, sem nenhuma validade estatística. Sabemos que os erros associados às técnicas de plaqueamento e de NMP são significativos.

Foi realizada, também, uma quantificação do teor de óleos e graxas para

verificação do nível de degradação do óleo cru durante o processo de atenuação natural monitorada (ANM). A Figura 16 mostra o resultado do teor de OG durante as dez semanas de teste.

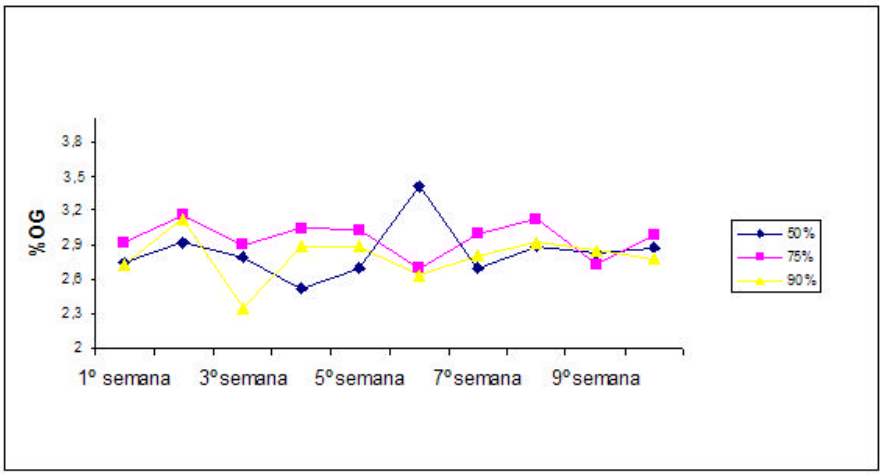

Figura 16. Teor de óleos e graxas das amostras de solo contaminado com 5% m/m de petróleo e 50, 75 e 90% da CRA.

A Figura 16 mostra que não houve uma diminuição significativa do teor de óleos e graxas no decorrer das dez semanas, o que implica em duas possibilidades: os microorganismos utilizaram outra fonte de carbono, mais assimilável que o óleo cru, como fonte de energia – provavelmente, a própria matéria orgânica do solo –; ou o limite de detecção da técnica não permitiu apurar um nível de degradação tão baixo.

Cabe ressaltar, também, que o processo de atenuação natural de poluentes orgânicos requer um longo tempo de tratamento para o solo contaminado. MOURA *et al*. (2006) realizaram um teste de simulação do processo de atenuação natural em microcosmos expostos a variações climáticas. Durante o ensaio, foi realizado o acompanhamento da concentração de microorganismos no solo, bem como, do teor de

óleos e graxas. Ao final dos primeiros 105 dias de ensaio, foi observada uma queda de cerca de 15% no valor de OG para o solo contaminado com 5% de óleo, indicando uma baixa remoção do poluente.

Isso leva a pensar que, para a obtenção de resultados satisfatórios, na presença de uma fonte de carbono facilmente assimilável, se faz necessária à aplicação de outras técnicas auxiliares – como bioaumento e/ou bioestímulo – para promover uma degradação mais significativa do contaminante. Assim, na fase seguinte, foram avaliadas, principalmente, a contribuição das fontes de nitrogênio e suas respectivas concentrações nos testes de biodegradação de óleo cru, em microescala.

4.3.2 SEGUNDA ETAPA: EXPERIMENTOS EM MICROCOSMOS

Os ensaios de biodegradação em microcosmos buscaram estabelecer as melhores condições a serem empregadas nos experimentos posteriores (terceira etapa): a fonte e a relação nutricional adequadas e a CRA mais favorável para otimização do processo de biorremediação de um solo contaminado com 5% m/m de petróleo.

Dessa forma, as fontes de nitrogênio empregadas foram a uréia comercial (U) e a torta de mamona comercial marca A (MA). As amostras sem correção de nitrogênio foram inseridas com o intuito de investigar o real benefício do bioestímulo. Para fins de quantificação do gás carbônico, proveniente da respiração microbiana e não da degradação do óleo, foram dosadas amostras de solo sem contaminação, como controles.

As duas relações nutricionais empregadas foram C:N 100:10 e 100:20. A escolha das relações foi baseada, principalmente, nos resultados descritos em

OLIVEIRA e LEMOS (2005) que utilizaram uréia como fonte de nitrogênio, nas proporções supracitadas. A escolha da mamona, como nutriente, se baseia no fato da torta ser um subproduto da extração do óleo, sendo o último destinado à produção do biodiesel (MELO, 2008). Dessa forma, a utilização de um resíduo agroindustrial – a torta de mamona – como insumo na tecnologia de biorremediação, torna-se atrativa pelo reaproveitamento do mesmo.

As CRA's utilizadas nessa fase foram determinadas no ensaio preliminar por meio do monitoramento da microbiota nativa. Dentre as três CRAs estudadas na fase de ANM, apenas 50% e 75% foram selecionadas por favorecer um maior número de UFC de microorganismos presentes no solo contaminado, especialmente na quinta semana, momento chave na fase anterior.

Os resultados obtidos para o primeiro teste de biodegradação em microcosmos, utilizando uréia e torta de mamona como fontes de nitrogênio, são mostrados nos gráficos das Figuras 17 e 18.

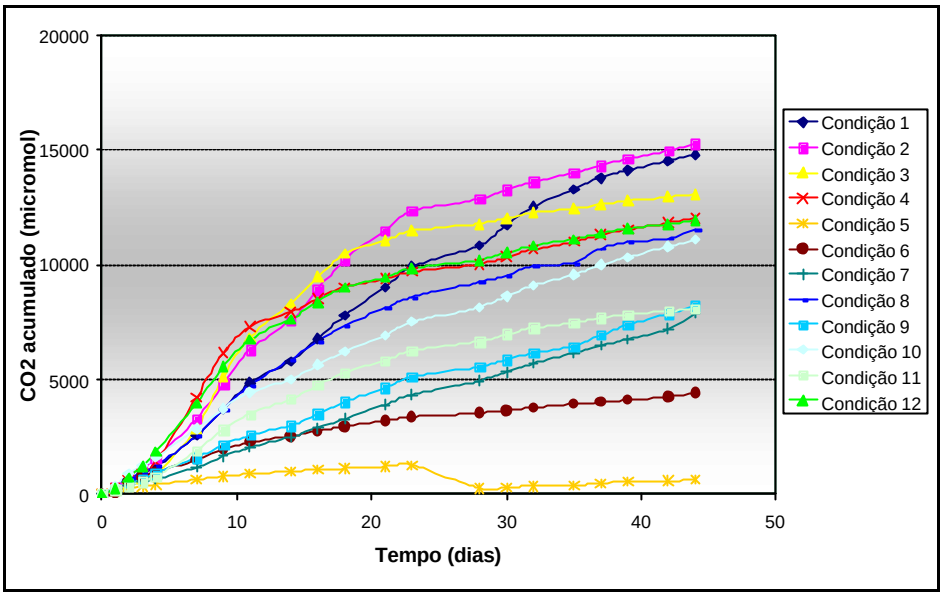

Figura 17. Teste de biodegradação de solo contaminado com 5% de petróleo, utilizando uréia (U) como nutriente: condições 1-12

(Condição 1: SCU 100/10 50%CRA; Condição 2: SCU 100/10 75%CRA; Condição 3: SCU 100/20 50%CRA; Condição 4: SCU 100/ 20 75%CRA; Condição 5: SV 50%CRA; Condição 6: SV 75%CRA; Condição 7: SC 50%CRA; Condição 8: SC 75%CRA; Condição 9: SVU 100/10 50%CRA; Condição 10: SVU 100/10 75%CRA; Condição 11: SCU 100/20 50%CRA; Condição 12: SVU 100/20 75%CRA)

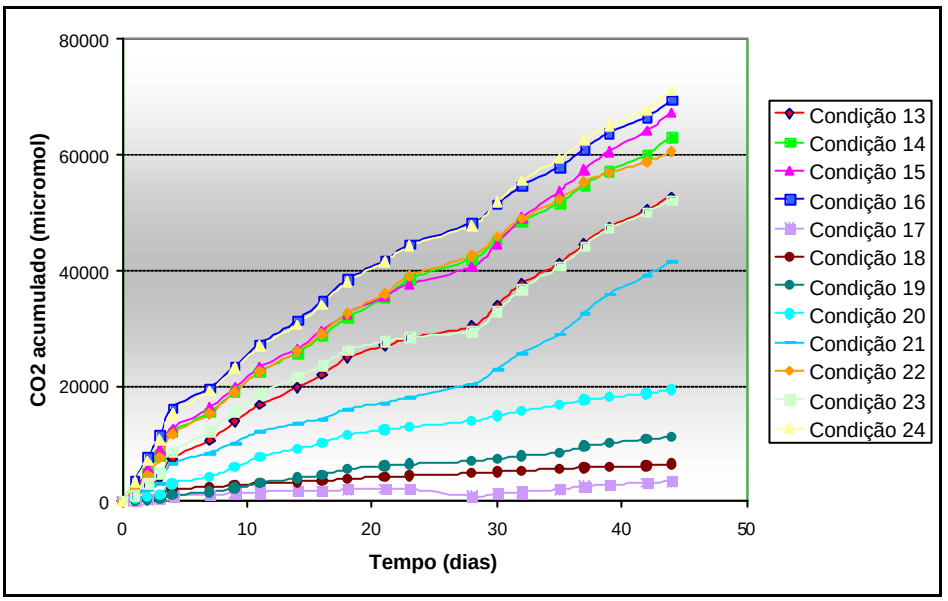

Figura 18. Teste de biodegradação de solo contaminado com 5% de petróleo, utilizando torta de mamona (MA) como nutriente: condições 13-24

(Condição 13: SCMA 100/10 50%CRA; Condição 14: SCMA 100/10 75%CRA; Condição 15: SCMA 100/20 50%CRA; Condição 16: SCMA 100/20 75%CRA; Condição 17: SV 50%CRA; Condição 18: SV 75%CRA; Condição 19: SC 50%CRA; Condição 20: SC 75%CRA; Condição 21: SVMA 100/10 50%CRA; Condição 22: SVMA 100/10 75%CRA; Condição 23: SVMA 100/20 50%CRA; Condição 24: SVMA 100/20 75%CRA)

É importante ressaltar que as amostras bioestimuladas são apenas as condições 1-4 (uréia) e 13-16 (torta de mamona). As outras condições testadas foram utilizadas apenas para avaliarmos a real eficiência do processo de bioestímulo na remediação do solo contaminado.

A partir dos resultados apresentados, foi feita uma comparação entre as condições que empregavam fonte de nitrogênio – condições 1–4 (uréia) e 13–16 (torta de mamona) – e as amostras que continham apenas solo contaminado, representando o processo de atenuação natural monitorada (ANM), conforme mostram as Figuras 19 e 20, respectivamente.

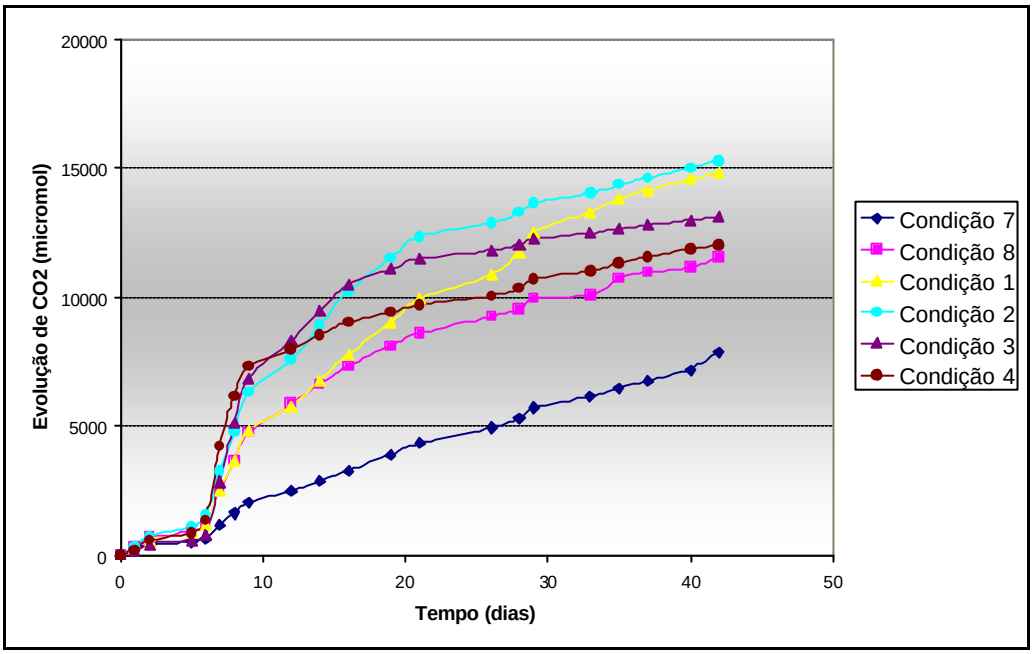

Figura 19. Teste de biodegradação de solo contaminado com 5% de petróleo, utilizando uréia: Condições 1, 2, 3, 4, 7 e 8.

(Condição 1: SCU 100/10 50%CRA; Condição 2: SCU 100/10 75%CRA; Condição 3: SCU 100/20 50%CRA; Condição 4: SCU 100/10 75%CRA; Condição 7: SC 50%CRA; Condição 8: SC 75%CRA)

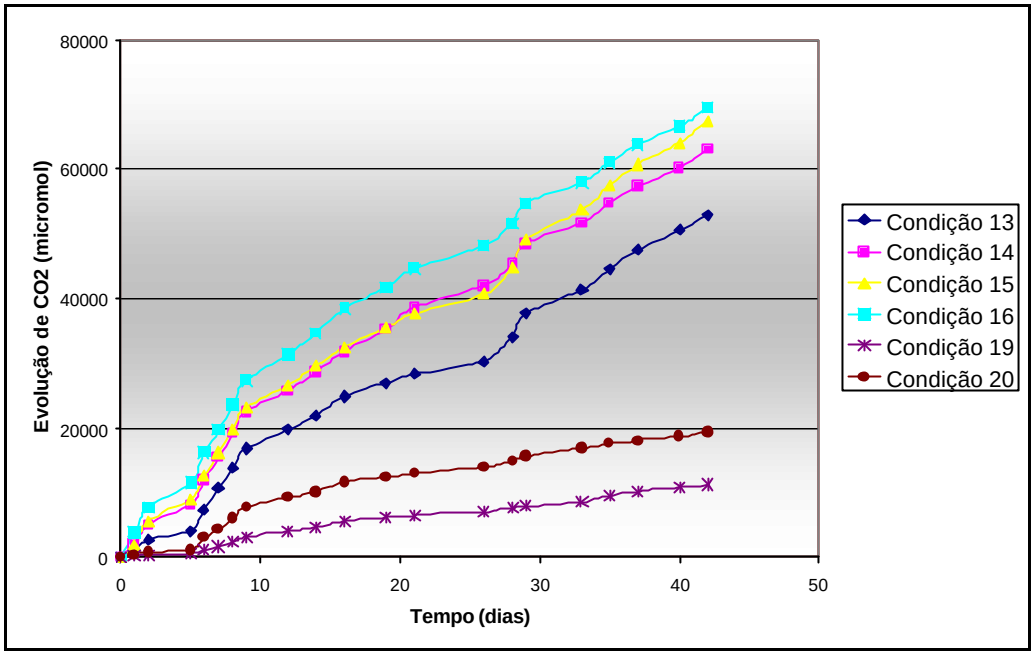

Figura 20. Teste de biodegradação de solo contaminado com 5% de petróleo, utilizando mamona: Condições 13, 14, 15, 16, 19 e 20.
(Condição 13: SCMA 100/10 50%CRA; Condição 14: SCMA 100/10 75%CRA; Condição 15: SCMA 100/20 50%CRA; Condição 16: SCMA 100/20 75%CRA; Condição 19: SC 50%CRA; Condição 20: SC 75%CRA)

Analisando as Figuras 19 e 20, pode-se observar que as condições empregando tanto uréia, como torta de mamona, nas duas relações testadas – condições 1-4 e 13-16, respectivamente, – produziram uma maior evolução de gás carbônico do que as condições de atenuação natural. Esse é um dado interessante, pois sugere que as amostras bioestimuladas, com ambas as fontes e as concentrações de nitrogênio aplicadas, apresentaram uma maior taxa de biodegradação em relação às amostras sem nutrientes adicionais. Vale também salientar que, nas figuras supracitadas, observa-se uma produção de gás carbônico quatro vezes maior, no mínimo, para as amostras corrigidas com mamona do que para aquelas contendo uréia. Assim, numa análise inicial, o emprego da torta da mamona, como nutriente no processo de biorremediação, destaca-se como o mais eficiente, até o presente momento.

