

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

Desenvolvimento de Biorreator Não Convencional para o Tratamento de Solos Contaminados por Petróleo

Andréa Camardella de Lima Rizzo

Rio de Janeiro 2008

DESENVOLVIMENTO DE BIORREATOR NÃO CONVENCIONAL PARA O TRATAMENTO DE SOLOS CONTAMINADOS POR PETRÓLEO

ANDREA CAMARDELLA DE LIMA RIZZO

Tese de doutorado apresentada à Escola de Química Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadores:

Prof. Dra. Selma Gomes Ferreira Leite Dr. Luis Gonzaga Santos Sobral

EQ / UFRJ Rio de Janeiro 2008

Desenvolvimento de Biorreator Não Convencional para o Tratamento de Solos Contaminados por Petróleo

ANDREA CAMARDELLA DE LIMA RIZZO

Tese 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 Doutor em Ciências.

Aprovada por:		
Jehno Gos Sael		
Profa. Dra. Selma Gomes Ferreira Leite		
Mai Esperf		
Prof. PhD. Luiz Gonzaga dos Santos Sobral		
Prof. Dra. Denize Dias de Carvalho		
The sale of the		
Prof. Dra. Eliana Flávia Camporese Sérvulo		
G hyaldat A		
Prof. Dr. Geraldo Lippel Sant'Anna Jr.		
- Faria Claudia Garbosa		
Prof. Dra. Maria Cláudia Barbosa		
Palo Ny 2)		
Prof. Dr. Paulo Negrais Carneiro Seabra		
Rio de Janeiro		

26 de Fevereiro de 2008

Rizzo, Andréa Camardella de Lima

Desenvolvimento de biorreator não convencional para o tratamento de solos contaminados por petróleo / Andréa Camardella de Lima Rizzo. -- Rio de Janeiro: UFRJ/Escola de Química, 2008.

xxi, 188 p.: il.

Orientadores: Selma Gomes Ferreira Leite e Luiz Gonzaga dos Santos Sobral

Tese (doutorado) – UFRJ/ Escola de Química/Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2008.

1. Biorreator. 2. Solos Contaminados. 3. Petróleo – Tese . I. Título. II. Tese (Doutorado -UFRJ/ EQ).

"A visão de mundo do pesquisador influi na escolha do problema, na fonte de dados, no método escolhido e na forma como se realizam os estudos."

Nota de aula Profa. Élida Azevedo Hennington, IPEC, 30/11/2007

DEDICATÓRIA

Cultivo Uma Rosa Branca José Martí (1853–1895)

Cultivo uma rosa branca, em julho como em janeiro, para o amigo verdadeiro que me dá sua mão franca.

E para o cruel que me arranca o coração com que vivo, cardo, urtiga não cultivo: cultivo uma rosa branca.

Ao meu pai, Edson (in memorian), por acreditar em mim, às vezes mais do que eu mesma, e por estar ao meu lado, sempre ...

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais, Edson e Vilma, por acreditarem tanto em mim e no meu trabalho.
 Vocês são o meu exemplo, a minha estrutura, o meu porto seguro. A força, o apoio, o amor, o espelho.
- Ao Claudio pelo amor, pela Mariana, pelo companheirismo, pelo apoio e pela paciência. Você se formou comigo, defendeu tese de mestrado comigo e agora defende tese de doutorado. Primeiro lugar na prova de títulos para o cargo de marido de Andréa.
- À Mariana por ela existir. Pelos lindos sorrisos, beijinhos e carinhos nas horas de maior estresse. Meu melhor projeto de vida.
- Aos meus orientadores, Dra. Selma Gomes Ferreira Leite e Dr. Luiz Gonzaga dos Santos Sobral, pela orientação em si durante o desenvolvimento do trabalho, pela confiança, pelo apoio e pela amizade. Selma é minha mãe tecnológica e uma das maiores incentivadoras do meu trabalho. Luiz é um amigo especial que conquistei no CETEM e um eterno professor. Obrigada por tudo.
- A amiga Adriana Ururahy Soriano, que é, antes de tudo, a segunda mãe do biorreator
 e a minha irmã de coração tão querida. Quantas idéias, dúvidas, certezas, devaneios,
 descobertas, sonhos, realizações, terapias. Valeu amiga. À pesquisadora Adriana
 Ururahy Soriano do CENPES/Petrobras, coordenadora do projeto, pelo apoio e
 incentivo.
- Ao Dr. Ronaldo Luiz Correa dos Santos, Coordenador de Processos Metalúrgico e Ambientais do CETEM/MCT, pai do biorreator, incentivo, apoio e equilíbrio nas horas difíceis. Um grande amigo. Em alguns momentos acho que só nós três (eu, Adriana e Ronaldo) acreditamos que esse sonho poderia se realizar.
- À Renata da Matta dos Santos, meu braço direito (e esquerdo) e irmã do reator, pois ambos nasceram para a vida tecnológica juntos. São meus dois orgulhos.
- Aos estagiários de nível superior, nível médio e técnico da CPMA que em algum momento, ao longo desses anos, colaboraram com o andamento da tese: Daniel Felipe, Camila, Rosana Macedo, Denner Conceição, Paula Batista, Bianca Manhães, Pedro Felix, Felipe Duarte, Michel Menezes, Danielle Rocha, Janaína Pires, Tatiane Moura, Rodnei Soares, Danielle Reichwald, Gisele Furukawa. Ao técnico da CPMA Jorge Moura pela grande ajuda e ensinamentos. Às Pesquisadoras do grupo de biorremediação Valéria Millioli e Judith Liliana Lemos.
- À Fátima Engel por me acolher em momentos difíceis e pela fantástica ajuda na reta final da tese.

- A dupla dinâmica da CPMA e amigos de todas as horas Ary Caldas e Grace Britto.
 Nossa meta: Não se deprima e cuide da Biossegurança.
- Ao engenheiro Pedro Ormastrone da Trindade que adotou o reator como filho durante um certo período.
- À amiga Claudia Duarte da Cunha, incentivadora de todas as horas e responsável pelas análises de diversidade microbiana. A calma em momentos turbulentos.
- Ao Jorge Luiz Cruz, o JL, pela ajuda em todos os momentos.
- Ao CETEM, em especial à Diretoria e à Coordenação de Processos Metalúrgicos e Ambientais (CPMA), por me acolher como membro da casa, pelo incentivo na realização do doutorado e pela disponibilização completa de sua infra-estrutura.
- A equipe da oficina do CETEM, por tudo, destacando Célio, Jacinto e Miranda, e em especial ao Mario (Bola) que com a sua criatividade, musicalidade e paciência me socorreu os momentos difíceis e alegrou alguns dias cinzas.
- Ao CENPES/Petrobras pelo fomento, fornecimento dos solos e do óleo e pela disponibilização de sua estrutura laboratorial e administrativa para a viabilização do projeto.
- Aos amigos adotados do CENPES/BTA pela enorme ajuda prestada em todos os momentos analíticos ou não, em particular ao Ronalt Leite Vital, Frederico Landa, Renata Casella, Eliane, Val, Paulo Negrais Seabra, Gina Vazques, Mario do Rosário, Antônia Volpon e Monica Linhares.
- Ao Dr. Alexandre Rosado pela colaboração e cessão da infra-estrutura laboratorial para a realização das análises de diversidade microbiana.
- As amigas Bio Cristina Sisinno (ENSP/FIOCRUZ) e Martha Bulus (FEEMA/RJ) pelo apoio na realização dos ensaios ecotoxicológicos com aqueles bichinhos simpáticos, as minhocas.
- A Escola de Química da UFRJ da todo seu corpo docente por toda base de minha formação profissional. Grandes mestres e grandes amigos.
- A Deus pela minha existência, pela minha missão nessa vida e pelos amigos que conquistei.

RESUMO

RIZZO, Andrea Camardella de Lima. Desenvolvimento de Biorreator Não Convencional para o Tratamento de Solos Contaminados por Petróleo.. Orientadores: Selma Gomes Ferreira Leite e Luis Gonzaga Santos Sobral . Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2008. Dissertação (Doutorado em Ciências).

Este trabalho objetivou selecionar, em escala laboratorial, uma configuração apropriada de biorreator a ser empregado no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, bem como definir as condições de processo para operação do mesmo. Adicionalmente buscou-se adequar e otimizar, em microcosmos, as necessidades nutricionais do consórcio microbiano envolvido no processo de biorremediação de dois solos brasileiros contaminados com petróleo, avaliar o efeito da incorporação de material estruturante de origem orgânica e, complementarmente, avaliar a eficiência do sistema de tratamento desenvolvido (biorreatores de bancada e biorreator piloto) na redução do teor de contaminante nos solos. Assim, foi concebido um biorreator do tipo tambor fixo com agitador interno contendo pás (quatro diferentes configurações foram testadas) que comprovou, através de testes mecânicos, ser eficiente na homogeneização do conteúdo do mesmo

Os resultados dos ensaios de biodegradabilidade em microcosmos e dos testes em biorreator de bancada indicaram que tanto a aplicação da técnica de bioestímulo quanto a incorporação do material estruturante (serragem) refletiram positivamente na atividade microbiana, podendo ser adotadas como técnicas auxiliares ao processo de biorremediação dos dois solos estudados. No caso do bioestímulo, com correção do teor de nitrogênio do solo, a adição de uréia se mostrou mais adequada do que a de nitrato de sódio. Já a incorporação da serragem foi responsável por um aumento significativo da remoção do contaminante.

Nos ensaios realizados no biorreator piloto, a remoção de HTP no solo 2 foi de 15% após o bioestímulo, enquanto que no teste associando o bioestímulo à incorporação da serragem essa remoção foi elevada para 35%, representando um aumento de cerca de 2 vezes na eficiência do processo. A adição da serragem praticamente dobrou a taxa diária de remoção de HTP obtida apenas com a adição da uréia (de 0,14 para 0,26 mg HTP/g solo.dia).

O biorreator apresentou desempenho satisfatório na condução do processo de biorremediação, ficando comprovado que o sistema de homogeneização, incluindo a conformação da pá instalada, interfere na eficiência de biodegradação do óleo cru. Além

disso, pode-se concluir que o aumento de escala refletiu diretamente no aumento na taxa diária de biodegradação já que na escala de bancada o valor máximo obtido foi de 0,18 mg HTP/g solo.dia enquanto que no biorreator piloto o valor chegou a 0,26 mg HTP/g solo.dia (condições com bioestímulo e adição da serragem).

ABSTRACT

RIZZO, Andrea Camardella de Lima. **Development of an Unconventional Bioreactor for Petroleum Contaminated Soils Treatment**. Supervisors: Selma Gomes Ferreira Leite and Luis Gonzaga Santos Sobral. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2008. Dissertation (Doctorate on Science).

This work aimed at selecting, in laboratory scale, an appropriate bioreactor configuration to be used in petroleum hydrocarbon contaminated soils, as well as defining operational process conditions. Additionally, some experiments were conducted in microcosms to adapt and optimize nutritional needs of the microbial consortium involved in the bioremediation process of two Brazilian contaminated soils with crude oil as well as to evaluate the effect of adding organic bulking agent. It was also evaluated the treatment system (bench and pilot scale bioreactors) efficiency in reducing the soils contaminant concentration. Thus, a fixed drum bioreactor containing an internal agitator equipped with paddles (four different configurations were tested) was developed and proved, through mechanical tests, to be efficient in homogenizing the bioreactor content.

The microcosms biodegradability tests results, as well as bench bioreactor's, indicated that biostimulation and bulking agent addition (sawdust) had positive effects in microbial activity and could be adopted as auxiliaries bioremediation techniques to the two studied soils. In biostimulating the soil with nitrogen content correction, urea addition was more appropriate than the addition of sodium nitrate. Already, sawdust incorporation was responsible for a significant increase of contaminant's removal.

In pilot scale bioreactor experiments, soil 2 TPH removal, after biostimulation, was 15%, while contaminant removal after biostimulation associated to sawdust incorporation was 35%, representing an increase as high as twice the previous efficiency. Sawdust addition doubled, approximately, the TPH daily rate removal obtained with urea addition only (from 0.14 to 0.26 mg TPH/g soil.day).

Bioreactor showed a satisfactory acting in conducting the bioremediation process, proving that the homogenization system, including paddle's design, interferes in crude oil biodegradation efficiency. Besides, it can be concluded that the scale increase reflected directly in TPH daily rate removal, since maximum obtained value in bench scale was, after biostimulation and sawdust addition, 0.18 mg TPH/g soil.day, reaching 0.26 mg TPH/g soil.day in pilot scale bioreactor.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Custo estimado de remediação de solos para diferentes tipos de tratamento
Tabela 3.2. Distribuição Típica da População Microbiana em Solos e Água Subterrânea
Tabela 3.3. Gêneros Microbianos Degradadores de Hidrocarbonetos
Tabela 4.1. Caracterização dos solos virgem e contaminado
Tabela 4.2. Caracterização dos solos virgem e contaminado
Tabela 4.3. Condições Empregadas nos Testes em Protótipos de Parafusos Transportadores
Tabela 4.4. Ensaios de Biodegradabilidade em Microcosmos com o Solo 1 69
Tabela 4.5. Ensaios de Biodegradabilidade em Microcosmos com o Solo 2
Tabela 4.6. Ensaios de Biorremediação com Solo 1 no Protótipo 1
Tabela 4.7. Ensaios de Biorremediação com Solo 2 no Protótipo 1
Tabela 4.8. Ensaios de Biorremediação com Solo 2 nos Protótipos 2, 3 e 4
Tabela 4.9. Materiais adicionados nos ensaios em biorreator piloto
Tabela 5.1. Comparação dos Resultados da Caracterização Física e Química preliminar da Primeira e Segunda Remessas de Solo 1
Tabela 5.2. Correlação Percentual de Ocupação x Volume de Solo x Massa de Solo (ρ solo seco = 1,1 g/cm ³)
Tabela 5.3. Resultados inicias e finais de HTP (mg/g) para os testes em biorreator 128
Tabela 5.4. Resultados dos ensaios de biorremediação com o Solo 2 no Protótipo 1 134
Tabela 5.5. Acompanhamento do crescimento microbiano no 1°, 2°, 3° e 4° testes com Solo 2 no biorreator P1
Tabela 5.6. Resultados dos ensaios de biorremediação com o Solo 2 nos Protótipos 2, 3 e 4
Tabela 5.7. Resultados de quantificação da população microbiana degradadora de óleo cru dos ensaios de biorremediação com o Solo 2 nos Protótipos 2, 3 e 4 137
Tabela 5.8. Resultados dos ensaios de biorremediação com o solo 2 no biorreator piloto
Tabela 5.9. Monitoramento da população microbiana degradadora durante os testes no bioreator piloto

Tabela 5.10. Comparação dos resultados de eficiência mensal de degradação de HTP	. 144
Tabela 511. Resultados de HTP no início (t = 0), no meio (t= 6 meses) e ao final do processo de atenuação natural (t= 12 meses)	. 155

LISTA DE FIGURAS

0
9
0
0
3
4
5
6
9
1
2
3
3
4
4
5
6
6
7

Figura 4.12. Desenhos das quatro diferentes configurações de pás alternativas (a, b, c) instaladas nos protótipos P2, P3 e P4 de biorreator de bancada, respectivamente.	76
Figura 4.13. Desenho esquemático do biorreator em escala ampliada confeccionado pela Albrecht Equipamentos Industriais Ltda	78
Figura 4.14. Interface do software ELIPSE SCADA ® BIO REATOR BRL – 400	80
Figura 4.15. Sistema experimental para simulação do processo de atenuação natural monitorada do Solo 2 (a) e detalhamento esquemático do mesmo (b)	92
Figura 5.1. Moscovita (mica branca) Presente no Solo Virgem	94
Figura 5.2. Quartzo Presente no Solo Virgem	94
Figura 5.3. Caolinita Presente no Solo Virgem	95
Figura 5.4. Solo Virgem - Aglomerado de Quartzo/Caolinita/Mica	95
Figura 5.5. Análise Comparativa dos Resultados de Classificação Granulométrica do Solo Virgem	96
Figura 5.6. Caracterização Mineralógica do Solo Virgem – Difratograma	98
Figura 5.7. Registro fotográfico das amostras representativas das duas remessas de Solo 1	99
Figura 5.8. Perfis Cromatográficos do Solo 1; (A) Primeira Remessa e (B) Segunda Remessa	101
Figura 5.9. Micrografias obtidas pelo MEV de partículas do solo 2 sem contaminação.	102
Figura 5.10. Difratograma de raios X da amostra solo orientada sem matéria orgânica.	103
Figura 5.11. Aspecto do Solo Virgem Após Homogeneização no Carrossel (50% de ocupação; umidade variando de 50 a 90% da CRA (na foto CC); agitação a 5 rpm, por 1 min)	104
Figura 5.12. Aspecto do Solo 1 no Protótipo de Tambor Rotativo (50% de ocupação; 50% da CRA (na foto CC); aleta de 2 cm; agitação a 3-4 rpm, por 18h)	106
Figura 5.13. Aspecto do Solo 1 no Protótipo de Tambor Rotativo (40% de ocupação; 40% da CRA (na foto CC); aleta de 2 cm; agitação a 3-4 rpm, por 18h)	106
Figura 5.14. Aspecto do Solo 1 no Protótipo de Tambor Rotativo (40% de ocupação; 40% da CRA (na foto CC); aleta de 1,5 cm; agitação a 3-4 rpm, por 18h)	107
Figura 5.15. Aspecto do Solo 1 no Protótipo de Tambor Rotativo (40% de ocupação; 50% da CRA (na foto CC); aleta de 1,5 cm; agitação a 3-4 rpm, por 18h)	107
Figura 5.16. Vista geral do primeiro protótipo de biorreator.	

Figura 5.17. Detalhe do eixo central (agitador) instalado no biorreator	109
Figura 5.18. Representação esquemática do biorreator de bancada	109
Figura 5.19. Representação esquemática dos locais de adição das pedras coloridas (L1 e L2) e dos locais de coleta de amostras (A, B, C, D, E e F) para avaliação da eficiência de homogeneização do conteúdo do Reator	112
Figura 5.20. Curvas de evolução de CO ₂ do TESTE INICIAL com Solo 1	114
Figura 5.21. Curvas de evolução de CO ₂ (mmol) do Teste ADEQUAÇÃO DE UMIDADE E RELAÇÃO NUTRICIONAL	116
Figura 5.22. Curvas de evolução de CO ₂ (mmol) do teste ADIÇÃO DE MATERIAL ESTRUTURANTE	118
Figura 5.23. Curvas de evolução de CO ₂ (mmol) do TESTE INICIAL com Solo 2	120
Figura 5.24. Curvas de evolução de CO_2 (mmol) do TESTE ADIÇÃO DE MATERIAL ESTRUTURANTE E FONTE DE NITROGÊNIO com Solo 2	122
Figura 5.25. Cromatogramas relativos às amostra inicial (a) e final (b) do 1° teste no biorreator como Solo 1.	124
Figura 5.26. Registro do protótipo de biorreator utilizado para o ensaio de biodegradação, ao fim do experimento (a- detalhe do acúmulo de material; b – vista superior)	125
Figura 5.27. Registro do desgaste das pás de aço-inóx, ao fim do experimento (adetalhe das pás dentadas; b- detalhe das pás lisas)	125
Figura 5.28. Alteração do sistema de descarte de material pelo fundo do biorreator	126
Figura 5.29. Acompanhamento da concentração de HTP (mg/g) ao longo do 2º TESTE S1 no protótipo 1 de biorreator.	126
Figura 5.30. Cromatogramas das análises de HTP realizadas nas amostras iniciais de solo contaminado empregadas nos testes realizados em biorreator de bancada.	128
Figura 5.31. Cromatogramas das análises de HTP realizadas nas amostras do 2° TESTE S1	130
Figura 5.32. Acompanhamento do teor de óleos e graxas (OG) ao longo do 2º TESTE S1	132
Figura 5.33. Acompanhamento da concentração dos microrganismos degradadores no solo durante o 2º TESTE S1.	133
Figura 5.34. Biorreator Piloto	138
Figura 5.35. Cromatogramas das amostras inicial (a) e final (7 semanas) do 1º teste com Solo 2 no biorreator piloto.	141
Figura 5.36. Cromatogramas das amostras inicial (a), intermediária (7 semanas) e final (14 semanas) do 2º teste com Solo 2 no biorreator piloto	142

Figura 5.37. Gel de DGGE-16S para as diferentes amostras avaliadas	147
Figura 5.38. Dendograma obtido para o gel de DGGE-16S com as amostras avaliadas	148
Figura 5.39. Evolução de CO ₂ dos experimentos em meio líquido	150
Figura 5.40. Percentuais de biodegradação (PB,) obtidos nos ensaios em meio líquido.	151
Figura 5.41. Evolução de CO ₂ dos experimentos em meio sólido (microcosmos)	152
Figura 5.42. Concentração de óleos e graxas durante o experimento de atenuação natural monitorada (ANM)	154
Figura 5.43. Cromatogramas representativos das amostras de solo contendo 5% de óleo retiradas do experimento de ANM nos tempos de 0, 6 e 12 meses	157
Figura 5.44. Cromatogramas representativos das amostras de solo contendo 10% de óleo retiradas do experimento de ANM nos tempos de 0, 6 e 12 meses	158
Figura 5.45. Acompanhamento da densidade microbiana ao longo dos experimentos de ANM.	159

SUMÁRIO

Capítulo 1	
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	2
Capítulo 2	
2. OBJETIVOS	6
Capítulo 3	
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1. O Petróleo: origem, composição e atividades potencialmente poluidoras	3 8
3.2. Solo	9
3.2.1. Aspectos gerais	9
3.2.2. Contaminação dos solos	11
3.3. Biorremediação: Aspectos Gerais e Fatores que Afetam o Processo	13
3.3.1. Aeração	14
3.3.2. Nutrientes	14
3.3.3. Umidade	15
3.3.4. pH	16
3.3.5. Temperatura	16
3.3.6. Agitação	16
3.3.7. Disponibilização dos contaminantes	17
3.3.8. Tipo de solo	17
3.4. Os Microrganismos do Solo e seu Papel na Degradação de Poluentes Orgânicos	19
3.5. Estratégias de Aumento da Eficácia dos Processos de	25
3.5.1. Bioestímulo	25
3.5.2. Bioaumento e bioenriquecimento	26
3.5.3. Adição de surfactantes	28
3.5.4. Adição de Material Estruturante	29
3.6. Tecnologias para Biorremediação de Solos Contaminados	32
3.6.1. Tecnologias de tratamento in-situ	33
3.6.2. Tecnologias de tratamento ex-situ	35
3.7. Biorreatores	36
3.7.1.Tipos de Biorreatores	38
3.7.1.1. Reatores de fase semi – sólida (ou reatores de lama)	38

	3.7.1.2. Reatores de fase sólida	42
	3.8. Monitoramento do Processo de Biorremediação	46
С	apítulo 4	
4.	. MATERIAIS E MÉTODOS	51
	4.1. Caracterização dos Solos Empregados	52
	4.1.1. Solo 1	52
	4.1.2. Solo 2	55
	4.2. Definição da Configuração de Protótipo de Biorreator de Bancada	58
	4.2.1. Avaliação Inicial do Comportamento Mecânico do Solo 1 em Diferentes Protótipos de Biorreatores em Escala de Bancada	58
	4.2.1.1. Ensaios em homogeneizador de amostras	58
	4.2.1.2. Ensaios em tambor rotativo	60
	4.2.1.3. Ensaios em parafuso transportador	61
	4.2.2. Proposição e dimensionamento de configuração alternativa de biorreator	62
	4.3. Ensaios de Biodegradabilidade em Microcosmos	66
	4.3.1. Ensaios de biodegradabilidade com o solo 1	66
	4.3.2. Ensaios de biodegradabilidade com o solo 2	71
	4.4. Experimentos em Biorreator de Bancada	73
	4.4.1. Ensaios de biorremediação com solo 1 no protótipo 1	73
	4.4.2. Ensaios de biorremediação com solo 2 no protótipo 1	75
	4.4.3. Confecção de novos protótipos de biorreator em escala de bancada e ensaios de biorremediação com solo 2 no protótipo com novas pás	76
	4.5. Projeto e Confecção de Biorreator Piloto	77
	4.6. Experimentos em Biorreator Piloto	80
	4.7. Metodologias Para o Monitoramento dos Ensaios de Biodegradação	81
	4.7.1. Análise cromatográfica do CO ₂ produzido	81
	4.7.2. Quantificação de microrganismos degradadores de óleo cru (hidrocarbonoclásticos)	82
	4.7.3. Análise do teor de óleos e graxas	82
	4.7.4. Análise da concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo	83
	4.7.5. Umidade	83
	4.8. Ensaios Complementares	83
	4.8.1. Ensaios ecotoxicológicos	83
	4 8 2 Avaliação da diversidade microbiana	85

4.8.3. Avaliação da biodisponibilidade do óleo contaminante no solo 1	88
4.8.3.1. Extração do contaminante orgânico do solo	88
4.8.3.2. Produção do inoculo	89
4.8.3.3. Experimentos de biodegradação	89
4.8.4. Simulação do processo de atenuação natural do solo 2	90
apítulo 5	
. RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
5.1. Caracterização dos Solos Empregados	94
5.1.1. Solo 1	94
5.1.2. Solo 2	101
5.2. Definição da Configuração de Protótipo de Biorreator de Bancada	104
5.2.1. Avaliação inicial do comportamento mecânico do solo 1 en diferentes protótipos de biorreatores em escala de bancada	
5.2.1.1. Ensaios em homogeneizador de amostras	104
5.2.1.2. Ensaios em tambor rotativo	105
5.2.1.3. Ensaios em parafuso transportador	108
5.2.2. Proposição e dimensionamento de configuração alternativa de biorreator	
5.3. Ensaios de Biodegradabilidade em Microcosmos	113
5.3.1. Ensaios de biodegradabilidade com o solo 1	113
5.3.2. Ensaios de biodegradabilidade com o solo 2	119
5.4. Experimentos em Biorreator de Bancada	123
5.4.1. Ensaios de biorremediação com solo 1 no protótipo 1	123
5.4.2. Ensaios de biorremediação com solo 2 no protótipo 1	133
5.4.3. Confecção de novos protótipos de biorreator em escala de bancada e ensaios de biorremediação com solo 2 nos protótipos com novas pás	3
5.5. Projeto e Confecção de Biorreator Piloto	
5.6. Experimentos em Biorreator Piloto	
5.7. Ensaios Complementares	
5.7.1. Ensaios ecotoxicológicos	
5.7.2. Avaliação da diversidade microbiana	
5.7.3. Avaliação da biodisponibilidade do óleo contaminante no solo 1	150
5.7.4. Simulação do processo de atenuação natural do solo 2	154

Capítulo 6

6. CONCLUSÕES	163
6.1. Quanto à Definição da Configuração de Protótipo de Biorreator de Bancada	163
6.2. Quanto aos Ensaios de Biodegradabilidade em Microcosmos	163
6.3. Dos Experimentos em Biorreatores de Bancada	164
6.4. Dos Ensaios no Biorreator Piloto	166
6.5. Geral	166
Capítulo 7	
7. SUGESTÕES	169
Capítulo 8	
8. BIBLIOGRAFIA	171

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Com o processo de industrialização e o desenvolvimento de tecnologias e produtos cada vez mais avançados, não só o progresso e o bem-estar foram gerados. Problemas ligados à poluição ambiental se acentuaram e trouxeram como conseqüência a necessidade da conscientização quanto à importância da restrição de lançamentos indiscriminados de poluentes nos solos, rios, lagos, oceanos e na atmosfera, bem como de investimentos no desenvolvimento e implementação de tecnologias de remediação.

A indústria petroleira brasileira, como exemplo, principalmente refinarias e áreas de produção de petróleo, eventualmente se depara com vazamentos de óleo cru e/ou seus derivados, que atingem tanto os recursos hídricos quanto os solos. As tecnologias para tratamento de águas contaminadas com hidrocarbonetos encontram-se em um estágio de desenvolvimento bem mais avançado em comparação com as tecnologias para o tratamento de solos impactados. Em decorrência desta realidade torna-se cada vez mais urgente a necessidade de se desenvolver e aplicar tecnologias eficientes de tratamento dos solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, que apresentem grande contaminação orgânica, mas tempo e custo de processo reduzidos.

O elevado potencial do uso de microrganismos, apontados na literatura como agentes degradadores das mais diversas substâncias, indica o tratamento biológico como um dos mais eficientes modos de reduzir os efeitos adversos dos hidrocarbonetos sobre o meio ambiente (ALEXANDER, 1999). Desta forma, a aplicação de técnicas de biorremediação vem se destacando como uma das estratégias mais promissoras a serem adotadas no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo (TRINDADE, 2002). Segundo Providenti *et al.* (1993), a biorremediação, ao contrário dos processos físicos e químicos, é considerada como um método seguro, eficiente e mais barato para remoção de poluentes perigosos.

O termo biorremediação engloba a família de tecnologias que se baseiam na atividade microbiana para degradar compostos orgânicos, resultando na sua transformação em metabólitos ou na mineralização dos contaminantes (MOLINA-BARAHONA *et al.*, 2004; NAKAGAWA e ANDRÉA, 2006).

Segundo Bernoth *et al.* (2000), tanto compostos orgânicos como inorgânicos podem ser biodegradados ou transformados através de processos microbianos. Nas aplicações mais comuns da biorremediação, os microrganismos naturalmente presentes nos solos

ou águas contaminados são estimulados a degradar os contaminantes orgânicos, como hidrocarbonetos de petróleo, através da manipulação de condições ambientais tais como suprimento de oxigênio, concentração de nutrientes e teor de umidade.

A biorremediação engloba uma série de tecnologias e técnicas distintas para tratamento não só de solos, como também de águas contaminadas e outros resíduos, e que podem ser classificadas como processos de tratamento ex-situ ou in-situ (KHAN et al., 2004). Os processos de tratamento ex-situ são aqueles que envolvem a remoção física do material contaminado do local original e o encaminhamento do mesmo para o processo de tratamento em si, que ocorre em outro local (BOOPATHY, 2000). Por outro lado, os processos de tratamento in-situ são baseados no estímulo à biodegradação de contaminantes no solo e da água, sem a escavação da camada contaminada do solo, através da adição de nutrientes (principalmente nitrogênio, fósforo e potássio), oxigênio e, em alguns casos, microrganismos. Normalmente os processos de tratamento in-situ são associados a sistemas de bombeamento e recirculação de água, de forma a transportar/suprir nutrientes e oxigênio aos aqüíferos contaminados e solos associados (ROSS, 1990/91).

Dentre as principais tecnologias empregadas na biorremediação podem ser citadas: "Bioventing" (ou bioventilação), "Air Sparging", "Biosparging" "Bioslurping" (ou extração multifásica), "Pump-and-treat" (ou bombeamento e tratamento), Fitorremediação, "Landfarming", Biopilhas e os Biorreatores (ROSS, 1990/91; BARKER *et al.*, 1995; ALEXANDER, 1999; BERNOTH *et al.*, 2000; BOOPATHY, 2000; JORGENSEN *et al.*, 2000; SEMPLE *et al.*, 2001; TRINDADE, 2002; KHAN *et al.*, 2004 SEABRA *et al.*, 2006; SANTOS, 2007). Estas podem estar associadas a técnicas específicas visando o aumento da atividade microbiana como, por exemplo, o bioestímulo, o bioaumento, a adição de biossurfactantes e a incorporação de materiais estruturantes.

Atualmente, cresce o número de trabalhos envolvendo o uso de biorreatores para tratamento de solos contaminados e de resíduos sólidos (PROVIDENTI et al., 1993; GRAY et al., 1994; PUSKAS et al., 1995; BANERJI et al., 1995; BANERJEE et al., 1995; SANER et al., 1996a; SANER et al., 1996 b; URURAHY, 1998; BRINKMANN et al., 1998; RICHNOW et al., 2000; NANO et al., 2003; TROQUET et al., 2003; WARD et al., 2003; KHAN et al., 2004; PURWANINGSIHA et al., 2004; COLLINA et al., 2005; ARRAR et al., 2007).

No caso específico da biorremediação de solos contaminados, tanto a aplicação de técnicas de tratamentos in-situ, quanto de tratamentos ex-situ em fase sólida, muitas vezes tornam-se inviáveis sob o ponto de vista técnico (limitações geológicas da área contaminada, dificuldades operacionais, fortes influências climáticas dentre outros) e/ou econômico (custo elevado). Desta forma, a utilização de biorreatores surge como uma alternativa interessante, apresentando como principais vantagens a possibilidade de monitoramento contínuo do desempenho do sistema, o controle das condições ideais de processo, imprescindíveis à manutenção da atividade microbiana, e o reduzido tempo de remediação (TRUAX et al., 1995; STROO et al., 1997; WOO E PARK, 1999; RICHNOW et al., 2000; WARD et al., 2003; GOGOI et al., 2003; SANTOS, 2007). Dentre outros fatores que fortalecem esta tendência, chama-se atenção para o fato de que o movimento restrito dos microrganismos no solo, em muito afeta a biodegradação dos contaminantes, dado seu reduzido acesso aos nutrientes e aos próprios contaminantes a serem degradados (PROVIDENTI et al., 1993). Em um biorreator essa limitação pode ser totalmente contornada através da instalação de um sistema de homogeneização/mistura adequado.

O emprego de biorreatores torna-se uma alternativa ainda mais promissora nos casos de contaminação de solos tropicais (de natureza argilosa), em função da baixa aplicabilidade das demais técnicas de biorremediação neste tipo de solo. Isto se deve, em especial à formação de um sistema e mistura deficiente já que a baixa permeabilidade apresentada por esse tipo de solo dificulta a incorporação de oxigênio e nutrientes fundamentais à biodegradação. No tratamento em biorreatores esta dificuldade é contornada através de sistemas eficientes de homogeneização e aeração.

Capítulo 2

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho de tese de doutorado foi selecionar, em escala laboratorial, a melhor configuração de um biorreator a ser empregado no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, bem como definir as condições ideais de operação do mesmo.

Os objetivos específicos foram:

- ⇒ Adequar e otimizar as necessidades nutricionais do consórcio microbiano envolvido no processo de biorremediação de dois solos contaminados com petróleo em microcosmos.
- ⇒ Avaliar o efeito da incorporação de material estruturante de origem orgânica aos solos estudados.
- ⇒ Avaliar o desempenho de configurações de biorreatores que comportem maiores teores de sólidos.
- ⇒ Avaliar a eficiência do sistema de tratamento desenvolvido (biorreator) na redução do teor de óleo contaminante dos dois solos estudados.

Capítulo 3

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O Petróleo: origem, composição e atividades potencialmente poluidoras

Ao longo da história da Terra, grande quantidade de organismos animais e vegetais foi, lentamente, depositando-se no fundo dos lagos e mares. Pela ação do calor e da pressão, provocada pelo seguido empilhamento das camadas geológicas, estes depósitos orgânicos foram transformados, face às reações termoquímicas, em petróleo (óleo cru e gás). O petróleo bruto possui em sua composição moléculas de hidrocarbonetos, cujas frações leves formam os gases e as frações pesadas o óleo cru. Por isto, o petróleo é definido como uma mistura complexa de hidrocarbonetos sólidos, líquidos e gasosos (CORRÊA, 2003).

O petróleo foi um dos primeiros recursos naturais que nossos antepassados aprenderam a usar. No entanto, sua utilização mais intensa só começou por volta de 1847 quando um comerciante de Pittsbourg (Pensilvânia, EUA) começou a engarrafar e vender petróleo proveniente de vazamentos naturais, para ser utilizado como lubrificante (CORRÊA, 2003). Cinco anos mais tarde (1852), um químico canadense descobriu que o aquecimento e a destilação do petróleo produzia um líquido que podia ser utilizado em lâmpadas, o querosene. No entanto, somente em agosto de 1859 foi perfurado o primeiro poço de petróleo em Titusville, Pensilvânia (EUA). A partir daí o petróleo passou a ser utilizado em larga escala, substituindo os combustíveis disponíveis, principalmente o carvão, na indústria, e os óleos de rícino e de baleia, na iluminação. Com a invenção dos motores a explosão, no final do século XIX, teve início o emprego de frações até então desprezadas do petróleo, e suas aplicações multiplicaram-se rapidamente. No final do século XIX, dez países já extraíam petróleo de seus subsolos (PETROBRAS, 2005).

No Brasil, apesar das primeiras concessões terem sido outorgadas pelo Imperador em 1858, na Bahia, e da primeira perfuração ter sido realizada no final do século XIX em Bofefes, São Paulo, foi somente a partir de 1919 que as atividades de perfuração se tornaram mais freqüentes. Em 1939, na localidade de Lobato, na Bahia, foi obtido petróleo pela primeira vez no território brasileiro, surgindo assim a indústria nacional do petróleo (PETROBRAS, 2005).

O petróleo é uma matéria-prima essencial à vida moderna, sendo o componente básico de mais de 6.000 produtos. Dele se produz gasolina, combustível de aviação, gás de cozinha, lubrificantes, borrachas, plásticos, tecidos sintéticos, tintas e até mesmo

energia elétrica. O petróleo é responsável ainda por cerca de 34% da energia utilizada no Brasil (PETROBRAS, 2005).

Conforme citado anteriormente, o petróleo é um produto da decomposição de matéria orgânica armazenada em sedimentos, que migra através de aqüíferos e fica aprisionado em reservatórios. Aproximadamente 600 bilhões de barris de petróleo já foram extraídos do subsolo, porém, muito óleo adicional tem sido localizado por perfurações e ainda está para ser extraído. No entanto, uma grande quantidade permanece para ser encontrada. Estima-se que, considerando todas as bacias sedimentares do mundo, algo em torno de 1,5 e 3,0 trilhões de barris de petróleo poderão ainda vir a serem descobertos (CORRÊA, 2003).

Da etapa de exploração até a comercialização de seus derivados ("do poço ao posto") alguns impactos ambientais podem ser identificados durante o processamento do petróleo. Esses impactos vão desde as conseqüências dos estudos sísmicos realizados na etapa de exploração, passando pela geração de resíduos (sólidos e líquidos) e emissões atmosféricas durante o processo de refino, até as conseqüências de eventuais vazamentos acidentais ocorridos em terra ou em mar (CORRÊA, 2003).

Nas fases de perfuração e produção, os cuidados maiores são com o lançamento de resíduos, entre eles a lama de perfuração, além da prevenção e do controle de acidentes nos poços. No transporte de petróleo e derivados a preocupação é com a adoção de medidas preventivas e de controle, para evitar derrames de óleo. Nas refinarias, têm sido desenvolvidos e implantados sistemas de tratamento para todas as emissões atmosféricas potencialmente poluidoras (chaminés, filtros, etc.) e para os despejos líquidos, que são tratados por processos físico-químicos e/ou biológicos. Já os resíduos sólidos podem ser encaminhados para reciclagem (quando possível) ou serem tratados em unidades de recuperação de óleo e/ou de tratamento biológico (biorremediação) (PETROBRAS, 2005). Pode-se afirmar que de todas as etapas que compõem a cadeia produtiva do petróleo, o transporte, a exploração e produção em terra e a comercialização são as que potencialmente podem vir a poluir os solos.

3.2. Solo

3.2.1. Aspectos gerais

O planeta Terra é constituído de 3 partes, a atmosfera, a hidrosfera e a geosfera, que interagem constantemente entre si através da ação de agentes físicos, químicos e

biológicos. Dessa interação permanente surgiu o solo, definido como uma mistura de compostos minerais e orgânicos, que continua em constante transformação, pois as interações não param de acontecer. Além disso, a ação antropogênica tem agilizado de forma assustadora essas transformações (LUCHESE *et al.*, 2001).

Sob a ação do conjunto de fenômenos biológicos, físicos e químicos, o solo começa a se formar, organizando-se na forma de camadas sobrepostas de aspecto e constituição diferentes. Essas camadas são aproximadamente paralelas à superfície, e denominadas horizontes. O conjunto de horizontes, num corte vertical que vai da superfície até o material semelhante ao que deu origem ao solo é o perfil do solo. O perfil de um solo completo e bem desenvolvido possui basicamente seis tipos de horizontes, que costumavam ser chamados de "horizontes principais" (Figura 3.1) e são convencionalmente identificados pelas letras maiúsculas O, A, E, B, C e R (NRCS *Soils*) (LUCHESE *et al.*, 2001).

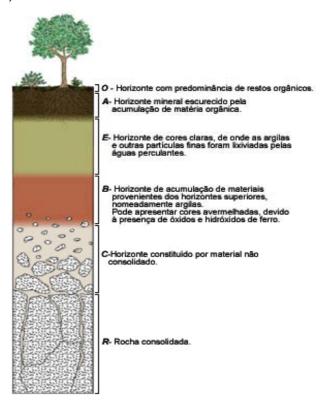


Figura 3.1. Esquema de um perfil de solo mostrando os principais horizontes (Fonte: SANTOS, 2007)

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

Em um solo encontram-se três fases fundamentais: a sólida, a líquida e a gasosa.

A fase sólida ocupa 50%, em média, do volume total de um solo, sendo constituída por minerais provenientes da decomposição da rocha mãe pela meteorização ou intemperismo, e da matéria orgânica, em constante processo de mineralização e humidificação. A concentração de matéria orgânica presente em um solo pode variar de 0,5% em solos desérticos até 95% em solos turfosos, sendo que essa concentração normalmente decresce à medida que a profundidade do solo aumenta (LUCHESE *et al.*, 2001).

A fase líquida, ou solução do solo, encontra-se nos espaços vazios da fase sólida, denominados de poros do solo, e pode ocupar entre 15 e 35% do volume total do solo. Nessa solução encontram-se os nutrientes na forma iônica ou complexados (LUCHESE et al., 2001).

Da mesma forma, a fase gasosa, ou ar do solo, encontra-se nos poros da fase sólida e, por esse motivo, disputa o mesmo espaço com a fase líquida. Seus volumes são inversamente proporcionais. Num momento de capacidade máxima de retenção de água de um solo, o teor de ar deste solo tende a zero. O ar do solo assemelha-se ao ar atmosférico, pois provém deste. No entanto, a atividade biológica no solo, dentre outros fatores, pode causar alterações na composição do mesmo (LUCHESE *et al.*, 2001). A composição dos solos pode ser variável, sendo normalmente dependente das características da sua formação. Porém, de modo geral, costuma-se dizer que um solo constitui-se de: 20-30% de ar, 20-30% de água, 45% de minerais e 5% de matéria orgânica.

3.2.2. Contaminação dos solos

O solo é reconhecido como um recurso natural básico, sendo um componente fundamental dos ecossistemas e dos ciclos naturais, um reservatório de água, um suporte essencial da atividade agrícola e um espaço para as atividades humanas. No entanto, a integridade desse recurso pode, algumas vezes, ser comprometida por desenvolvimento sócio-econômico atividades antropogênicas inerentes ao humanidade, quando as mesmas são realizadas sem o comprometimento com a preservação ambiental. A degradação do solo pode ocorrer por meio da desertificação, pelo uso de tecnologias inadequadas, pela falta de conservação, pela destruição da vegetação (desmatamento queimadas), dentre ou outros (http://www.ambientebrasil.com.br, 2005).

A contaminação do solo e do subsolo consiste na deposição, disposição, descarga, infiltração, acumulação, injeção ou aterramento de substâncias ou produtos poluentes, em estado sólido, líquido ou gasoso. Assim, pode-se concluir que essa contaminação ocorrerá sempre que houver adição de compostos que modifiquem as características naturais do solo e suas utilizações, produzindo efeitos negativos no mesmo (AMBIENTE BRASIL, 2005).

A contaminação de solos pela introdução de óleo no meio ambiente não se constitui em uma novidade; ao contrário, há registros desse tipo de poluição desde 1754. No entanto, conforme citado por Ururahy (1998), foi a partir da década de 60 que as atenções se voltaram para essa realidade e várias técnicas de tratamento passaram a ser adotadas. Essas técnicas baseiam-se em processos físicos (lavagem, extração à vapor), químicos (extração por solvente, processos oxidativos avançados - POAs, desalogenação química, correções superficiais), térmicos (dessorção térmica, incineração) e biológicos ("landfarming", biopilhas, biorreatores etc.). No entanto, o tipo de tratamento a ser adotado deve ser analisado individualmente, avaliando-se as peculiaridades de cada contaminante e os custos envolvidos. Na Tabela 3.1 encontramse os custos relativos a alguns dos diferentes tipos de tratamento empregados para solos contaminados.

Tabela 3.1. Custo estimado de remediação de solos para diferentes tipos de tratamento. (Fontes: SANTOS, 2007; SEMPLE et al. apud TRINDADE, 2002.)

tratamento. (Fontes. SANTOS, 2007, SEMPLE et al. apud TRINDADE, 2002.)	
TRATAMENTO	CUSTO ESTIMADO DE REMEDIAÇÃO (U\$/ TONELADA)
Remoção para Aterros	Acima de 100
Processos Físicos:	
Lavagem do solo	25-150
Lavagem físico-química	50-175
Extração à vapor	75
Processos Químicos:	
Extração por solvente	50-600
Desalogenação química	175-450
Correções superficiais	10-25
Tratamentos Térmicos:	
Dessorção térmica	25-225
Incineração	50-1200
Tratamentos Biológicos:	
Air sparging e Biosparging	20 - 50
Bioslurping (custo de implantação)	200.000
Landfarming	10-90
Bioventilação	15-90
Biorreatores de lama	30-85
Biopilhas	15-35
Fitorremediação	O custo da remediação de um acre
-	(40470 m ²) de solo contaminado para
	uma profundidade de 50 cm é estimado
	ser de US\$60 a US\$100 mil.

No que toca aos processos biológicos de tratamento de solos, uma variedade de tecnologias já são utilizadas freqüentemente e novas e promissoras ferramentas têm sido desenvolvidas a fim de alcançar estágios avançados de tratamento, conforme poderá ser verificado oportunamente ao longo desse trabalho. No entanto, a aceitação da biorremediação como uma tecnologia viável, ainda depende da relação custo/benefício e os métodos empregados precisam ter no máximo os mesmos custos dos tratamentos químicos e físicos existentes (TRINDADE, 2002).

3.3. Biorremediação: Aspectos Gerais e Fatores que Afetam o Processo

Várias são as definições encontradas na literatura, porém destaca-se a adotada pela Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA) de cunho genérico sobre a prática da biorremediação: Biorremediação é o processo de tratamento que utiliza a ocorrência natural de microrganismos para degradar substâncias toxicamente perigosas transformando-as em substâncias menos ou não tóxicas. Já o Escritório de Estudos Geológicos do Departamento do Interior do Governo Americano (USGS), por sua vez, adota a definição do American Heritage Dictionary of the American Language que define biorremediação como: O uso de agentes biológicos tais como bactérias e plantas, para remover ou neutralizar contaminantes, como poluentes do solo e da água (CHAPELLE apud MARTINS et al., 2003).

Seja qual for a definição adotada, o fundamental para que o processo de biorremediação ocorra de forma eficaz é o correto estabelecimento de condições ambientais adequadas. Caso isto não aconteça, o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos envolvidos no processo de degradação serão severamente afetados e, conseqüentemente, a biorremediação dos compostos poluentes ficará comprometida.

Do ponto de vista prático, segundo Moreira e Siqueira (2002), a biorremediação é fundamentada em três aspectos microbiológicos principais, os quais serão abordados ao longo do presente trabalho:

- a). A existência de microrganismos com capacidade catabólica para degradar o contaminante;
- b). A disponibilidade ou a acessibilidade do contaminante ao ataque microbiano ou enzimático;
- c). A existência de condições ambientais adequadas para o crescimento e atividade do agente biorremediador.

Providenti et al. (1993) afirmam que as condições ambientais podem afetar o processo de biodegradação em dois níveis: influenciando o crescimento e a atividade microbiana e influenciando também as propriedades físicas e químicas dos poluentes. Os efeitos das diferentes condições ambientais impostas ao sistema solo/poluentes/microbiota podem ser interativos, o que torna difícil prever um modelo de comportamento deste sistema. A otimização das condições ambientais é, portanto, uma etapa fundamental no desenvolvimento de qualquer tecnologia a ser adotada no processo de biorremediação de solos contaminados.

A seguir são apresentados alguns dos principais fatores que afetam o processo de biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo.

3.3.1. Aeração

Condições aeróbias são necessárias para que ocorra a biodegradação relativamente rápida de hidrocarbonetos de petróleo, uma vez que a degradação anaeróbia destes compostos já foi demonstrada como sendo extremamente lenta (BANERJI et al., 1995).

O oxigênio é utilizado pelos microrganismos não só como aceptor final de elétrons na respiração aeróbia, mas também como substrato nas reações biodegradativas catalisadas pela enzima oxigenase. Isto inclui o rompimento dos anéis, a hidroxilação dos compostos aromáticos e a oxidação dos compostos alifáticos (PROVIDENTI *et al.*, 1993). A adequada aeração do sistema solo/contaminante é, portanto, essencial ao processo de biodegradação aeróbia.

3.3.2. Nutrientes

Em geral, para sobreviver, os microrganismos necessitam de fontes de nutrientes e de um aceptor final de elétrons. Organismos aeróbios envolvidos no processo de biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, como citado anteriormente, utilizam o oxigênio como o aceptor final de elétrons e o carbono orgânico, proveniente dos contaminantes, como fonte de carbono. Nitrogênio, fósforo e potássio são, por sua vez, os principais nutrientes inorgânicos adicionados, se necessário, durante os processos de biorremediação. Com o objetivo de prevenir limitações nutricionais durante o tratamento biológico utiliza-se, normalmente, a relação C:N:P:K de 100:10:1:1, baseada no teor de carbono orgânico (LALLY e RUSSEL, 1996). No entanto, Deuel e Holliday (1997) sugerem uma relação C:N:P:K de 150:1:0,25:0,25 como sendo suficiente

para suportar o crescimento e a atividade microbiana durante o processo de degradação de poluentes orgânicos em solos.

O nitrogênio pode ser adicionado na forma de uréia, cloreto de amônio ou nitrato de amônia. Segundo Alexander (1999), essas fontes de nitrogênio são facilmente assimiladas pelo metabolismo bacteriano. Já o fósforo pode ser adicionado na forma de fosfato de sódio, fosfato de potássio, sais orto-fosfórico e polifosfato (DEUEL e HOLLIDAY, 1997).

Muitos estudos relatam que a adição de nitrogênio e fósforo aumenta a biodegradação de óleo cru e seus derivados, sem que sejam observados danos ao meio ambiente (LEAHY e COLWELL, 1990; MARGESIN e SCHINNER, 1997; LIN *et al.*, 1999; WALWORTH *et al.*, 1997). No entanto, em estudo visando o estabelecimento das relações nutricionais adequadas para a biorremediação de solo areno-argiloso contaminado por óleo cru, Soriano (2001) verificou que dosagens excessivas, principalmente do nitrogênio, podem interferir negativamente no processo de biodegradação. O mesmo efeito inibitório foi comprovado por Trindade *et al.* (2005) tendo como base estudos realizados por Walworth *et al.* (2001).

3.3.3. Umidade

Durante o processo de biorremediação de solos contaminados o teor de umidade deve ser mantido entre 50-80% da capacidade de campo do solo para que taxas ótimas de degradação sejam obtidas (DEUEL e HOLLIDAY, 1997). Woo e Park (1999) citam que para o caso específico do tratamento em biorreatores, na prática, o teor de umidade necessário à operação ótima do sistema vai variar de acordo com a textura do solo contaminado.

Sabe-se que reduzidos teores de umidade afetam negativamente o metabolismo microbiano, a movimentação dos microrganismos no solo, assim como o transporte dos nutrientes através deste. Por outro lado, teores excessivos de umidade limitam o transporte de oxigênio no solo (PROVIDENTI *et al.*, 1993). A definição do teor de umidade adequado a ser adotado no tratamento biológico de solos contaminados, seja em biorreatores, seja em biopilhas ou "landfarming", constitui-se portanto, na etapa fundamental da otimização do processo de biorremediação.

3.3.4. pH

A atividade microbiana é fortemente dependente do pH do meio. Da mesma forma, a solubilidade dos contaminantes e a sorção destes ao solo podem variar em função do pH (PROVIDENTI *et al.*, 1993). Segundo Alexander (1999), a biodegradação tende a ser mais efetiva nas faixas de pH em torno da neutralidade.

3.3.5. Temperatura

A temperatura tem profundo efeito não só nas características físicas (solubilidade, sorção, viscosidade, volatilização) dos contaminantes presentes no solo, mas também no metabolismo microbiano (PROVIDENTI *et al.*, 1993; BANEJI *et al.*, 1995). Em temperaturas baixas, hidrocarbonetos líquidos se transformam em parafinas sólidas, hidrocarbonetos solúveis precipitam e ocorre uma queda considerável na solubilidade destes. Estas características físicas alteradas podem interferir significativamente na disponibilização destes contaminantes para os microrganismos responsáveis pela biodegradação, afetando assim as taxas de degradação dos mesmos.

3.3.6. Agitação

Os microrganismos, como se sabe, não se dispersam facilmente no solo e não possuem a habilidade de se movimentar de um ponto de contaminação para outro. Este movimento restrito dos microrganismos no solo pode afetar severamente a biodegradação dos contaminantes, uma vez que o substrato precisa estar disponível e acessível tanto para os microrganismos quanto para suas enzimas extracelulares, para que a metabolização dos mesmos ocorra (PROVIDENTI et al., 1993). O movimento é importante para que os microrganismos atinjam as interfaces onde nutrientes, contaminantes e outros microrganismos estejam agregados. Para que a biodegradação efetiva de compostos pouco solúveis ocorra é necessário um contato estreito entre as células e os poluentes.

A adição de água, citada por muitos autores como uma alternativa atrativa, pode auxiliar no aumento do movimento microbiano, porém, esbarra na possibilidade de lixiviação dos poluentes para o lençol freático (no caso de tratamento *in-situ*) e na limitação ao transporte de oxigênio no meio, quando teores excessivos de umidade são adicionados (PROVIDENTI *et al.*, 1993).

Freqüentemente a agitação mecânica, utilizada em algumas técnicas de biorremediação para aumentar a aeração do solo, facilita também a dispersão deste microrganismos degradadores (PROVIDENTI et al., 1993). Diferentes sistemas de agitação vêm sendo estudados de forma a maximizar o contato entre microrganismos e

contaminantes durante o processo de biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo (ALEF e NANNIPIERI, 1995; http://www.icp.ecp.com/home/oferta/icp/pos-semi-biodegradacion.htm, 2003).

3.3.7. Disponibilização dos contaminantes

A baixa disponibilização, para os microrganismos, de muitos dos contaminantes encontrados em solos é um dos principais fatores que interferem no processo de biodegradação. Mesmo quando microrganismos capazes de degradar os poluentes estão presentes no sistema e todas as condições ambientais estão adequadas, a impossibilidade destes microrganismos em entrar em contato com os compostos poluentes pode vir a interferir negativamente nas taxas de degradação (PROVIDENTI et al., 1993; SEMPLE et al., 2004; HAWS et al., 2006).

Não são só as limitações relacionadas ao movimento restrito dos microrganismos no solo, citadas anteriormente, que podem afetar severamente a biodegradação dos contaminantes. Vários autores (PROVIDENTI *et al.*, 1993; ALEF e NANNIPIERI, 199;5 BOOPATHY, 2000) indicam que a baixa solubilidade dos contaminantes é um dos fatores que pode influenciar no crescimento microbiano e, conseqüentemente, na biodegradação dos hidrocarbonetos.

Adicionalmente, são sugeridos outros possíveis fatores limitantes à biodegradação como, por exemplo, a não emulsificação adequada dos hidrocarbonetos, o que resulta em pequenas áreas superficiais para contato com as células microbianas. Sabe-se que, microrganismos que apresentam a capacidade de adesão a compostos hidrofóbicos podem solubilizá-los e, assim, promover a metabolização e a degradação dos mesmos (PROVIDENTI et al., 1993). Sendo assim, uma tentativa de incrementar a metabolização e conseqüentemente a biodegradação de hidrocarbonetos é aumentar a solubilização destes compostos empregando, por exemplo, surfactantes (ALEXANDER, 1999).

3.3.8. Tipo de solo

No caso do tratamento biológico de solos contaminados, o tipo de solo a ser tratado também exerce papel importante na determinação da eficiência da biodegradação (PALA *et al.*, 2006).

A metabolização e a biodegradação de muitos poluentes podem ser limitadas pela sorção (adsorção ou absorção) dos compostos aos componentes do solo. A sorção é responsável pelo "aprisionamento" dos contaminantes, removendo-os do estado dissolvido. Se os compostos encontram-se fortemente sorvidos, eles podem se

apresentar indisponíveis aos microrganismos, limitando assim a sua biodegradação. Por outro lado, a sorção pode reduzir/minimizar alguns dos efeitos tóxicos dos poluentes no solo através da baixa disponibilização dos mesmos. Desta forma, o comportamento dos contaminantes no solo é influenciado pela competição dos processos de biodegradação e sorção (PROVIDENTI *et al.*, 1993). Em geral, a sorção de compostos hidrofóbicos neutros em solos é dependente do teor de matéria orgânica presente neste solo. Segundo Providenti *et al.* (1993) a sorção aumenta com o aumento do percentual de matéria orgânica e, conseqüentemente, a biodegradação diminui.

Scherr *et al.* (2007), em recente trabalho de avaliação das interações existentes entre os compostos orgânicos e os constituintes do solo, verificaram que o tipo de solo interfere diretamente na extensão da biodegradação dos contaminantes sob dois aspectos: i). na biodisponibilidade do contaminante e ii). na estrutura e densidade da população microbiana degradadora.

Woo e Park (1999) ressaltam que a textura do solo contaminado determina, em grande parte, a umidade ótima requerida para a operação de biorreatores, variável que se encontra intimamente relacionada ao grau de mistura e à aglomeração. Truax *et al.* (1995) e Boopathy (2000) vão mais além e chamam a atenção para o fato de que a forte dependência entre os parâmetros de processo (comportamento mecânico e biodegradabilidade) e a textura do solo, resulta das diferentes propriedades de superfície de frações tais como areia, silte e argila, que compõem o mesmo.