A fim de se realizar uma análise mais apurada sobre a real influência das

diferentes fatores (fonte de nitrogênio, relação nutricional e umidade), empregados no processo de biodegradação, foi realizado um planejamento estatístico.

Ferramentas estatísticas, como o planejamento experimental, têm sido cada vez mais utilizadas em pesquisas envolvendo processos de biorremediação do petróleo.

OLIVEIRA e MILLIOLI (2005) utilizaram um planejamento fatorial completo para avaliar o percentual de biodegradação do óleo cru em solo contaminado com 5% m/m de petróleo. Para este fim, foram verificadas as adições de nitrogênio, sob a forma de nitrato de amônio (NH_4NO_3), nas relações C:N 100:10 e 100:5; de fósforo, sob a forma de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4), nas relações C:P 100:2 e 100:1; e umidade, em 50 e 90% da CRA.

MOLINA-BARAHONA *et al.* (2004) avaliaram os efeitos de adição de nutrientes e de resíduos comuns, oriundos da colheita, na biodegradação de hidrocarbonetos em solos contaminados com diesel. Foi feito um planejamento fatorial fracionado para avaliar os efeitos da relação de C:N (100:10 ou 100:30), teor de umidade (20% ou 30% m/m), concentração de resíduos de colheita (2% ou 3% m/m) e tipo de resíduo (milho ou cana-de-açúcar) na remoção de diesel.

Deste modo, no presente trabalho, as amostras adicionadas de uréia (1-4) e torta de mamona (13-16) foram correlacionadas por meio de um planejamento experimental, utilizando o software comercial *Statistica* 7.0, conforme descrito no item 3.5.2 de Materiais e Métodos. Assim sendo, empregou-se um planejamento fatorial completo com três fatores e dois níveis, no qual foram analisados os seguintes fatores: a fonte de nitrogênio (uréia e mamona), a concentração do nutriente (10 e 20, que indicam, respectivamente, relações C:N 100:10 e 100:20) e a CRA (50 e 75%). Neste planejamento, a variável de resposta foi o resultado do carbono removido (µg), no final

do teste, e calculado a partir do gás carbônico obtido na análise de cromatografia gasosa, realizada nos testes em microcosmos. A matriz do planejamento fatorial completo (2^3), gerada pelo software, é apresentada na Tabela 9.

Tabela 9. Matriz do planejamento fatorial completo (2^3)

Planejamento: 2**(3-0)					
	Duplicata	**CRA**	**Concentração**	**Fonte de Nitrogênio**	**Carbono removido (µg)**
1	1	50,00	10,00	1,00	166976,10
2	1	75,00	10,00	1,00	209001,30
3	1	50,00	20,00	1,00	160351,00
4	1	75,00	20,00	1,00	146440,90
5	1	50,00	10,00	2,00	613782,20
6	1	75,00	10,00	2,00	751161,00
7	1	50,00	20,00	2,00	820943,10
8	1	75,00	20,00	2,00	828493,40
9	2	50,00	10,00	1,00	188640,70
10	2	75,00	10,00	1,00	157676,10
11	2	50,00	20,00	1,00	149464,80
12	2	75,00	20,00	1,00	142535,40
13	2	50,00	10,00	2,00	653666,90
14	2	75,00	10,00	2,00	761728,70
15	2	50,00	20,00	2,00	795972,70
16	2	75,00	20,00	2,00	838978,30

Concentração: 10 (C:N 100/10) e 20 (C:N 100:20); Fonte: 1 (uréia) e 2 (torta de mamona)

Os ensaios foram feitos com uma réplica e de forma aleatória, respeitando os princípios básicos de um planejamento de experimentos. Fazer um experimento com réplicas é muito importante por dois motivos: primeiro, permite a obtenção do erro experimental; segundo, se a média de uma amostra for usada para estimar o efeito de um fator no experimento, a replicação permitirá a obtenção de uma estimativa mais precisa desse fator. Além disso, os métodos estatísticos requerem que as observações,

ou os erros, sejam variáveis aleatórias distribuídas independentemente. Os experimentos, com suas réplicas, devem ser realizados de forma aleatória, de modo a garantir a distribuição equânime de todos os fatores não considerados (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

Sendo assim, nessa etapa, foi possível verificar a significância estatística das variáveis independentes, ou fatores investigados (fonte de nitrogênio, concentração do nutriente e CRA), num nível de confiança de 95% ($p<0,05$). Examinando a Figura 21, pode-se comparar os valores observados ou experimentais (pontos) da remoção de carbono e os valores preditos ou obtidos pelo modelo (representados pela reta), gerados pelo *software*. Considera-se que, quanto mais próximo os pontos (valores observados) estão da reta (valores preditos), melhor é o ajuste (TRINDADE, 2002).

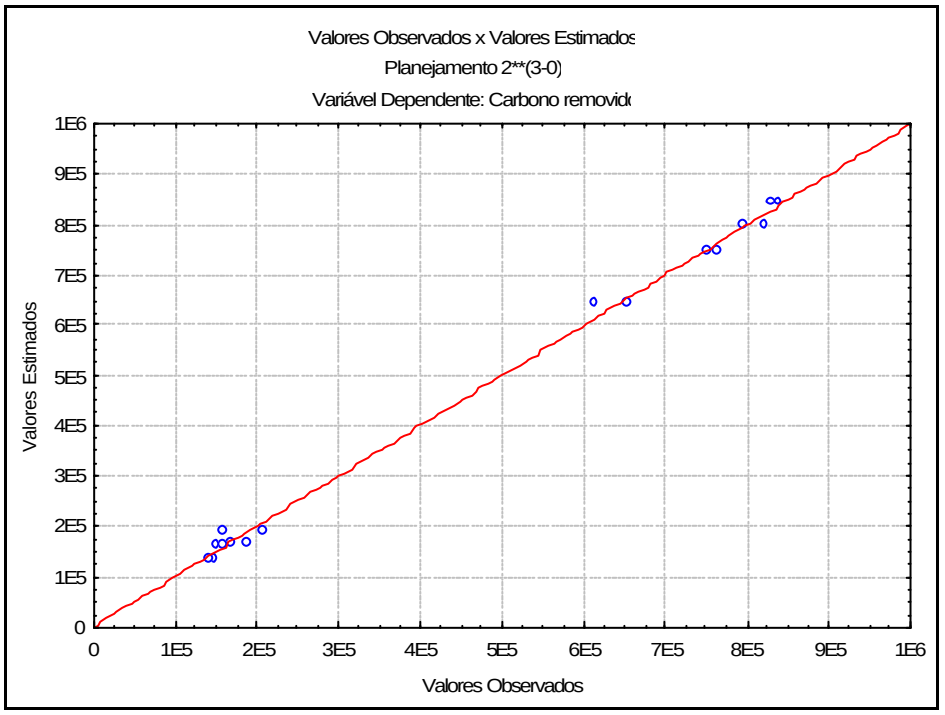

Figura 21. Relação entre os valores experimentais observados e os preditos pelo planejamento fatorial completo 2^3, avaliando os fatores fonte de nitrogênio, concentração do nutriente e CRA.

Analisando a Figura 21 e considerando a utilização de um sistema altamente heterogêneo, como o solo, aliado aos microorganismos presentes, pode-se afirmar que houve um ajuste satisfatório (R^2= 0,99692) dos valores experimentais com os valores obtidos pelo modelo.

Seguindo critérios estatísticos e de significância, foi gerado o diagrama de Pareto (Figura 22) que exibe, de forma mais simples e direta, os efeitos que apresentaram relevância estatística.

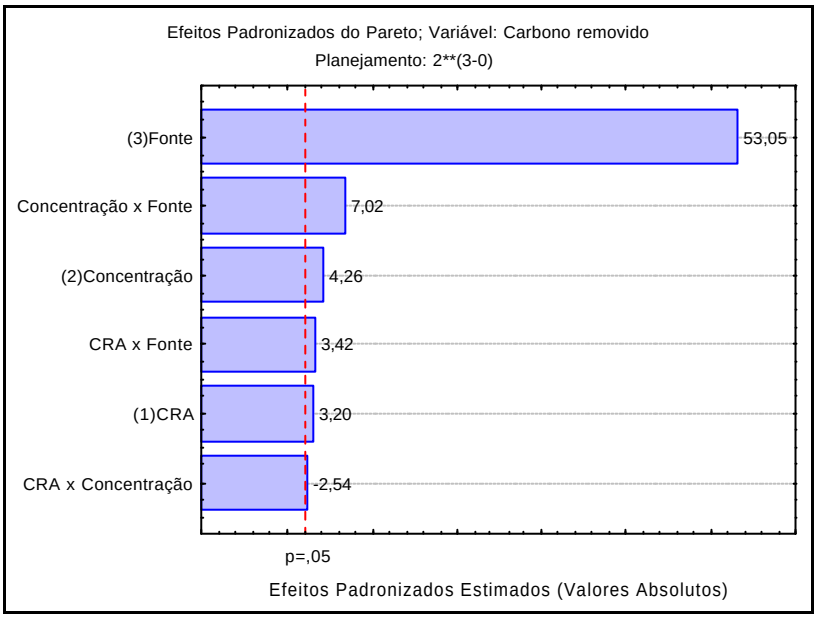

Figura 22. Gráfico de Pareto: visualização dos efeitos estatisticamente relevantes para os resultados de carbono removido do planejamento fatorial completo 2^3, avaliando os fatores fonte de nitrogênio, concentração do nutriente e CRA.

Na Figura 22, os retângulos que se prolongam à direita da linha divisória (p= 0,05) representam, simbolicamente, que os seus efeitos são estatisticamente relevantes. Quer dizer que todos os fatores (fonte de nitrogênio, concentração do nutriente e CRA) e respectivas interações apresentaram relevância estatística. É válido ressaltar que, o

fator fonte de nitrogênio foi o que mais influenciou no processo de biorremediação, quanto aos resultados de carbono removido.

A interação entre os fatores concentração x CRA, das fontes 1 (uréia) e 2 (mamona), ainda pode ser visualizada no gráfico das médias, apresentado na Figura 23, a seguir.

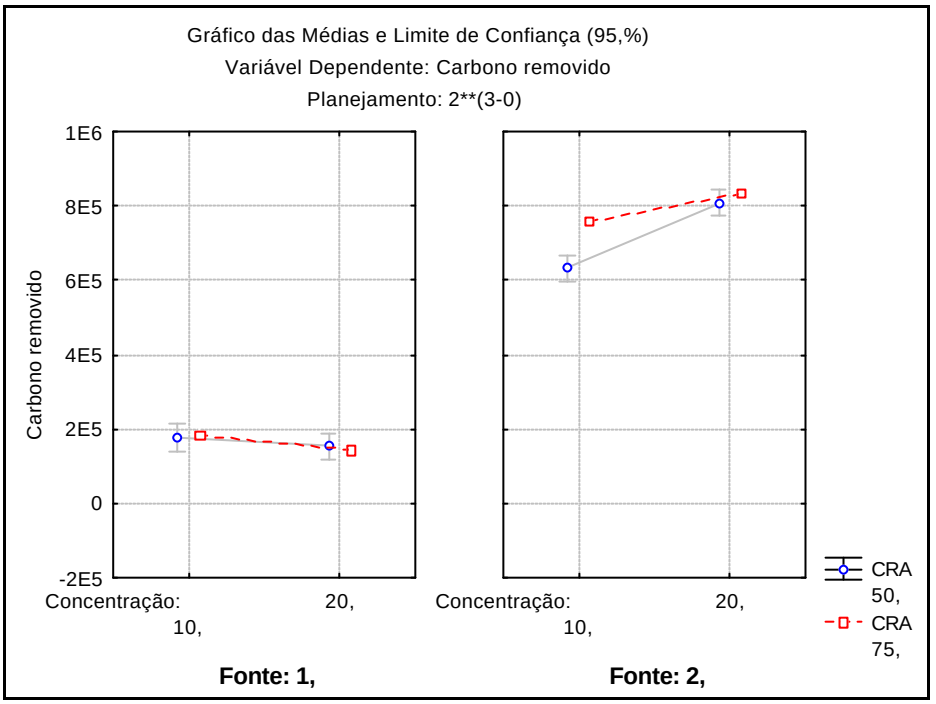

Figura 23. Gráfico das médias das interações entre os fatores concentração x CRA das fontes 1 (uréia) e 2 (mamona) obtido pelo planejamento fatorial completo 2^3.

A Figura 23 confirma o efeito de interação dos fatores CRA e concentração do nutriente, principalmente para a fonte 1 (uréia), dado que as linhas nos diferentes níveis se cruzaram. Vale ressaltar que a interação entre os fatores é menor para a fonte 2 (mamona) quando comparada à fonte 1 (uréia). Também é possível avaliar pelo gráfico das médias, que a fonte 2 (mamona) apresentou os melhores resultados de remoção de carbono, principalmente, nos níveis superiores de concentração (20) e CRA (75%).

No planejamento fatorial completo (2^3), realizado por OLIVEIRA e MILLIOLI (2005), mencionado anteriormente, a análise estatística apontou como variável mais significativa a adição de nitrogênio, observando-se que quanto maior a concentração de nitrogênio, maior a biodegradação do óleo. Os fatores fósforo e umidade não foram estatisticamente significativos nas concentrações analisadas. A partir do planejamento experimental, outras relações nutricionais foram testadas para se determinar a concentração ótima para o processo de biodegradação. Desse modo, a relação C:N:P 100:15:1 apresentou a maior porcentagem de biodegradação, sendo a mesma igual a 25,2%, após 30 dias de teste.

PALA *et al*. (2006) realizaram um planejamento experimental 2^3 para avaliar a influência de três variáveis (conteúdo de nitrogênio, pH e a taxa de aeração) na eficiência de remoção do poluente, empregando biorreatores, por 30 dias. A correção do nitrogênio e o ajuste do pH foram feitos pela adição de NH_4NO_3 e de solução de NaOH 0,1N, respectivamente. Dentre os fatores estudados, destaca-se como variável mais significativa o conteúdo de nitrogênio na remoção do carbono orgânico. Porém, essa variável afeta o processo de forma negativa: quanto maior o conteúdo de nitrogênio, menor a remoção de carbono orgânico. No nosso estudo, a influência da concentração de nitrogênio foi mais significativa para a fonte 2 (torta de mamona) e o seu efeito no processo foi positivo: quanto maior a concentração do conteúdo de nitrogênio, maior a quantidade de carbono removido.

Sendo assim, o planejamento experimental realizado no presente trabalho apontou a fonte de nitrogênio como fator mais influente, nos resultados de carbono removido; dado importante para o teste da próxima etapa. Dentre os níveis empregados, destacou-se a mamona (fonte 2), na relação nutricional C:N 100/20 (concentração 20) e

75% da CRA. Porém, uma análise mais criteriosa, empregando os controles, está descrita a seguir para determinação das melhores condições empregadas.

Assim, uma questão que deve ser considerada quando se realiza o bioestímulo, em testes com monitoramento de gás carbônico como índice de biodegradação, é a origem do CO_2 gerado. Geralmente, a população microbiana utiliza como fonte de energia os compostos mais simples e facilmente degradáveis. Isso implica na possibilidade da biodegradação preferencial de outras fontes, que não o contaminante, ou apenas da fonte de nitrogênio adicionada, em detrimento do petróleo. O resultado disso é uma alta taxa de evolução de CO_2 nas amostras sem, contudo, promover a biodegradação do petróleo.

Para se realizar um estudo sobre a origem do CO_2 produzido e, consequentemente, avaliar a ocorrência da degradação do petróleo, alguns parâmetros foram considerados, como: a evolução de CO_2 devido à respiração microbiana e ao consumo da fonte de nitrogênio. Dessa maneira, foram descontados do gás carbônico gerado nas condições bioestimuladas 1-4 (uréia) e 13-16 (mamona): i) os controles contendo SV – condições 5, 6 (controles do teste uréia), 17 e 18 (controles do teste mamona) –; e ii) as amostras contendo SV com as respectivas fontes de nitrogênio (condições 9, 10, 11e 12) – para as amostras com uréia – e condições 21, 22, 23 e 24 – para as amostras com mamona.

Essa avaliação foi feita para investigarmos a real contribuição do nutriente na biorremediação do petróleo, uma vez que o mesmo (especificamente a mamona, por conta da inserção de uma quantidade mais significativa, devido a menor porcentagem de nitrogênio em sua composição) pode ter sido, preferencialmente, degradado frente ao contaminante, o que não era a intenção. Dessa maneira, foi possível descontar a parcela

de gás carbônico produzido, que não era proveniente da biodegradação do óleo e, assim, ter uma indicação dos ensaios com a maior remoção de carbono proveniente, principalmente, do petróleo.

Muitos estudos de biodegradação dos contaminantes orgânicos têm utilizado a evolução de gás carbônico como uma medição da atividade microbiana ou da mineralização. O gás produzido, contudo, pode não ser derivado somente dos compostos sob avaliação. A degradação da matéria orgânica do solo pode também contribuir na remoção do carbono (ALEXANDER, 1999). Portanto, tratamentos de controle convenientes devem ser incluídos para identificar cada fonte do CO_2 produzido (KIM *et al*., 2005). Dessa forma, o emprego de controles é referenciado na literatura como forma de minimizar os resultados provenientes de outras fontes de carbono, presentes no sistema, e assim, privilegiar o composto de interesse, no nosso caso, o petróleo.

Os gráficos das Figuras 24 (testes com uréia) e 25 (testes com torta de mamona) apresentam a produção de gás carbônico, já descontado os controles mencionados.

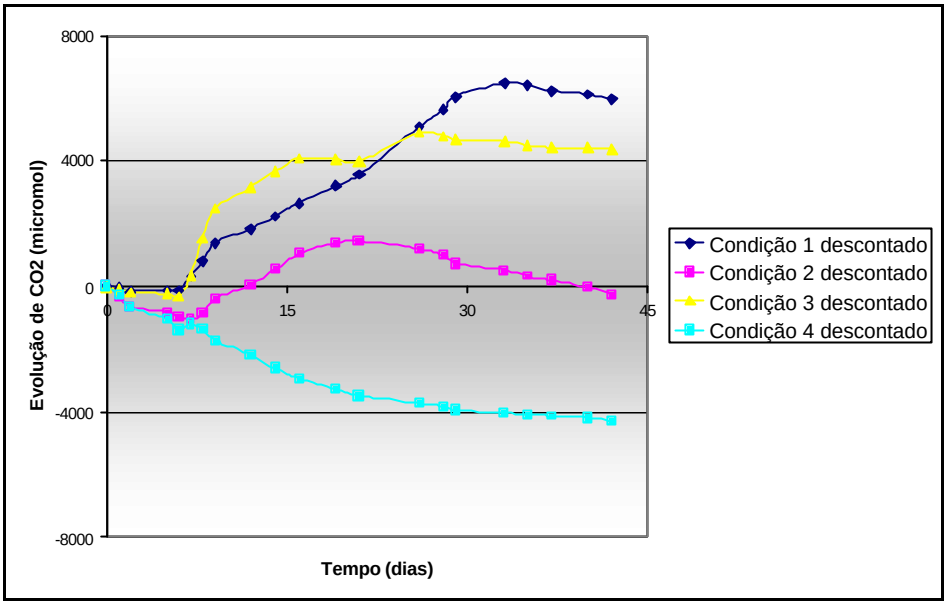

Figura 24. Testes utilizando uréia: Condições 1-4 descontadas

(Condição 1 descontada: (1-9)-5; Condição 2 descontada: (2-10)-6; Condição 3 descontada: (3-11)-5; Condição 4 descontada: (4-12)-6)

(Condição 1: SCU 100/10 50%CRA; Condição 2: SCU 100/10 75%CRA; Condição 3: SCU 100/20 50%CRA; Condição 4: SCU 100/ 20 75%CRA; Condição 5: SV 50%CRA; Condição 6: SV 75%CRA; Condição 9: SVU 100/10 50%CRA; Condição 10: SVU 100/10 75%CRA; Condição 11: SCU 100/20 50%CRA; Condição 12: SVU 100/20 75%CRA)

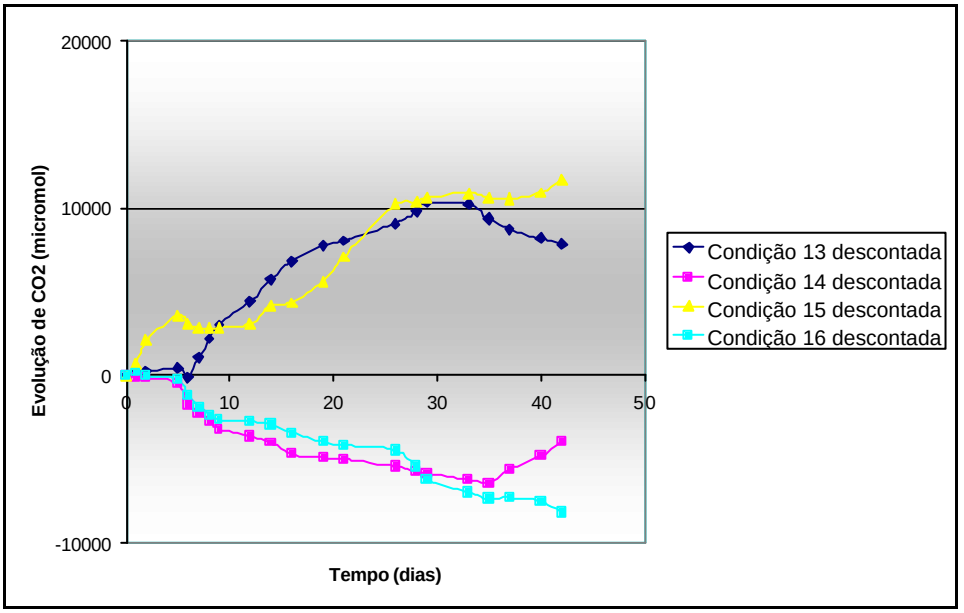

Figura 25. Testes utilizando torta de mamona: Condições 13-16 descontadas

(Condição 13 descontada: (13-21)-17; Condição 14 descontada: (14-22)-18; Condição 15 descontada: (15-23)-17; Condição 16 descontada: (16-24)-18)

(Condição 13: SCMA 100/10 50%CRA; Condição 14: SCMA 100/10 75%CRA; Condição 15: SCMA 100/20 50%CRA; Condição 16: SCMA 100/20 75%CRA; Condição 17: SV 50%CRA; Condição 18: SV 75%CRA; Condição 21: SVMA 100/10 50%CRA; Condição 22: SVMA 100/10 75%CRA; Condição 23: SCMA 100/20 50%CRA; Condição 24: SVMA 100/20 75%CRA)

Analisando as Figuras 24 e 25, é possível notar a evolução de CO_2 negativa proveniente de algumas amostras – condição 4, contendo uréia 100:20 e 75% da CRA, e condições 14 e 16, ambas com 75% da CRA e mamona nas relações 100/10 e 100/20. Isso é explicado pela evolução de CO_2 inexpressiva proveniente do petróleo somado ao erro inerente a técnica.

Como condições promissoras na biodegradação do solo contaminado, pelo método da análise de gás carbônico gerado, destacam-se as condições 1 e 15, ambas com 50% de CRA, contendo, respectivamente, uréia 100/10 e mamona 100/20. A Figura 26 exibe as condições 1 e 15, que se mostraram mais favoráveis diante de uma análise mais criteriosa.

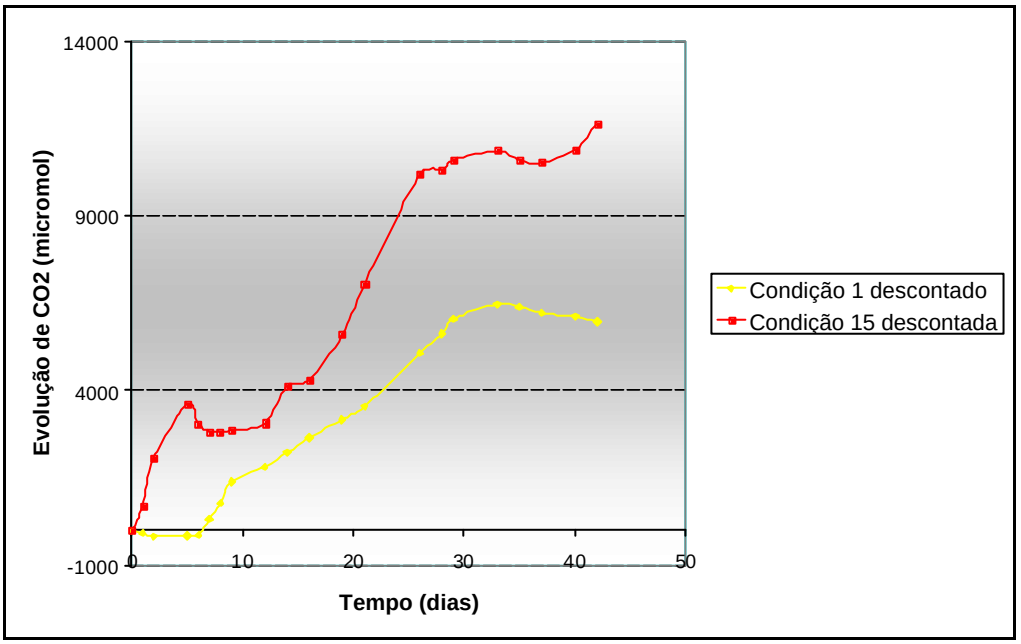

Figura 26. Condições promissoras para a biodegradação de petróleo nos testes em microcosmos: 1 (uréia 100/10 com 50% de CRA) e 15 (mamona 100/20 com 50% de CRA) descontadas[E].

[E] Condição 1 descontada: (1-9)-5; Condição 15 descontada: (15-23)-17.

A Figura 26 aponta que a condição 15 favoreceu a maior remoção de carbono, durante todo o teste, quando comparada à condição 1. Portanto, a adição de mamona na relação carbono-nitrogênio 100/20 e 50% da CRA se mostrou satisfatória nos ensaios de biodegradação do óleo cru, durante o teste em microcosmos.

Essa informação comprova que o planejamento estatístico é uma ferramenta válida para avaliação das condições mais promissoras dos testes de biorremediação, mesmo sem considerar os frascos controles. Isso pode ser comprovado, uma vez que a fonte e a relação eleitas como mais promissoras foram as mesmas da análise com subtração dos controles. Porém, é válido ressaltar a importância de se utilizar frascos controles para experimentos bióticos já que as variáveis influentes são diversas. No nosso caso, o emprego das condições controles permitiu o abatimento da parcela de gás carbônico produzido, que não era proveniente da biodegradação do óleo. Assim, os resultados, com a subtração das condições controles, forneceram uma indicação dos ensaios com as maiores taxas de remoção de gás carbônico proveniente, principalmente, do petróleo.

Porém, é importante salientar que, segundo OLIVEIRA e LEMOS (2005), o monitoramento dos experimentos por meio da evolução de CO_2 é uma ferramenta válida, mas com limitações. Sabe-se que, nesse tipo de determinação é dosado apenas o gás carbônico, como produto final do processo de mineralização do petróleo. Dessa forma, a evolução do CO_2 não se constitui, necessariamente, no quadro real da degradação, pois, existem condições biológicas que não conduzem o contaminante até a mineralização completa. Por conta disso, os autores sugerem a determinação de HTP – hidrocarbonetos totais do petróleo – como a técnica analítica mais adequada no acompanhamento dos processos de biorremediação, pois reflete uma situação mais real

da degradação do contaminante presente nas amostras.

TRINDADE *et al.* (2005) assumem que – como conseqüência do metabolismo aeróbico dos microorganismos heterotróficos presentes no solo – se 2 mols de carbono orgânico são consumidos (a partir do óleo intemperizado ou, mesmo, da matéria orgânica natural do solo), 1 mol de carbono é empregado na geração de CO_2, e o outro mol de carbono é incorporado na biomassa. Então, a quantificação por cromatografia gasosa representa somente 50% da biodegradação da matéria orgânica total, confirmando a limitação da técnica.

Dessa forma, ao final do processo biológico, as condições 1 e 15, empregando uréia e mamona, consideradas como mais promissoras para os testes de biodegradação, foram as escolhidas para realização da análise dos hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP). Para fins de comparação, também foi executada a análise de HTP dos respectivos controles sem fonte de nitrogênio (ANM).

Para esse fim, foi avaliado o incremento da remoção de hidrocarbonetos, ao final do processo, nas condições 1 e 15 (Tabela 10), contendo uréia e mamona, respectivamente, em relação às condições 7 e 19 (sem fontes de nitrogênio), empregadas como controles, representando o processo de atenuação natural monitorada (ANM).

Tabela 10. Incremento na remoção de HTP, no final do processo, para as condições 1 e 15, em relação aos seus respectivos controles, sem fonte de nitrogênio.