Conforme citado por Providenti et al. (1993), esforços vêm sendo realizados no sentido de superar os fatores limitantes à biodegradação de contaminantes em solos. Problemas relacionados aos microrganismos podem ser superados através (a) do isolamento de espécies ou consórcios degradadores; (b) do melhoramento de formulações e métodos de inoculação para introdução de microrganismos nos solos contaminados e/ou (c) do melhoramento da atividade degradadora de microrganismos endógenos. Já problemas relacionados com a disponibilização dos contaminantes e com a dispersão dos microrganismos podem ser superados através do uso de surfactantes e homogeneização sistema solo/contaminante/microbiota, adequada do respectivamente. Por outro lado, se as condições ambientais são originalmente inadequadas, limitando assim a biodegradação dos poluentes, o uso de biorreatores deve então ser considerado uma vez que nestes é possível o controle efetivo e a otimização destas condições como por exemplo, a aeração, o teor de umidade, o grau de mistura e a temperatura.

3.4. Os Microrganismos do Solo e seu Papel na Degradação de Poluentes Orgânicos

Segundo Bernoth *et al.* (2000), tanto compostos orgânicos como inorgânicos podem ser biodegradados ou transformados através de processos microbianos. Nas aplicações mais comuns da biorremediação, microrganismos que ocorrem naturalmente, em solos ou águas contaminados, são estimulados a acelerar a degradação de contaminantes orgânicos, como os hidrocarbonetos de petróleo, através da manipulação de condições ambientais tais como suprimento de oxigênio, concentração de nutrientes e teor de umidade.

O solo é um habitat bastante peculiar com relação a outros habitats terrestres devido a sua natureza heterogênea complexa e dinâmica. Estas características permitem que organismos com metabolismos completamente distintos possam conviver lado a lado, interagindo em um estado de equilíbrio dinâmico, muitas vezes com relações de dependência essenciais para a sua sobrevivência. Quanto maior a complexidade da comunidade biológica, como ocorre na maioria dos solos, maior é a sua estabilidade (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

Os microrganismos que habitam o solo realizam atividades imprescindíveis para a manutenção e sobrevivência também das comunidades vegetais e animais. Como citado por Louis Pasteur: "O papel dos infinitamente pequenos é infinitamente grande". No solo, as atividades principais dos organismos são: decomposição da matéria orgânica, produção de húmus, ciclagem de nutrientes e energia, fixação de nitrogênio atmosférico, produção de compostos complexos que causam agregação do solo, decomposição dos poluentes e controle biológico de pragas e doenças (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

A biota do solo inclui representantes de todos os grupos de microrganismos (bactérias, fungos, algas) e cada microhabitat do solo, em um tempo ou outro, pode conter células de diferentes espécies que podem estar interagindo positivamente ou negativamente (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). Um exemplo de interação é a simbiose

que é definida como a associação permanente, ou prolongada, entre organismos dissimilares que é caracterizada por contato físico, troca de metabólitos e de nutrientes, integração morfológica e fisiológica e regulação funcional entre parceiros (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). Outros exemplos de interações positivas são comensalismo, protocooperação, e mutualismo. Já como interações negativas, pode-se citar a competição, o parasitismo e a predação.

A presença de um microrganismo específico em determinado solo é função das condições ambientais dominantes e dos limites de sua bagagem genética (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). Algumas espécies de microrganismos podem sobreviver em condições extremas de salinidade, temperatura, pressão e pH. Além disso, os microrganismos, de modo geral, são bastante versáteis em adaptar-se a mudanças ambientais. Limitações físicas (umidade, aeração, porosidade) e (disponibilidade de nutrientes e toxicidade de elementos como metais pesados e hidrocarbonetos) podem ocorrer nos solos, porém muitas espécies são capazes de se adaptar a essas condições (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). A adoção de práticas de recuperação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo através da aplicação de técnicas de biorremediação vale-se justamente dessa versatilidade microbiana, uma vez que os microrganismos envolvidos no processo desenvolvem, ou apresentam naturalmente, a capacidade de utilizar o composto poluente como fonte de carbono e energia na ausência de uma fonte mais facilmente assimilável.

Romantschuk *et al. apud* Trindade (2002), citam que existem, pelo menos, duas principais situações que resultam em microrganismos capazes de degradar um ou mais compostos orgânicos:

- A microbiota nativa é exposta ao contaminante por um período suficientemente longo para a evolução genética criar a rota metabólica de degradação do composto. Este tipo de evolução acontece constantemente, porém, é relativamente lenta. Como conseqüência, a comunidade microbiana possui a rota de degradação, mas a degradação pode ser ineficiente devido à baixa concentração celular ou pelo baixo nível de atividade microbiana;
- A microbiota nativa, a qual está adaptada às condições locais, é exposta ao contaminante xenobiótico e esta população adquire genes e rotas de degradação de microrganismos imigrados naturalmente de outro local. A transferência de material genético pode ocorrer por conjugação, transdução ou por transformação.

Todos estes processos ocorrem nos ambientes naturais, porém também são relativamente lentos.

No entanto, a lentidão e ineficiência notada nestes processos naturais podem ser contornadas pela introdução, ao local contaminado, de microrganismos exógenos que possuem as rotas metabólicas de degradação os quais agem, desta forma, como doadores de material genético e também pela introdução de microrganismos modificados geneticamente os quais possuem rotas obtidas artificialmente em laboratórios (TRINDADE, 2002; WATANABE, 2001). Essas duas opções de aumento da atividade microbiana e, conseqüentemente, da eficiência do processo de biorremediação serão melhor discutidas mais adiante nesse trabalho.

A diversidade metabólica e o curto tempo de geração das bactérias caracterizamnas como boas iniciadoras das reações de biodegradação de poluentes (SÁ, 2002).

Dentre os gêneros de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo predominam *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* e *Micrococcus* (LEBLANC e FITZGERALD, 1990; DAS e MUKHERJEE, 2007). Vasudevan e Rajaram (2001) identificaram os gêneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium* e *Aeromonas* como constituintes de um consórcio isolado de um solo contaminado com óleo cru. Von der Wied *et al.*, (2007) recentemente isolaram de um solo contaminado com óleo cru, coletado de uma área de preservação ambiental de floresta tropical (Reserva Biologia de Poço das Antas, Brasil), uma nova linhagem de bactéria degradadora e a identificaram, através de testes morfológicos, bioquímicos e genotípicos, como sendo da espécie *Dietzia cinnamea*.

Embora as bactérias sejam responsáveis pela biodegradação da maioria dos hidrocarbonetos, algumas espécies de fungos filamentosos e leveduras têm habilidade de degradar esses compostos (PRINCE, 1993).

Os fungos filamentosos são considerados mais eficientes do que as bactérias sob condições adversas do processo como, por exemplo, valores extremos de pH, limitação de nutrientes e baixos teores de umidade. Dentre os fungos filamentosos, algumas linhagens de *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. são reconhecidas como sendo capazes de degradar uma maior quantidade de hidrocarbonetos. Além destes, Colombo *et al.* (1996) constataram o consumo de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos por linhagens dos gêneros *Pleurotus*, *Trametes e Coriolopsis*.

A vantagem do emprego de fungos filamentosos em relação às bactérias que habitam os solos contaminados, por exemplo, reside na capacidade que os primeiros possuem em excretar enzimas que atacam diretamente os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs), enquanto que as bactérias possuem um sistema enzimático intracelular. Além disso, os fungos são capazes de degradar moléculas de HPAs de alta massa molar (quatro ou mais anéis), enquanto que a maioria das bactérias limita-se à degradação de HPAs de baixa massa molar (GROTENHUIS *et al.*, 1998; DRITSA *et al.*, 2007; LEONARDI *et al.*, 2007).

Em alguns estudos envolvendo a utilização de hidrocarbonetos de petróleo por leveduras, relata-se que diferentes espécies do gênero *Candida* demonstraram preferência em degradar hidrocarbonetos de cadeias lineares (SÁ, 2002). Outros trabalhos demonstram que leveduras pertencentes aos gêneros *Sporobolomyces* e *Rhodotorula* foram capazes de degradar hidrocarbonetos alifáticos, cíclicos e aromáticos (DEL'ARCO, 1999). Atlas (1991) citou outros gêneros de leveduras com esta mesma capacidade: *Saccharomyces*, *Candida*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Trichosporium* e *Cladosporium*. Sá (2002) em estudo envolvendo a biorremediação de solo tropical contaminado com óleo cru isolou e identificou como uma das principais linhagens degradadoras do poluente orgânico, uma levedura da espécie *Rhodotorula glutinis var. dairenesis*.

Poucos estudos têm sido conduzidos a fim de investigar o potencial de degradação de hidrocarbonetos por espécies de algas. Cerniglia et al. (1992) observaram que nove cianobactérias, cinco algas verdes, uma alga vermelha, uma alga marrom e duas diatomáceas foram capazes de degradar naftaleno em meio líquido. Leahy e Colwell (1990) relataram que a alga *Protolheca zopfii* degradou 40% dos hidrocarbonetos contidos no óleo cru quando este foi utilizado como substrato.

Reconhecidamente, as bactérias são os principais microrganismos degradadores de hidrocarbonetos envolvidos no processo de biorremediação de solos, uma vez que com o aumento da profundidade do solo, o número de bactérias não é drasticamente afetado, enquanto o número de fungos ou actinomicetos diminui. Este aumento da população bacteriana é atribuído à habilidade das bactérias utilizarem outros aceptores de elétrons que não o oxigênio (BOOPATHY, 2000). Esta presença acentuada da população bacteriana em solos pode ser observada através dos dados apresentados na Tabela 3.2:

Tabela 3.2. Distribuição Típica da População Microbiana em Solos e Água Subterrânea

MICRORGANISMOS	POPULAÇÃO		
	Superfície (nº de células/g de solo)		
Bactérias	10 ⁸ -10 ⁹		
Actinomicetos	10 ⁷ -10 ⁸		
Fungos	10 ⁵ -10 ⁶		
Algas	10 ⁴ -10 ⁵		
	Subsolo (nº de células/g de solo)		
Bactérias	10 ³ -10 ⁷		
	Água Subterrânea (n° de células/ml)		
Bactérias	10 ² -10 ⁵		

Fonte: Vieira apud Trindade (2002).

De acordo com o que foi apresentado anteriormente, fica clara a existência de uma ampla variedade de microrganismos com habilidade para utilizar hidrocarbonetos. Um resumo dos microrganismos encontrados na literatura com esta habilidade encontra-se na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Gêneros Microbianos Degradadores de Hidrocarbonetos

_		FUNGOS			
BACTÉRIAS		LEVEDURAS	FILAMENTOSOS	3	ALGAS
Achromobacter Acinetobacter Aeromonas Agrobacterium Alcaligenes Arthrobacter Bacillus Brevibacterium Chromobacterium Comamonas Corynebacterium Cytiphaga Flavobacterium Gluconobacter Micrococcus	Mycobacterium Nocardia Pasteurella Proteus Pseudomonas Rhodococcus Sarcina Serratia Streptomyces Vibrio Xanthomonas	Candida Debaryomyces Rhodotorula Sporobolomyces	Acremonium Aspergillus Aureobasidium Beauveria Botrytis Ceriporiopsis Chrysosporium Cladosporium Cochliobolus Colorospora Coniothyrium Coriolopsis Cryphonectria Cylindrocarpon Dendryphiella Drechslera Fusarium Geotrichum Glicocladium Gongronella	Graphium Humicola Lulwortria Mortierella Mucor Oxyoirus Paecilomyces Penicillium Phialophora Phoma Pleurotus Rhizopus Scolecobasidium Scopulariopsis Spicaria Tolypocladium Trametes Trichoderma Varicosporina Verticilium	Prototheca zopfii

Fonte: Trindade (2002); Sá (2002).

Apesar da enorme diversidade microbiana encontrada no solo (WATANABE, 2001) e da presença de várias espécies potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos, deve-se lembrar, conforme citado por Moreira e Siqueira (2002), que somente uma pequena fração da biomassa do solo tem atividade heterotrófica, e, normalmente, apenas

parte desta é competente para a degradação do composto poluente de interesse. Além disso, deve-se considerar que o processo de degradação é na maioria das vezes executado por um consórcio microbiano, e não por uma única população microbiana, o que exige interações controladas e equilibradas entre os componentes de uma comunidade degradadora.

Nos últimos 20 anos, várias pesquisas vêm sendo realizadas com a finalidade de elucidar os mecanismos de biodegradação de hidrocarbonetos e os aspectos bioquímicos relacionados (PRINCE *et al.*, 1999).

Existem aproximadamente 200.000 compostos diferentes no óleo cru. Geralmente, todos aqueles que têm cadeias carbônicas curtas são facilmente degradados, já o aumento das cadeias implica em uma maior complexidade estrutural e, conseqüentemente, em uma diminuição do número de microrganismos capazes de degradar estes compostos. Algumas das maiores estruturas moleculares são insolúveis e a maioria dos microrganismos pode utilizar apenas os compostos dissolvidos em água (LEBLANC e FITZGERALD, 1990). Como conseqüência, observa-se entre os diversos hidrocarbonetos uma diferença em relação a sua susceptibilidade ao ataque microbiano. Em geral, a ordem decrescente de susceptibilidade é: n-alcanos > alcanos ramificados > compostos aromáticos de baixo peso molecular > ciclo-alcanos > compostos poliaromáticos > compostos polares (LEAHY e COLWELL, 1990).

Sabe-se que os hidrocarbonetos podem ser degradados através de três vias metabólicas: respiração aeróbica, respiração anaeróbia e via fermentativa (RATLEDGE, 1994). Na via aeróbia, a primeira etapa da biodegradação consiste na oxidação do hidrocarboneto, que é promovida por enzimas oxigenases. Nesta via o oxigênio é utilizado como aceptor final de elétrons e os produtos finais são, principalmente, CO₂ e H₂O. Na respiração anaeróbia substratos inorgânicos desempenham a função de aceptores finais de elétrons, onde o CO₂ é reduzido a metano, sulfato a sulfeto, nitrato a nitrogênio molecular ou íon amônio. Já a degradação por via fermentativa caracteriza-se por empregar os substratos fosforilados como aceptores finais de elétrons, resultando em compostos como CO₂, acetato, etanol, propionato e butirato (RATLEDGE, 1994; URURAHY, 1998).

Levando-se em consideração que a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em solo é prioritariamente regida por processos aeróbios, somente esta via metabólica de degradação será considerada como sendo a prioritária ao longo do desenvolvimento

deste trabalho. A decomposição aeróbica de um composto orgânico poluente (geralmente uma macromolécula) no solo é um processo biocatalítico complexo que envolve a ação das enzimas que produzem monômeros específicos em função da composição do substrato disponível.

3.5. Estratégias de Aumento da Eficácia dos Processos de Biorremediação

Conforme citado anteriormente, vários fatores relacionados ao contaminante e ao ambiente contaminado podem limitar a extensão dos processos de biodegradação. O estabelecimento de condições ambientais adequadas é fundamental para que o processo de biorremediação aconteça de forma eficaz. Caso isto não ocorra o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos envolvidos no processo serão severamente afetados e, conseqüentemente, a biodegradação dos compostos poluentes ficará comprometida.

Várias estratégias de biorremediação envolvendo o aumento da atividade microbiana podem ser empregadas em ambientes contaminados, a fim de acelerar o processo natural de biodegradação desses compostos. Dentre estas, as mais utilizadas para superar as limitações da atividade microbiana e, conseqüentemente, acelerar a degradação dos hidrocarbonetos poluentes são: adição de fontes de nutrientes e oxigênio ("Bioestimulo"); aumento da microbiota do solo através da adição de microrganismos endógenos ou exógenos ("Bioaumento" e/ou "Bioenriquecimento"); aumento da disponibilidade dos hidrocarbonetos ao ataque dos microrganismos através da adição de surfactantes ou de microrganismos com habilidade de produzir biosurfactantes; adição de microrganismos geneticamente modificados (OGM's) e a adição de material estruturante.

3.5.1. Bioestímulo

Para sobreviverem os microrganismos, de uma forma geral, necessitam de fontes de nutrientes e de um aceptor final de elétrons. Organismos aeróbios envolvidos no processo de biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo utilizam o oxigênio como o aceptor final de elétrons e o carbono orgânico, proveniente dos contaminantes, como principal fonte de carbono. Nitrogênio, fósforo e potássio são, por sua vez, os principais nutrientes inorgânicos adicionados, se necessário, durante os processos de biorremediação.

O bioestímulo é uma das estratégias mais adotadas em processos de recuperação de áreas impactadas e consiste na correção das condições nutricionais (nitrogênio, fósforo, potássio), de aeração, de umidade e de pH do solo, para aumentar a atividade da

população existente nas áreas contaminadas (ATLAS, 1981; LIN *et al.*, 1999; GOGOI *et al.*, 2003 AULENTA *et al.*, 2005; BENTO *et al.*, 2005; AYOTAMUNO *et al.*, 2006; SALINAS-MARTINEZ *et al.*, 2007).

O suprimento de oxigênio em sítios contaminados pode ser realizado através da adição de agentes oxidantes, tais como o peróxido de hidrogênio. No entanto, a realização de revolvimento/aragem e aeração forçada do solo são as práticas mais adotadas (BOOPATHY, 2000; VASUDEVAN e RAJARAM, 2000).

Durante o processo de biorremediação de solos contaminados o teor de umidade deve ser mantido entre 50-80% da capacidade de campo do solo para que taxas ótimas de degradação sejam obtidas (DEUEL e HOLLIDAY, 1997). Woo e Park (1999) citam que, na prática, o teor de umidade necessário à biodegradação dos poluentes vai variar de acordo com a textura do solo contaminado.

A atividade microbiana, por sua vez, é também fortemente dependente do pH do meio. Segundo Alexander (1999), em geral a biodegradação tende a ser mais efetiva nas faixas de pH em torno da neutralidade.

3.5.2. Bioaumento e bioenriquecimento

A densidade de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos presentes no solo contaminado a ser remediado é um fator que influencia a taxa e a extensão da biodegradação.

Em situações onde a população microbiana degradadora dos sítios contaminados é pequena ou não é capaz de degradar misturas complexas de hidrocarbonetos, como por exemplo, o óleo cru, a inoculação com uma concentração maior de microrganismos degradadores torna-se uma estratégia interessante. A mesma deve ser aplicada visando a aumentar a biodegradação do composto poluente e reduzir o período de adaptação dos microrganismos presentes nos locais contaminados. Esta estratégia recebe a denominação de **bioaumento**, quando os microrganismos inoculados são endógenos (extraídos do próprio solo contaminado, crescidos *in vitro* e re-introduzidos no ambiente em maior concentração), ou de **bioenriquecimento**, quando os microrganismos inoculados são exógenos (PROVIDENTI *et al.*, 1993; ROMANTSCHUK *et al.*, 2000). No entanto, alguns autores adotam o termo bioaumento para ambos os casos (VOGEL, 1996; MOREIRA e SIQUEIRA, 2002; HAMDIA *et al.*, 2007).

Destaca-se que para que a inoculação de microrganismos exógenos (bioenriquecimento) tenha sucesso, é necessário que os mesmos tenham habilidade de degradar a maior parte dos contaminantes, possuam estabilidade genética e alto nível de atividade enzimática, capacidade de competir com a população intrínseca do solo, não sejam patogênicos e não produzam substâncias tóxicas durante o processo de biodegradação (LEAHY e COLWELL, 1990; ROMANTSCHUK et al., 2000).

São relatados, na literatura, vários sucessos de aplicação da técnica de bioaumento em ambientes contaminados. Smith et al. (1997) obtiveram um aumento da biodegradação de misturas de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA's) após a inoculação do solo com um consórcio composto por bactérias degradadoras. Na revisão realizada por Leahy e Colwell (1990), foi descrito que a adição de bactérias no solo acelerou a taxa de biodegradação de pesticidas. Ghazali et al. (2004) avaliaram a biorremediação de solo contaminado com óleo diesel aplicando a técnica de bioaumento. Os autores verificaram que a introdução de uma formulação composta por 6 linhagens bacterianas (constituídas predominantemente por Bacillus e Pseudomonas sp.) isoladas de um solo contaminado com hidrocarbonetos e purificadas, efetivamente foi responsável por uma degradação significativa dos hidrocarbonetos inicialmente presentes no solo contaminado com óleo diesel (57% dos alcanos e 20 - 50% dos alifáticos) após 60 dias de ensaio.

Contrariamente, em ambientes onde já se estabeleceu um equilíbrio e a microbiota nativa encontra-se adaptada, tanto o bioaumento quanto o bioenriquecimento podem não acarretar aumento das taxas de biodegradação (ATLAS, 1995; ALEXANDER, 1999). Nestes casos, a simples bioestimulação da microbiota nativa pode ser mais eficiente.

Uma alternativa interessante é apresentada por Hamdia et al. (2007), na qual o bioaumento é realizado através do uso de um solo contaminado com HPA's, já tratado, como inóculo, sendo o mesmo adicionado a outro solo extremamente contaminado com HPA's (3000 mg HPAs/kg solo seco). Os autores obtiveram aumento de cerca de 496% na remoção de antraceno e pireno quando da adoção dessa variante da técnica de bioaumento, quando comparados aos ensaios realizados apenas com a adoção da técnica de bioestímulo da população nativa.

Particularmente, no que se refere à técnica de bioenriquecimento, a mesma pode ainda englobar a utilização de organismos geneticamente modificados (OGM's). A troca de material genético tem sido apresentada como um dos fatores que afetam a obtenção

da capacidade de biodegradação de hidrocarbonetos pelos microrganismos, durante o período de adaptação dos mesmos nas áreas contaminadas (SÁ, 2002). Essa troca de material genético pode ocorrer de forma natural, através da transferência de plasmídeos, ou através de modificações genéticas realizadas em laboratório.

A transferência de plasmídeos pode ocorrer naturalmente em solos não estéreis e a freqüência deste evento depende do tamanho e da razão de células doadoras e receptoras (PROVIDENTI *et al.*, 1993).

Por outro lado, bactérias podem ser geneticamente modificadas em laboratório para múltiplos propósitos, dentre eles para degradar uma ampla faixa de hidrocarbonetos e/ou produzir biossurfactantes (PIEPER e REINEKE, 2000). Providenti et al. (1993) relataram aumento da biodegradação de óleo, após a inoculação do solo com *Pseudomonas aeruginosa* SB30, bactéria engenheirada produtora de biosurfactante. Segundo Watanabe (2001), em alguns casos, quando microrganismos geneticamente modificados são introduzidos em ambientes contaminados, a taxa de degradação do poluente é aumentada devido às transferências de plasmídeos para a população nativa, proporcionando a maior degradação do poluente e não pela contribuição direta do organismo inoculado.

No entanto, o conhecimento sobre os impactos da utilização de microrganismos geneticamente modificados em áreas contaminadas ainda é muito precário, necessitando da realização de pesquisas complementares para elucidar esses efeitos. Soma-se a isso, as restrições legais atualmente existentes quanto ao uso de agentes remediadores geneticamente modificados (OGM's) ou não (Lei nº 11105, 2005; Resolução CONAMA nº 314, 2002).

3.5.3. Adição de surfactantes

A biodegradação de hidrocarbonetos pode ser limitada pela sorção (adsorção e absorção) desses compostos pelos componentes do solo resultando em uma redução da quantidade de hidrocarbonetos suscetíveis ao ataque microbiano. Além disso, a não emulsificação adequada dos hidrocarbonetos resulta em pequenas áreas superficiais para contato com as células microbianas. Uma tentativa de incremento da metabolização e da possibilidade de biodegradação de hidrocarbonetos contaminantes é o aumento da solubilização destes substratos e a maior dessorção destes da matriz do solo empregando-se surfactantes e emulsificantes (ALEXANDER, 1999). Os surfactantes, em particular, podem interagir com os compostos presentes nos hidrocarbonetos de petróleo

e aumentar a solubilidade dos mesmos em água (BANERJI *et al.*, 1995). Desta forma, a presença de surfactantes, naturais ou sintéticos, torna estes compostos disponíveis aos microrganismos e consequentemente à biorremediação.

A adição de surfactantes sintéticos aumenta a solubilidade dos hidrocarbonetos, mas a maioria desses compostos é considerada tóxica aos microrganismos e ao meio ambiente (LEAHY e COLWELL, 1990; PROVIDENTI et al., 1993).

Diversos pesquisadores (PROVIDENTI et al., 1993; BANAT, 1995; BANERJI et al., 1995; ALEXANDER, 1999; NITSCHKE e PASTORE, 2002; RAHMAN et al, 2003; MILLIOLI et al., 2005; LEONARDI et al., 2007) vêm investigando o uso de emulsificantes e surfactantes produzidos microbiologicamente para aumentar a biodegradação de compostos hidrofóbicos, como os hidrocarbonetos de petróleo. Uma das principais vantagens do emprego dos bioemulsificantes ou biosurfactantes (normalmente glicolipídeos) é a sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e elevada eficácia em algumas situações.

O uso dos surfactantes, em particular dos biosurfactantes, é um método promissor de disponibilização dos contaminantes à atividade microbiana, principalmente quando empregado em associação com tecnologias de tratamento *ex-situ* de solos contaminados. No entanto, o seu uso associado à tecnologias de tratamento *in-situ* pode causar a lixiviação dos poluentes hidrofóbicos para o lençol freático devido ao aumento da mobilidade dos mesmos (PROVIDENTI *et al.*, 1993).

3.5.4. Adição de material estruturante

Como mencionado anteriormente, condições aeróbicas e a presença de microrganismos apropriados, e em concentrações adequadas, são condições necessárias para se obter elevada taxa de biodegradação em solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. No entanto, a eficácia dos processos de biorremediação pode ser limitada por fatores como a baixa disponibilidade dos contaminantes e dos nutrientes aos microrganismos, bem como pela aeração insuficiente do solo. Uma baixa concentração de oxigênio pode limitar a biodegradação do óleo, como tem sido comprovado por diversos autores (ALEXANDER, 1999; VASUDEVAN e RAJARAM, 2001). Sabe-se, também, que os fatores limitantes citados são geralmente agravados quando a permeabilidade do solo contaminado é baixa, sendo este parâmetro diretamente relacionado aos teores de argila e silte característicos de grande parte do solo brasileiro. Durante o processo biológico de tratamento, no entanto, a textura do solo,

e conseqüentemente a sua permeabilidade, pode ser aumentada através da adição de materiais estruturantes.

Materias estruturantes (ou "bulking agents") são materiais de baixa densidade que, quando incorporados ao solo são responsáveis pela melhoria de algumas características físico-químicas do mesmo. Os materiais adicionados reduzem a densidade do solo, aumentando a sua porosidade e facilitando a difusão de oxigênio por entre as partículas sólidas. Adicionalmente pode ocorrer alteração na capacidade de retenção de água do solo. Todos esses fatores contribuem conjuntamente para o aumento da aeração do sistema solo-contaminante e, conseqüentemente, da atividade microbiana (RHYKERD et al., 1999; VASUDEVAN e RAJARAM, 2001).

Os materiais estruturantes empregados como auxiliares no processo de biorremediação de solos impactados podem ser de origem inorgânica ou orgânica. Dentre os materiais de origem inorgânica utilizados pode-se citar argila calcinada, vermiculita, areia, perlita, cascalho, dentre outros (CHO *et al.*, 1997 DAVIS e WILSON, 2000). Já os de origem orgânica incluem materiais tais como composto estabilizado, grãos de café, casca de coco, casca de arroz, palha, cavaco de madeira, serragem e farelo de trigo (ALEXANDER, 1999; DAVIS e WILSON, 2000; STRAUBE *et al.*, 2003; LEE *at al.*, 2007; ROLDA'N-MARTY'N *et al.*, 2007; ROJAS-ALVELIZAPA *et al.*, 2007).

Uma ampla revisão da literatura especializada indica que os materiais estruturantes de origem orgânica são os mais empregados nos processos de biorremediação de solos contaminados por petróleo, seja em escala laboratorial, seja em escala ampliada (ELEKTOROWICKZ, 1994; CHO et al., 1997; ALEXANDER, 1999; RHYKERD et al., 1999; DAVIS e WILSON, 2000; JORGENSEN et al., 2000; VASUDEVAN e RAJARAM, 2001; BARRINGTON et al., 2002; CHOI et al., 2003; STRAUBE et al., 2003; MEYSAMI e BAHERI, 2003; MOLINA-BARAHONA et al., 2004; RAIMUNDO et al., 2004; LEE at al., 2007; ROLDA'N-MARTY'N et al., 2007; ROJAS-ALVELIZAPA et al., 2007). Segundo Santos (2007), esses materiais devem possuir características tais como: baixo custo, não competitividade com o contaminante como fonte de carbono (reduzida biodegradação) e disponibilidade próxima à área do seu reaproveitamento, dentre outras.

Em trabalho de associação das técnicas de bioaumento (adição de inóculo microbiano composto de linhagens de fungos filamentosos) e adição de material estruturante, Meysami e Baheri (2003) verificaram, em escala laboratorial, que só ocorreu a colonização dos fungos no solo quando foi adicionado material estruturante ao mesmo.

Além disso, os autores observaram que dentre os materiais estruturantes testados (cavaco de madeira, musgo e flocos de farelo de trigo) a mistura de musgo com os flocos de farelo de trigo (5 – 10% de flocos), adicionada na concentração de 6% p/p ao solo contaminado, foi a que apresentou melhor resultado em termos de crescimento, penetração e atividade enzimática microbiana. Segundo os autores, o musgo é majoritariamente composto de resíduos de madeira que promovem um aumento considerável dos espaços livres no solo, facilitando a aeração do mesmo. Já os flocos de farelo de trigo contêm trigo e glicose que proporcionam o crescimento acelerado dos fungos filamentosos e induzem a maior produção de enzimas por esses microrganismos.

Em experimentos realizados por Vasudevan e Rajaram (2001) para otimizar a biorremediação de solo contaminado com borra de petróleo, foi verificada uma remoção, em 90 dias, de 76% dos hidrocarbonetos inicialmente presentes na condição na qual foi adicionado farelo de trigo como material estruturante. Já na condição onde houve apenas o bioestímulo da microbiota nativa do solo contaminado essa remoção foi de 66%. A adição do material estruturante mostrou também ter um efeito fundamental na população microbiana nativa, uma vez que foi observado pelos autores um aumento de 120 vezes na população microbiana com relação à inicial.

Jorgensen *et al.* (2000) empregaram cavaco de madeira como material estruturante, em associação à técnica de bioaumento, para a biorremediação de solo contaminado com óleo lubrificante em biopilha, em escala de campo (40 m³). Os resultados obtidos indicam uma redução de 70% no teor de óleo contaminante, sendo este resultante basicamente da adição de material estruturante, uma vez que, segundo os autores, a adição de inóculo microbiano (bioaumento) não apresentou efeito positivo no processo de biodegradação do poluente.

A concentração de agente estruturante a ser utilizada no tratamento de solos pode variar de 2 a 12% p/p (BAHERI e MEYSAMI, 2002; MOLINA-BARAHONA *et al.*, 2004; ROLDA'N-MARTY'N *et al.*, 2007). Em estudo desenvolvido por Baheri e Meysami (2002) os resultados mostraram que a alteração na concentração do agente estruturante (mistura de turfa e flocos de farelo de trigo) de 6 para 12% causou um incremento de cerca de 5 pontos percentuais na redução do teor de hidrocarbonetos no solo.

Molina-Barahona *et al.* (2004) avaliaram os efeitos da suplementação de nutrientes e da adição de resíduos de colheita, para bioestimular os microrganismos autóctonos na biodegradação de diesel. Os experimentos foram realizados em microcosmos utilizando um planejamento experimental fatorial fracionário para a avaliação dos efeitos de relação

nutricional C:N (100:10 ou 100:30), teor de umidade (20% ou 30%, p/p), concentração (2% ou 3%, p/p) e tipo (milho ou cana-de-açúcar) de resíduos de colheita. A condição correspondentes a relação C:N de 100:10, 30% de umidade e 3% resíduo de milho apresentou a atividade metabólica mais alta com 7,7 vezes maior produção de CO₂. Foi observado também, nesta mesma condição, o crescimento de microrganismos heterotróficos e degradadores de hidrocarbonetos, removendo 67% de diesel em 109 dias.

Rolda´n-Marty´n et al. (2007) testaram a adição de 2, 4, 6 e 8% p/p de grãos de café como material estruturante no tratamento de solo contaminado com petróleo (58.000 mgHTP/kg solo) e adotando uma relação C:N:P de 100:10:1, 20% de umidade e 28°C. Os autores verificaram que a a maior remoção percentual de HTP ocorreu, após 15 dias de ensaio, com a adição de 2% do estruturante. Foi observada uma redução de 63% na concentração inicial do contaminante, além de um maior crescimento bacteriano e fúngico, quando comparado com as outras condições testadas. Observações microscópicas (microscopia eletrônica de varredura) indicaram uma colonização fúngica acentuada nos grãos de café.

A adição de material estruturante torna-se também uma alternativa atraente quando o solo contaminado a ser tratado já passou por um acentuado processo de intemperização e os compostos orgânicos poluentes encontram-se fortemente aderidos à matriz do solo. Nesses casos, apesar da microbiota nativa encontrar-se adaptada à presença do contaminante, a reduzida biodisponibilidade do contaminante e dos nutrientes bem como a reduzida concentração de oxigênio, podem ser desfavoráveis ao processo de biorremediação. A adição de materiais estruturantes orgânicos, geralmente, contribui para o aumento da atividade microbiana e, também, daqueles microrganismos degradadores específicos, como os degradadores de hidrocarbonetos de petróleo (JORGENSEN et al., 2000; NAKAGAWA e ANDREA, 2006).

3.6. Tecnologias para Biorremediação de Solos Contaminados

O termo biorremediação engloba uma série de tecnologias distintas para tratamento não só de solos, mas também de águas contaminadas e outros resíduos, e que podem ser classificadas como processos *ex-situ* ou *in-situ* (KHAN *et al.*, 2004).

Apesar das várias tecnologias disponíveis para o tratamento de solos contaminados, a seleção daquela mais adequada para uma determinada situação

dependerá das características do contaminante e do solo, das exigências dos órgãos de controle ambiental, do custo envolvido e do tempo requerido para o tratamento. Essa etapa de seleção é freqüentemente uma etapa difícil, mas extremamente importante para o sucesso do tratamento adotado (KHAN *et al.*, 2004).

As principais tecnologias empregadas na biorremediação são apresentadas a seguir (ROSS, 1990/91; BARKER *et al.*, 1995; ALEXANDER, 1999; BERNOTH *et al.*, 2000; BOOPATHY, 2000; TINDADE, 2002; EPA, 2004; KHAN *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2007; SANTOS, 2007; SCHMIDT *et al.*, 2007; WICK *et al.*, 2007).

3.6.1. Tecnologias de tratamento in-situ

- "Bioventing" (ou Bioventilação): tecnologia baseada na introdução de ar na zona insaturada do solo, suprindo assim a necessidade de oxigênio requerida pelo processo da biodegradação aeróbia.
- "Air Sparging" e "Biosparging": tecnologias semelhantes ao "Bioventing", porém o ar é introduzido na zona saturada, isto é, no lençol freático. A proposta é não somente suprir as necessidades de oxigênio, mas também transferir os poluentes voláteis para a zona insaturada na qual se encontram os microrganismos capazes de degradá-los. Além disso, a biorremediação irá ocorrer em alguma extensão no aqüífero devido à introdução do oxigênio. O air sparging, envolve a injeção de ar atmosférico, sob pressão, transferindo os contaminantes da zona saturada para a zona insaturada (superfície), onde o aumento das concentrações de oxigênio promove a degradação aeróbia dos compostos orgânicos. Esse fluxo de ar não deve ser excessivo a ponto de transferir os compostos voláteis para a atmosfera. Porém, no biosparging, além da injeção de ar na zona saturada do solo (lençol freático), nutrientes podem ser injetados com o objetivo de aumentar a biodegradação dos contaminantes.
- Bioslurping (Extração multifásica): é uma nova tecnologia de remediação que associa elementos de bioventing e bombeamento para recuperação dos contaminantes livres de águas subterrâneas e solos onde ocorre a extração simultânea das diversas fases dos hidrocarbonetos a partir da aplicação de alto vácuo em poços de extração. Tanto a fase vapor quanto a fase líquida extraída são encaminhadas para sistemas de separação específicos (separadores água/óleo, separadores de vapores/líquidos). Além disso, o fluxo de ar gerado pela extração dos vapores pelo tubo promove a aeração da zona insaturada, aumentando o conteúdo de oxigênio e a taxa de degradação aeróbia

- "Pump-and-treat" (ou bombeamento e tratamento): tecnologia baseada no bombeamento da água contaminada para a superfície e posterior tratamento em biorreatores semelhantes aos normalmente utilizados em sistemas de tratamento aeróbio de efluentes líquidos, como por exemplo, o sistema de lodos ativados.
- Atenuação Natural Monitorada ou Biorremedição intrínseca: processo de tratamento não assistido baseado em processos naturais biológicos, químicos e físicos, sendo apenas realizado monitoramento regular da concentração do contaminante. O processo ocorre sem intervenção humana de forma a conter a expansão da contaminação, reduzindo a massa, a toxicidade, o volume ou concentração dos contaminantes.
- Fitorremediação: tecnologia que envolve a utilização de vegetais superiores, diretamente ou indiretamente, resultando em remoção ou degradação do poluente. Esse processo pode ocorrer através da remoção do poluente pela própria planta ou pela degradação do poluente pelos microrganismos que colonizam as suas raízes ou que estão em uma porção do solo bem próxima destas.
- Biorremediação Eletrocinética: tecnologia adequada para o tratamento de solos que contenham alto teor de material fino (silte, argila) que se baseia na introdução de uma corrente elétrica no solo. A corrente direta (CD) promove o transporte de espécies químicas solúveis (nutrientes e aceptores de elétrons) através de solos com baixa permeabilidade, indiretamente contribuindo para o aumento da disponibilização dessas espécies para os microrganismos e, conseqüentemente, aumentando a eficiência do processo de biodegradação do contaminante.

3.6.2. Tecnologias de tratamento ex-situ:

- "Landfarming": tecnologia normalmente utilizada para o tratamento de resíduos industriais perigosos. Os resíduos são dispostos em células de tratamento de grandes dimensões e misturados à camada superficial do solo, na qual encontra-se uma maior atividade microbiana. O solo sofre freqüente revolvimento e aragem com objetivo de suprir o oxigênio necessário à atividade microbiana. Da mesma forma, para a manutenção da atividade microbiana, o pH, a umidade e as concentrações de nutrientes são corrigidos periodicamente.
- Biopilhas: tecnologia variante do "landfarming", baseando-se, no entanto, em um sistema mais complexo que permite o controle da perda de compostos voláteis durante a fase operacional e a introdução de água, nutrientes e oxigênio. Porém, esse tipo de sistema não permite a freqüente mistura do solo para suprir limitações referentes à heterogeneidade e à disponibilização de nutrientes e contaminantes.
- Biorreatores: O tipo de biorreator mais comum para o tratamento de solos contaminados são os reatores de lama ou "slurry reactors". Neste, após escavação e peneiramento, o solo contaminado é misturado a uma fase aquosa (que pode conter microrganismos e/ou nutrientes e/ou surfactantes). A "lama" gerada contém mais ou menos sólidos (de 10 a 40% p/p) em função do tipo de solo, dos equipamentos de agitação e do sistema de aeração disponíveis. A lama tratada normalmente é desidratada ou, alternativamente, pode ser submetida à biorremediação em fase sólida. Uma outra opção em termos de configuração de biorreatores são os de fase sólida, onde trabalha-se com teores reduzidos de umidade no solo (10 − 20 %). Esses reatores, a serem estudados durante o desenvolvimento da presente tese, serão abordados oportunamente.

No caso específico da biorremediação de solos contaminados, tanto a aplicação de tecnologias de tratamentos *in-situ*, quanto de tratamentos *ex-situ* em fase sólida, tais como "Landfarming" e Biopilhas, muitas vezes torna-se inviável sob o ponto de vista técnico (limitações geológicas da área contaminada, dificuldades operacionais, fortes influências climáticas dentre outros) e/ou econômico (custo elevado). Desta forma, a utilização de biorreatores surge como uma alternativa interessante, apresentando como principais vantagens a possibilidade de monitoramento contínuo do desempenho do sistema, o controle das condições ideais de processo, imprescindíveis à manutenção da atividade microbiana, e o reduzido tempo de remediação .

O emprego de biorreatores torna-se uma alternativa ainda mais promissora nos casos de contaminação de solos de natureza argilosa, em função da baixa aplicabilidade

das demais técnicas de biorremediação neste tipo de solo. Isto se deve à característica de baixa permeabilidade apresentada pelos solos argilosos, o que dificulta a incorporação de oxigênio e nutrientes fundamentais à biodegradação. No tratamento em biorreatores esta dificuldade é contornada, uma vez que estes possuem sistemas eficientes de homogeneização e aeração.

3.7. Biorreatores

Conforme citado anteriormente, é possível observar um aumento no número de trabalhos envolvendo o uso de biorreatores para tratamento de solos contaminados (PROVIDENTI et al., 1993; GRAY et al., 1994; BANERJEE et al., 1995; BANERJI et al., 1995; BRINKMANN et al., 1998; URURAHY, 1998; NANO et al., 2003; TROQUET et al., 2003; WARD et al., 2003; PURWANINGSIHA et al., 2004; COLLINA et al., 2005; ARRAR et al., 2007). Dentre outros fatores que fortalecem esta tendência, chama-se atenção para o fato, já citado, de que o movimento restrito dos microrganismos no solo, em muito afeta a biodegradação dos contaminantes, uma vez que torna-se pequeno o acesso dos mesmos aos nutrientes e aos próprios contaminantes a serem degradados.

Nos métodos clássicos de tratamento biológico de solos contaminados, o problema relacionado à manutenção da adequada homogeneização do solo durante o tratamento é sempre encontrado. As principais dificuldades incluem a introdução de aditivos (nutrientes, surfactantes, etc.) e a concentração localizada de poluentes em algumas regiões do sistema. Estes problemas podem ser significativamente reduzidos através do uso de biorreatores, onde o material é misturado de forma mais efetiva. Isto permite uma amostragem mais significativa e uma medida mais realista do sucesso do processo de descontaminação (ALEF e NANNIPIERI, 1995).

Quando comparado com as técnicas clássicas de biorremediação, como "Landfarming" e "Biopilhas", o emprego de biorreatores apresenta como principais vantagens (ALEF e NANNIPIERI, 1995):

- o Controle de emissões atmosféricas e da geração de águas de processo.
- o Controle e manutenção das condições operacionais (pH, temperatura, teor de umidade, etc.).
- o Manutenção de grau de mistura adequado (agitação contínua ou descontínua).
- o Controle da degradação dos poluentes através de um monitoramento mais efetivo.

- o Possibilidade de incorporação de aditivos diretamente no reator (água, microrganismos, surfactantes, nutrientes, corretivos de pH, co-substratos, etc).
- Sistema de aeração facilitado.
- o Reduzida área requerida para instalação do sistema.
- o Possibilidade de tratamento de solos com teor expressivo de partículas finas.
- Não há contato direto entre o conteúdo do reator (poluentes) e o ambiente durante o processo de tratamento, o que representa vantagem do ponto de vista ambiental e de segurança.

Ainda segundo Alef e Nannipieri (1995), o tempo requerido para a descontaminação de solos em biorreatores é menor do que o envolvido em biopilhas, porém encontra-se diretamente relacionado a fatores tais como o tipo de contaminante, sua concentração, tipo de matriz do solo, etc. Os autores exemplificam estas afirmações citando que para o tratamento de solos arenosos, contaminados com hidrocarbonetos facilmente biodegradáveis, são necessários apenas alguns dias de operação, enquanto para solos argilosos ou siltosos impactados por hidrocarbonetos poliaromáticos, são esperadas várias semanas para se atingir níveis aceitáveis de recuperação.

Se o tempo envolvido nos processos de biorremediação depende de uma série de diferentes fatores, o custo, por sua vez, se encontra totalmente relacionado à extensão deste tempo. Também o tipo de reator adotado interfere na economicidade do tratamento, em função de diferentes custos de investimento e de operação a ele associados. De acordo com Alef e Nannipieri (1995), o custo total de tratamento de solos em biorreatores normalmente se situa na faixa de US\$ 30 a US\$ 85 por tonelada. Como se pode perceber, a questão econômica envolvida nos processos de descontaminação de solos é bem complexa, devendo ser avaliada à luz de comparações não só financeiras, mas também, técnicas.

No caso específico de solos contaminados por óleo ou resíduos oleosos, freqüentemente acumulados em diques, tanto em refinarias, quanto em áreas de produção, a associação dos diferentes fatores citados, tais como características e heterogeneidade do solo a ser tratado, microrganismos e rotas bioquímicas possivelmente envolvidos em sua decomposição, vêm apontando, a despeito do custo, para a viabilidade de utilização de biorreatores.

A seleção da configuração mais indicada de biorreator a ser adotada, bem como da técnica de biorremediação associada (bioestímulo, bioaumento, incorporação de material

estruturante, dosagem de biossurfactantes, etc.) devem ser realizadas levando-se em consideração as características do solo a ser tratado (percentual de material argiloso, etc.), a natureza do contaminante (recalcitrância, viscosidade, etc.), a composição da mistura a ser tratada (sólido, água e contaminante), os microrganismos envolvidos, o grau de importância da aeração, o nível de necessidade de agitação, dentre outros.

3.7.1.Tipos de biorreatores

Vários tipos de biorreatores vêm sendo testados para diferentes aplicações (PROVIDENTI et al., 1993; GRAY et al., 1994; ALEF e NANNIPIERI, 1995; BANERJEE et al., 1995; BANERJI et al., 1995; KRÜGER et al., 1995; PUSKAS et al, 1995; TRUAX et al., 1995; SANER et al., 1996a; SANER et al., 1996 b; BRINKMANN et al., 1998; URURAHY, 1998; WOO e PARK, 1999; RICHNOW et al., 2000; ICP, 2003; NANO et al., 2003; TROQUET et al., 2003; WARD et al., 2003; PURWANINGSIHA et al., 2004; COLLINA et al., 2005; ARRAR et al., 2007).

Para tratamento de solos contaminados sem prévia remoção das frações mais finas do solo é recomendado o uso de biorreatores horizontais (reatores de fase sólida: tambor rotativo ou tambor fixo) (ALEF e NANNIPIERI, 1995). O procedimento de lavagem de alguns solos contaminados, por sua vez, produz uma suspensão altamente contaminada contendo frações finas do solo. Os biorreatores verticais (reatores de fase semi-sólida ou reatores de lama) já são mais adequados ao tratamento destas suspensões.

Conforme citado por Alef e Nannipieri (1995), a maioria dos biorreatores tem incorporado à sua estrutura um sistema de agitação que assegura que o material a ser tratado seja adequadamente homogeneizado. Isto possibilita a introdução e mistura adequada de aditivos para ajuste de alguns parâmetros como teor de umidade, fontes de oxigênio e nutrientes, pH, etc. Alguns reatores, se necessário, podem também contar com um sistema de aquecimento de forma a acelerar o processo de biodegradação.

3.7.1.1. Reatores de fase semi – sólida (ou reatores de lama)

A maior parte dos trabalhos recentes realizados sobre biorremediação de solos contaminados empregando-se biorreatores aborda o tratamento em fase semi-sólida (lama) (PURWANINGSIHA *et al.*, 2004; COLLINA *et al.*, 2005; ARRAR *et al.*, 2007; CLARK e BOOPATHY, 2007; DERUDI *et al.*, 2007; MOHAN *et al.*, 2007; OKUDA *et al.*, 2007; SHAILAJA et al., 2007) . O tratamento em reatores de lama é análogo ao tratamento biológico convencional com biomassa em suspensão (ex: lodos ativados). Segundo Mueller *et al.* (1991) os biorreatores de lama podem ser projetados com

diferentes configurações (Figuras 3.2, 3.3 e 3.4), de forma a otimizar fatores que normalmente são limitantes ao crescimento e atividade microbiana no solo (principalmente a disponibilização de substrato, nutrientes inorgânicos e oxigênio). Para que este grau de otimização da atividade microbiana seja atingido, é adicionada água ao solo contaminado objetivando a formação uma "lama" (suspensão de solo em água). Esta "lama" é continuamente agitada de forma a maximizar a taxa de transferência de massa e o contato entre os contaminantes e os microrganismos capazes de degradá-los (STROO et al., 1997). Os reatores de lama podem ter sua operação conduzida sob o sistema de batelada simples, batelada seqüencial ou com alimentação semi-contínua ou contínua.

Normalmente aplicam-se, no tratamento em fase semi-sólida, equipamentos (biorreatores) verticais, nos quais, via de regra, o teor de sólidos se situa na faixa de 20 a 40% p/p (ALEF e NANNIPIERI, 1995). Além disto, as partículas de solo no interior deste tipo de reator não devem exceder o tamanho de 100 µm. Em função destas exigências os biorreatores verticais (reatores de lama) são normalmente empregados em combinação com sistemas de lavagem de solos.

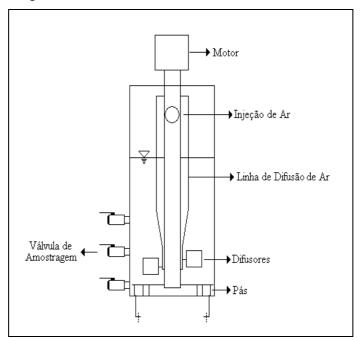


Figura 3.2. Biorreator de Lama Utilizado para Testes em Escala Piloto (Fonte: BANEJI *et al.*, 1995)

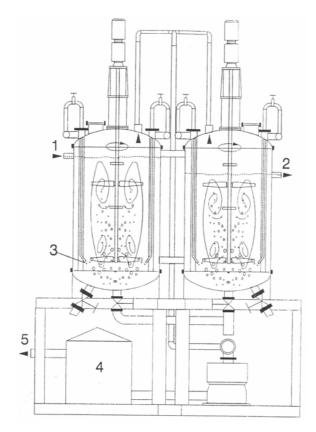


Figura 3.3. Biorreatores de Lama em Cascata: (1) Alimentação; (2) Descarga; (3) Entrada de Ar Comprimido; (4) Filtro de Carvão Ativado; (5) Saída de Ar Filtrado (Fonte: ALEF e NANNIPIERI, 1995)

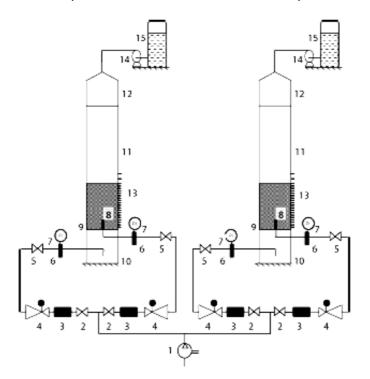


Figura 3.4. Biorreator de lama do tipo leito fluidizado ("jet -fluidized bed")

(Fonte: ARRAR et al. 2007; numeração detalhada no artigo)

Woo e Park (1999) citam que o tratamento de solos contaminados em biorreatores verticais de lama é considerado como um dos métodos mais rápidos de biorremediação uma vez que os substratos são eficientemente transportados até a população microbiana. O uso deste tipo de reator apresenta também como vantagens rápidas taxas de degradação, pequena área requerida para instalação e alto grau de flexibilidade. As rápidas taxas de degradação são resultantes da capacidade de maximizar as taxas de transferência de massa e fornecer condições ótimas para atividade microbiana (STROO et al., 1997). A variedade de opções para sistemas de agitação e aeração permite o tratamento de uma grande diversidade de materiais com diferentes características. Conforme citado por Stroo et al. (1997) o principal objetivo da agitação e da aeração é fornecer oxigênio suficiente através da lama de forma a prevenir as limitações à atividade microbiana inerentes a transferência de oxigênio . A agitação do conteúdo do reator pode ser realizada somente pela aeração ou através da aeração associada a um sistema mecânico de agitação (ARRAR et al., 2007). No entanto, este tipo de tratamento é relativamente caro (WOO e PARK,1999).

Conforme citado anteriormente, o emprego de biorreatores de lama é limitado ao tratamento de solos contendo teor considerável de partículas finas. Solos que contenham partículas mais grossas, como areia, que requerem um dispêndio energético elevado para serem mantidas em suspensão e adequadamente homogeneizadas neste tipo de reator necessitam passar por uma etapa prévia de separação desta fração mais grossa da fração silte e argila e por uma etapa de lavagem. Desta forma, este tipo de tratamento requer a incorporação de outras etapas operacionais como a lavagem do solo e o tratamento dos efluentes gerados no sistema, o que eleva em muito o custo do tratamento.

Banerjee *et al.* (1995) citam também como principais desvantagens do uso de biorreatores de lama a elevada razão água/sólidos (valores típicos situam-se em torno de 4:1, ou mais, em peso) e a elevada energia requerida para agitação do sistema de forma a manter as partículas de solo em suspensão.

A despeito das limitações e restrições relacionadas ao seu uso, esse tipo de configuração vem sendo adotada não apenas no tratamento de solos contaminados por petróleo e seus derivados, mas também no tratamento de solos contaminados com herbicidas (MOHAN *et al.*, 2007) e explosivos (CLARK e BOOPATHY, 2007).

3.7.1.2. Reatores de fase sólida

Os biorreatores de fase sólida são particularmente adequados ao tratamento de material com alto teor de sólido. Nestes tipos de biorreatores, o teor de umidade é mantido em níveis suficientes apenas para a manutenção da atividade microbiana (SANER et al., 1996a). A despeito das vantagens econômicas associadas à redução da incorporação de água na biorremediação de solos, relativamente poucos são os estudos que exploram os biorreatores de fase sólida, em função dos efeitos prejudiciais que a limitação da água pode vir a exercer sobre o metabolismo microbiano.

Alef e Nannipieri (1995) destacam que, dentre as configurações de reatores de fase sólida mais comuns, estão as horizontais, que podem apresentar duas subconfigurações, que diferem entre si, basicamente, na forma de mistura: os tambores rotativos e os tambores fixos. Nos primeiros, a homogeneização do sistema é promovida pela rotação do tambor como um todo, em torno de seu eixo, enquanto na segunda, a mistura se deve à movimentação de um eixo central, de geometria variada.

TAMBOR ROTATIVO

O emprego de biorreatores do tipo Tambor Rotativo no tratamento de solos contaminados vêm sendo freqüentemente citado na literatura (ALEF e NANNIPIERI, 1995; BANERJEE et al., 1995; KRÜGER et al., 1995; TRUAX et al., 1995; BRINKMANN et al., 1998; WOO e PARK, 1999). Biorreatores do tipo tambor rotativo apresentam uma combinação atrativa entre agitação efetiva, mesmo com elevados teores de sólidos (MASLIYAH et al. 1992), e elevadas taxas de aeração (GRAY et al. 1994). Segundo Alef e Nannipieri (1995) a capacidade de carga efetiva deste tipo de reator gira em torno de 60% do volume total do mesmo.

Segundo Woo e Park (1999) os primeiros biorreatores deste tipo apresentaram limitações relacionadas a homogeneização/agitação adequada em função da formação de filme de solo na parede do reator e à formação de agregados de solo ("pellets"). Isto fazia com que as taxas de transferência de massa fossem reduzidas e, conseqüentemente, ocorria um decréscimo na atividade microbiana. Esforços para aumentar a eficiência de agitação através da incorporação de impelidores de pás no interior do tambor foram, em sua maioria bem sucedidos, porém implicam em um consumo de energia significativamente mais elevado. Alternativamente, a adição de teores adequados de umidade no reator se mostrou efetiva para agitação sem acarretar em agregação do material. Parthen *et al.* (1990) reportam que a adição de 50% (p/p) de

água apresenta efeito benéfico no tratamento de solo contaminado com HPA's e hidrocarbonetos alifáticos. No entanto, o autor não sugere teores ótimos de água a serem adicionados à solos com diferentes texturas. Woo e Park (1995), por sua vez, apresentam em seu trabalho o resultado do efeito do teor de água (20, 30 e 40% de umidade) e da velocidade de rotação do tambor (1, 3, 6 e 12 rpm) na taxa de biodegradação de HPA's presentes como contaminantes em um solo contendo 81% de areia, 18,4% de silte e 0,6% de argila, utilizando um biorreator do tipo tambor rotativo de 12,6 litros de capacidade. Para as condições operacionais otimizadas, foi obtida uma degradação de 95% dos HPA's totais após 20 dias de tratamento.

Banerjee *et al.* (1995) reportam o uso de um biorreator do tipo tambor rotativo com 2 kg de capacidade, no tratamento de solo argiloso contaminado com antraceno. O equipamento foi operado com carga de sólidos de cerca de 60%, em peso, e inoculado com cultura mista de bactéria. O monitoramento do desprendimento de CO₂ demonstrou que a degradação e a mineralização do antraceno ocorreu simultaneamente e que cerca de 55% do antraceno inicial foi mineralizado. O diagrama esquemático da unidade experimental utilizada pelos autores é apresentado na Figura 3.5, abaixo.

Cabe destacar que neste tipo de configuração é imprescindível a otimização do sistema de agitação e do sistema de introdução de ar.