Condição	Condição-Controle (ANM)	Incremento na remoção de HTP (%)
1	7	62,34
15	19	54,40

Dessa forma, a condição 1, empregando uréia na relação C:N 100/10 e 50% da CRA, mostrou um incremento, aproximadamente, 15% maior na remoção de hidrocarbonetos totais do petróleo em comparação à condição 15, com mamona na relação C:N 100/20 e 50% da CRA. Isso reforça a limitação da técnica de determinação de gás carbônico, por cromatografia gasosa, como produto final do processo de mineralização do petróleo. Assim sendo, a determinação de HTP reflete uma situação mais real da degradação do contaminante presente nas amostras, como mencionado anteriormente.

Por conseguinte, a condição empregando uréia, como fonte de nitrogênio, na relação C:N 100/10 e 50% da CRA, foi selecionada para a próxima etapa.

4.3.3 TERCEIRA ETAPA: ENSAIOS EM BIORREATORES ESTÁTICOS

Os ensaios de biodegradação para solo contaminado com 5% m/m de petróleo (SC5%), em biorreatores estáticos, buscaram avaliar a contribuição das seguintes condições de teste: o biaumento fúngico, realizado em dois momentos distintos; o bioestímulo, empregando a fonte de nitrogênio e a relação nutricional determinada na etapa em microcosmos; e a associação bioaumento-bioestímulo.

Além disso, foram testadas amostras contendo solo contaminado com 1% m/m de petróleo (SC1%). Para esses ensaios, foi empregada a uréia, a fonte de nitrogênio determinada como a mais promissora para o teste de biodegradação do solo com 5% m/m de óleo cru, realizado na segunda etapa do trabalho. Porém, foi utilizada uma relação C:N intermediária (100:15) às relações testadas, visto que a relação natural do solo contaminado com 1% m/m de petróleo já apresentava uma relação C:N natural

igual a 100:12,55, como já mencionado no item 4.1. Sabe-se que uma amostra, com menor concentração de contaminante, pode apresentar comportamento distinto daquele observado numa condição com nível maior de contaminação. Deste modo, foram testadas três condições (8, 9 e 10) empregando solo contaminado com 1% m/m de petróleo, utilizando as mesmas fonte e CRA empregadas para o solo com 5% de contaminação. O objetivo era avaliar qual das concentrações de contaminante presente no solo, 1% ou 5% m/m, produziria uma maior remoção efetiva de hidrocarbonetos totais de petróleo, frente ao uso de técnicas auxiliares de bioaumento fúngico e bioestímulo.

O bioaumento predominantemente fúngico foi incorporado em dois momentos distintos. Para as condições 2, 4 e 8, adição do inóculo foi realizada na primeira semana– I (1ª SEM) –, enquanto que, para as condições 3, 5, 6 e 9, a mesma ocorreu na quinta semana – I (5ª SEM) –, momento identificado como promissor na primeira etapa, devido ao aumento da população fúngica e decréscimo dos heterotróficos totais. Vale ressaltar que, a adição do inóculo foi realizada na primeira semana e não no início do tratamento para as condições supracitadas. Isso foi feito para proporcionar um período de adaptação da microbiota nativa ao contaminante e, assim, realizar, concomitantemente, o bioaumento numa população microbiana mais tolerante e resistente ao petróleo – principalmente, no que tange aos fungos.

Dentre as fontes de nitrogênio estudadas na etapa anterior, a uréia, na relação C:N 100/10 (U100/10), foi selecionada como nutriente para três condições (1, 2 e 3); e na relação C:N 100:15 (U100/15), para as condições 8 e 9. Vale lembrar que a escolha da uréia se deve ao fato da maior remoção de carbono no teste em microcosmos. Apesar disso, foi testada a condição 6, empregando torta de mamona, na proporção C:N 100/20

(MB100/20), como fonte de nitrogênio, para avaliar a contribuição desse nutriente, em testes de biodegradação numa escala maior (biorreatores estáticos), associado ao bioaumento predominantemente fúngico, por um tempo maior ao utilizado em microcosmos.

As CRA's empregadas também foram determinadas na etapa anterior, pela quantificação do gás carbônico produzido no estágio em microcosmos. As amostras de solo contendo os dois níveis de contaminação (1 e 5% m/m de óleo cru), acrescidas de uréia, como nutriente, foram umedecidas com 50% da CRA. Cabe lembrar que os diferentes níveis das CRA's, no planejamento estatístico realizado na segunda etapa, não influenciaram tanto como a concentração do nutriente na remoção do carbono. Portanto, na amostra, contendo torta de mamona, foi empregada a CRA equivalente a 75%. Isso foi feito para avaliar o comportamento do processo de biodegradação, em escala de bandeja, para um solo contaminado contendo maior atividade de água. A escolha da adição de maior umidade para a amostra com mamona, se deve a possibilidade da respectiva fonte de nitrogênio absorver parte da água presente no sistema contaminado, já que a capacidade de retenção de água da mesma (67,5%) não foi considerada.

O inóculo predominante fúngico foi quantificado, pela técnica de plaqueamento em superfície, utilizando meio específico para fungos (agar saboraud) com cloranfenicol. A população fúngica, adicionada ao sistema contaminado, foi equivalente a 1,33 x 10^6 UFC/g solo, na primeira semana, e 1,40 x 10^6 UFC/g solo, na quinta semana.

O tamanho do inóculo adicionado nas amostras está inferior ao descrito na literatura. TRINDADE (2002) avaliou o melhor tamanho de inóculo para a

biodegradação do óleo cru no solo já contaminado. Para isso, ele utilizou um inóculo de 10^6 UFC/g solo e outro de 10^8 UFC/g solo, a fim de se verificar a influência de um inóculo, com duas ordens de grandeza superior à quantidade de microorganismos já presentes no solo (10^6 UFC/g solo).A condição mais favorável à degradação foi aquela com o inóculo de microorganismos degradadores de 10^8 UFC/g solo. Em outro trabalho, TRINDADE *et al.* (2005) adicionaram as amostras de solo, um inóculo equivalente a 10^8 UFC/g solo. O consórcio microbiano era constituído por duas linhagens de microorganismos degradadores de óleo cru, previamente isolados a partir de um solo contaminado com óleo.

ATAGANA *et al.* (2005) avaliaram a eficiência de fungos indígenas do solo na remoção de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) a partir de um solo contaminado com creosoto. Foram empregados cinco gêneros diferentes de fungos, em 18 tratamentos com duplicata, por 70 dias. A utilização das populações fúngicas consorciadas foi mais efetiva (94,1% nos tratamentos com correção de nutrientes) na remoção do creosoto, do que o uso dos gêneros individuais, com um máximo de 88% na remoção dos poluentes. Segundo os autores, a redução de creosoto obtida foi maior do que a observada em experimentos anteriores, usando um consórcio de microorganismos, principalmente bactérias, no mesmo solo contaminado. Isso comprova a eficiência da adição do inóculo fúngico, no processo de biorremediação, principalmente, quando os compostos-alvo são frações recalcitrantes, como é o caso dos hidrocarbonetos poliaromáticos.

O ensaio de biodegradação foi monitorado pela quantificação dos microorganismos degradadores (heterotróficos totais e fungos), por meio da técnica de número mais provável (NMP), utilizando placas de polietileno. A Figura 27 mostra duas

placas de polietileno, utilizadas para análise de microorganismos degradadores referente à condição 6 (solo contaminado com 5% m/m de petróleo contendo mamona na relação 100:20, 75% da CRA e bioaumento predominantemente fúngico adicionado na quinta semana – SC5% MB100/20 75% da CRA + I (5ª SEM)), para as semanas 4 e 8, respectivamente.

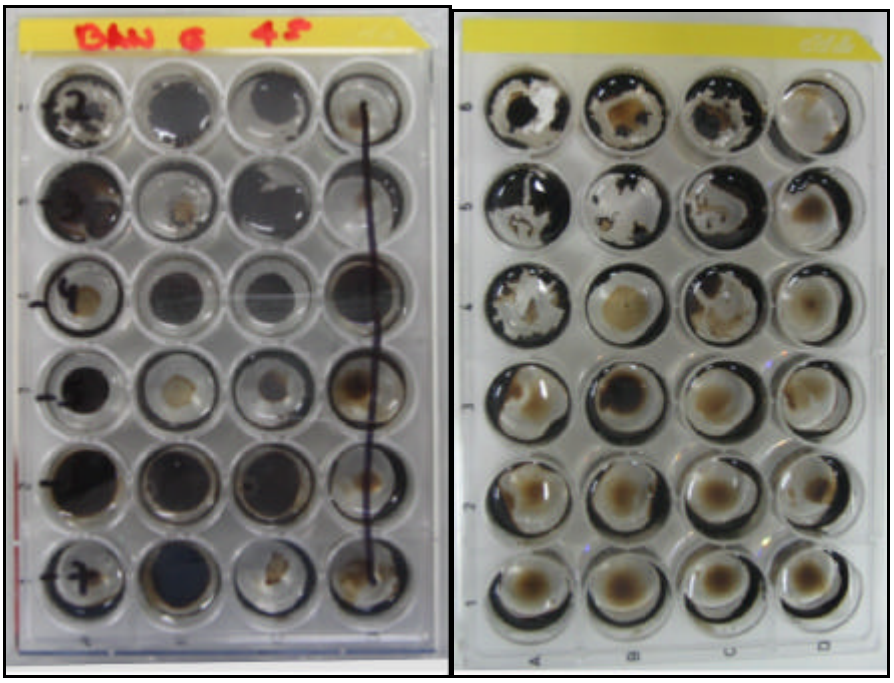

Figura 27. Visualização de microorganismos degradadores para a condição 6, nas semanas 4 e 8, respectivamente.

O teste foi considerado positivo ao detectar a degradação visual da película de óleo ou pela presença de turvação do meio, evidenciando o crescimento da microbiota. Para fins de comparação, foi utilizado um controle sem inóculo. A partir disso, foi calculado o NMP de microorganismos degradadores por grama de solo

A Figura 28 mostra o NMP de microorganismos degradadores presentes nas bandejas 1-10 durante as 8 semanas de teste. A quantificação foi feita tanto para os microorganismos degradadores totais, quanto para fungos degradadores. A análise de

fungos degradadores foi realizada por meio do emprego do antibiótico cloranfenicol (CLOR).

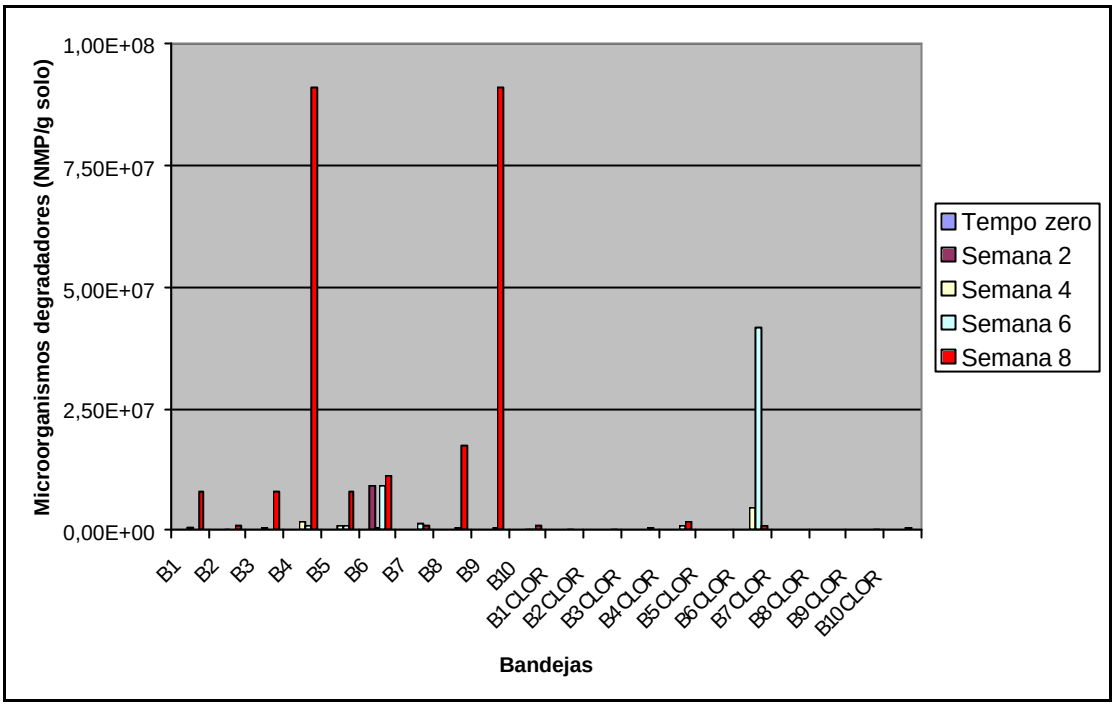

Figura 28. Microorganismos degradadores presentes nos biorreatores estáticos
(Condição 1: SC5% U100/10 50%CRA; Condição 2: SC5% U100/10 50%CRA + I (1ª SEM); Condição 3: SC5% U100/10 50%CRA + I (5ª SEM); Condição 4: SC5% 50%CRA + I (1ª SEM); Condição 5: SC5% 50%CRA + I (5ª SEM); Condição 6: SC5% MB100/20 75%CRA+ I (5ª SEM); Condição 7: SC5% 50%CRA; Condição 8: SC1% U100/10 50%CRA + I (5ª SEM) 75%CRA; Condição 7: SC5% 50%CRA; Condição 8: SC1% U100/15 50%CRA + I (1ª SEM); Condição 9: SC1% U100/15 50%CRA + I (5ª SEM); Condição 10: SC1% 50%CRA)

A partir da Figura 28, é possível observar a predominância dos microorganismos degradadores totais em relação aos fungos degradadores, principalmente, na oitava semana, mesmo para as condições 3, 5, 6 e 9, que tiveram a adição de inóculo fúngico na quinta semana. Isso demonstra que, mesmo com o bioaumento realizado, a população bacteriana prevaleceu frente aos fungos filamentosos.

A fim de avaliar a remoção de hidrocarbonetos do petróleo das amostras dispostas em biorreatores estáticos, foi realizada a análise de HTP *Finger Print* no início

e no final do processo biológico. Essa análise possibilitou identificar, pela distribuição dos compostos encontrados, se o HTP teria origem de fato em combustíveis fósseis (incluindo a predominância de gasolina, diesel ou óleos mais pesados), enquanto a análise de TPH total, realizada na segunda etapa, permitiu a interferência de outros compostos orgânicos gerados no processo biológico.

Dessa forma, a Figura 29 mostra a remoção de hidrocarbonetos derivados do petróleo, calculadas através da diferença do HTP obtidos no início e no final do teste, para as Bandejas 1-10.