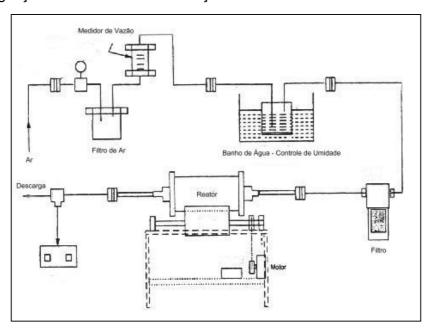


Figura 3.5. Diagrama Esquemático de Unidade Experimental Com Biorreator do Tipo Tambor Rotativo para Tratamento de Solo Contaminado

(Fonte: BANERJEE et al., 1995)

TAMBOR FIXO

Segundo Alef e Nannipieri (1995), tambores fixos apresentam a vantagem de poderem ser utilizados em escala ampliada (reatores de volume total de 420 m³ já foram construídos), apesar de só comportarem um nível de ocupação máximo de 40%, enquanto em tambores rotativos, é possível atingir percentagens de ocupação de até 60% do volume útil. O modelo de agitador ilustrado por estes autores (Figura 3.6) consiste em um eixo helicoidal, que atua tal como um parafuso transportador, a exemplo dos que são usados na classificação e no transporte de minérios. Cabe ressaltar que os parafusos transportadores se adequam mais a processos contínuos, que envolvem tempos de residência relativamente reduzidos; desta forma, é de se esperar que sua aplicabilidade na biorremediação de solos seja limitada. Ainda assim, o Instituto Colombiano do Petróleo (ICP)/Empresa Colombiana de Petróleo (ECP) oferecem em sua "home-page" a tecnologia intitulada "Proceso Semicontinuo para la Biodegradación Estimulada e Intensiva de Lodos Aceitosos", que consiste, justamente, no tratamento biológico de resíduos sólidos da indústria do petróleo (borras oleosas) em reatores do tipo tambor fixo, dotado de eixo helicoidal (parafuso transportador) (Figura 3.7). Tal tecnologia apresenta como vantagem a de acelerar cerca de 16 vezes o processo de biodegradação natural dos hidrocarbonetos. Poucos detalhes adicionais são oferecidos, por se tratar de uma área de interesse comercial (http://www.icp.ecp.com/home/oferta/icp/pros-semi-biodegradacion.htm, 2003).

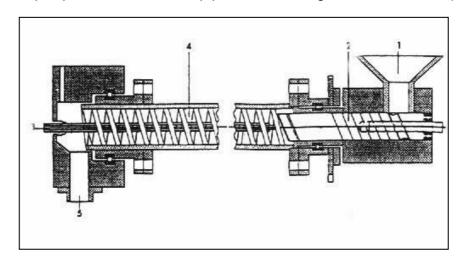


Figura 3.6. Reator do Tipo Tambor Fixo: (1) Alimentação do Solo Contaminado; (2) Transporte do Solo no Interior do Reator; (3) Introdução de Aditivos; (4) Corpo do Reator; (5) Descarga de Solo Tratado.

(Fonte: ALEF e NANNIPIERI, 1995)

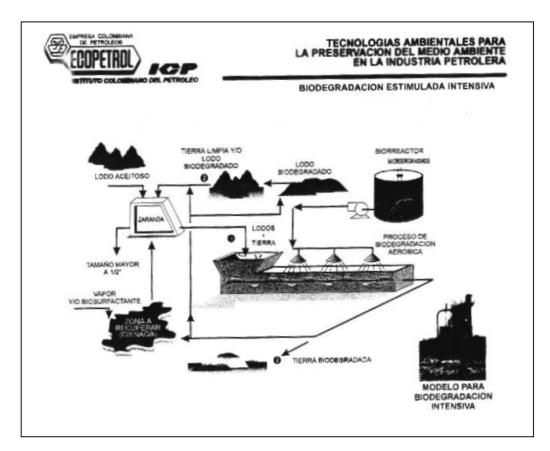


Figura 3.7. Esquema Representativo do "Proceso Semicontinuo para la Biodegradación Estimulada e Intensiva de Lodos Aceitosos"

(Fonte: http://www.icp.ecp.com/home/oferta/icp/pros-semi-biodegradacion.htm, 2003)

Levando em consideração que um dos fatores chave para a efetiva homegeneização do conteúdo de um bioreator diz respeito às características físicas do material a ser tratado, Saner et al. (1996a) desenvolveram um protótipo para tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos. Nesse reator (Figura 3.8), do tipo tambor fixo onde o solo não era tratado como lama, foram instalados dois discos de engrenagens circulares conectados a um eixo central e dois eixos secundários onde foram instaladas "lâminas" agitadoras de características específicas. Os autores verificaram que, em ensaio realizado com solo modelo contaminado com diesel, foi conseguida uma otimização da transferência de massa pelo sistema de agitação adotado, o que refletiu diretamente na biodegradação do composto orgânico, monitorada através das taxas de geração de CO₂ e de consumo de O₂ ao longo do teste.

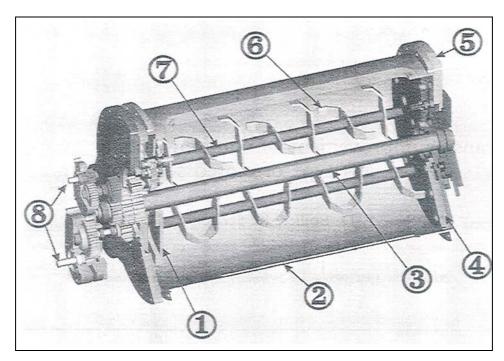


Figura 3.8. Esquema representataivo do biorreator desenvolvido por SANER *et al.* (1996a). (1), (4) e (8) Engrenagens. (2) Corpo do reator. (3) Eixo central. (5) Tampa. (6) Agitadores. (7) Eixo agitador secundário.

3.8. Monitoramento do Processo de Biorremediação

Geralmente a confirmação da eficácia da aplicação de um processo de biorremediação ocorre através da avaliação de resultados obtidos na quantificação de parâmetros químicos e/ou físico-químicos pré-estabelecidos em leis e regulamentos, como por exemplo, concentração residual de hidrocarbonetos e/ou metais. As metodologias de quantificação podem variar desde métodos gravimétricos mais simples, como o método de quantificação de óleos e graxas (NASCIMENTO et al., 2003), até formas mais complexas como a cromatografia gasosa associada a detectores específicos (ionização de chama, massas), empregada na quantificação de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP's), de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA's) e das frações de petróleo (saturados, aromáticos, resina e asfaltenos - SARA).

Para Fiúza e Vila *apud* Santos (2007), a análise química periódica da concentração de contaminantes no solo deve estar, sempre que possível, associada à determinação de parâmetros biológicos por serem esses considerados como métodos indiretos de acompanhamento do processo. Esses últimos incluem a quantificação da biomassa (heterotrófica total e hidrocarbonoclástica) e análise do consumo de O₂ ou produção de CO₂.

Segundo Morais (2005), estudos envolvendo a medida da taxa de mineralização através da produção de CO₂ (conhecidos como testes respirométricos ou ensaios de biodegradabilidade) podem fornecer informações sobre a biodegradabilidade de hidrocarbonetos em solos contaminados. Esta metodologia tem sido empregada amplamente como etapa prévia na seleção das técnicas de biorremediação a serem adotadas, pois fornecem resultados rápidos e confiáveis. A geração de CO₂ foi citada por Ortiz *et al.* (2006) como um dos métodos mais simples para avaliar a atividade global da comunidade microbiana do solo, visto que a mesma é resultado direto da respiração endógena microbiana e a quantidade de CO₂ gerado pode ser relacionado diretamente à presença de biomassa ativa nas amostras de solo.

Além da recomendação da associação de métodos indiretos no monitoramento dos processos de biorremediação, tem-se buscado o estabelecimento de parâmetros que espelhem o real impacto do contaminante no solo, antes e após o tratamento proposto.

Sabe-se que as metodologias analíticas associadas à quantificação dos valores de referência estabelecidos em leis e regulamentos envolvem, em sua maioria, pelo menos uma etapa de extração química intensiva para que o composto passe para uma fase líquida e nessa seja quantificado. Esse processo pelo qual a amostra sólida, ou semisólida, é submetido freqüentemente não representa a real condição de extração (lixiviação e/ou solubilização) a qual aquela amostra será submetida no ambiente. Quando avaliado dessa forma, um processo de biorremediação muitas vezes não é considerado eficiente uma vez que a concentração residual do poluente pode vir a permanecer acima dos valores de referência estabelecidos na legislação ambiental pertinente. Por outro lado, essa concentração residual pode englobar a fração não biodisponível do contaminante, isto é, a fração não disponível aos organismos e portanto pouco nociva e de difícil eliminação por processo biológico (SISINNO et al, 2004).

Vários autores têm destacado a importância de estimativas práticas da fração biodisponível do contaminante como parte integrante de estudos preliminares à etapa de aplicação de um processo de biorremediação. Tais estimativas são úteis não só na quantificação da fração do contaminante que realmente estará susceptível ao ataque microbiano, mas também como ferramenta a ser associada a estudos de avaliação de risco (HARMS e BOSMA *apud* HAWS *et al.*,2006). Várias metodologias vêm sendo aplicadas tanto para a avaliação da contaminação de um solo, como para verificação de sua qualidade após processo de tratamento. Entretanto, apenas por meio dos ensaios ecotoxicológicos os efeitos sinérgicos das substâncias (bem como seus sub-produtos)

podem ser avaliados. Nesses ensaios são verificados os efeitos das variáveis ambientais que são capazes de afetar a toxicidade das substâncias aos componentes vivos de um ecossistema.

Estudos realizados após processo de remediação de solos contaminados por hidrocarbonetos mostraram que mesmo enquadrados do ponto de vista de legislação, muitos solos ainda podem apresentar uma toxicidade residual, constatada apenas por meio dos ensaios ecotoxicológicos (HUND e TRAUNSPURGER, 1994; NUNES-HALLDORSON et al., 2004; PLAZA et al. 2005).

Ensaios preliminares realizados tanto com amostras contaminadas por hidrocarbonetos (SISINNO et al., 2004a e b) como para uma amostra contaminada com mercúrio (SISINNO et al., 2005) indicaram que o ensaio de comportamento de fuga (ISO, 2004) pode ser um dos ensaios aplicados na complementação da avaliação de áreas contaminadas. Entretanto, os ensaios para avaliação da ecotoxicidade com organismos de solo não estão bem estabelecidos no Brasil, pelo fato de não existir ainda normas da ABNT e em função de estarem descritos testes desatualizados e portanto pouco recomendados para a aplicação (Manual do IBAMA - SEMA, 1988).

Uma outra ferramenta cuja aplicação vem crescendo no monitoramento dos processos de biorremediação de solos contaminados é a biologia molecular. Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, associadas ao conhecimento em bioinformática, tornou-se possível a caracterização de comunidades microbianas mistas em determinados ecossistemas, revelando os grupos atuantes, muitos destes até então desconhecidos. Tais técnicas exercem hoje papel fundamental no desenvolvimento do conhecimento dos microambientes (ROSADO e DUARTE, 2002) e essa revolução do conhecimento possibilitou a criação de um novo campo na Microbiologia Ambiental denominado Ecologia Microbiana Molecular (ROSADO et al., 1997).

A utilização de técnicas moleculares permite, portanto, um conhecimento mais aprofundado dos grupos microbianos presentes, após a seleção natural imposta por condições extremas, como a presença de substâncias poluentes e de suas formas distintas de tratamento. Do ponto de vista técnico, estes métodos são viáveis porque são rápidos e sensíveis para identificar e monitorar a população microbiana presente e atuante no processo de Biorremediação (WILKSTRÖM *et al.*, 1996).

Os resultados obtidos com estas técnicas possibilitam definir com maior precisão o melhor processo de Biorremediação a ser implementado, desenvolvendo mecanismos que promovam a atividade máxima de um determinado grupo microbiano de interesse. Por exemplo, a presença de uma grande quantidade de cópias de um gene catabólico em uma área contaminada pode ser um indicativo de que esteja ocorrendo um processo de biodegradação natural ou que a estratégia de tratamento empregada é eficiente (WILKSTRÖM et al., 1996).

Estas técnicas podem ser usadas para complementar o monitoramento nos estudos de impactos ambientais. Além de avaliar a diversidade genética de amostras ambientais, estudando o efeito da presença de um determinado poluente na estrutura da comunidade microbiana, é possível verificar àqueles que se adaptam e atuam no processo de Biorremediação. Pode também ser aplicada no monitoramento de microrganismos inoculados *in situ*, avaliando sua permanência ou eliminação nos processos de Bioaumento (JANSSON *et al.*, 2000; IWAMOTO e NASU, 2001).

Capítulo 4

4. MATERIAIS E MÉTODOS

No desenvolvimento do presente trabalho de tese foram utilizados dois solos de origens distintas: o Solo 1 proveniente da região sudeste (estado de São Paulo) e o Solo 2 proveniente da região nordeste do Brasil (estado de Sergipe). O estudo foi iniciado empregando-se o Solo 1 como modelo, sendo então realizados ensaios de biodegradabilidade em microcosmos, a seleção da melhor configuração de biorreator de bancada e os primeiros experimentos de biodegradação no dito biorreator.

No entanto, ao longo dos 4 anos em que o trabalho de tese foi conduzido o Solo 1 passou por um processo natural de intemperização no próprio local de armazenamento, além de ter sido adequadamente destinado pela empresa, no ano de 2005, sendo necessária a seleção de um novo solo para a continuidade do estudo. O Solo 2 foi então selecionado, tendo em vista que o mesmo representa uma realidade em termos de caracterização de um solo comum no território brasileiro, além ser proveniente de um campo de exploração e produção de petróleo em terra, onde não se pode descartar a possibilidade de ocorrência de um acidente ambiental (vazamento involuntário de petróleo). Assim sendo, novos ensaios de biodegradabilidade foram realizados em microcosmos com o Solo 2, repetindo os realizados com o Solo 1 e que apresentaram resultados promissores em termos de remoção do contaminante orgânico, bem como testes complementares de biodegradação no biorreator de bancada e experimentos em biorreator piloto.

Face ao anteriormente exposto, e de forma a tornar mais didática a apresentação do escopo do trabalho, o presente capítulo será subdividido em 8 seções, a saber: Caracterização dos Solos Empregados (4.1), Definição da Configuração de Protótipo de Biorreator de Bancada (4.2), Ensaios de Biodegradabilidade em Microcosmos (4.3), Experimentos em Biorreatores de Bancada (4.4), Projeto e Confecção de Biorreator Piloto (4.5), Experimentos em Biorreator Piloto (4.6), Metodologias para o Monitoramento dos Ensaios de Biodegradação (4.7) e Ensaios Complementares (4.8).

Nesta última seção, serão apresentados os resultados de testes de avaliação ecotoxicológica e da diversidade microbiana de amostras de solo antes e após os tratamentos efetuados (4.8.1 e 4.8.2), além de dois ensaios complementares ao trabalho de tese e que serviram de base para consolidar os resultados obtidos ao longo de todo o trabalho: Avaliação da Biodisponibilidade do Óleo Contaminante no Solo 1 (4.8.3) e Simulação do Processo de Atenuação Natural do Solo 2 (4.8.4).

4.1. Caracterização dos Solos Empregados

4.1.1. Solo 1

Na primeira fase do estudo utilizou-se um solo contaminado em 1999, com óleo cru (MARLIN - 80% e ALBACORA -20%) e outro sem contaminação, denominado de virgem, coletado na mesma região do primeiro. Ambos os solos são provenientes do estado de São Paulo, região sudeste do Brasil.

O solo contaminado foi removido do local após o acidente que o originou e armazenado, adequadamente, em local devidamente impermeabilizado com manta de polietileno (PE) e dotado de sistema de drenagem, conforme orientações do órgão de controle ambiental do estado (SANTOS *et al.*, 2001). A primeira amostragem dos solos empregados no desenvolvimento deste trabalho (contaminado e virgem) foi realizada por uma equipe da Petrobras, especializada neste tipo de procedimento, que garantiu a representatividade das amostras. As amostras encaminhadas para o CETEM foram mantidas sob refrigeração a 4° C após etapas prévias de homogeneização, quarteamento e peneiramento em peneira de malha 10 mesh.

A caracterização inicial dos solos foi realizada com o intuito de subsidiar o desenvolvimento do processo de tratamento biológico. Foram levantadas, assim, inicialmente, as características físico-químicas, orgânicas, inorgânicas e microbiológicas mais relevantes.

Na Tabela 4.1 a seguir, encontram-se os principais resultados da caracterização de ambos os solos (virgem e contaminado), obtidos anteriormente por Rizzo *et al.* (2002) e Trindade (2002).

Tabela 4.1. Caracterização dos solos virgem e contaminado (adaptado de SANTOS et al., 2001, RIZZO et al., 2002 e TRINDADE, 2002).

CARACTERIZAÇÃO	SOLO VIRGEM	SOLO CONTAMINADO (Solo 1)
FÍSICO-QUÍMICA		
Distribuição Granulométrica (%)		
Areia Grossa	5,4	40,5
Areia Fina	78,9	19,3
Silte	4,3	28,1
Argila	11,4	12,1
Densidade (g/cm³)	1,2	1,1
Densidade de Partícula (g/cm³)	3,5	2,3
Porosidade (%)	64,5	52,0
Limite de liquidez	ND	NA
Limite de plasticidade	Não plástico	NA
pH	5,4	4,8
Capacidade de Retenção de Água (%)	32,8	26,9
ORGÂNICA		
HTP (mg/g)	NA	53,8
HPA (mg/g)	NA	9,75
S.A.R.A. (%)		
Parafinas	NA	41,18
Aromáticos	NA	26,24
Resinas	NA	32,58
Óleos e Graxas (%)	0,2	4,9
Matéria Orgânica (g/kg)	10,2	47,9
MICROBIOLÓGICA		
Pop. Heterotrófica Total (UFC/g de solo)	2,70x10 ⁵	2,38x10 ⁶
Pop. Degradadora (NMP/g de solo)	1,43x10 ³	4,28x10 ⁵
INORGÂNICA		
Fertilidade		
Ca ⁺² (cmol/Kg)	NA	2,7
Ca ⁺² (cmol/Kg) Mg ⁺² (cmol/Kg)	NA	0,7
K⁺ (cmol/Kg)	NA	0,11
Na ⁺ (cmol/Kg)	NA	0,14
Al ⁺³ (cmol/Kg)	NA	0,0
P _{assimilável} (mg/Kg)	NA	2,0
N (g/Kg)	NA	0,6

ND: não detectado; NA: não analisado

Verifica-se que apesar do alto teor de contaminação presente no Solo 1 (53,8 mg HTP/g solo) a densidade microbiana heterotrófica total detectada (2,38 x 10⁶ UFC/g solo) fortaleceu, ainda mais, a opção pela adoção das técnicas de biorremediação no tratamento do mesmo. Já a concentração de microrganismos degradadores observada (4,28 x 10⁵ NMP/g solo) indica um elevado grau de adaptação da população microbiana ao contaminante presente neste solo.

Os baixos níveis de fertilidade do solo contaminado (relação C:N:P igual a 100:1,25:0,004) desfavorecem, a princípio, a ocorrência da biodegradação natural (ou intrínseca) dos poluentes, indicando a necessidade de adição de nutrientes para aumentar a atividade microbiana (técnica de bioestimulação).

Em função da parcela significativa de finos existente no solo (40,2% de silte + argila) fez-se essencial a realização de uma caracterização mineralógica do referido solo, por ser esta fração uma das principais determinantes do comportamento mecânico dos solos, bem como das interações solo/contaminante (PROVIDENTI *et al.*, 1993; BOOPATHY, 2000). Nessa etapa de caracterização mineralógica do solo foram efetuadas observações ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) e determinação de minerais por difração de Raios X.

Para efeito de observação ao MEV, foi empregado o solo virgem (não contaminado), proveniente da mesma região onde ocorreu o vazamento de óleo. Este procedimento foi adotado em função do risco de dano ao equipamento, caso fossem analisadas amostras do solo contaminado. Uma vez que o objetivo da observação ao MEV consistia em determinar as características elementares da matriz do solo, e não dos contaminantes presentes, as determinações em amostras de solo virgem foram consideradas satisfatórias. As análises foram realizadas pela Coordenação de Análises Minerais - Setor de Caracterização Tecnológica - do Centro de Tecnologia Mineral (SCT/COAM/CETEM/MCT). Após polimento e metalização com ouro de 8 amostras representativas do solo virgem, foram feitas observações ao MEV, modelo LEICA S440. As imagens foram geradas por detetor de elétrons secundários, que gera os níveis de cinza na dependência da morfologia. Além disso, foram obtidos espectros de composição química qualitativa por dispersão de energia (EDS – Electron Dispersive Spectroscopy) em pontos de área de aproximadamente 2 µm, selecionados mediante o exame das imagens. O EDS utilizado foi um Link ISIS L300 com detetor de SiLi Pentafet, janela ultrafina ATW II, de resolução de 133 eV para 5,9 keV.

Já as análises de Difração de Raios X foram executadas em difratômetro Siemens AXS D5005 com trocador automático de amostras de 40 posições e detetor de estado sólido de Nal. As seguintes condições de análise foram empregadas: radiação de Cu K α (λ = 1.54184 Å), 40 kV, 40 mA, geometria θ /2 θ , *range* de análise 3 a 70° 2 θ , passo de 0,02° 2 θ , tempo de análise 1,0 s por passo, e amostra em rotação durante a análise a 60 rpm (*spinner*).

A distribuição granulométrica foi refeita, por método distinto ao adotado anteriormente por SANTOS *et al.* (2001), para fins de validação dos resultados inicialmente obtidos. Tal ensaio foi realizado pelo Laboratório de Geotecnia do Programa de Engenharia Civil da COPPE/UFRJ, pelo método ABNT NBR 7181 (dezembro de 1984), com uma amostra representativa do solo virgem.

Como citado anteriormente, ao longo do desenvolvimento experimental da tese, o Solo 1 passou por um processo natural de intemperização no próprio local de armazenamento da empresa. Ressalta-se que, na época da primeira amostragem do solo para início do trabalho, nem o CETEM nem a EQ/UFRJ dispunham de espaço físico adequado ao armazenamento de quantidade suficiente de solo em condições refrigeradas para o desenvolvimento de todo o projeto (câmara fria, 4° C). Sendo assim, duas coletas/amostragens distintas foram realizadas. O primeiro lote coletado apresentou contaminação orgânica da ordem de 5% m/m de HTP (hidrocarbonetos totais de petróleo) e foi todo empregado nos testes em microcosmos, no desenvolvimento do protótipo de biorreator de bancada, conforme será descrito posteriormente neste capítulo. Já o segundo lote foi empregado em ensaios complementares em microcosmos e em experimentos no biorreator de bancada, a serem descritos posteriormente. Antes porém, foi necessária uma caracterização química e físico-química deste lote de solo para dar següência ao trabalho experimental.

Tendo sido comprovada a acentuada intemperização sofrida pelo Solo 1 e a conseqüente redução do teor de contaminante neste, concluiu-se que esforços para a aplicação de técnicas que visassem o aumento da eficiência de biodegradação tenderiam a não surtir o efeito desejado devido às características de recalcitrância da contaminação residual presente.

Tornou-se, então, imprescindível para a continuidade do projeto, a seleção de um novo solo com características físico-químicas similares às do Solo 1, sendo apresentado pela Petrobrás o solo proveniente do estado de Sergipe (Solo 2).

4.1.2. Solo 2

O Solo 2, utilizado na condução da segunda fase do trabalho experimental de tese, é proveniente de um campo de exploração de petróleo em terra, localizado no estado de Sergipe. A coleta do solo foi realizada por equipe da Petrobras de forma a garantir a representatividade da mesma. Esse solo já vinha sendo empregado no desenvolvimento de outros estudos envolvendo a aplicação do processo de

biorremediação (biopilhas etc) no próprio CETEM e na Petrobras e algumas características físicas e químicas já haviam sido determinadas conforme apresentado na Tabela 4.2 (SEABRA, 2005; SEABRA et al., 2006).

Tabela 4.2. Caracterização dos solos virgem e contaminado (adaptado de SEABRA, 2005: RIZZO et al., 2006, SEABRA et al. 2006 e SANTOS, 2007).

2005; RIZZO et al., 2006, SEABR	RA et al, 2006 e SANTOS, 2007).				
CARACTERIZAÇÃO	SOLO VIRGEM	SOLO CONTAMINADO (SOLO 2)			
FÍSICO-QUÍMICA					
Distribuição Granulométrica (%)					
Areia	75	NA			
Silte	14	NA			
Argila	11	NA			
Limite de Liquidez	ND	NA			
Limite de Plasticidade	Não plástico	NA			
Densidade da Partícula (g/mL)	2,2	1,4			
Densidade do solo (g/mL)	1,3	1,2			
Porosidade (%)	43	16			
рН	6,8	6,4			
Capacidade de Retenção de Água (%)	34	28			
ORGÂNICA					
HTP (mg/g)	NA	20,31*			
HPA	NA	NA			
S.A.R.A. (%)					
Parafinas	NA	43,68			
Aromáticos	NA	15,18			
Resinas	NA	21,08			
Matéria orgânica (%)	1,7	5,8			
Óleos e Graxas (%)	0,37	3,42			
INORGÂNICA	1				
Fertilidade					
Ca ⁺² (cmol/Kg)	NA	11, 0			
Mg ⁺² (cmol/Kg)	NA	3,6			
K⁺ (cmol/Kg)	NA	1,2			
Na ⁺ (cmol/Kg	NA	0,385			
Al ⁺³ (cmol/Kg)	NA 2.45	0			
P _{assimilável} (g/Kg)	0,15	0,13			
N (g/Kg)	1,3	2,3			
MICROBIOLÓGICA					
Pop. Heterotrófica Total (UFC/g de solo)	9,8 X10 ⁶	-			
Pop. Degradadora (NMP/g de solo)	2,8 X10 ⁶	-			

ND: não detectado; NA: não analisado *: média dos resultados de caracterização obtidos

Após a chegada do material no CETEM, foi realizada uma etapa de secagem a temperatura ambiente durante aproximadamente uma semana. Em seguida, o material foi homogeneizado, quarteado e peneirado em uma malha de 10 mesh (peneira ABNT nº12)

antes de ser disponibilizado para os experimentos. Até a realização dos testes, o solo foi estocado em câmara fria a 4°C.

Ao contrário do Solo 1, que se tratava de uma contaminação real, o Solo 2 não era originalmente contaminado. Assim, para a simulação de uma contaminação neste solo optou-se pela utilização do óleo cru do tipo Sergipano Terra, proveniente da mesma região de origem do solo, de forma a simular uma contaminação que possa vir a ocorrer durante a exploração dos poços localizados na área (vazamento involuntário de petróleo). O teor de contaminação adotado foi de 5% m/m.

A densidade microbiana heterotrófica total (9,8 x10⁶ UFC/g solo) e degradadora (2,8x10⁶ NMP/g solo) no solo virgem indicam a viabilidade da aplicação do processo de biorremediação.

Os níveis naturais de fertilidade do Solo 2 contaminado (C:N:P = 100:6,86:0,39) estão acima dos verificados para o Solo 1, porém ainda exigem que seja avaliada a necessidade de ajustes na relação C:N:P de forma a maximizar a atividade microbiana degradadora (aplicação da técnica de biestímulo).

Assim como realizado com o Solo 1, foi realizada pela Coordenação de Análises Minerais (COAM/CETEM) uma etapa complementar de caracterização, utilizando a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) acoplada a um sistema de dispersão de energia (EDS), e a Difração de Raios-X. As metodologias e equipamentos foram os mesmos empregados para o Solo 1 e descritos no item 4.1.1.

No procedimento de contaminação simulada do solo, as amostras de solo sem contaminação eram retiradas do estoque em câmara fria (4°C), sete dias antes da realização dos experimentos, sendo novamente secas a temperatura ambiente, por um período de quatro dias. A contaminação foi simulada no laboratório, ou na usina piloto, adicionando óleo cru na concentração de 5% m/m de solo seco. Após 72h, o material contaminado (solo + óleo) era utilizado para o desenvolvimento dos ensaios de biodegradação seja em microcosmos, seja nos biorreatores de bancada ou mesmo no biorreator piloto.

4.2. Definição da Configuração de Protótipo de Biorreator de Bancada

4.2.1. Avaliação inicial do comportamento mecânico do solo 1 em diferentes protótipos de biorreatores em escala de bancada

A partir de ensaios preliminares, realizados em homogeneizador de amostras do tipo carrossel e descritos a seguir, e de trabalhos reportados na literatura sobre aplicação de biorreatores de fase sólida e semi-sólida no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo (ALEF e NANNIPIERI, 1995; BANERJEE et al., 1995; BANERJI et al., 1995; KRÜGER et al., 1995; TRUAX et al., 1995; BRINKMANN et al., 1998; WOO e PARK, 1999; RICHNOW et al., 2000; ICP, 2003; PURWANINGSIHA et al., 2004; COLLINA et al., 2005; ARRAR et al., 2007; CLARK e BOOPATHY, 2007; DERUDI et al., 2007; MOHAN et al., 2007; OKUDA et al., 2007; SHAILAJA et al., 2007), foram idealizados dois protótipos de biorrreatores em escala reduzida, sendo um do tipo tambor rotativo e o outro, parafuso transportador. As observações, inicialmente visuais, decorrentes do comportamento mecânico do Solo 1 contaminado e do solo virgem, em cada um dos sistemas, permitiram a melhoria gradual dos protótipos e, finalmente, a proposição de uma terceira configuração de biorreator que será apresentada no item 4.3.2.

4.2.1.1. Ensaios em homogeneizador de amostras

Os ensaios com o solo virgem, realizados em homogeneizador de amostras do tipo "Carrossel" (Figura 4.1), tiveram como objetivo a observação do comportamento mecânico do solo quando submetido a movimento rotacional. Esses ensaios exploraram também a diferença do teor de umidade (50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 e 90% da capacidade de retenção de água - CRA) para um percentual de ocupação dos frascos de amostra empregados de, aproximadamente, 50%. Os testes foram conduzidos a 5 rpm, com observações visuais em 30' e 1 min.