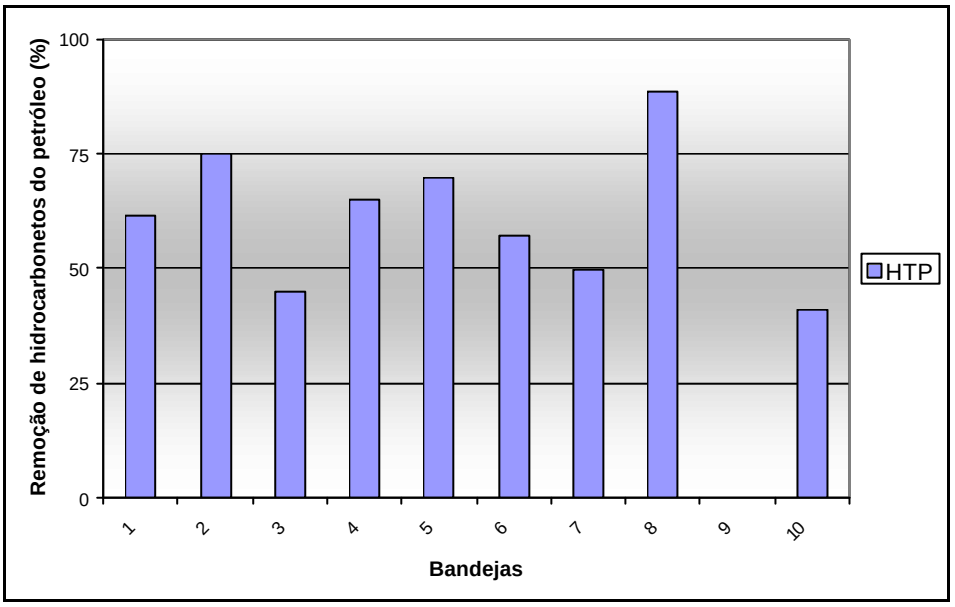

Figura 29. Remoção de hidrocarbonetos derivados do petróleo para as Bandejas 1-10.

Observando a Figura 29, é possível verificar que as condições 7 e 10, que representam os processos de atenuação natural monitorada (ANM) para os respectivos solos contaminados com 5 e 1% m/m de petróleo, apresentaram remoção de HTP equivalente a 49,56% e 40,96%, respectivamente. Dessa forma, condições como a 3 (SC 5% U100/10, 50% CRA + I 5ªSEM) e 9 (SC 1% U100/15, 50% CRA + I 5ªSEM), que

apresentaram valores de remoção de HTP inferiores aos obtidos pelos processos de ANM (controles), foram consideradas desfavoráveis para o processo biológico. Entretanto, as demais condições testadas (1, 2, 4, 5, 6 e 8) se sobressaíram em eficiência comparadas aos controles de ANM.

Então, a partir dos resultados apresentados na Figura 29, destacam-se as condições 2 (uréia 100:10, 50% da CRA e bioaumento na 1ª semana) e 5 (50% da CRA e bioaumento na 5ª semana), para tratamento de amostras de solo contaminado com 5% m/m de óleo cru; e a condição 8 (uréia 100:15, 50% da CRA e bioaumento na 1ª semana) para emprego em testes de degradação em solo contaminado com 1% m/m de contaminante. As condições 2, 5 e 8 apresentaram índices de remoção de HTP equivalentes a 74,86%, 69,67% e 88,59%.

Sendo assim, a condição 8 se destacou como a mais eficiente quanto à remoção do contaminante. Esse resultado comprovou que um sistema, com menor concentração de óleo cru, permitiu uma maior remoção do contaminante, visto que, no nosso caso, o sistema com 1% m/m de petróleo (condição 8) apresentou um índice de remoção de HTP maior do que a amostras contendo 5% m/m (condições 1-7).

Ainda na Figura 29, pode-se observar que a eficiência de remoção de TPH das condições 4 e 5 (65, 02% e 69,67%, respectivamente) com bioaumento nas primeira e quinta semanas, foi mais favorável do que a aplicação do bioestímulo na condição 1 (U 100:10), utilizada como única forma de tratamento, com remoção em torno de 61% de TPH. Além disso, o emprego do bioaumento na quinta semana (condição 5) foi ligeiramente mais promissor para a biodegradação de HTP, do que a adição do inóculo no início do tratamento (condição 4), para amostras sem correção de nitrogênio.

Vale salientar que, as condições 2 e 8, uma combinação de bioaumento e

bioestímulo, apresentaram um abatimento do contaminante superior a qualquer outra condição utilizada. No entanto, a condição 2 (74,86% de remoção de TPH) foi apenas ligeiramente superior à condição 5 (69,67% de remoção de TPH), tratada unicamente com bioaumento na quinta semana.

Assim sendo, dentre as condições testadas nos ensaios de biodegradação, destacam-se o emprego da uréia na relação C:N 100:15, com 50% da CRA e adição do bioaumento, na primeira semana do tratamento, para amostras contaminadas, tanto com 1% m/m (condição 8), quanto com 5% m/m de contaminante (condição 2), diferenciando-se, apenas, na relação C:N utilizada (100:10) para a condição 2.

Com base na análise anterior, pode-se inferir o seguinte: a associação bioestímulo-bioaumento se mostrou mais favorável na biodegradação do petróleo do que as técnicas empregadas individualmente; o biaumento realizado no início do processo apresentou resultados mais satisfatórios do que a adição posterior, especialmente, quando associado ao bioestímulo.

Quanto a condição 6, adicionada de mamona na relação 100:20, com 75% da CRA e bioaumento na 5ª semana, pode-se dizer que foi capaz de sustentar a biodegradação de petróleo, apresentando uma remoção cerca de 57,11%.

De qualquer forma, deve ser destacado, no presente trabalho, o emprego da uréia como fonte de nitrogênio, em processos de degradação utilizando biorreatores estáticos. Como já foi comentado, a condição 6, que teve a adição da torta de mamona, apresentou resultados de remoção do poluente inferiores as condições 1 e 2 que utilizaram uréia no processo de bioestímulo, para o solo com 5 % m/m de petróleo. Isso confirma o que já havia sido detectado na segunda etapa dos testes: apesar das amostras, contendo mamona, terem apresentado resultados animadores nos ensaios em microcosmos, o

monitoramento realizado por meio da evolução de gás carbônico exibiu limitações significativas. Portanto, a determinação de HTP, mais uma vez, se apresentou como ferramenta mais adequada no acompanhamento dos processos de biorremediação.

Segundo BENTO *et al.* (2005), a melhor performance do bioaumento pode ser atingida pelo emprego dos microorganismos, que já estão presentes no solo, e pelo aumento da densidade da população microbiana. A partir desse pressuposto, o aumento da comunidade microbiana específica, em conjunto com a adição de nutrientes, promove uma redução substancial no tempo de tratamento. No artigo em questão, foi obtida uma maior degradação de HTP das frações leves (75,2%) e pesadas (72,7%), para um solo contaminado com óleo diesel, proveniente de Long Beach, quando utilizada a técnica do bioaumento, em comparação às técnicas de atenuação natural e bioestímulo, também empregadas. Isso comprova a eficiência da prática do bioaumento, relatada na literatura, e confirma que os índices de remoção de hidrocarbonetos são satisfatórios, de acordo com o artigo supracitado.

Por outro lado, DEL'ARCO e FRANÇA (1999), utilizaram um consórcio microbiano, obtido de um *landfarming* e associado aos microorganismos indígenas, para o processo de biorremediação de um sedimento arenoso, contendo óleo leve. A adição do inóculo, no começo do experimento, resultou num aumento de 31 % de eficiência na remoção da fração pesada do óleo, quando comparada à amostra sem bioaumento. Isso mostra que a introdução de uma cultura exógena também pode estimular o processo de biodegradação.

OLIVEIRA e LEMOS (2005) avaliaram as condições de biodegradação de um solo contaminado com 5% (m/m) de petróleo, por meio das técnicas convencionais de bioaumento e bioestímulo. Foi realizado um bioaumento fúngico, utilizando uma

espécie isolada (*Aspergillus versicolor*) numa concentração de 25% v/v da CRA. As fontes de nitrogênio empregadas no bioestímulo foram uréia (U) e extrato de levedura (EL), nas seguintes relações C/N: 100:10 e 100:20 para U e 100:10 e 100:25 para EL. O acompanhamento do processo de biodegradação foi realizado por cromatografia gasosa.

Por meio da dosagem de CO_2, foi observado que o inóculo fúngico trouxe um efeito positivo ao processo de degradação, principalmente, para as amostras bioestimuladas. Assim, foi realizada a análise de HTP para as condições determinadas como mais eficientes na produção de CO_2. O resultado foi mais satisfatório quando utilizadas as relações de C:N 100/10 associadas ao bioaumento fúngico, tanto para U (39,30%) como para EL (39,4%). Cabe ressaltar que o emprego de ambas as fontes orgânicas de nitrogênio, em conjunto com a prática do bioaumento, provocaram um aumento em torno de 57% na remoção de HTP, em relação à amostra controle. Nesse trabalho, assim como no nosso estudo, foi comprovada a eficácia do emprego do bioestímulo, sob a forma de uréia, especialmente, em associação à técnica de bioaumento fúngico.

HAMDI *et al.* (2007) empregaram os seguintes tratamentos para a remoção de HPA (hidrocarbonetos poliaromáticos) a partir de solos contaminados com frações pesadas: i) bioaumento pela adição de solo contaminado com HPA recalcitrante (SCR), contendo degradadores indígenas ativados; associação de bioaumento/bioestímulo por incorporação de lodo de esgoto (LE) e palha de arroz degradada (PAD). Os tratamentos produziram maior remoção do poluente do que o solo contaminado não corrigido, especialmente, na presença de PAD ou SCR (>96%), o que demonstra a eficácia das técnicas de bioaumento e bioestímulo, em conjunto ou separadas.

TRINDADE *et al.* (2005) realizaram uma comparação na eficiência de

biodegradação de dois solos, um recentemente contaminado, e outro intemperizado, após a aplicação das técnicas de bioaumento e bioestímulo. Ambos os solos, provenientes do Brasil, estavam contaminados com 5,4% de hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP). A maior eficiência de biodegradação (7,4%) e a maior porcentagem de remoção de HTP (14,3%) foi atingida para o solo contaminado intemperizado (contaminado há quatro anos) após 41 dias de tratamento. Esse fato pode ser explicado pela presença de um consórcio microbiano nativo, melhor adaptado, no solo intemperizado, capaz de promover resultados de descontaminação mais significativos do que no sistema contaminado recentemente.

Isso mostra que, no presente trabalho, o resultado de remoção – acima de 70% de redução de HTP para as melhores condições – foram muito satisfatórios, ainda mais, se levarmos em consideração, que o solo em estudo tinha sido recentemente contaminado. Segundo o artigo, de TRINDADE *et. al.* (2005), ambos os solos (contaminado recentemente e o intemperizado), submetidos ao tratamento, apresentaram eficiência de degradação aproximadamente duas vezes maior do que os processos de atenuação natural. No nosso caso, o mesmo foi observado para as condições empregando solo contaminado com 1% m/m de petróleo. A condição 8 – com uréia na relação 100:15 e bioaumento realizado na primeira semana – apresentou o dobro da remoção (88,5%) do que o processo de atenuação natural monitorada (41%).

4.3.4 QUARTA ETAPA: ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE AGUDA

Na última etapa, foi realizada a avaliação da qualidade do solo contaminado por meio de ensaios de toxicidade aguda com minhocas. O objetivo era avaliar o impacto

toxicológico, sobre os organismos terrestres, das diferentes concentrações do poluente presentes no solo – lote 4 (1% m/m de petróleo) e lotes 2, 3 e 5 (5% m/m de petróleo), além do comportamento das fontes de nitrogênio – lotes 3 (uréia 100:10) e 5 (mamona100:20) – empregadas no tratamento biológico do sistema contaminado. O lote 1 (solo virgem) e o lote 6 (solo artificial) foram empregados como controles.

O primeiro parâmetro avaliado foi o índice de letalidade, conforme mostra a Figura 30.

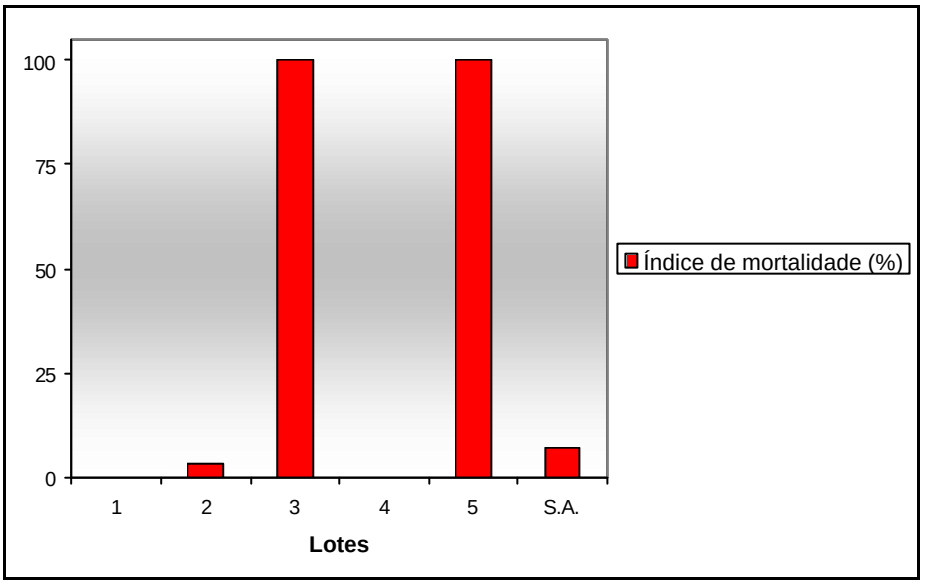

Figura 30. Índice de letalidade das minhocas adicionadas aos lotes para avaliação ecotoxicológica.

No ensaio de toxicidade aguda, o solo artificial (S.A.), nossa amostra-controle, apresentou um índice de letalidade equivalente a 7%. Sendo assim, segundo RAMOS *et al*. (2007) o teste pode ser aceito, já que mortalidade no controle foi inferior a 10%.

Dessa forma, destacam-se os lotes 3 e 5, correspondentes ao solo contaminado acrescentados, respectivamente, de uréia, na relação C:N 100/10, e torta de mamona, na

relação 100:20, por apresentarem alta letalidade (100%) quando comparados ao lote 1, contendo solo virgem (0% de morte). Vale ressaltar após 24h do início do teste, as minhocas presentes no lote 5 (torta de mamona) apresentaram comportamento de fuga, indicando a função de habitat limitada para a amostra em questão.

Segundo GOULART *et al.* (2004), os anelídeos liberam substâncias nitrogenadas pelos poros e nas excretas. Por conta disso, os autores realizam um experimento com o objetivo de comprovar o quão tóxicas são estas substâncias, uma vez contidas no solo provenientes de adubações foliares. Foi empregada a minhoca vermelha da Califórnia *Eisenia foetida*, devido sua boa adaptação ao esterco de gado curtido como substrato alimentar e por ser a espécie mais utilizada para a prática da minhocultura. Em 8 caixas, contendo 30 L de esterco, colocou-se 200 g de minhocas por recipiente. Procedeu-se a rega de quatro caixas, a cada três dias, com uma solução de uréia na concentração de 10% (m/v). Os demais recipientes, utilizados como controle, foram regados apenas com água, obedecendo o mesmo intervalo de tempo. Obteve-se, já na primeira semana, a morte de 70 % das minhocas do primeiro grupo, enquanto no segundo, o desenvolvimento ocorreu normalmente. Concluiu-se que as minhocas não conseguiram sobreviver, em substratos que contenham esta concentração de uréia. Isso comprova a sensibilidade, diagnosticada no presente trabalho, das minhocas diante das fontes de nitrogênio.

Ao analisarmos os lotes 2 e 4, contendo, respectivamente, 5 e 1 % m/m de petróleo, observamos que o índice de letalidade não foi significativo, com porcentagens iguais a 3,3 e 0%. As amostras são consideradas tóxicas somente quando o índice de mortalidade ultrapassa 50%. Assim, pode-se concluir que as estratégias adotadas para promover a degradação do petróleo – no caso, a incorporação das fontes de nitrogênio –

foram mais agressivas à qualidade do solo do que o próprio contaminante.

A literatura descreve trabalhos sobre avaliação ecotoxicológica do solo, na presença dos contaminantes, após tratamento biológico. Alguns estudos empregam outros organismos terrestres, diferentes das minhocas, para obtenção do nível de letalidade (HAMDI *et al.*, 2007).

Em relação à análise da perda de biomassa das minhocas, consideramos como referência o solo virgem (lote 1). Os lotes avaliados foram aqueles com índice de mortalidade inferior a 50%, no caso, os lotes 2 e 4, que representam solos contaminados com 5 e 1% m/m de petróleo, respectivamente. Os resultados são apresentados na Figura 31.

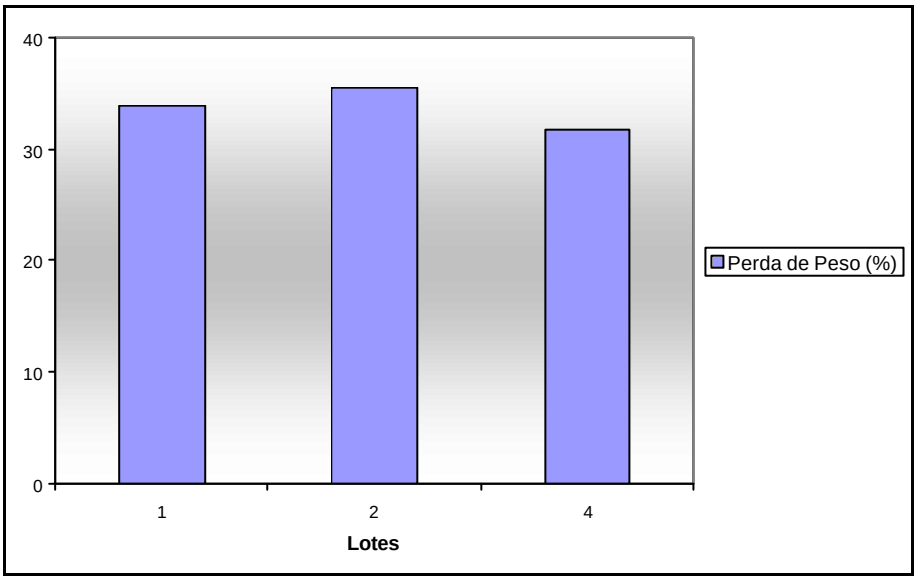

Figura 31. Perda de biomassa das minhocas nos lotes 1, 2 e 4.

De acordo com a Figura 31, as perdas de biomassa para os solos contaminados com as duas diferentes concentrações de óleo cru (lotes 2 e 4) foram semelhantes ao resultado obtido para o solo virgem (lote 1). Dessa forma, os solos contendo 5 e 1%

m/m de petróleo não foram considerados tóxicos para os testes de letalidade e perda de biomassa realizados.

SISINNO *et al*. (2006) também avaliaram o impacto do petróleo sobre a qualidade do solo e seus organismos. Amostras de áreas contaminadas por hidrocarbonetos, originadas de uma garagem de ônibus (Amostra 1), um posto de serviços e abastecimento (Amostra 2) e uma área com derramamento de óleo (Amostra 3), foram avaliadas por meio de ensaios de comportamento com minhocas da espécie *Eisenia fetida*. Foram realizados testes de comportamento, letalidade e reprodução. No ensaio de letalidade (toxicidade aguda), os 30 organismos expostos ao solo contaminado morreram, indicando alta mortalidade (100%) quando comparada ao controle (0% de morte). Segundo os autores do trabalho, os ensaios realizados com minhocas – adaptados com o uso de solos de áreas contaminadas – podem ser aplicados na complementação da avaliação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos.

Entretanto, deve-se ressaltar que variáveis relacionadas à composição do solo a ser testado precisam ser sempre bem avaliadas, se o objetivo dos ensaios for a avaliação da toxicidade com amostras naturais, sem a necessidade de mistura com o solo artificial. Esses ensaios poderão ser aplicados na avaliação de risco ecológico para verificar o grau de injúria aos organismos representantes do ecossistema afetado e sua capacidade de encontrar condições de se estabelecer novamente em uma área comprometida por contaminação química (SISINNO *et al*., 2006).

Segundo SISINNO *et al.* (2006), esses ensaios também poderão auxiliar na avaliação da capacidade de recuperação ecológica de uma área, após processo de descontaminação. Atualmente, a efetiva descontaminação de uma área é avaliada apenas por análises químicas. Entretanto, não se pode afirmar que as concentrações

remanescentes dos contaminantes ainda não sejam tóxicas para os organismos do solo ou, mesmo, que o uso de substâncias, durante o processo de remediação da área, não possa ter afetado seu equilíbrio ecológico, como parece ter sido o nosso caso.

CAPÍTULO 5: Conclusões e Sugestões

5.1 CONCLUSÕES

- PRIMEIRA ETAPA: ENSAIO PRELIMINAR

- A partir da quantificação de microorganismos presentes no solo, durante o processo de atenuação natural monitorada, detectou-se que, na quinta e sexta semanas do experimento, houve um aumento na população fúngica e um decréscimo no número de microorganismos heterotróficos totais, possivelmente, ocasionado pela competição fungos-bactérias. Dessa forma, a quinta semana foi eleita como o momento adequado para execução de um bioaumento predominantemente fúngico no solo, na terceira etapa do trabalho.

- Foram selecionadas as CRA's de 50% e 75% para a próxima fase de testes, por promoverem o aumento da microbiota fúngica, especialmente, na quinta e sexta semanas. Além disso, levou-se em conta o gasto de um menor volume de água e, consequentemente, menor geração de resíduo.

- A análise de óleos e graxas (OG) não identificou uma redução significativa na concentração inicial do poluente, no decorrer das dez semanas. As possibilidades que justificaram a ausência de degradação durante o processo de atenuação natural monitorada foram: os microorganismos utilizaram outra fonte de carbono, mais assimilável que o óleo cru, como fonte de energia – provavelmente, a própria matéria orgânica do solo –; ou o limite de detecção da técnica não permitiu apurar um nível de degradação tão baixo.

- SEGUNDA ETAPA: EXPERIMENTOS EM MICROCOSMOS

- As condições com bioestímulo, testadas na segunda etapa, empregando tanto uréia, como torta de mamona, como nutrientes adicionais, nas relações C:N 100/10 e 100/20, produziram uma maior evolução de gás carbônico do que as condições de atenuação natural (ANM).

- No testes em microcosmos, observou-se uma produção de gás carbônico quatro vezes maior, no mínimo, para as amostras corrigidas com mamona do que para aquelas contendo uréia. Dessa forma, o emprego da torta da mamona, como nutriente no processo de biorremediação, se destacou como o mais eficiente.

- A análise estatística indicou que os fatores (fonte de nitrogênio, concentração do nutriente e CRA) e a interação entre eles influenciaram estatisticamente na variável de resposta. É válido ressaltar que a influência, nos resultados de carbono removido, foi maior para o fator fonte de nitrogênio.

- As condições selecionadas como promissoras na biodegradação do solo contaminado, pelo método da análise de gás carbônico gerado com desconto dos respectivos controles, foram as amostras contendo uréia 100/10 e mamona 100/20, ambas com 50% de CRA.

- Por meio da análise de hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP), a condição empregando uréia na relação C:N 100/10 e 50% da CRA, mostrou um incremento maior na remoção de petróleo (62,34%) comparada à amostra com mamona na relação C:N 100/20 e 50% da CRA (54,40%).

- A técnica de determinação de gás carbônico, por cromatografia gasosa, se mostrou limitada, já que considera apenas o produto final do processo de mineralização do

petróleo. Assim, a determinação de HTP foi considerada a análise mais confiável, por refletir uma situação mais real da degradação do contaminante presente nas amostras.

- TERCEIRA ETAPA: ENSAIOS EM BIORREATORES ESTÁTICOS

- O ensaio de biodegradação foi monitorado pela quantificação dos microorganismos degradadores (heterotróficos totais e fungos), por meio da técnica de número mais provável (NMP). Neste ensaio, observou-se a predominância dos microorganismos degradadores totais em relação aos fungos degradadores, principalmente na oitava semana, mesmo para as condições que tiveram a adição de inóculo fúngico na quinta semana. Isso demonstrou que, mesmo com o bioaumento realizado, a população bacteriana prevaleceu frente aos fungos filamentosos.
- Foi comprovada a eficiência da adição do bioaumento, já que as condições referenciadas como mais promissoras (2, 5 e 8) apresentaram maior remoção do contaminante (74,86%, 69,67% e 88,59%, respectivamente), quando comparadas com a condição 1, que não teve adição do inóculo, com remoção de, aproximadamente, 61% de HTP.
- Um sistema com menor concentração de óleo cru permitiu uma maior remoção do contaminante, visto que, no nosso caso, o sistema com 1% m/m de petróleo (condição 8) apresentou um índice de remoção de HTP maior do que a amostras contendo 5% m/m (condições 1-7)
- A associação bioestímulo-bioaumento se mostrou mais favorável nos resultados de biodegradação do petróleo do que as técnicas empregadas individualmente.
- O bioaumento, realizado no início do processo, apresentou resultados mais

satisfatórios, do que o efetuado na quinta semana, principalmente, quando acompanhado de bioestímulo, como foi o caso das condições 2 e 8, em relação as demais.

- A condição 6, que teve a adição da torta de mamona, apresentou resultados de remoção do poluente inferiores as condições 1 e 2 que utilizaram uréia no processo de bioestímulo, para o solo com 5 % m/m de petróleo. Isso confirma a limitação do monitoramento realizado por meio da evolução de gás carbônico, discutido na segunda etapa.

- QUARTA ETAPA: ECOTOXICIDADE

- Os lotes 3 e 5, correspondentes ao solo contaminado acrescentados, respectivamente, de uréia, na relação C:N 100/10, e torta de mamona, na relação 100:20, apresentaram alta letalidade (100%) quando comparados ao lote 1, contendo solo virgem (0% de morte).

- Nos lotes 2 e 4, contendo, respectivamente, 5 e 1 % m/m de petróleo, o índice de letalidade não foi significativo, com porcentagens iguais a 3,3 e 0%.

- As estratégias adotadas para promover a degradação do petróleo – no caso, a incorporação das fontes de nitrogênio – foram consideradas mais agressivas à qualidade do solo do que o próprio contaminante.

5.1 SUGESTÕES

- Repetir os tratamentos de biodegradação, empregando os biorreatores estáticos, por um período mais longo (10 semanas, pelo menos), com o intuito de verificar uma maior remoção do contaminante.
- Avaliar a toxicidade das fontes de nitrogênio, utilizando outros organismos diferentes das minhocas.
- Testar a adição do bioaumento em momentos diferentes dos que foram avaliados no presente trabalho. As primeiras seis semanas se mostraram mais promissoras para a inclusão do inóculo.
- Avaliar a contribuição de rejeitos ricos em nitrogênio, provenientes de uma indústria alimentícia, como nutrientes em testes de biorremediação, empregando a técnica de bioestímulo.
- Repetir as melhores condições definidas pelos testes de biodegradação, em reator tipo bandejas. O uso do equipamento deveria permitir, principalmente, o controle de algumas variáveis, tais como: controle da temperatura, correção de umidade, bem como a injeção de ar.
- Produzir um inóculo mais eficiente, por meio do cultivo da microbiota, extraída do solo, em meio contendo petróleo ou derivados, a fim de privilegiar o crescimento das espécies degradadoras, tanto bacterianas, quanto fúngicas.
- Realizar uma avaliação ecotoxicológica das amostras de solo, após tratamento biológico, para avaliar a toxicidade do material, empregando minhocas ou outros organismos terrestres.

CAPÍTULO 6: Referências Bibliográficas

ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA. J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAIS, R. F.; ÁLVARES, V. H; SCHAEFER, C. E. G. R. (2000) **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: SBCS (1): 299-352

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

ALEXANDER, M. (1999) **Biodegradation and Bioremediation**. 2 ed. New York: Academic Press. 453 p.

ANTUNES, J. G. (1997) **Bioconversão de D-xilose a etanol por *Pichia stipitis***. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

ARAÚJO, F. S. M. e LEMOS, J. L. S. (2002) **Isolamento e identificação de fungos degradadores de petróleo**. In: X Jornada de Iniciação Científica, Centro de Tecnologia Mineral – CETEM/MCT.

ASTM - American Society for Testing and Materials (2004). Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm Eisenia fetida and the Enchytraeid Potworm Enchytraeus albidus. Standard Guide E-1676-04.

ATAGANA, H. I.; HAYNES, R. J. & WALLIS, F. M. (2006) Fungal Bioremediation of creosote contaminated soil: a laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi**. Water, Air, and Soil Pollution**, 172: 201-219.

ATLAS, R. M. (1981) Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective. **Microbiological Reviews,** 45 (1):180 – 209.

ATLAS, R. M. (1991) Microbial Hydrocarbon Degradation: bioremediation of spills. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 52: 149 – 156.

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

BAIRD, C. (2002) **Química Ambiental**. 2 ed. Porto Alegre: Bookman. 622 p.

BALBA, M. T., AL-AWADHI, N., AL-DAHER, R. (1998) Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **Journal of Microbiological Methods**, 32: 155–164.

BARROS, C. A. (2007) **Um Estudo sobre Biorremediação: uma ciência levada à sala de aula**. Monografia apresentada no final do curso de Licenciatura em Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 60 p.

BARROS, C. A.; RASCHLE, L. H.; OLIVEIRA, S. D. e LEMOS, J. L. S. (2007) **Estudo da degradação de petróleo em solo areno-argiloso com bioaumento fúngico utilizando casca de coco como material estruturante.** In: VII Meeting of the Southern Hemisphere on Mineral Techonogy & XXII Encontro Nacional de Tratamento de Minérios e Metalurgia Extrativa. V. 2 – Ouro Preto/Minas Gerais.

BELTRÃO, N. E. M. (2004) **Zoneamento e Época de Plantio da Mamoneira para o nordeste brasileiro**. Paraíba: Embrapa Algodão.

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

BERNARD, A. M. (1997) Effects of heavy metals in the envioronment on human health. In: **Contaminated soils.** Les Colloques, 85:.21-33.

BONAVENTURA, C.; JOHNSON, F. M. (1997) Healthy environments for healthy people: Bioremediation today and tomorrow. **Environmental Health Perspectives**, 105: 5 – 20.

BORRESEN, M. H., RIKE, A.G. (2006). Effects of nutrient content, moisture content and salinity on mineralization of hexadecane in an Artic soil. **Cold Regions Science and Technology,** xx (submetido)

BOOPATHY, R. (2000) Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology,** 74: 63 – 67.

BRAGA, B.; HESPANHOL, I.; CONEJO, J. G. L.; BARROS, M. T. L; SPENCER, M.; PORTO, M.; NUCCI, N.; JULIANO, N.; EIGER, S. (2002) Introdução à Engenharia Ambiental. São Paulo: Prentice Hall. 305 p.

BRASIL. Lei Federal n. 6.939 de 31 de agosto de 1981. **Define a política nacional do meio ambiente**.