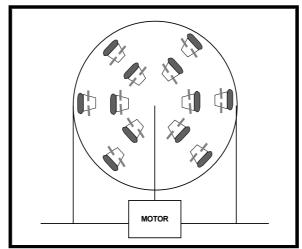


Figura 4.1. Homogeneizador de Amostras do Tipo "Carrossel"

Em função do comportamento mecânico observado para o solo virgem, uma segunda bateria de testes foi executada, com amostras do solo contaminado (Solo 1), desta vez contemplando o binômio "Ocupação/Umidade". Nesses testes menores taxas de ocupação foram avaliadas (20, 30 e 40% do volume útil) e os teores de umidade adotados também sofreram redução, ficando na faixa de 40 a 50% da CRA. As seguintes condições foram investigadas na busca pela minimização do fenômeno de aglomeração ("peletização"):

- (A) 40% de percentual de ocupação e 50% da CRA
- (B) 40% de percentual de ocupação e 45% da CRA
- (C) 40% de percentual de ocupação e 40% da CRA
- (D) 30% de percentual de ocupação e 50% da CRA
- (E) 30% de percentual de ocupação e 45% da CRA
- (F) 30% de percentual de ocupação e 40% da CRA
- (G) 20% de percentual de ocupação e 50% da CRA
- (H) 20% de percentual de ocupação e 45% da CRA
- (I) 20% de percentual de ocupação e 40% da CRA

É importante ressaltar que o percentual de ocupação do material sólido em reatores, relacionado à própria configuração desses, pode contribuir para a formação de regiões de compactação ou mesmo para a formação de agregados ("pellets"), conforme observado por BRINKMANN *et al.* (1998). Desta forma, a identificação do percentual de ocupação adequado deve ser combinado à otimização do teor de umidade (expresso em

percentual da capacidade de retenção de água) para a definição das melhores condições operacionais do reator.

4.2.1.2. Ensaios em tambor rotativo

O emprego de reatores do tipo tambor rotativo no tratamento de solos contaminados vêm sendo freqüentemente citado na literatura (BANERJEE *et al.*, 1995; KRÜGER *et al.*, 1995; TRUAX *et al.*, 1995; BRINKMANN *et al.*, 1998; WOO e PARK, 1999), conforme registrado anteriormente.

Com o objetivo de avaliar a aplicabilidade deste tipo de configuração no tratamento do Solo 1, foi adotado o protótipo de reator ilustrado na Figura 4.2. Ainda nesta figura observam-se as dimensões do reator de bancada, em acrílico, bem como o esquema da unidade motora responsável pela movimentação rotacional do sistema. O reator possuía um volume nominal de 510 mL, relação comprimento/diâmetro (c/d) de 1,06 e volumes úteis correspondentes a 476,4 mL (para uma altura de aleta de 2cm – testes A e B) e, posteriormente, 484,8mL (para uma altura de aleta de 1,5cm – testes C e D).

Nos referidos testes, o comportamento do solo contaminado foi observado sob diferentes condições de ocupação (% do volume útil) e de umidade (% da capacidade de retenção de água - CRA):

- (A) $V_{\text{útil}} = 476,4\text{mL}$; 50% do volume útil; 50% da CRA.
- (B) $V_{\text{útil}} = 476,4\text{mL}$; 40% do volume útil; 40% da CRA.
- (C) V_{útil} = 484,8mL; 40% do volume útil; 40% da CRA.
- (D) $V_{\text{útil}} = 484,8\text{mL}$; 40% do volume útil; 50% da CRA.

Durante a realização dos 4 testes, o protótipo foi mantido em unidade motora localizada na usina piloto do CETEM (Figura 4.2), sob rotação lenta (3 a 5 rpm), por aproximadamente 18 horas. Ao fim de cada teste, a extremidade rosqueada do reator foi removida e o aspecto do solo no interior do mesmo foi registrado fotograficamente.

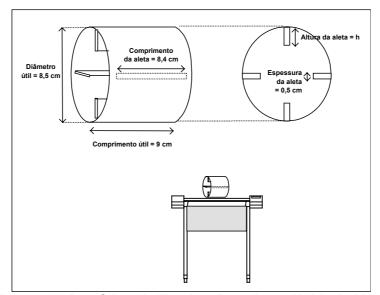


Figura 4.2. Protótipo de Tambor Rotativo e Unidade Motora

Na confecção deste protótipo, especial atenção foi dada as aletas. Tal preocupação justificou-se pela significativa agregação visualizada nos testes realizados anteriormente com o solo contaminado (testes no homogeneizador de amostras - carrossel) e pelas afirmações feitas por Woo e Park (1999), de que tambores não aletados permitem a compactação de material sólido nas paredes do reator e a formação de agregados, contribuindo para um grau de mistura deficiente.

4.2.1.3. Ensaios em parafuso transportador

Parafusos transportadores, embora menos utilizados, também vêm sendo reportados na literatura como aplicáveis no tratamento de solos contaminados (ALEF e NANNIPIERI, 1995; ICP, 2003).

Visando simular o uso de um parafuso transportador em escala de bancada, um eixo helicoidal, em aço inox, de diâmetro externo de 2,3 cm e diâmetro interno de 1,7 cm, foi fixado a um motor de agitador mecânico, de modo a revolver o solo no interior de 3 diferentes colunas de vidro (diâmetros internos e relações comprimento/diâmetro distintas). Neste protótipo, o binômio "Umidade/Ocupação" foi explorado, conforme apontado na Tabela 4.3.

			-			
TESTE	COMP. COLUNA (cm)	d _{INTERNO} COLUNA (cm)	RELAÇAÕ c/d _{INTERNO} (adimens.)	∆d ^(a) (cm)	OCUPAÇÃO (% do V _{ÚTIL})	UMIDADE (% da CRA)
Α	10,5	4,0	2,63	1,7	40	40
В	13,0	2,5	5,2	0,2	30	40
С	13,0	2,5	5,2	0,2	40	40
D	10,5	3,0	3,5	0,7	40	40
Е	10,5	3,0	3,5	0,7	40	50

Tabela 4.3. Condições Empregadas nos Testes em Protótipos de Parafusos

Transportadores

O esquema geral do protótipo de parafuso transportador pode ser visualizado na Figura 4.3 :

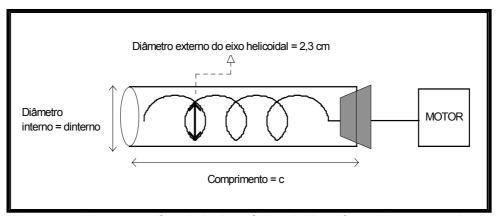


Figura 4.3. Esquema Geral do Protótipo de Parafuso Transportador

4.2.2. Proposição e dimensionamento de configuração alternativa de biorreator

Com base nas observações e nos resultados obtidos na etapa de avaliação do comportamento mecânico/reológico do solo contaminado nos diferentes protótipos de biorreatores em escala reduzida, que desencorajou o uso de tambores rotativos e tambores fixos com eixo do tipo parafuso transportador, nova pesquisa começou a ser feita, desta vez objetivando um levantamento dos tipos de misturadores de sólidos e/ou solos existentes. Foram localizados, via Internet, dois fabricantes de misturadores industriais (HC Davis Sons Manufacturing Co., Inc. – http://www.hcdavis.com/agitator.htm e Mueller Technologies International – http://www.mueller-trade.com/Mixing/Agitator_Types.htm). Destes, o primeiro fabricante foi contatado, resultando em significativa troca de informações. Duas possibilidades de configuração para o misturador/agitador interno do reator do tipo tambor fixo foram, a princípio, levantadas: agitador tipo pás (Figura 4.4) ou agitador tipo espirais (Figura 4.5). Valendo-se da

⁽a) Diferença entre o diâmetro interno da coluna e o diâmetro externo do eixo helicoidal (espaçamento "parede interna – eixo helicoidal").

experiência adquirida durante os testes descritos no item 4.2.1, no que diz respeito ao comportamento do solo (tendência a aglomeração e formação de pellets), foi selecionado, a princípio, o agitador do tipo pás (Figura 4.4) como sendo o que mais se adequaria aos objetivos do projeto de tese. Assim sendo, investiu-se na concepção de um misturador semelhante, de bancada, a ser confeccionado e montado pela equipe da oficina do Centro de Tecnologia Mineral (CETEM/MCT).

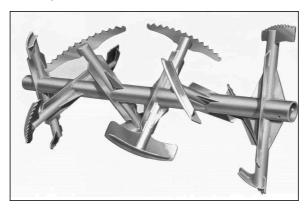


Figura 4.4. Esquema Representativo de um Agitador Interno (tipo pás) de um Reator do Tipo Tambor Fixo (http://www.hcdavis.com/agitator.htm)

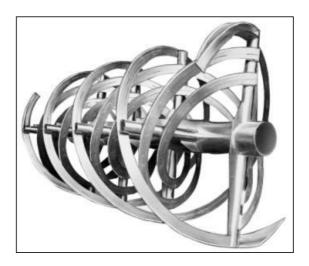


Figura 4.5. Esquema Representativo de um Agitador Interno (tipo espirais) de um Reator do Tipo Tambor Fixo (http://www.hcdavis.com/agitator.htm)

Na Figura 4.6, a seguir, é apresentado o esquema representativo do sistema de tratamento (incluindo o corpo do reator, pontos de amostragem/monitoramento/entradas e saídas e o sistema de agitação) que foi concebido. O objetivo inicial foi o de confeccionar um modelo/protótipo onde o corpo do tambor fixo fosse de acrílico, de forma a tornar possível a visualização do comportamento do material no interior do reator quando da realização dos testes. No que diz respeito ao material de confecção do agitador central, baseado na Figura 4.4 apresentada anteriormente, optou-se inicialmente

pelo PVC para confecção do eixo central e dos eixos perpendiculares, e pelo aço inox para a confecção das pás, de forma a conferir maior resistência às mesmas.

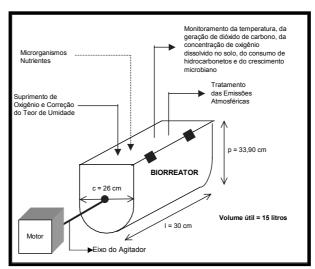


Figura 4.6. Esquema representativo do Sistema de Tratamento *Ex-Situ* de Solos Contaminados por Hidrocarbonetos de Petróleo, incluindo Biorreator.

O distanciamento das pás para o corpo do reator foi estabelecido inicialmente em 3 mm de forma a ser evitada a criação de um espaço vazio acentuado e a conseqüente formação de um "filme" de material (solo) nas paredes (Figura 4.7). Por outro lado, caso fosse estabelecido um menor espaçamento este poderia vir a ter como conseqüência danos (rachaduras) nas paredes do reator devido ao atrito excessivo das pás e do solo com estas.

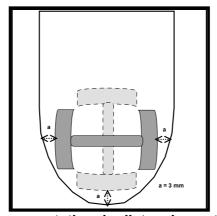


Figura 4.7. Esquema representativo do distanciamento das pás do agitador central em relação às paredes do biorreator (vista lateral).

Ao eixo central foram acoplados 5 eixos perpendiculares aos quais foram fixadas 2 pás (uma em cada extremidade). Os eixos perpendiculares foram fixados ao eixo central de forma que as pás localizadas em suas extremidades "fechem" o quadrante relativo ao diâmetro da seção cilíndrica do biorreator (Figura 4.7).

Decidiu-se que a inclinação e direcionamento das pás seriam definidos após os testes iniciais a serem realizados no protótipo, pois só após a visualização do comportamento do solo no reator seria possível o ajuste do posicionamento das mesmas.

Nas Figuras 4.8 (a e b), a seguir, são apresentados os desenhos detalhados do reator. O mesmo é cilíndrico, dotado de motor e eixo central ou agitador. O eixo central é dotado de cinco eixos perpendiculares onde as extremidades de cada um dos eixos perpendiculares são dotadas de uma pá de geometria específica. Na parte inferior do biorreator existe uma comporta para descarga do material de solo após o processo de biorremediação. Ao mesmo foi instalada uma tampa superior para carga e descarga e onde existe um duto de entrada para insumos como oxigênio, água, nutrientes, biossurfatante, etc. Além disso, esse duto é utilizado para retirar o CO₂ resultante do metabolismo bacteriano, bem como compostos orgânicos voláteis, que possam vir a ser gerados como subproduto da biodegradação dos poluentes orgânicos, e ar em excesso, durante o procedimento de aeração.

A vazão de ar alimentada ao sistema por compressor através de sistema de distribuição específico foi monitorada através da leitura direta em medidor de vazão da marca OMEL, modelo LAMBDA No. 51975G com capacidade de 4 a 45 l/min. A taxa de aeração aplicada para todos os testes foi de 20 l/min.

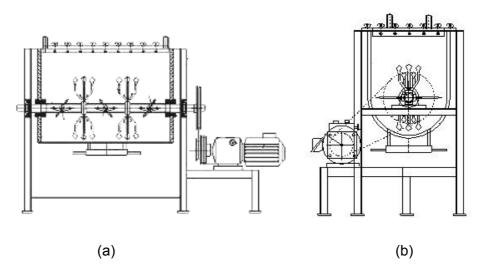


Figura 4.8. Desenho esquemático do protótipo de biorreator de bancada confeccionado no CETEM. A.Vista frontal; B. Vista lateral.

Na Figura 4.9, que é uma vista superior do biorreator, são indicados os pontos de amostragem (A, B, C, D, E) no interior do mesmo onde ocorre a coleta de amostras de

solo para análises químicas e microbiológicas, de forma a assegurar a representatividade da amostragem efetuada.

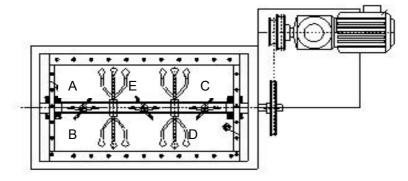


Figura 4.9. Vista superior do protótipo de biorreator de bancada.

Conforme a Figura 4.10, a primeira configuração de pá instalada no biorreator é em forma de rim.

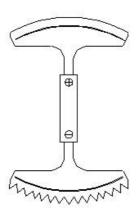


Figura 4.10. Primeira configuração de pá instalada no protótipo de biorreator de bancada (P1).

4.3. Ensaios de Biodegradabilidade em Microcosmos

4.3.1. Ensaios de biodegradabilidade com o solo 1

A biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em solo é prioritariamente regida por processos aeróbios onde a matéria orgânica disponível como fonte de energia para os microrganismos é transformada em CO₂ e água (produtos de sua completa mineralização) com grande liberação de energia. Esta energia, conservada e disponibilizada sob a forma de ATP, possibilita o crescimento celular, já que pode ser utilizada na síntese de proteínas, entre outros biopolímeros.

O conhecimento deste fenômeno metabólico celular permite estimar, através da quantificação do gás liberado (CO₂), a atividade respiratória microbiana associada ao

consumo do contaminante (principal fonte de carbono biodisponível na amostra) (HEITZER e SAYLER, 1993; SOLANO-SERENA et al., 1998; NONCENTIN et al., 2000; GIBB et al., 2001; TROQUEL et al., 2003; MORAIS, 2005; ORTIZ et al., 2006). Este procedimento foi adotado no presente trabalho para fins de avaliação da biodegradabilidade do contaminante orgânico, no caso do óleo cru, face às diversas condições testadas nos ensaios em microcosmos.

Assim sendo, anteriormente ao desenvolvimento/concepção do biorreator, objeto principal deste estudo, realizaram-se ensaios de biodegradabilidade em microcosmos para a adequação de condições de processo, sendo os mesmos avaliados através da quantificação de CO₂. Esta etapa prévia torna-se necessária tendo em vista os diversos fatores limitantes ao processo de biorremediação, tais como a presença de microrganismos capazes de degradar o contaminante, nutrientes, pH, temperatura, umidade, oxigênio e o tipo de contaminante (MOLINA-BARAHONA *et al.*, 2004). Os principais fatores avaliados nessa etapa foram a adequação da relação nutricional e da umidade empregadas, bem como a eficácia ou não da adição de material estruturante orgânico como forma de acelerar o processo de biorremediação..

Todos os ensaios desenvolvidos em microcosmos adotaram o sistema experimental apresentado na Figura 4.11, a seguir, que consistia de um frasco kitazato de 250 mL com rolha de silicone e saída lateral vedada por um tubo de látex e pinça de Mohr. Nesses frascos foram adicionados 50g do solo contaminado (ou do solo controle sem contaminação), água e os aditivos necessários a cada condição testada.



Figura 4.11. Sistema experimental utilizado nos ensaios de biodegradação em microcosmos

O teor de umidade foi corrigido individualmente no microcosmo para cada condição testada de forma a se obter valores correspondentes a 30 ou 50% da capacidade de retenção de água do Solo 1, dependendo da condição testada.

Uma vez que o Solo 1 apresentou, na etapa de caracterização, pH igual a 4,8 (considerado baixo para aplicação da biorremediação), 24 horas antes de cada ensaio de biodegradação em microcosmos foi necessária a neutralização da amostra de solo a ser utilizada com hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂) até pH 7. Este corretivo de pH foi adicionado em quantidade determinada através das curvas de neutralização obtidas por Santos *et al.* (2001) em trabalho anterior com esse mesmo solo.

Todos os testes foram realizados em duplicata e todos os frascos foram incubados em estufa a 30°C durante o período de condução de cada teste (31 ou 42 dias). Nesse período, os frascos eram retirados periodicamente (diariamente na primeira semana, e a cada 48 h durante o restante do período do teste, exceto finais de semana) para análise cromatográfica do CO₂ gerado no *headspace* do microcosmo, aeração e correção de umidade, quando necessário.

Na Tabela 4.4, a seguir, são apresentadas as condições dos três testes que compuseram essa etapa do trabalho com o Solo 1: TESTE INICIAL, ADEQUAÇÃO DE UMIDADE & RELAÇÃO NUTRICIONAL e ADIÇÃO DE MATERIAL ESTRUTURANTE.

O primeiro teste de biodegradabilidade realizado com o Solo 1, denominado de TESTE INICIAL, objetivou verificar a resposta do solo contaminado, em termos de geração de CO₂, quando submetido a aplicação da técnica de bioestímulo, adotando-se para isso a relação nutricional clássica sugerida na literatura que é C:N:P = 100:10:1 (ALEXANDER, 1999). A correção dos teores de N e P foi realizada através da adição dos sais inorgânicos nitrato de sódio (NaNO₃) e de fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄). Como padrão de comparação para verificar a eficácia da aplicação da técnica, usou-se o solo contaminado não bioestimulado apenas com correção do teor de umidade (solo controle). Além disso, buscou-se identificar a possibilidade de geração de CO₂ no solo contaminado por processos abióticos através da adição de azida de sódio (0,3% m/m).

Tabela 4.4. Ensaios de Biodegradabilidade em Microcosmos com o Solo 1

IDENTIFICAÇÃO DO TESTE	CONDIÇÃO (a)	SOLO	CORREÇÃO DE UMIDADE (% da CRA)	AJUSTE DE pH (pH = 7)	CORREÇÃO DE N e P (C:N:P) (b)	ADIÇÃO DE MATERIAL ESTRUTU- RANTE	TEMPO DE ENSAIO (DIAS)
	CAZ - Controle Abiótico (0,3% p/p de azida de sódio)	Solo 1	50	Não	100:1,25:0,004	Não	42
INICIAL	C BIOEST	Solo 1	50	Sim	100:10:1	Não	42
	O	Solo 1	50	Não	100:1,25:0,04	Não	42
	^	Solo virgem	50	Não	100:1,25:0,04	Não	42
	VBIOEST	Solo virgem	90	Sim	100:10:1	Não	42
	C ₃₀ C _T	Solo 1	30	Sim	100:10:1	Não	31
ADEQUAÇÃO DE C30CS/N	C ₃₀ C _{S/N}	Solo 1	30	Sim	100:1,25:1	Não	31
UMIDADE	& C30S/C	Solo 1	30	Não	100:1,25:0,004	Não	31
RELAÇÃO	C ₅₀ C _T	Solo 1	20	Sim	100:10:1	Não	31
NUTRICIONAL	C ₅₀ C _{S/N}	Solo 1	50	Sim	100:1,25:1	Não	31
	C ₅₀ S/C	Solo 1	20	Não	100:1,25:0,004	Não	31
ADIÇÃO DE	DE C	Solo 1	20	Sim	100:1,25:1	Não	42
MATERIAL	C Serr 10%	Solo 1	50	Sim	100:1,25:1	Sim	42
ESTRUTURANTE	V Serr 10%	Solo virgem	50	Sim	100:1,25:1	Sim	42

Identificação da amostra

Correções de nitrogênio (N) e fósforo (P) realizadas descontando-se as concentrações originais destes nutrientes no solo contaminado e obtidas através da adição de nitrato de sódio (NaNO₃) e de fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄). © (**a**

Amostras de solo virgem foram também submetidas às condições de tratamento com e sem o bioestímulo de forma a ser verificada a geração de CO₂ resultante apenas de biodegradação da matéria orgânica original do próprio solo.

Ao final do TESTE INICIAL, no qual foi constatada a necessidade de aplicação da técnica de bioestímulo de modo a favorecer a degradação biológica do óleo cru presente no solo contaminado, partiu-se para a realização de ensaio complementar para definição do teor de umidade e da melhor relação nutricional a serem adotados para o solo em questão.

Embora seja indispensável à manutenção da atividade microbiana, a água, se em grandes quantidades, tende a dificultar o processo de biorremediação de solos, em função das barreiras impostas ao transporte de oxigênio e à diluição de nutrientes (ALEXANDER, 1999). Do ponto de vista mecânico, o excesso de umidade (acima de 50% m/m) em solos com características argilosas impõe severas limitações ao tratamento em biorreatores, em função de fenômenos de agregação (BRINKMANN *et al.*, 1998; WOO e PARK, 1999). Faz-se necessário, portanto, buscar um equilíbrio entre estas exigências, equilíbrio este que se traduz pela adequação do teor de umidade a ser empregado (ALEF e NANNIPIERI, 1995).

Desta forma, após consulta a referências bibliográficas sobre a adequação das dosagens de nutrientes e do teor de umidade em processos de biorremediação (DEUEL e HOLLIDAY, 1997; WALWORTH et al., 1997; BRINKMANN et al., 1998; ALEXANDER, 1999; FOGHT et al., 1999; TRINDADE et al., 2005; WALWORTH et al., 2001), foi conduzido o teste denominado de ADEQUAÇÃO DE UMIDADE & RELAÇÃO NUTRICIONAL. Neste teste foram avaliados teores de umidade de 30 e 50% da capacidade de retenção de água (CRA) do solo (8,4 e 14 % de umidade, respectivamente) e a correção conjunta ou isolada dos macro-nutrientes essenciais (nitrogênio e/ou fósforo).

O terceiro teste de biodegradabilidade, denominado de ADIÇÃO DE MATERIAL ESTRUTURANTE, objetivou avaliar a eficiência da adição de um material estruturante de origem orgânica, no caso a serragem, como auxiliar no processo de biodegradação do contaminante orgânico, tendo em vista ser esta uma opção quando o solo contaminado a ser tratado já passou por um acentuado processo de intemperização e os compostos orgânicos poluentes encontram-se fortemente aderidos à matriz do solo, como no caso

do Solo 1. Nesses casos, apesar da microbiota nativa encontrar-se adaptada à presença do contaminante, a reduzida biodisponibilidade do contaminante e dos nutrientes bem como a reduzida concentração de oxigênio, podem ser desfavoráveis ao processo de biorremediação. A adição de materiais estruturantes orgânicos, geralmente, contribui para o aumento da atividade microbiana de uma forma geral e também daqueles microrganismos degradadores específicos, como os degradadores de hidrocarbonetos de petróleo (ELEKTOROWICKZ, 1994; CHO et al., 1997; ALEXANDER, 1999; RHYKERD et al., 1999; DAVIS e WILSON, 2000; JORGENSEN et al., 2000; VASUDEVAN e RAJARAM, 2001; BARRINGTON et al., 2002; CHOI et al., 2003; STRAUBE et al., 2003; MEYSAMI e BAHERI, 2003; MOLINA-BARAHONA et al., 2004; RAIMUNDO et al., 2004; LEE at al., 2007; ROLDA'N-MARTY'N et al., 2007; ROJAS-ALVELIZAPA et al., 2007).

A serragem, com tamanho de partículas entre 1,68mm e 4,76mm (- 10 # e + 4#, respectivamente), foi escolhida como o material estruturante a ser empregado tendo em vista os resultados promissores obtidos em trabalhos anteriores (RAIMUNDO *et al.*, 2004; AZEVEDO *et al.*, 2005). Esse material foi obtido de uma serralheria no Rio de Janeiro, onde era caracterizado como resíduo, e não possuía adição de produtos químicos conservantes da madeira. Uma vez que a concentração de agente estruturante a ser utilizada no tratamento de solos pode variar de 2 a 12% m/m, optou-se pela adição da serragem em concentração igual a 10% m/m.

Ao final desta etapa, as melhores condições de processo identificadas nos ensaios em microcosmos foram aplicadas nos ensaios de biorremediação no protótipo de biorreator de fase sólida ainda em escala de bancada (item 4.4.1).

4.3.2. Ensaios de biodegradabilidade com o solo 2

Após a seleção do Solo 2 para continuidade do trabalho experimental da tese, foi necessária a realização de ensaios de biodegradação em microcosmos, semelhantes aos realizados com o Solo 1, visando determinar as melhores condições para o tratamento do mesmo (Tabela 4.5).

O primeiro teste de biodegradação, identificado como TESTE INICIAL, buscou estabelecer a relação nutricional adequada para otimizar o processo de biorremediação. Os nutrientes avaliados foram o nitrogênio e o fósforo, os quais foram adicionados ao solo contaminado na forma dos sais inorgânicos, nitrato de sódio (NaNO₃) e fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), respectivamente. Os cálculos para adição de nutrientes foram baseados no conteúdo de carbono orgânico total no solo, determinado pelo teor de

carbono da matéria orgânica já presente no solo mais o teor de carbono proveniente da contaminação. Admitiu-se que este último era de 85% da massa de óleo adicionada (TRINDADE, 2002).

Para as cinco condições testadas, a correção do teor de umidade foi estabelecida em 50% da capacidade de retenção de água (CRA) do Solo 2 (14% de umidade), tendo sido esse teor definido como o mais adequado nos ensaios realizados com o Solo 1.

Como o pH do Solo 2 já se encontrava naturalmente próximo a neutralidade (6,4) não foi necessária a correção do valor do mesmo.

As relações nutricionais apresentadas para as condições 1 e 2 do TESTE INICIAL são as relações naturalmente encontradas no solo sem contaminação e solo contaminado, respectivamente. As demais condições tiveram o teor de nitrogênio e fósforo corrigidos, em conjunto ou separadamente, em concentrações testadas anteriormente para o Solo 1 ou citadas na literatura.

No segundo teste, denominado de "ADIÇÃO DE MATERIAL ESTRUTURANTE E FONTE DE NITROGÊNIO", a eficácia da adição da serragem como material estruturante foi avaliada após o estabelecimento da relação nutricional mais adequada. A concentração de 10% m/m da serragem foi mantida e buscou-se avaliar também uma fonte de nitrogênio alternativa a utilizada até então (nitrato de sódio), principalmente levando-se em consideração a possibilidade de ampliação de escala do sistema de tratamento proposto (biorreator). A uréia comercial (45% de nitrogênio) foi a fonte selecionada, tendo em vista a mesma ser empregada comumente como fertilizante agrícola e possuir custo reduzido quando comparado as fontes de nitrato. Segundo levantamento realizado com empresas fornecedoras de produtos químicos em novembro de 2007, o custo do nitrato de sódio é de R\$ 22,00/kg, em média. Já o custo médio da uréia é de R\$ 12,50/kg, representando cerca de 43% de redução.

Neste teste procedeu-se a adição da serragem (10% m/m) também ao solo sem contaminação (SV Serr 10%), de forma que os resultados de evolução de CO₂ obtidos fossem representativos somente da degradação da serragem e da matéria orgânica natural do próprio solo, e pudessem ser usados descontando-os dos valores de CO₂ obtidos nas demais condições, nas quais a serragem foi adicionada ao solo contaminado. Dessa forma, poder-se-ia obter a estimativa da geração de CO₂ resultante apenas da degradação do óleo cru. Para a condição com solo virgem, a correção de nitrogênio não

foi necessária visto que a relação nutricional do solo sem contaminação é de C:N=100:13, valor este acima do que vem sendo testado, C:N=100:10.