BRASIL. MINISTÉRIO DO INTERIOR. (1983) Diretrizes nacionais de limpeza urbana: 1ª fase –Formulação do Programa. Rio de Janeiro: Sema/CNDU/Abes *apud* DIAS, A. E. X. O. (2000) Biorremediação de áreas afetadas por resíduos sólidos tóxicos**.** In: SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA, R. M. (Org.) **Resíduos Sólidos, Ambiente e Saúde: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 142 p.

BRITO, N. N.; BRANDÃO, T. C. O.; CONEGLIAN, C. M. R.; SOBRINHO, G. D.; TONSO, S. e PELEGRINI, R. (2003) **Compostagem**. IV Fórum de Estudos Contábeis, Faculdades Integradas Claretianas, Rio Claro, SP.

BRITO, N. N.; ZAMORA, P. P.; NETO, A. L. O.; DE BATTISTI, A.; PATERNIANI, J. E. S. e PELEGRINI, R. T. (2004) **Utilização de fungos na remediação de efluentes industriais**. IV Fórum de Estudos Contábeis, Faculdades Integradas Claretianas, Rio Claro, SP.

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

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Secretaria do Estado do Meio Ambiente. São Paulo. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br. Pesquisado em agosto de 2007.

CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (2005) **Métodos de Avaliação da Toxicidade de Poluentes a Organismos Aquáticos**. Orientações para Manutenção, Cultivo e Realização de Testes de Toxicidade com Organismos Aquáticos. Vol. 1. São Paulo.

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.

CONAMA. Resolução n°314 de 29 de outubro de 2002. **Dispõe sobre o registro de produtos destinados à remediação e dá outras providências.**

CÔRREA, O. L. S. (2003) **Petróleo: noções sobre exploração, perfuração, produção e microbiologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 90 p.

COSTA, H.M. *et al* (2004). Effects from the castor oil on sílica-filled natural rubber compounds. **Polímeros**, v.14, p.46-50.

CUNHA, C. D.; LEITE, S. G. F. (2000) Gasoline biodegradation in different soil microcosms. **Brazilian Journal of Microbiology**, 31: 45-49.

DAVIS, J. S.; WESTLAKE, D. W. S. (1978) Crude oil utilization by fungi. Can. J. Microbiol. 25: 146-156 *apud* ATAGANA, H. I.; HAYNES, R. J. & WALLIS, F. M. (2006) Fungal Bioremediation of creosote contaminated soil: a laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi**. Water, Air, and Soil Pollution**, 172: 201-219.

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.

DEL'ARCO, J. P. (1999).**Degradação de hidrocarbonetos por bactérias e fungos em sedimento arenoso**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 171 p.

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

DE OLIVEIRA, D. et al (2005). Optimization of alkaline transesterification of soybean oil and castor oil for biodiesel production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 121: 553-560. (Artigo mamona)

DIAS, A. E. X. O. (2000) Biorremediação de áreas afetadas por resíduos sólidos tóxicos**.** In: SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA, R. M. (Org.) **Resíduos Sólidos, Ambiente e Saúde: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 142 p.

DYMINSKI, A. S. (2006) **Contaminação de solos e águas subterrâneas.** Acessado em: www.cesec.ufpr.br/docente/andrea/TC019_**Contaminacao**_de_**solos**.pdf - Pesquisado em: 19/05/2008.

DINIZ, A.; FRAGA, H. (2005) Poluição dos Solos: Riscos e Conseqüências**. Revista da Faculdade de Ciência e Tecnologia**, 2: 97 – 106. Disponível em: http://hdl.handle.net/10284/208. Pesquisado em agosto de 2007.

DORN, P. B.; SALANITRO, J. P. (2000) Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. **Chemosphere**, 40: 419 – 426.

DORN, P. B.; VIPOND, T. E.; SALANITRO, J. P.; WISNIEWSKI, H. L. (1998) Assessment of the Acute Toxicity of Crude Oils in Soils using Earthworms, Microtox and Plants. **Chemosphere** (5), 31: 845-860.

EMBRAPA ALGODÃO (2005) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: http://www.cnpa.embrapa.br. Acessado em 06 de agosto de 2007.

EMBRAPA (1997). **Manual de Métodos de Análise de Solos**. 2 ed. Rio de Janeiro. 212p.

FERRARI, M. D. (1996) Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y su aplicación em la biorremediación de suelos y lodos contaminados. **Revista Argentina de Microbiologia**, 28: 83-98.

FONSECA, M. R. M. (1992) **Química: química orgânica.** São Paulo: FTD, 368 p.

GILMAN, J. C. (1957) A Manual of Soil Fungi. Iowa St. College Press, AMES *apud* ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R. e AZEVEDO, J. L. (Eds.) (1991) **Tratado de Microbiologia, v. 2.** São Paulo: Editora Manole, 126 p.

GOULART, L. M.; RAMOS, R. F.; RIBEIRO, P. D.; CARVALHO, M. E. G.; DE PAULO, M. L. L.; ROSÁRIO, H. E.; GIACULI, C. P.; FERREIRA, M. L. G.; SILVA, E. M.; SILVA, J. C. (2001) **Aplicação de Uréia em Substrato de Esterco de Gado Curtido para Cultivo da *Eisenia foetida*.** Disponível em: http://www.unb.br/ib/Zoo/CBZ/resumos/Annelida.pdf. Acessado em 22 de julho de 2008.

GRIFFIN, D.H. (1994). Fungal Physiology. 2 ed. New York: John Wiley & Sons.

GÜNTER, H. (2005). Poluição dos solos. In: PHILIPPI JR., A., PELICIONI, M. C. (Eds). **Educação Ambiental e Sustentabilidade**. São Paulo: Manole, pp.191.

HAMDI, H.; BENZARTI, S.; MANUSADZIANAS, L.; AOYAMA, I. & JEDIDI, N. (2007) Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, 39: 1926 – 1935.

http://www.dzo.uem.br/disciplinas/Solos/nutrientes.doc. Acessado em 31 de maio de 2007.

http://www.maxwell.lambda.ele.puc-rio.br/cgi-bin/PRG_0599.EXE/4333_3.PDF?). Acessado em 28 de abril de 2008.

http://sbrtv1.ibict.br/upload/sbrt5926.pdf?PHPSESSID=e3b8397659a63ceddd4a882916 01ea95. Acessado em 12 de março de 2008.

http://www.uab-gtip.uab.es/Apuntsmicro/**hongos**.pdf. Acessado em 14 de maio de 2008

http://pt.wikipedia.org/wiki/Mamona. Acessado em 09 de julho de 2008.

JORGENSEN, K. S., PUUSTINEN, J. & SUORTTI, A. M. (2000) Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon Contaminated Soil by Composting in Biopiles. **Environmental Pollution,** 107: 245-254.

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

KIM, S.; CHOI, D. H.; SIM, D. S.; OH, Y. (2005) Evaluation of bioremediation effectiveness on crude oil-contaminated sand. **Chemosphere**, 59: 845-852.

LANGWALDT J. H.; PUHAKKA, J. A. (2000) On-site biological remediation of contaminated groundwater: a review. **Environmental Microbiology**, 62: 3112 – 3120.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. (1990) Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. **Microbiological Reviews**, 54 (3): 305 – 315.

LEBLOND, J. D.; SCHULTZ, W.; SAYLER, G. S. Observations on the preferential biodegradation of selected components of polyaromatic hydrocarbon mixtures. **Chemosphere**, 42: 333 – 343.

LEITE, W. C. A. (1995) Resíduos sólidos urbanos: contribuição para o gerenciamento.In: TAUK-TORNISIELO, S. M. et al. (Orgs.) Análise ambiental: estratégias e ações. São Paulo: T. A. Queiroz Ed. *apud* DIAS, A. E. X. O. (2000) Biorremediação de áreas afetadas por resíduos sólidos tóxicos**.** In: SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA, R. M. (Org.) **Resíduos Sólidos, Ambiente e Saúde: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 142 p.

LEMOS, J. L. S. (2003) Emprego de fungos no tratamento de solos contaminados com petróleo - Otimização das condições de cultivo. Relatório interno elaborado para o CNPq. Biblioteca do Centro de Tecnologia Mineral – CETEM, **RI2003-036-00**.

LEMOS, J. L. S. (2001) **Estudo da Produção de Xilanases por *Aspergillus awamori* em bagaço-de-cana**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 297 p.

LIMA, R. L. S.; SEVERINO, L. S.; ALBUQUERQUE, R. C.; BELTRÃO, N. E. M. (2006) **Avaliação da Casca e da Torta de Mamona como Fertilizante Orgânico.** In: Segundo Congresso Brasileiro de Mamona, Aracaju, Sergipe. Disponível em: http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/publicacoes/trabalhos_cbm2/018.pdf. Acessado em 12 de maio de 2008.

LIN, Q.; MENDELSSOHN, I. A.; HENRY JR., C. B.; ROBERTS, P. O.; WALSH, M. M.; OVERTON, E. B.; PORTIER, R. J. (1999) Effects of bioremediation agents on oil degradation in mineral and sandy salt marsh sediments. **Environmental Technology**, 20: 825 – 837.

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 20/08/2006.

MARZLUF, G. A. (1981) Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. **Microbiol. Rev.**, 45: 437 – 461.

MELO, W. C. (2008) **Produção de bioetanol da torta de mamona (*Ricinus communis L.*) obtida do processo biodiesel.** Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 191 p.

MOLINA-BARAHONA, L.; RODRÝGUEZ-VÁZQUEZ, R.; HERNÁNDEZ-VELASCO, M.; VEGA-JARQUÍN, 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.

MOLLEA, C.; BOSCO, F. & RUGGERI, B. (2005) Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies. **Chemosphere** (submetido).

MONTEIRO , J. M. G. (2007) **Plantio de Oleaginosas por Agricultores Familiares do Semi-árido nordestino para Produção de biodiesel como uma Estratégia de Mitigação e Adaptação às Mudanças Climáticas**. Tese (Doutorado em Ciências de Planejamento Energético). Pós-Graduação em

engenharia/COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 302p.

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. **Rev. Iberoam. Micol**., 21: 103 – 120.

MOURA, T. S.; SANTOS, R. M.; RIZZO, A. C. L. (2006) **Simulação de um Processo de Atenuação Natural de Solo Contaminado por Petróleo**. In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, SP.

NAMKOONG, W.; HWANG, E.; PARK, J.; CHOI, J. (2002) Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. **Environmental Pollution**, 119: 23 – 31 *apud* SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. (2005) Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, 136: 187 – 195.

NYER, E. K. (1998) In: Groundwater and soil remediation: practical methods and strategies. Ann Arbor Press, Michigan *apud* ROSADO, A. (2005) **Microbiologia e Biorremediação de Petróleo e Derivados**. Rio de Janeiro: Núcleo de Ciências Ambientais/UFRJ, 62 p.

NOBRE, M. M.; NOBRE, R. C. M. (2004) Remediação de solos: Técnicas alternativas melhoram desempenho. **Revista Química e Derivados.** Editora QD. Disponível em: http://www.quimica.com.br/revista/qd417/solo1.htm. Acessado em: 11 de março de 2004.

NORTHCOTT, G. L., JONES, K.C., 2000. Experimental approaches and analytical techniques for determining organic compound bound residues in soil and sediment. **Environmental Pollution,** 108: 19-43.

OECD - Organization for Economic Development (1984) **OECD Guideline for Testing of Chemicals** No. 207. Earthworm Acute Toxicity Test. Paris.

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. Acessado em 12 de abril de 2008.

OLIVEIRA, F. R., MILLIOLI, V. S. (2005) **Utilização da técnica de bioestímulo, avaliando-se parâmetros como relação nutricional e umidade na biorremediação de solo contamiando com óleo cru.** In: XIII Jornada de Iniciação Científica, Centro de Tecnologia Mineral – CETEM/MCT.

OLIVEIRA, S. D. e LEMOS, J. L. S. (2005) **Biodegradação de petróleo de solo areno-argiloso por fungo filamentoso**. In: XIII Jornada de Iniciação Científica, Centro de Tecnologia Mineral – CETEM/MCT.

ÖSTERREICHER-CUNHA, P.; VARGAS JR, E. A.; GUIMARÃES, J. R. D.; CAMPOS, T. M. P.; NUNES, C. M. F.; COSTA, A.; ANTUNES, F. S.; SILVA, M. I. P.; MANO, D. M. (2004) Evaluation of bioventing on a gasoline–ethanol contaminated disturbed residual soil. **Journal of Hazardous Materials,** 110: 63 – 76.

PALA, D. M.; CARVALHO, D. D.; PINTO, J. C. & SANT'ANNA JR., G. L. (2006) A suitable model to describe bioremediation of a petroleum-contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation,** 58: 254 – 260.

PANKRANTZ, T. M. (2001) Environmental Engineering Dictionary and Directory. CRC Press, Boca Raton, FL *apud* SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. (2005) Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, 136: 187 – 195.

PAUDYN, K., RUTTER, A.; ROWE, R. K.; POLAND, J. S. (2008) Remediation of hidrocarbon contaminated soils in the Canadian Artic by landfarming. **Cold Regions Science and Technology,** 53: 102 – 114.

PEARSON, K. M. (1995). On the remediation of polluted land – ex-site treatment. In: GOMES, M. M. & HOGLAND, W. (Eds.) proceedings of the Latin American. Swedish Seminar on Solid Waste Management and Round Table on Landfill Technology and Contaminated Site Remediation. Sweden: Lund University, 195 – 196 *apud* DIAS, A. E. X. O. (2000) Biorremediação de áreas afetadas por resíduos sólidos tóxicos**.** In: SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA, R. M. (Org.) **Resíduos Sólidos, Ambiente e Saúde: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 142 p.

PEREIRA, L. T. C. e LEMOS, J. L. S. (2003) **Os Fungos Filamentosos, uma opção em estudo para a Biorremediação II.** In: XI Jornada de Iniciação Científica, Centro de Tecnologia Mineral – CETEM/MCT.

PERES, C. S. e NAUMOFF, A. F. (1998) Destinação de resíduos sólidos urbanos: o processo de compostagem. In: SOARES, C. H. L. (Ed.) **II Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada.** Florianópolis: Universidade de Santa Catarina, v. 2. Disponível em: http://www.ufsc.br/ccb/PDF/c7.PDF

PLETSCH, M.; CHARLWOOD, B. V.; ARAÚJO, B. S. (1999) Fitorremediação de águas e solos poluídos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. Disponível em: http://www.biotecnologia.com.br/ Pesquisado em: junho de 2008.

POTTER, C. L.; GLASER, J. A.; CHANG, L.W.; MEIER, J.R.; DOSANI, M. e HERRMANN, R. F. (1999) Degradation of Polynuclear Aromatic Hydrocarbon Under Bench-Scale Compost Conditions. **Environmental Science Technology,** 33: 1717 – 1725.

PUC-RIO – Certificação Digital nº9716243/CA – Petróleo e Gasolina**.** Disponível em: http://www.maxwell.lambda.ele.puc-rio.br/cgi-bin/PRG_0599.EXE/4333_3.PDF?, Pesquisado em: Outubro de 2007.

PUTZKE, J. e PUTZKE, M. T L. (2004) **Os Reinos dos Fungos**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2 ed., 603 p. v.1

PUTZKE, J. e PUTZKE, M. T L. (2002) **Os Reinos dos Fungos.** Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 214 p. v.2

PRINCE, R. C. (1993) Petroleum spill bioremediation in marine environments. **Critical Reviews in Microbiology**, 19(4): 217 – 242.

RAMOS, A. S.; EGLER, S. G; CASTILHOS, Z. C. (2007) **Implantação do Laboratório de Ecotoxicologia Aplicada à Indústria Mínero-metalúrgica**

(LECOMIN) do CETEM. In: I Jornada do Programa de Capacitação Interna, Centro de Tecnologia Mineral – CETEM/MCT.

RAVELET, C.; KRIVOBOK, S.; SAGE, L. e STEIMAN, R. (2000). Biodegradation of Pyrene by Sediment Fungi. **Chemosphere**, 40: 557 – 563.

REICHE, A. P. e LEMOS, J. L. S. (2006) **Estudo do potencial de degradação de petróleo de linhagens de fungos isoladas de solo nordestino.** In: XIV Jornada de Iniciação Científica, Centro de Tecnologia Mineral – CETEM/MCT.

RISER-ROBERTS, E. (1998) Remediation of Petroleum Contaminated Soil: Biological, Physical, and Chemical Processes. CRC Press LLC, Boca Raton, FL *apud* SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. (2005) Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, 136: 187 – 195.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; CARDOSO, A. A. (2004) Introdução à Química Ambiental. Porto Alegre: Bookman. 154p.

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

ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R. e AZEVEDO, J. L. (Eds.) (1988) **Tratado de Microbiologia, v. 1.** São Paulo: Editora Manole, 186 p.

ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R. e AZEVEDO, J. L. (Eds.) (1991) **Tratado de Microbiologia, v. 2.** São Paulo: Editora Manole, 126 p.

SÁ, M. C. C. (2002) **Tratamento biológico de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 105 p.

SANCHEZ, M. A.; CAMPBELL, L. M.; BRINKER, F. A.; OWENS, D., 2000. Attenuation the natural way. A former wood-preserving site offers a case study for evaluating the potential of monitored natural attenuation. Industrial Wastewater**,** 5: 37-42 *apud* SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. (2005) Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, 136: 187 – 195.

SANTOS, R. M. (2007) **Avaliação da adição do pó da casaca de coco verde, como material estruturante, na biorremediação de solo contaminado por petróleo.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 143 p.

SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. (2005) Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, 136: 187 – 195.

SEABRA, P. N. C. (2005) **Aplicação de biopilha na biorremediação de solos contaminados com petróleo.** Tese (Doutorado no Programa de Engenharia Química) – COPPE , Universidade Federal do Rio de Janeiro. 169 p.

SEMPLE, K.T.; REID, B.J. e FERMOR, T. R. (2001) Impact of Composting Strategies on the Treatment of Soils Contaminated with Organic Pollutants. **Environmental Pollution,** 112: 269 – 283.

SEVERINO, L. S. (2005) O que sabemos sobre a torta de mamona. Campina Grande: Embrapa Algodão. 31p. (Documentos, 134) *apud* LIMA, R. L. S.; SEVERINO, L. S.; ALBUQUERQUE, R. C.; BELTRÃO, N. E. M. (2006) **Avaliação da Casca e da Torta de Mamona como Fertilizante Orgânico.** In: Segundo Congresso Brasileiro de Mamona, Aracaju, Sergipe. Disponível em: http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/publicacoes/trabalhos_cbm2/018.pdf. Acessado em 12 de maio de 2008.

SILVEIRA, V. D. (1995) **Micologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural. 336p.

SISINNO, C. L. S.; BULUS, M. R. M; RIZZO, A. C.; MOREIRA, J. C. (2006) Ensaio de Comportamento com Minhocas (*Eisenia fetida*) para Avaliação de Áreas Contaminadas: Resultados Preliminares para Contaminação por Hidrocarbonetos. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.** (1), 2: 137-140.

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

SLAUGHTER, J. C. (1988) Nitrogen metabolism**.** In: BERRY, D. R.; BLACKWELL (Eds). **Physiology of industrial fungi**. London: Scientific Publication: 59 – 129.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. (1995) **Análise de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: Departamento de Solos, UFRGS, Boletim técnico n. 5., 2 ed., 174p.

TRINDADE, P. V. O. (2002) **Avaliação das Técnicas de Bioaumentação e Bioestimulação no Processo de Biorremediação de Solo Contaminado por Hidrocarbonetos de Petróleo**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 127 p.

TRINDADE, P. V. O.; SOBRAL, L. G.; RIZZO, A. C. L.; LEITE, S. G. F.; SORIANO, A. U. (2005) Bioremediation of a weathered and a recently oil-concontaminated solis from Brazil: a comparison study. **Chemosphere,** 58: 515 – 522.

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

WIAME, M. A. J., GRENSON, M.; ARST, H. N. (1985). Nitrogen catabolite repression in yeast and filamentous fungi. In: ROSE, A. H. and TEMPEST, D. W. (Eds). **Advances in Microbial Physiology** (26): 1 – 87.

WIDDEL, F.; RABUS, R. (2001) Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. **Current Opinion in Biotechnology**, 12: 259–276.

ZAIDI, B. R.; IMAM, S. H. (1999) Factors Afecting Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Phenanthrene in the Caribbean Coastal Water 1**. Marine Pollution Bulletin**, 38: 737 – 7

ANEXO A

Tabela 1A. Rotina de Fertilidade das tortas de mamona

Rotina de Fertilidade		Torta de Mamona A	Torta de Mamona B
Na		0,135	0,248
Ca		13,5	10,5
Mg		8,0	7,0
K		2,87	1,56
H+Al		9,5	10,0
Al		0,00	0,00
S		24,51	19,31
T		34,01	29,31
V	%	72	66
pH H_2O	1: 2,5	7,5	8,7
C_{org} (%)		14,7	13,7

A= marca A; B = marca B

Tabela 2A. Evolução de gás carbônico (µmol) para as condições 1-6

Tempo (dias)	Condição 1	Condição 2	Condição 3	Condição 4	Condição 5	Condição 6
0	0	0	0	0	0,00	0
1	260,92	297,45	197,16	228,20	117,44	240,90
2	590,39	759,90	430,82	578,20	270,48	537,47
3	882,67	1119,08	616,33	895,05	346,95	739,60
4	1166,47	1553,81	855,51	1379,71	416,23	941,74
7	2540,99	3269,00	2847,10	4223,55	618,91	1491,88
9	3675,37	4801,58	5116,53	6153,59	763,13	1955,99
11	4837,53	6285,70	6848,99	7303,30	877,09	2258,44
14	5791,49	7573,62	8300,72	7943,84	980,78	2522,84
16	6782,23	8904,45	9477,03	8530,51	1053,28	2738,50
18	7788,21	10224,90	10487,38	9031,24	1121,73	2953,76
21	9026,38	11506,66	11068,41	9398,09	1193,29	3198,10
23	9917,77	12339,37	11484,22	9708,80	1255,47	3353,81
28	10853,91	12864,49	11791,08	10033,67	238,26	3535,18
30	11749,03	13270,20	12047,54	10344,77	276,64	3652,94
32	12538,81	13623,82	12259,67	10676,30	330,71	3780,30
35	13298,31	14009,02	12456,60	11009,54	379,28	3924,98
37	13802,84	14342,37	12636,19	11308,23	460,80	4015,34
39	14139,97	14625,38	12785,22	11546,67	530,35	4096,31
42	14545,14	14996,86	12963,08	11836,11	566,88	4228,01
44	14817,37	15278,23	13097,17	12040,68	620,65	4427,14

Tabela 2A. Evolução de gás carbônico (µmol) para as condições 7-12

Tempo (dias)	Condição 7	Condição 8	Condição 9	Condição 10	Condição 11	Condição 12
0	0,00	0	0	0	0	0
1	199,08	293,78	211,37	364,23	155,43	256,10
2	393,29	686,22	490,56	864,05	347,63	704,89
3	524,61	931,46	679,46	1210,54	512,38	1198,84
4	651,29	1222,53	873,74	1582,06	748,64	1841,89
7	1162,52	2500,79	1590,17	2830,19	1880,50	3942,80
9	1637,82	3703,81	2124,08	3722,80	2813,69	5565,98
11	2035,96	4742,27	2557,79	4432,27	3480,49	6752,75
14	2488,09	5871,48	2985,55	4992,00	4150,26	7624,51
16	2872,75	6623,70	3490,48	5634,00	4741,95	8389,04
18	3286,25	7326,28	4017,36	6228,34	5292,57	9021,78
21	3892,04	8119,69	4656,06	6924,32	5822,24	9456,64
23	4341,21	8597,75	5109,49	7525,91	6249,31	9853,07
28	4928,07	9239,64	5534,52	8143,88	6654,31	10204,78
30	5311,19	9524,52	5846,55	8633,72	6980,49	10542,29
32	5704,00	9958,21	6154,28	9113,20	7247,49	10839,52
35	6159,37	10082,23	6447,48	9570,23	7469,78	11122,80
37	6472,61	10715,06	6945,07	9993,69	7680,49	11390,81
39	6747,26	10983,46	7377,26	10337,32	7826,21	11586,24
42	7203,19	11141,12	7857,59	10795,99	7981,13	11785,79
44	7879,80	11549,214	8221,49	11107,98	8098,50	11936,01

Tabela 3A. Evolução de gás carbônico (µmol) para as condições 13-18

Tempo (dias)	Condição 13	Condição 14	Condição 15	Condição 16	Condição 17	Condição 18
0	0	0	0,00	0	0,00	0,00
1	1169,35	2172,16	1966,44	3763,45	155,17	240,90
2	2681,74	5056,08	5598,65	7660,36	321,56	627,94
3	4088,88	8062,18	8889,52	11470,43	446,51	980,22
4	7387,02	12031,58	12545,45	16161,67	948,60	2112,20
7	10589,68	15457,58	16149,74	19651,99	1168,61	2453,17
9	13801,19	19039,37	19771,67	23431,27	1400,42	2788,87
11	16756,14	22460,36	23235,95	27319,48	1625,85	3145,66
14	19685,49	25712,02	26492,17	31326,84	1788,54	3415,06
16	21949,55	28573,89	29513,58	34660,84	1880,05	3585,90
18	24851,88	31771,88	32508,04	38422,20	2042,19	3898,99
21	26977,26	35230,86	35462,32	41772,32	2157,81	4261,37
23	28256,77	38500,95	37687,90	44594,14	2215,03	4481,20
28	30294,61	42011,61	40592,93	48183,61	885,92	4847,00
30	34026,13	45235,82	44687,45	51471,26	1339,67	5108,34
32	37662,79	48430,36	49026,21	54651,34	1681,11	5342,55
35	41295,24	51737,75	53653,26	57987,78	2101,30	5650,22
37	44551,83	54730,05	57422,46	61050,51	2578,11	5856,45
39	47490,49	57279,16	60688,90	63782,72	2864,47	5997,33
42	50499,21	60172,94	64156,80	66630,75	3227,62	6205,66
44	52810,38	63037,07	67340,45	69477,99	3453,93	6475,02

Tabela 4A. Evolução de gás carbônico (µmol) para as condições 19-24

Tempo (dias)	Condição 19	Condição 20	Condição 21	Condição 22	Condição 23	Condição 24
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	155,13	375,39	842,48	2040,59	1115,72	3349,29
2	322,55	772,15	2160,67	4582,74	3193,83	7069,06
3	478,94	1140,19	3191,02	7567,61	4838,00	10733,43
4	1155,35	2995,25	6586,97	11647,63	8532,34	15234,57
7	1610,34	4304,60	8381,02	15224,98	12160,75	19094,89
9	2276,95	5911,83	10228,03	18972,88	15547,13	23061,28
11	3159,01	7751,59	12100,14	22517,88	18757,34	26850,85
14	4015,88	9156,14	13511,73	25936,90	21627,27	30625,96
16	4597,16	10045,54	14333,65	29014,74	23499,49	34038,54
18	5523,33	11538,51	16014,95	32562,11	26148,83	37938,75
21	6072,23	12371,18	17072,50	35876,75	27706,94	41490,08
23	6426,48	12899,38	18020,37	39031,95	28414,09	44279,47
28	6996,77	13878,37	20374,91	42604,11	29503,47	47815,37
30	7437,73	14824,02	22889,25	45852,29	33020,58	51818,11
32	7878,32	15641,95	25655,42	48968,75	36746,93	55543,50
35	8446,27	16765,04	28987,33	52325,00	40695,43	59351,69
37	9554,39	17532,61	32644,08	55295,22	44260,78	62541,09
39	10119,52	18025,23	35923,55	56921,35	47299,58	65057,75
42	10771,08	18657,67	39114,42	58777,83	50050,46	67937,79
44	11184,89	19326,51	41492,79	60574,28	52250,83	71172,13

Tabela 5A. Número mais provável por grama de solo (NMP/g solo) dos microorganismos degradadores.

Bandejas	Tempo zero	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8
B1	8,74E+02	2,36E+02	5,70E+05	9,12E+04	7,98E+06
B2	9,12E+03	8,74E+02	1,63E+05	9,12E+04	1,06E+06
B3	1,63E+03	3,53E+03	3,53E+05	9,12E+04	7,98E+06
B4	1,63E+03	2,77E+04	1,63E+06	9,12E+05	9,12E+07
B5	3,53E+03	1,63E+04	9,12E+05	9,12E+05	7,98E+06
B6	1,63E+04	9,12E+06	3,53E+05	9,12E+06	1,10E+07
B7	1,63E+03	9,12E+03	5,70E+04	1,48E+06	1,03E+06
B8	9,12E+03	1,63E+04	9,12E+04	3,53E+05	1,75E+07
B9	3,53E+03	7,98E+03	5,70E+04	4,18E+05	9,12E+07
B10	8,74E+02	3,53E+03	1,63E+05	1,63E+05	1,03E+06
B1 CLOR	1,63E+03	7,98E+03	9,12E+04	2,77E+05	9,12E+04
B2 CLOR	9,12E+03	5,70E+03	3,53E+04	9,12E+04	1,63E+05
B3 CLOR	9,12E+03	5,70E+03	9,12E+04	8,74E+04	3,53E+05
B4 CLOR	3,53E+03	9,12E+03	1,63E+04	9,12E+05	1,63E+06
B5 CLOR	3,53E+03	9,12E+03	9,12E+03	4,18E+04	1,63E+04
B6 CLOR	1,63E+03	3,53E+03	4,56E+06	4,18E+07	7,98E+05
B7 CLOR	3,53E+03	9,12E+03	9,12E+03	7,98E+04	9,12E+03
B8 CLOR	3,53E+03	2,77E+04	9,12E+03	3,53E+04	9,12E+04
B9 CLOR	1,63E+03	2,77E+03	9,12E+04	3,53E+03	1,14E+05
B10 CLOR	9,12E+03	3,53E+03	9,12E+03	3,53E+05	7,98E+04

Tabela 6A. Quantificação de hidrocarbonetos por análise de HTP *Finger Print*.

	Inicial (mg/kg)		**Final (mg/kg)**	
Bandejas	**n-alcanos**	**HTP**	**n-alcanos**	**HTTP**
B1	870,7	7165,64	313,95	2761,04
B2	849,95	6930,27	202,96	1742,03
B3	1218,61	12698,92	888,97	6974,97
B4	668,38	6040,91	345,63	2113,12
B5	993,56	8339,01	282,88	2529,1
B6	721,34	9783,27	181,14	4196,44
B7	1203,26	12486,64	792,06	6298,06
B8	1011,65	10676,72	135,49	1218,61
B9	141,98	1310,89	147,99	1310,93
B10	199,16	1890,18	129,56	1116