Tabela 4.5. Ensaios de Biodegradabilidade em Microcosmos com o Solo 2

IDENTIFICAÇÃO DO TESTE	CONDIÇÃO (A)	SOLO	CORREÇÃO DE UMIDADE (% da CRA) (b)	CORREÇÃO DE N e P (C:N:P) ®	ADIÇÃO DE MATERIAL ESTRUTURANTE	TEMPO DE ENSAIO (DIAS)
	1	Solo Virgem	50	100:13:1,5*	Não	42
	2	Solo 2	50	100:6,86:0,39*	Não	42
INICIAL	3	Solo 2	50	100:6,86:1	Não	42
	4	Solo 2	50	100:10:0,39	Não	42
	5	Solo 2	50	100:10:1	Não	42
	SC Nit	Solo 2	50	100:10:0,39	Não	42
ADIÇÃO DE MATERIAL	SC Nit Serr 10%	Solo 2	50	100:10:0,39	Sim	42
ESTRUTURANTE e	SC Ur	Solo 2	50	100:10:0,39	Não	42
FONTE DE NITROGÊNIO	SC Ur Serr 10%	Solo 2	50	100:10:0,39	Sim	42
COLINO	SV Serr 10%	Solo virgem	50	100:13:1,5*	Sim	42

^{*}Relação nutricional natural do solo

4.4. Experimentos em Biorreator de Bancada

O monitoramento dos processos de biorremediação conduzidos no biorreator de bancada seja para o Solo 1, seja para o Solo 2, envolveu, de uma forma geral, a quantificação da concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP), a determinação da concentração de óleos e graxas (OG), o acompanhamento dos valores de pH e do teor de umidade e o monitoramento da alteração da concentração da população microbiana presente no solo, no início e ao final dos ensaios.

Todas as metodologias/técnicas empregadas serão detalhadas no item 4.7. Metodologias para o Monitoramento dos Ensaios de Biodegradação.

4.4.1. Ensaios de biorremediação com solo 1 no protótipo 1

Após a concepção do protótipo de biorreator de bancada, denominado de protótipo 1, e realização dos testes mecânicos no mesmo, iniciou-se a etapa de condução de ensaios de biorremediação do Solo 1 neste biorreator.

As condições específicas, para cada um dos ensaios realizados, são apresentadas na Tabela 4.6, a seguir, e foram selecionadas em função dos resultados promissores alcançados nos testes de biodegradabilidade em microcosmos apresentados anteriormente (item 4.3).

Nit = Adição de NaNO₃, Ur = Adição de Uréia

Conforme será detalhado posteriormente no item 5.1.1 do Capítulo 5 (Resultados e Discussões), para o início dos testes no protótipo 1 foi necessária uma nova coleta/amostragem do solo 1 no local de armazenamento temporário do mesmo na empresa geradora do resíduo (dique de contenção) e, conseqüentemente, uma nova caracterização do material entregue ao CETEM. Assim feito, utilizou-se essa nova remessa de Solo 1(identificada como segunda remessa) para a realização desta etapa do trabalho experimental de tese.

Durante os testes de avaliação da capacidade de carga do reator (adição de quantidades crescentes de solo contaminado para verificação da resistência mecânica do corpo do tambor, do eixo e do motor), definiu-se a carga de 8kg de solo úmido (com o teor de umidade de 50% CRA) como sendo a carga ideal para o início do teste. Este valor corresponde a 40% de ocupação do volume útil do reator (29,96 litros).

No primeiro teste (1º TESTE S1), que premiou a aplicação apenas da técnica de bioestímulo, adotou-se a relação nutricional de C:N:P de 100:1,25:1 e ajustou-se o pH para 7, sendo estas condições estabelecidas como ótimas em testes anteriores em microcosmos (item 4.3).

O material era mantido agitado no interior do reator através do movimento rotacional do eixo central (4 a 5 rpm) durante cerca de 7 horas diárias, com exceção dos finais de semana e feriados quando o sistema de agitação era mantido desligado por questões de segurança. O teste foi conduzido por um período de 42 dias. Diariamente o reator era aerado por 1 hora, utilizando-se ar comprimido, por um sistema de distribuição de ar específico instalado no interior do reator, na parte superior do mesmo. A vazão de ar alimentada foi monitorada e mantida a aproximadamente 20 mL/min.

Tabela 4.6. Ensaios de Biorremediação com Solo 1 no Protótipo 1

Identificação	Taxa de Ocupação	Massa de Solo	Umidade	Correção pH	Correção Nutricional	Adição de Material	Tempo de Ensaio	4	Agitação	gitação Aer	
do Ensaio	(% volume útil)	(kg)	(%CRA)	(pH 7) ^(a)	(C:N:P) (b)	Estruturante	(dias)	RPM	Ciclos	I/min	Ciclos
1° TESTE S1	40	8	50	Sim	100:1,25:1	Não	42	4 - 5	7 h/dia; contínuo	20	1h/dia; contínua
2° TESTE S1	40	8	50	Sim	100:1,25:1	Sim	42	4 - 5	30 min/dia; 2 ciclos 15 min	20	1h/dia; contínua

⁽a) realizada com $Ca(OH)_2$ em quantidade estabelecida por curva de neutralização (SANTOS *et al.*, 2001)

⁽b) teor de nitrogênio original do solo1; teor de fósforo corrigido através da adição de KH₂PO₄

O 2º TESTE S1, teve como objetivo principal avaliar a eficácia da adição da serragem ao Solo 1, intensamente intemperizado, como forma de otimizar o processo de biodegradação do óleo residual. A concentração de material estruturante empregada (10% m/m) foi determinada em ensaios em microcosmos (item 4.3) e o mesmo foi adicionado com granulometria entre -10# e + 4# (-1,68mm e +4,76mm, respectivamente). A agitação foi alterada, com relação ao primeiro teste, para o sistema intermitente de ciclos de 15 minutos com a velocidade de 4-5 rpm, duas vezes ao dia, tendo em vista o desgaste excessivo das pás ao serem submetidas a agitação contínua por 7 horas/dia (condição do 1º Teste S1). Nesta nova condição, o primeiro ciclo de agitação ocorria na parte da manhã, no início de operação, e o segundo na parte da tarde, durante o período de aeração do reator.

4.4.2. Ensaios de biorremediação com solo 2 no protótipo 1

Os ensaios de biorremediação com o Solo 2 no protótipo 1 envolveram, assim como ocorreu com o Solo 1, a aplicação das técnicas de biestímulo e bioestímulo associado à adição de material estruturante (serragem). Com citado no item 4.3.2 (ensaios em microcosmos com o Solo 2), o solo foi contaminado artificialmente com 5% (m/m) de óleo cru.

Na Tabela 4.7, a seguir, são apresentadas as condições específicas para cada um dos ensaios realizados.

Destaca-se que, diferentemente do Solo 1, para o qual não havia a necessidade de incorporação de fonte de nitrogênio para correção da relação C:N:P, para o Solo 2 essa necessidade existe (detalhes a serem fornecidos no Capítulo 5 – Resultados e Discussão). Por esse motivo e visando ainda a redução do custo do processo de tratamento quando da ampliação de escala do mesmo, foram utilizada duas fontes distintas de nitrogênio: nitrato de sódio (1° e 2° Testes S2) e Uréia (3° e 4° Testes S2).

Tabela 4.7. Ensaios de Biorremediação com Solo 2 no Protótipo 1

Identificação		Massa de Solo	Umidade	Correção pH		Adição de Material Estruturante		Meterial					Tempo de		Agitação	A	eração
do Ensaio	(%volume útil)	(kg)	(%CRA)	(pH 7)	(C:N:P)		Ensaio (dias)	RPM	Ciclos	l/min	Ciclos						
1° TESTE S2	40	8	50	Não	100:10:0,39 (a)	Não	42	4 - 5	30 min/dia; 2 ciclos 15 min	20	1h/dia; contínua						
2º TESTE S2	40	8	50	Não	100:10:0,39 ^(a)	Sim	42	4 - 5	30 min/dia; 2 ciclos 15 min	20	1h/dia; contínua						
3º TESTE S2	40	8	50	Não	100:10:0,39 ^(b)	Não	42	4 - 5	30 min/dia; 2 ciclos 15 min	20	1h/dia; contínua						
4° TESTE S2	40	8	50	Não	100:10:0,39 (b)	Sim	42	4 - 5	30 min/dia; 2 ciclos 15 min	20	1h/dia; contínua						

(a) teor de nitrogênio corrigido com nitrato de sódio ou (b) com uréia

4.4.3. Confecção de novos protótipos de biorreator em escala de bancada e ensaios de biorremediação com solo 2 no protótipo com novas pás

Como continuidade do processo de aprimoramento do desenho das pás que compõem o eixo do biorreator, 3 novos modelos foram concebidos e confeccionados no CETEM. De forma a possibilitar a realização paralela de testes com as diferentes pás, foram confeccionados 3 novos biorreatores em escala de bancada. Esses novos reatores receberam as identificações de Protótipos 2, 3 e 4, em função da configuração das pás instaladas e possuíam dimensões semelhantes as do protótipo 1.

Na Figura 4.12 (a, b, c), são apresentados os desenhos das três diferentes configurações de pás alternativas à configuração inicial (forma de rim) instalada no protótipo 1 de biorreator de bancada. Todas as configurações foram concebidas de forma a proporcionar uma melhor homogeneização do solo no interior do reator e a minimização da formação de pelotas e de pontos de aglomeração durante o processo de tratamento do mesmo.

Na Figura 4.12 (a) a configuração de pá proposta não contempla a base em forma de rim. Nessa configuração, hastes cilíndricas metálicas saem diretamente da base do eixo das pás e se subdividem em hastes metálicas cilíndricas auxiliares que se distribuem em arranjos de 3 pontas achatadas.

Na configuração de pá ilustrada na Figura 4.12 (b), na base em formato de rim são fixadas entre 10 e 20 pequenas hastes cilíndricas metálicas com o objetivo de remover filmes de solo aderidos à parede do biorreator, bem como promover a homogeneização do solo. Configuração semelhante é ilustrada na Figura 4.12 (c), onde, no entanto, as hastes cilíndricas metálicas apresentam maior extensão do que as apresentadas na Figura 4.12 (b).

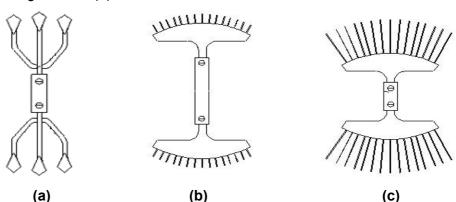


Figura 4.12. Desenhos das quatro diferentes configurações de pás alternativas (a, b, c) instaladas nos protótipos P2, P3 e P4 de biorreator de bancada, respectivamente.

Todas as pás foram devidamente instaladas nos seus respectivos protótipos e foram realizados testes com solo não contaminado para comprovação da eficiência dos sistemas de agitação/homogeneização, assim como conduzido com o Protótipo 1.

Em seguida, foram realizados ensaios de biodegradação com o solo 2 tendo como objetivo principal comparar o desempenho das diferentes pás, buscando verificar a ocorrência ou não de alterações na eficiência de remoção de hidrocarbonetos totais como conseqüência da conformação da pá.

As condições testadas foram idênticas as descritas no item 4.4.2 e premiaram a aplicação das técnicas de biestímulo e bioestímulo associado à adição de material estruturante (serragem). Como os resultados obtidos nos testes com o Solo 2 no protótipo 1 indicaram a viabilidade do uso da uréia como fonte de nitrogênio, os testes realizados com as demais configurações de pás (P2, P3 e P4) foram realizados apenas com essa fonte de nitrogênio.

Na Tabela 4.8, a seguir, são apresentadas as condições experimentais para cada ensaio realizado.

Tabela 4.8. Ensaios de Biorremediação com Solo 2 nos Protótipos 2, 3 e 4

Identificação do Ensaio	Taxa de Ocupação (%volume útil)	Massa de Solo (kg)	Umidade (%CRA)	Correção pH (pH 7)	Correção Nutricional (C:N:P) ^(a)	Adição de Material Estruturante	Tempo de Ensaio (dias)	de Agitação Ensaio RPM Ciclos		Aeração I/min Ciclos	
1° TESTE S2 P2	40	8	50	Não	100:10:0,39	Não	42	4 - 5	30 min/dia; 2 ciclos 15 min	20	1h/dia; contínua
2° TESTE S2 P2	40	8	50	Não	100:10:0,39	Sim	42	4 - 5	30 min/dia; 2 ciclos 15 min	20	1h/dia; contínua
1° TESTE S2 P3	40	8	50	Não	100:10:0,39	Não	42	4 - 5	30 min/dia; 2 ciclos 15 min	20	1h/dia; continua
2° TESTE S2 P3	40	8	50	Não	100:10:0,39	Sim	42	4 - 5	30 min/dia; 2 ciclos 15 min	20	1h/dia; continua
1° TESTE S2 P4	40	8	50	Não	100:10:0,39	Não	42	4 - 5	30 min/dia; 2 ciclos 15 min	20	1h/dia; contínua
2° TESTE S2 P4	40	8	50	Não	100:10:0,39	Sim	42	4 - 5	30 min/dia; 2 ciclos 15 min	20	1h/dia; contínua

(a) teor de fósforo original do solo2; teor de nitrogênio corrigido com uréia

4.5. Projeto e Confecção de Biorreator Piloto

Apesar de, pelo cronograma físico inicial da proposta de projeto de tese, essa etapa não estar prevista, ela fazia parte do escopo do projeto existente entre a EQ/UFRJ, o CETEM/MCT e a Petrobras, e se constitui basicamente da aplicação, em escala

ampliada, de todo o conhecimento gerado ao longo do trabalho de tese. Desta forma, a mesma foi incluída de forma bastante sintética no escopo deste trabalho.

Para a execução da etapa de confecção da unidade de demonstração, com capacidade estimada em 800 kg, foi firmada uma parceira com a Empresa Albrecht Equipamentos Industriais L^{tda.}, localizada em Joinville, Santa Catarina. A mesma foi preliminarmente selecionada pela capacidade demonstrada em outros projetos de pesquisa desenvolvidos em conjunto com a Petrobras.

O sistema fornecido pela Albrecht, apresentado na Figura 4.13, compreendeu 01 biorreator em formato "U" com dimensões ø800 x 1.200 x 1.000 mm, construído em aço carbono totalizando um volume de 876 litros. O biorreator possuía tampa frontal móvel construída em chapa de aço carbono e a remoção desta tampa permitia o livre acesso ao seu interior para remoção dos impelidores, limpeza, posicionamento dos aspersores, etc. Uma porta de carga estava alojada na parte superior do biorreator e era provida de uma lâmina de policarbonato para permitir a inspeção visual do comportamento do processo. Já a porta de descarga estava alojada no centro ao fundo do equipamento e era provida de tampa e vedação tipo fecho rápido. A descarga do solo tratado deverá ser efetuada com movimentos reversíveis dos impelidores.

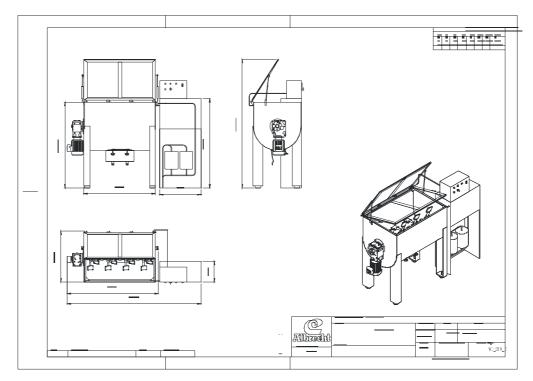


Figura 4.13. Desenho esquemático do biorreator em escala ampliada confeccionado pela Albrecht Equipamentos Industriais Ltda.

A configuração de pá instalada no biorreator piloto foi selecionada em função dos melhores resultados obtidos nos testes no protótipo de bioreator de bancada.

O reator possui como sistema de controle um medidor tipo TESTO-650 para monitoramento de temperatura e umidade no interior do reator e um analisador de gases do tipo infravermelho, da marca SERVOMEX para quantificação da concentração de CO₂.

O biorreator encontra-se ligado a um sistema de controle computadorizado que utiliza o software ELIPSE SCADA® com a finalidade de supervisionar e automatizar os componentes do sistema (agitação, aeração,introdução de aditivos), bem como o controle das variáveis do processo (temperatura, umidade, concentração de CO₂). A utilização do software ELIPSE SCADA® representou um ganho em termos de automação e controle do processo quando comparada com os protótipos de bancada utilizados na segunda etapa do projeto.

O software apresenta a interface "BIO REATOR BRL-400" (Figura 4.14), onde se pode observar através da tela do computador todas as possibilidades de controle e automação do processo. Pode-se visualizar o desenho esquemático do biorreator com o motor do eixo de agitação ativado com velocidade pré-fixada. No desenho do corpo do reator visualizam-se os valores dos parâmetros de acompanhamento de processo a saber: concentração de CO₂, temperatura interna do reator, temperatura externa e umidade. Conectados ao biorreator existem o compressor de ar e os cilindros para introdução de aditivos (água, nutrientes etc). Essa adição é controlada e programada de acordo com parâmetros pré-estabelecidos para tratamento do solo contaminado e programados na tela de estabelecimento das condições de processo. A dosagem dos aditivos e do ar é realizada através das válvulas solenóides acopladas na parte traseira do biorreator. Na tela da Figura 4.14, pode-se verificar ainda o tempo decorrido de processo, o tempo de rotação do motor e tempo de dosagem de nutrientes, os quais podem ser configurados através da tela de programação dos parâmetros.

Além disso pode-se acompanhar o consumo energético para cada teste realizado. Os alarmes e as intervenções realizadas pelos usuários são também registrados e visualizadas nesta mesma tela.

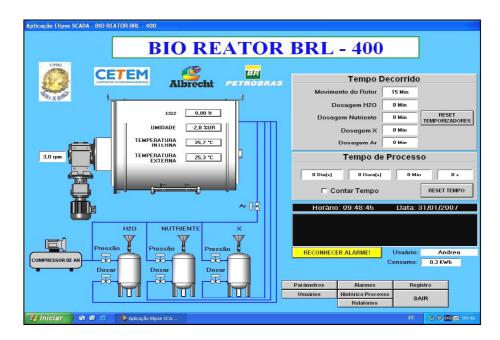


Figura 4.14. Interface do software ELIPSE SCADA ® BIO REATOR BRL - 400

A tela do ELIPSE SCADA® possui botões que permitem acesso rápido aos usuários, alarmes, registros , parâmetros, histórico do processo e relatórios de dados do processo em tempo real de funcionamento do biorreator (evolução dos parâmetros CO₂, umidade, temperatura).

4.6. Experimentos em Biorreator Piloto

Para execução dos ensaios no biorreator piloto foi utilizado o Solo 2. Até o momento do fechamento deste trabalho de tese, foram conduzidos dois testes no referido equipamento.

O 1° teste focou o tratamento de uma carga do Solo 2, sem a adição de material estruturante, usando uréia para estímulo da atividade microbiana, em especial dos microrganismos degradadores de hidrocarbonetos de Petróleo. Já o 2° teste usou uma carga de solo 2, bioestimulado, porém com a adição do material estruturante (serragem). O 1° teste teve duração de 7 semanas, enquanto o 2°Teste se estendeu por 14 semanas.

Em ambos os testes o reator foi carregado com uma carga mássica de cerca de 400 kg de material (solo, óleo, água e/ou material estruturante), ou seja 50% de ocupação (carga máxima 800 kg). O Solo 2 foi contaminado com 5% (m/m) de óleo sergipano terra, o teor de umidade corrigido para 50% CRA do solo e a uréia adicionada de forma a manter uma relação C:N:P = 100:10:0,39. No segundo teste, a serragem foi

adicionada na concentração de 10% m/m. As massas de serragem, uréia, óleo, e água, adicionados ao solo foram calculadas tendo como base os ensaios apresentados no item 4.4 (experimentos em biorreatores de bancada) e são apresentados na Tabela 4.9.

Tabela 4.9. Materiais adicionados nos ensaios em biorreator piloto

Material	Quantidade Adicionada (kg)
Serragem	40*
Uréia	0,8
Óleo	20
Água	53,2

^{*} Material adicionado apenas no segundo teste no biorreator piloto. No primeiro teste esta quantidade de material foi substituída por solo.

O monitoramento dos ensaios envolveu a quantificação da concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP), a determinação da concentração de óleos e graxas (OG), o acompanhamento dos valores de pH e do teor de umidade e o monitoramento da alteração da concentração da população microbiana presente no solo, no início e ao final dos ensaios. Todas as metodologias/técnicas empregadas serão detalhadas no item 4.7. Metodologias para o Monitoramento dos Ensaios de Biodegradação.

4.7. Metodologias Para o Monitoramento dos Ensaios de Biodegradação

A seguir, são apresentadas as metodologias analíticas utilizadas no monitoramento dos ensaios de biodegradação tanto em microcosmos (análise cromatográfica do CO₂ gerado) quanto nos biorreatores.

4.7.1. Análise cromatográfica do CO2 produzido

A análise cromatográfica de CO₂ foi empregada especialmente nos testes em microcosmos.

Com o auxílio de uma seringa para análise cromatográfica, foram injetadas, no Cromatógrafo a Gás HP 5890, amostras de 0,5mL das atmosferas internas dos kitazatos - "headspaces" referentes às condições analisadas. Todas as injeções foram realizadas em duplicata e os resultados expressos pela média dos valores de leitura obtidos. Uma vez que as respostas cromatográficas são dadas em % de área de integração, fez-se necessária a construção de curvas de calibração relacionando estas porcentagens de

área com o número de mmoles, ou de μmoles, de CO₂ produzidos. Construiu-se, assim, curva de calibração, de acordo com faixas de concentração de gás gerado na reação estequiométrica entre Na₂CO₃ e HCI, conforme metodologia descrita por Ururahy (1998). As condições gerais de análise empregadas durante o ensaio encontram-se listadas abaixo:

Vazão do gás de arraste (He): 17,5mL / min

• Vazão do gás de referência (He): 29,0 mL / min

• Temperatura do forno: 105°C

Temperatura do injetor: 110°C

Temperatura do detentor de condutividade térmica (TCD): 220°C

• Coluna de aço inox (3m X 3mm) recheada com Chromosorb 102

4.7.2. Quantificação de microrganismos degradadores de óleo cru (hidrocarbonoclásticos)

A quantificação da população microbiana degradadora de óleo cru foi realizada empregando-se a técnica do *Número Mais Provável* (NMP) descrita por Ururahy (1998) utilizando placas de polietileno com 24 cavidades. Foram adicionados 5g de solo em 50 mL de solução salina (NaCl, 0,9%) e fez-se a agitação da suspensão em shaker por 1 hora a 25°C a 150 rpm. Após a agitação as amostras sofreram diluições e, em seguida, foi realizado o preenchimento das cavidades da placa de NMP com 1,8 mL de meio mineral, 0,1mL da diluição adequada e, finalmente, 0,1mL de óleo cru (única fonte de carbono orgânico). As placas foram então incubadas em estufa a 30° C por uma semana e em seguida procedeu-se à estimativa do número mais provável (NMP) por grama de solo.

4.7.3. Análise do teor de óleos e graxas

O teor de óleos e graxas, nas amostras de solo, foi determinado através do método gravimétrico. Dois gramas de solo contaminado foram extraídos três vezes no ultra-som, utilizando aproximadamente 25mL de n-hexano (PA, mistura de isômeros) como solvente. O extrato orgânico obtido foi passado em um sistema de filtração contendo sulfato de sódio anidro. Em seguida, este extrato foi concentrado em roto-evaporador até 10mL e, em seguida, levado à secura em concentrador de amostras com purga de nitrogênio. O teor de OG foi determinado por diferença de massa. Essa metodologia foi adaptada do método US EPA3550B e registrada na biblioteca do CETEM (método IT2003-001-00). As análises foram realizadas em duplicata.

4.7.4. Análise da concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo

A análise dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) nas amostras de solo foi realizada pelo laboratório da BTA/PDEDS/CENPES/PETROBRAS no extrato obtido com equipamento ASE (*Accelerated Solvent Extractor*), modelo 200 da Dionex. Após eliminar a umidade da amostra de solo, através da adição de sulfato de sódio anidro, 2 g da amostra desidratada são colocados na célula de aço inox com capacidade de 33mL. Em seguida, são adicionados 4mL de diclorometano na célula iniciando-se o processo automático de extração. O extrato é transferido para o copo concentrador do equipamento Turbovap Modelo II, no qual é concentrado até o volume de 1mL (SEABRA, 2005). Esse concentrado foi então levado ao cromatógrafo a gás HP5890 (com coluna cromatográfica HP-5), para a determinação dos HTP, seguindo metodologia EPA8015B (US EPA, 1996). Segundo informações do laboratório executor das análises, são realizadas triplicatas das injeções e informadas as médias dos resultados encontrados. O erro não excede os 5%, normalmente associado às análises cromatográficas e, por esse motivo, não foi incorporado à análise dos resultados.

4.7.5. Umidade

Semanalmente, para todos os testes realizados tanto em biorreatores de bancada quanto no biorreator piloto, eram retiradas amostras de solo (amostra composta de diversos pontos do interior do reator) para acompanhamento do teor de umidade, através de método gravimétrico (secagem em estufa a 60°C/16 h). Em caso de perda de umidade, esta era reposta de forma a se atingir o teor de umidade inicial específico de cada teste.

4.8. Ensaios Complementares

4.8.1. Ensaios ecotoxicológicos

Os processos de biorremediação têm sido muito utilizados atualmente para o tratamento de solos contaminados por derivados da indústria do petróleo. Entretanto, apenas as análises químicas são usadas para verificação da eficiência do processo, sem a inclusão de um indicador biológico. É sabido também que a ecotoxicidade de um determinado contaminante em uma amostra de solo é diferente para os diferentes organismos expostos ao mesmo. Assim sendo, o espectro de organismos empregados como bioindicadores nos ensaios de avaliação ecotoxicológica deve incluir diferentes níveis tróficos. Além disso, como reportado por Hubálek *et al.* (2007), ensaios ecotoxicológicos de amostras de solo devem ser realizados empregando-se tanto testes

que envolvam o contato direto do bioindicador com o material sólido quanto testes que utilizem apenas o elutriato do solo.

O objetivo desse trabalho preliminar e puramente prospectivo, foi aplicar dois ensaios de toxicidade para avaliar o solo contaminado com óleo cru após o tratamento no biorreator de bancada (P1), em algumas das diferentes condições testadas ao longo da tese. Para isso, utilizou-se amostras finais do 1º e 2º testes com o Solo 1 (bioestímulo e bioestímulo com serragem) e a amostra final do 2º testes com o Solo 2 (bioestímulo com serragem).

Os ensaios de toxicidade escolhidos foram com bactéria luminescente *Vibrio fischeri* (ISO 11348-3:1998; EPA 823/ B, 1998; Norma Técnica CETESB L5.227), realizado em laboratório externo (TECAM ou TRIBEL) e um ensaio de comportamento de fuga com minhocas da espécie *Eisenia fetida* (ainda sob forma de minuta da ISO – International Organization for Standardization) (ISO, 1998c; ISO 2005a), realizado na FEEMA, que consiste na exposição das amostras do solo que será avaliado e do solocontrole, simultaneamente, para avaliar o percentual de organismos que se desloca do centro do recipiente-teste para a área do solo-controle.

O ensaio com a bactéria luminescente vem sendo utilizado para a avaliação ecotoxicológica de solos contaminados e é freqüentemente recomendado pelos órgãos de controle ambiental no Brasil como um parâmetro complementar de monitoramento da qualidade dos solos antes e após a exposição dos mesmos a processo de remediação.

O princípio do método é a inibição da emissão de luz pela *Vibrio fischeri* durante a realização de testes em batelada onde ocorre a exposição da suspensão celular a diferentes diluições do elutriato da amostra de solo. A queda na luminescência da suspensão celular é quantificada após 15 e 30 minutos de exposição, levando em conta um fator de correção específico relacionado a amostra controle. Os resultados são expressos como CE₅₀.

Já o ensaio de comportamento de fuga consiste na exposição das minhocas à amostra do solo que será avaliado e ao solo-controle, simultaneamente, para avaliar o percentual de organismos que se desloca, após 48 horas, do centro do recipiente-teste para a área do solo-controle. Uma amostra é considerada tóxica se mais do que 80% dos organismos expostos é encontrado no solo controle após o período de exposição. Os resultados são expressos como percentual de organismos do solo controle (ISO, 2005a). Os testes são realizados em quintuplicata, em condições controladas de temperatura

 $(20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C})$, intensidade constante de luz (400 lux a 800 lux) e ciclos de claro/escuro (12 h:12 h).

4.8.2. Avaliação da diversidade microbiana

Os experimentos conduzidos nesta etapa tiveram como objetivo avaliar a estrutura da comunidade microbiana dominante no Solo 2 antes (Solo Virgem) e após a contaminação por óleo cru (Solo Contaminado Inicial) e também ao final dos quatro diferentes testes conduzidos no primeiro protótipo de biorreator de bancada, identificado como P1, e nos dois testes realizados no biorreator piloto.

As amostras avaliadas receberam as seguintes identificações:

Solo Contaminado Inicial: solo 2 contaminado com 5% de óleo cru referente ao T₀ (amostra inicial) de todos os testes;

Solo Virgem - solo 2 sem contaminação;

Final 1º Teste S2 P1 – amostra final 1º teste com solo 2 no biorreator de bancada P1 e bioestímulo com nitrato de sódio;

Final 2° Teste S2 P1 – amostra final 2° teste com solo 2 no biorreator de bancada P1 e bioestímulo com nitrato de sódio e adição de serragem;

Final 3° Teste S2 P1 – amostra final 3° teste com solo 2 no biorreator de bancada P1 e bioestímulo uréia:

Final 4° Teste S2 P1 – amostra final 4° teste com solo 2 no biorreator de bancada P1 e bioestímulo com uréia e adição de serragem;

Final 1° teste Piloto – amostra final do 1° teste com solo 2 no biorreator piloto e bioestímulo uréia;

Final 2º teste Piloto - amostra final 2º teste com solo 2 no biorreator piloto e bioestímulo com uréia e adição de serragem.

EXTRAÇÃO DE DNA DOS SISTEMAS DE TRATAMENTO

A extração de DNA do solo foi realizada através do uso de um Kit de extração para solo (FastDNA® SPIN Kit for Soil) da BIO101 (Califórnia, EUA) que utiliza o método da extração direta. A qualidade e a pureza do DNA obtido foram avaliadas através da eletroforese em gel de agarose 0,8% (M/V). As amostras de DNA (5 μL) foram misturadas com a mesma quantidade de corante para eletroforese e aplicados nos géis. Após a aplicação, estes géis foram submetidos a uma corrente elétrica de 75V em tampão TBE 1x pelo período de 2 h. Os géis foram então corados com brometo de etídio e

fotografados sob luz U.V. em um sistema de análise de imagem (IMAGO, B & L Systems).

PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)

Os iniciadores diretos utilizados neste estudo foram acrescidos de uma seqüência nucleotídica rica em GC, também conhecida como "grampo-GC" (5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGC GCG GC

As misturas utilizadas em cada etapa de PCR, específicas para cada par de iniciadores empregado, foram submetidas a um termociclador (GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems), e serão descritas a seguir, assim como o programa utilizado.

Todos os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,2 % m/V). Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz U.V em um sistema de análise de imagem (IMAGO, B & L Systems).

PCR - 16S

Foram utilizados nesta etapa os iniciadores U968f-GC1 ("grampo" + 5' AAC GCG AAG AAC CTT AC 3') e L1401r (5' GCG TGT GTA CAA GAC CC 3') (NÜBEL et al., 1996). O iniciador U968f é homólogo a região 968-984 do gene *rrs* de *Escherichia coli*, enquanto que o iniciador L1401 é homólogo a região 1385-1401 deste mesmo gene. Estes iniciadores amplificam a região da alça V6-V8 do RNA ribossomal, que é mais variada do que as outras regiões descritas na literatura (WATANABE, KODAMA e HARAYAMA, 2001).

As misturas foram feitas para um volume final de amostra de 50 μ L com as seguintes concentrações de cada reagente: tampão da enzima Taq polimerase 1x (Promega), MgCl₂ (Promega) (2,5 mM), 200 μ M de cada dNTP (Promega), 10 ρ mol de cada iniciador (Oligos), 5 μ g de BSA (Sigma), 1% de formamida (Fluka), 3,75 U de Taq polimerase (Promega) e água Milli-Q estéril. Em cada reação foi aplicado 1 μ L de DNA .

O programa de PCR utilizado foi iniciado com um ciclo de desnaturação das fitas de DNA a 94°C por 4 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C por 2 min. O ciclo de extensão final foi de 10 min a 72 °C.

Os produtos foram verificados através de eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/V), conforme já descrito anteriormente.

DGGE (ELETROFORESE EM GEL COM GRADIENTE DE DESNATURANTES)

Os experimentos foram realizados utilizando o equipamento "Dcode™ Universal Mutation Detection System" (BIO-Rad Richmond, EUA).

Os géis de DGGE foram preparados com solução de poliacrilamida (6%) em tampão Tris-acetato (pH 8,3). Foi estabelecido um gradiente de 40 a 70% de desnaturantes químicos para o gel de DGGE-16S composto por uréia e formamida. O gradiente foi formado pela mistura de uma solução pura de poliacrilamida (6%) e outra contendo 100% de desnaturantes (uréia 7M e 40% de formamida). Foi feita uma eletroforese utilizando o mesmo tampão (TAE, pH 8,3) em temperatura de 60 °C. As condições da corrida, tempo e voltagem aplicados foram específicos para cada análise realizada. A corrida para o gel de DGGE-16S foi realizada a 75V por 18 h.

Os géis foram posteriormente corados com SYBR GREEN (Molecular Probes) diluído na razão de 1/10. 000 em tampão TAE 1x, segundo especificação do fabricante, por aproximadamente 40 minutos. Os géis foram posteriormente observados sob luz U.V e fotografados em um sistema de análise de imagem STORM (Pharmacia, Amersham).

ANÁLISE DOS GÉIS

Com a imagem digitalizada dos géis, foi feita uma análise para gerar o perfil densitométrico das bandas, utilizando o *software Image Quant* (v. 5.2). As bandas foram consideradas para construção da matriz, quando a altura do pico, referente a uma intensidade, não excedia a 1% do somatório de todas as alturas identificadas, de acordo com o protocolo descrito por Iwamoto et al. (2000). Com a matriz de presença e ausência de bandas obtida, foi feita a análise de grupo. Os cálculos de similaridade foram baseados no coeficiente de *Pearson* (CUNHA, 2004). Foi utilizado o método de UPGA para o cálculo de agrupamento nos dendrogramas gerados para cada gel utilizando o *Software Statistica for Windows* v. 7.0, (Statsoft, EUA).

4.8.3. Avaliação da biodisponibilidade do óleo contaminante no solo 1

Os resultados de biodegradação obtidos nos testes em escala de bancada com o Solo 1 foram, de uma certa forma, considerados baixos e refletem a dificuldade de se tratar um solo com características argilosas (classificado como areno argiloso) contaminado com óleo cru em uma concentração elevada (5,38% - 1ª remessa; 2,26% - 2ª remessa) e que passou por um processo de intemperização bastante acentuado (derramamento ocorrido entre 4 a 6 anos). As características físico-químicas do solo e as características químicas do contaminante já indicavam a tendência de obtenção de valores de eficiência de biodegradação reduzidos. No entanto, fazia-se necessária a identificação do principal entrave à obtenção de melhores resultados, de forma a embasar os estudos posteriores para se chegar à melhor solução técnica para o tratamento do solo em questão.

Dessa forma, foi realizado um teste de avaliação da degradação do óleo contaminante residual em meio líquido empregando tanto a microbiota nativa presente no próprio solo contaminado (já adaptada) quanto um consórcio miocrobiano degradador (bactéria + levedura) previamente identificado e empregado em estudos anteriores (SÁ, 2002; TRINDADE, 2002). O principal objetivo deste teste foi identificar o principal fator que vinha causando a reduzida biodegradação dos poluentes, seja a matriz do solo ou a composição da fração intemperizada do contaminante presente. Com este propósito, utilizou-se uma metodologia simples, baseada apenas na quantificação do CO₂ gerado, para avaliação da biodegradação do contaminante orgânico (petróleo) no solo e em meio líquido.

Para isso, foram realizados ensaios em microcosmos com o Solo 1 envolvendo a aplicação da técnica de bioestímulo e bioaumento e ensaios semelhantes em meio líquido.

No desenvolvimento deste trabalho o solo contaminado foi utilizado tanto como fonte de microrganismos (microbiota nativa e microrganismos degradadores isolados) quanto como fonte do extrato orgânico (contaminante) utilizado.

4.8.3.1. Extração do contaminante orgânico do solo

O extrato orgânico utilizado nos testes em meio líquido foi obtido a partir da extração de 50g de Solo 1 com n-hexano PA em ultra-som por 5 minutos. Em seguida o extrato orgânico, composto basicamente de óleo cru residual e solvente, foi inicialmente

concentrado em evaporador rotatório até cerca de 10 mL e em seguida em concentrador com purga de nitrogênio e aquecimento (50°C) até 2 mL.

O extrato final foi adicionado ao meio inorgânico (NaCl 5g/ L, K₂HPO₄ 1g/ L, NH₄H₂PO₄ 1g/ L, (NH₄)₂SO₄ 1g/ L, MgSO₄.7H₂O 0.2g/ L, KNO₃ 3g/ L) para ser empregado como fonte de carbono orgânico pelos microrganismos durante o teste em meio líquido.

4.8.3.2. Produção do inóculo

Nos testes envolvendo a aplicação da técnica de bioaumento, dois diferentes tipos de inóculos foram empregados. O primeiro, denominado de SEM, foi obtido extraindo-se os microrganismos nativos de 50g do Solo1 com 184 mL de meio inorgânico. A suspensão foi mantida sob agitação (150rpm) por 2 horas e em seguida deixada a decantar por mais 2 horas. Após esse período, 46 mL do sobrenadante foram utilizados como inóculo em cada um dos microcosmos dos ensaios em meio líquido, de forma a reproduzir a densidade microbiana (heterotrófica total e degradadora) presente nas amostras de solo que fazem parte dos testes em microcosmos (meio sólido) (10⁵ UFC/ g solo e 10⁴ NMP/ g solo, respectivamente).

O segundo tipo de inóculo, denominado de Consórcio degradador de Hidrocarbonetos (HDC), foi empregado tanto nos testes em microcosmos quanto nos testes em meio líquido. Esse inóculo era constituído de dois microrganismos degradadores de óleo cru (*Nocardia nova* e *Rhodotorula glutinis var. dairenesis*) previamente isolados do Solo 1 (SÁ, 2002). As culturas foram crescidas em meio mineral contendo óleo cru (4% v/v) como única fonte de carbono, centrifugadas e lavadas duas vezes em solução salina estéril, como descrito por Trindade *et al.* (2005). O inóculo foi adicionado às amostras de solo dos testes em microcosmos de forma a se obter uma concentração de aproximadamente 10⁸ UFC/g solo.

4.8.3.3. Experimentos de biodegradação

TESTES EM MEIO LÍQUIDO

Os testes em meio líquido foram conduzidos de forma a maximizar a biodisponibilidade de óleo através da melhoria da transferência de massa no sistema. Os experimentos foram realizados em kitazatos de 250 mL de capacidade, contendo um volume final de suspensão de 50 mL, incluindo meio inorgânico, extrato orgânico e inóculo microbiano.

As condições testadas foram:

Condição 1: Meio inorgânico (48 mL) e extrato orgânico (2 mL, 4%v/v).

Condição2: Meio inorgânico com inóculo SEM (48 mL) e extrato orgânico (2 mL, 4%v/v).

Condição 3: Meio inorgânico com inóculo SEM (46 mL), extrato orgânico (2 mL, 4%v/v) e inóculo HDC (2 mL).

Condição 4: Meio inorgânico (46 mL), extrato orgânico (2 mL, 4%v/v) e inoculo HDC (2 mL).

Todas as condições foram testadas em duplicata e todos os frascos foram incubados em estufa a 30°C por 30 dias. Nesse período os frascos eram retirados periodicamente para análise do CO₂ gerado, por cromatografia gasosa, e aeração.

TESTES EM MICROCOSMOS (MEIO SÓLIDO)

Os testes em microcosmos realizados nessa etapa do trabalho reproduziram condições testadas anteriormente nesse trabalho de tese e em trabalhos prévios desenvolvidos pela autora e colaboradores (TRINDADE *et al.*, 2005).

O sistema experimental utilizado foi o mesmo descrito no item 4.3.1. e o teor de umidade e o pH do Solo 1 (50g em cada sistema) foram ajustados para 50% da CRA e 7, respectivamente.

As condições testadas foram:

```
Condição 1: Solo 1, K_2HPO_4 (C:N: P =100:1,25; 1), inóculo HDC (2 mL).
```

Condição 2: Solo 1, K₂HPO₄ (C:N: P =100:1,25; 1)

Todas as condições foram testadas em duplicata e todos os frascos foram incubados em estufa a 30°C por 30 dias. Nesse período os frascos eram retirados periodicamente para análise do CO₂ gerado, por cromatografia gasosa, e aeração.

4.8.4. Simulação do processo de atenuação natural do solo 2

Ao longo do desenvolvimento do trabalho experimental de tese empregando o Solo 1, análises de HTP foram sendo realizadas conforme as diferentes amostras/coletas iam sendo encaminhadas ao CETEM. Dessa forma, foi possível acompanhar, de uma forma indireta, os efeitos do processo de atenuação natural ao qual o Solo 1 foi sendo submetido no local de estocagem do mesmo (Dique de contenção) e a conseqüente

redução na concentração do contaminante orgânico apenas pela exposição do solo às condições ambientais diversas. Esses resultados serviram como base de comparação para os resultados obtidos no protótipo de biorreator de bancada, de forma a comprovar a eficácia do mesmo na aceleração do processo de biorremediação.

Como o Solo 2 não era originalmente contaminado, fez-se necessária a simulação de um processo de atenuação natural deste solo para futura comparação de resultados.

Destaca-se que o processo de atenuação natural monitorada tem sido adotado como uma alternativa de tratamento de áreas impactadas onde não existe o risco de migração do poluente e conseqüente contaminação do lençol freático. Acrescenta-se ainda o custo reduzido de manutenção do processo como um todo, sendo necessário apenas o custo com o monitoramento analítico. No entanto, o tempo envolvido no processo costuma ser longo (meses ou anos) o que inviabiliza, muitas vezes, a sua utilização. Dependendo da área contaminada, do tipo e da concentração do contaminante, torna-se necessária a remoção do solo impactado e encaminhamento do mesmo para tratamento ex-situ, como por exemplo, o biorreator.

O objetivo desta etapa do trabalho foi aplicar o processo de atenuação natural ao Solo 2 e verificar os impactos deste após um ano de monitoramento. Os resultados obtidos deverão ser comparados com os resultados obtidos em ensaios realizados com o mesmo solo no biorreator, de forma a comprovar a eficácia dessa tecnologia como forma de aceleração da degradação do óleo.

Além da contaminação de 5% m/m, utilizada nos testes em microcosmos e nos biorreatores, simulou-se também uma amostra contaminada com 10% m/m de petróleo para verificação do desenvolvimento do processo de atenuação natural frente a um teor maior de contaminação orgânica.

O processo de atenuação natural foi simulado em microcosmos que consistiam de duas caixas de acrílico de 20 litros de capacidade total (40 x 25 x 20 mm) com fundo perfurado (tela) para permitir o escoamento da água de percolação proveniente da chuva.

No fundo de cada uma das caixas adicionou-se uma camada de brita, uma camada de areia de filtração e uma nova camada de brita buscando evitar o arraste da fração mais fina do solo contaminado (fração silte+argila) durante a condução dos

ensaios. Tais caixas foram apoiadas em caixas de polietileno com o objetivo de recolher a água percolada de chuva, conforme registrado na Figura 4.15 (a e b).

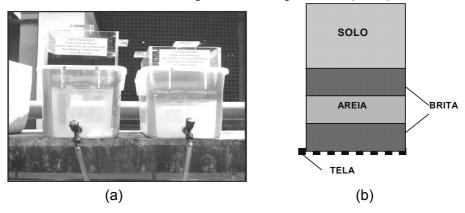


Figura 4.15. Sistema experimental para simulação do processo de atenuação natural monitorada do Solo 2 (a) e detalhamento esquemático do mesmo (b)

Em cada caixa (microcosmo) foram adicionados 5 kg de solo contaminado em laboratório, sendo adotadas duas concentrações distintas de contaminação por óleo cru: 5 e 10% m/m, respectivamente. Os sistemas foram deixados ao ar livre em área aberta da usina piloto do CETEM de forma que os solos contaminados fossem expostos às variações climáticas naturais (temperatura alta e baixa, período de seca e de chuva, vento, etc).

O protocolo de monitoramento do solo seguiu duas freqüências distintas. As amostragens para análises microbiológicas e a quantificação do teor de óleos e graxas (OG) aconteciam mensalmente até o final do ensaio (12 meses). No dia em que ocorria a retirada de amostras, realizava-se uma pequena homogeneização do conteúdo das caixas. Já a quantificação da concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo foi realizada apenas a cada 6 meses. As amostras foram retiradas de 5 pontos distintos das caixas para compor uma amostra homogênea do conteúdo das mesmas.

Durantes os três primeiros meses de ensaio foi realizada também análise semanal do teor de OG nos lixiviados presentes nas caixas de coleta de polietileno, para as duas condições de contaminação. No entanto, os resultados obtidos não foram significativos (resultados não apresentados) indicando, a princípio, a ausência de óleo solubilizado na água de chuva percolada. Por esse motivo essa rotina de monitoramento foi suspensa. Adicionalmente, visualmente não foi verificada dispersão de óleo nas camadas de brita e areia, não sendo assim realizadas análises de OG nesses dois materiais.

Todas as metodologias analíticas empregadas seguiram procedimentos descritos anteriormente no item 4.7.

Capítulo 5

5. Resultados e Discussão

5.1. Caracterização dos Solos Empregados

5.1.1. Solo 1

Como citado anteriormente (item 4.1.1), em função da parcela significativa de finos existente no Solo 1 (40,2% de silte + argila) foi realizada uma caracterização mineralógica do mesmo, por ser esta fração uma das principais determinantes do comportamento mecânico dos solos, bem como das interações solo/contaminante (PROVIDENTI *et al.*, 1993; BOOPATHY, 2000).

Observações ao MEV de amostras do solo virgem indicaram a predominância dos elementos O, Al, Si, K e Fe. Foi detectada a presença de mica, tanto moscovita (mica branca – Figura 5.1) quanto biotita, óxidos-hidróxidos de ferro (limonitas), quartzo (Figura 5.2) e caolinita (Figura 5.3). Não foram detectados minerais pesados, tais como Zr, Ti e Terras Raras, o que aponta para um solo originário do horizonte A. Foi possível também verificar a presença de aglomerados de quartzo/caolinita/mica de elevada área superficial (Figura 5.4).

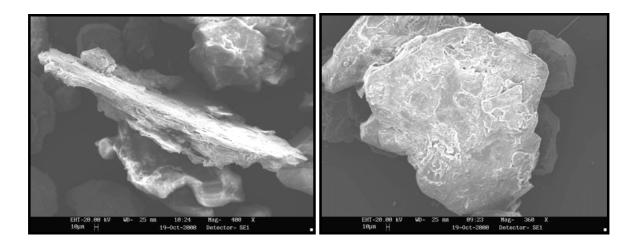


Figura 5.1. Moscovita (mica branca)
Presente no Solo Virgem.

Figura 5.2. Quartzo Presente no Solo Virgem.

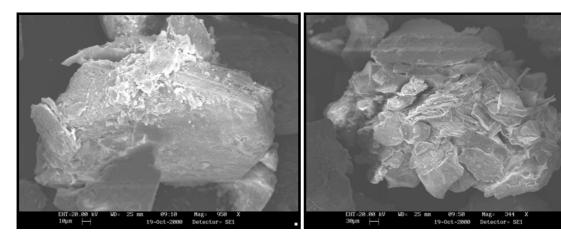


Figura 5.3. Caolinita Presente no Solo Virgem.

Figura 5.4. Aglomerado de Quartzo/Caolinita/Mica no solo virgem.

A caracterização mineralógica por microscopia eletrônica de varredura explicou em parte as características particulares do solo observadas durante a simples manipulação do mesmo, quais sejam:

- ✓ tendência à aglomeração (provocada pela presença de finos de caolinita e limonita);
- ✓ esfarinhamento dos "pellets" quando submetidos à pressão (predomínio de quartzo);
- ✓ cor avermelhada (quantidades significativas de óxidos de ferro) e
- ✓ elevada capacidade de retenção dos poluentes (presença de aglomerados de quartzo/caolinita/mica de elevada área superficial).

Ainda, com o objetivo de elucidar as possíveis causas para o comportamento reológico peculiar do solo virgem, alguns ensaios físicos foram realizados, tal como descrito no item 4.1.1. Os resultados obtidos na nova classificação granulométrica realizada para o solo virgem foram coincidentes com aqueles obtidos anteriormente pelo método de peneiramento a úmido, como pode ser observado na Figura 5.5.

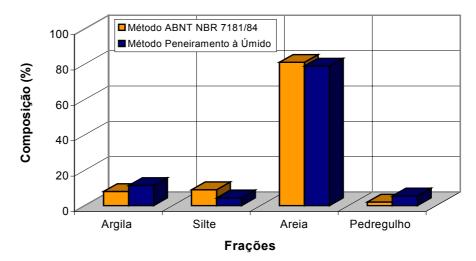


Figura 5.5. Análise Comparativa dos Resultados de Classificação Granulométrica do Solo Virgem

Os valores de densidade aparente apresentados anteriormente na Tabela 4.1 (item 4.1.1) ($\gamma \approx 1.2 \text{ g/cm}^3$ para o solo virgem e 1,1 g/cm³ para o solo contaminado) caracterizam o material coletado como sendo proveniente de solos originários do horizonte A (ALEF e NANNIPIERI, 1995), justamente o horizonte adequado para a condução de processos de biorremediação, por encerrar maior atividade e elevada diversidade microbiana.

Através do Diagrama Triangular adotado pela Sociedade Brasileira do Solo, onde as diferentes classes texturais estão delimitadas, tanto o solo contaminado, como o solo virgem, podem ser classificados como AREIAS ARGILOSAS, que se configuram como misturas de areia e argila, que contém material ligante (aglutinante argiloso) e mais de 10% dos seus grãos passando pela peneira *Tyler* 200 #. O fato do solo estudado ser areno-argiloso justifica comportamentos "híbridos", que são dependentes das condições de manipulação impostas durante o processo (nível de incorporação de água, forma de revolvimento).

O solo virgem, apesar de apresentar quantidades apreciáveis de argila e tender à formação de "pellets" quando foi submetido a um processo de revolvimento rotacional, não permitiu que fossem determinados os valores dos índices LL e LP. Depreende-se, a partir destes resultados, que nas condições de ensaio adotadas nos métodos para a determinação dos referidos índices de consistência, preponderam as características arenosas do solo e não as argilosas e que, portanto, nestas condições, o solo não se apresenta com as propriedades de um solo geotecnicamente moldável (tende ao desmoronamento e à erosão caso empilhado). Sendo assim, prevê-se que o referido solo

contenha quantidade de argila suficiente para promover efeitos de aglomeração quando umedecido, mas não o suficiente para conferir plasticidade aos aglomerados formados.

Este comportamento também pode decorrer do tipo de argilo-mineral presente e, principalmente, de sua estrutura já que a forma de arranjo das partículas e a organização de cargas em sua superfície determinam maiores ou menores forças de atração e repulsão, refletindo, conseqüentemente, no grau de coesão do solo como um todo (CETESB, 1992).

Conclui-se, portanto, que sendo o comportamento do solo estudado bastante dependente das condições a ele impostas (umidade, agitação etc.) a eficiência da descontaminação deste solo será profundamente influenciada pelo tipo de tratamento adotado, fortalecendo, portanto, a imprescindibilidade de uma etapa de otimização do processo.

Os resultados das determinações qualitativas dos minerais formadores do solo virgem, realizadas por Difração de Raios X, vieram ao encontro daqueles anteriormente obtidos por microscopia eletrônica de varredura. O difratograma exposto na Figura 5.6, a seguir, ilustra os picos característicos dos minerais contidos na amostra analisada (quartzo – SiO₂; moscovita – KAl₂(Si₃Al)O₁₀(OH, F)₂; caolinita – Al₂Si₂O₅(OH)₄, ilita – (K, H₃O)Al₂Si₃AlO₁₀(OH)₂ e hematita – Fe₂O₃). O fato da ilita não ter sido detectada anteriormente é plenamente justificável em face da semelhança existente entre este mineral e a moscovita (MOORE e REYNOLDS, 1989).

Destaca-se, com relação ao material argiloso presente, que a caolinita e a ilita são argilo-minerais, respectivamente, não expansivo e ligeiramente expansivo. De acordo com a literatura (BUENO e VILAR, 1980), a expansividade das argilas está ligada a maiores ou menores interações entre seus retículos, sendo que a força de união entre eles é maior na caolinita (limitação à penetração de água e conseqüente não expansividade), intermediária na ilita (pouca expansividade) e pequena na montmorilonita (grande expansividade).

Coerentemente com a literatura, a baixa expansividade foi observada, quando da simples manipulação do solo virgem. A não expansividade do solo em estudo parece ser vantajosa, já que poderia vir a reduzir a magnitude dos problemas mecânicos, apresentados pelo referido solo no interior do reator, quando da eventual elevação dos teores de umidade.

Concluindo a etapa de caracterização do Solo 1, pode-se afirmar que o mesmo apresenta um comportamento "híbrido", plenamente justificável pela sua natureza areno-argilosa. Da mesma forma que granulometricamente favorece a adoção de processos de biorremediação, por outro o solo exibe elevada complexidade, em função do teor de finos que contém. Tais afirmações fortalecem a importância de se investir no domínio do conhecimento do sistema solo/contaminante estudado, com vistas à proposição, ao desenvolvimento e à otimização física, química, biológica e mecânica do processo de tratamento de solos de natureza semelhante.

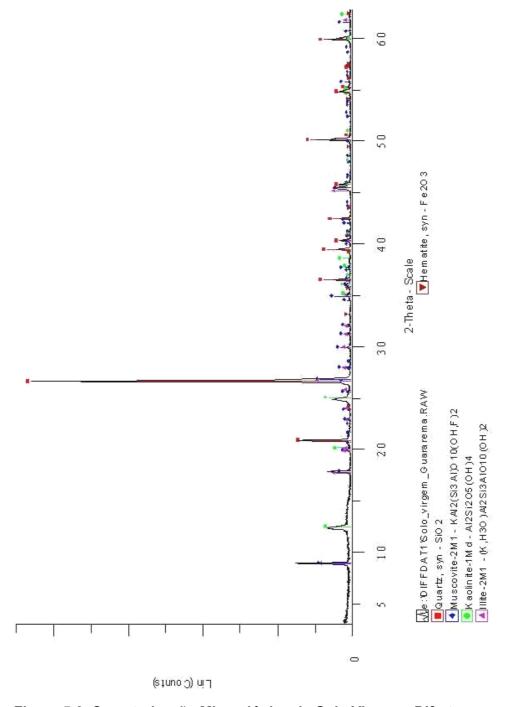


Figura 5.6. Caracterização Mineralógica do Solo Virgem - Difratograma

No que tange a caracterização química e físico-química do segundo lote de solo entregue no CETEM para a continuidade dos ensaios em microcosmos, bem como para a condução dos experimentos em bioreatores de bancada, foi possível observar a diferença de coloração da amostra em relação à primeira remessa de material.

Essa diferença no aspecto das amostras, conforme pode ser observado no registro fotográfico apresentado na Figura 5.7, permitiu, a princípio, inferir que o teor de óleo contaminante na segunda remessa seria inferior ao da primeira remessa.



Figura 5.7. Registro fotográfico das amostras representativas das duas remessas de Solo 1

Antes da realização das análises de caracterização físico-química dessa nova remessa de solo, esta foi submetida às etapas de homogeneização, quarteamento e peneiramento assim como adotado para a primeira remessa.

Na Tabela 5.1 abaixo, são apresentados os resultados da caracterização física e química preliminar realizada na segunda remessa, bem como os valores correspondentes dos parâmetros analisados obtidos quando da caracterização da primeira remessa de Solo 1.

Tabela 5.1. Comparação dos Resultados da Caracterização Física e Química preliminar da Primeira e Segunda Remessas de Solo 1

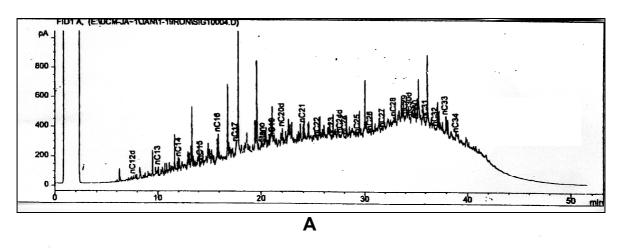
Parâmetros	Resultados	
Farametros	Primeira Remessa	Segunda Remessa
HTP (mg/g)	53,81	26,26
HPA's (mg/g)	9,75	4,37
Óleos e Graxas (%)	4,90	3,17
Matéria Orgânica (%)	11,35	8,27
рН	4,80	4,96
Capacidade de Campo (%)	26,90	37,04
Densidade Aparente (g/cm³)	1,1	1,1
Densidade de Partícula (g/cm³)	2,3	2,5
Porosidade (%)	52	56

Observa-se, através da análise dos resultados de HTPs, HPA's, óleos e graxas e matéria orgânica, uma redução considerável no teor de contaminantes. Esta redução pode ser atribuída, a princípio, ao longo período de tempo decorrido entre as coletas das amostras, associado às condições de armazenamento do solo no dique de contenção (material sujeito à intempéries, biodegradação natural etc.). A associação destes fatores pode ter tido como conseqüência a biodegradação natural do solo (ou intemperização).

Com relação aos resultados obtidos para o parâmetro densidade aparente, não houve alteração significativa entre as duas remessas de solo. Já para os resultados de densidade de partícula foi observado um aumento de 7% para o solo da segunda remessa. Isto pode ser explicado, a princípio, pelo fato de que tendo ocorrido uma redução no teor de contaminante no solo, e conseqüentemente na fração aderida em cada uma das partículas deste solo, a densidade destas partículas tende a aumentar. De forma semelhante, o aumento de 8% na porosidade do solo da segunda remessa pode ser explicado pela "desobstrução" de poros anteriormente ocupados com o óleo contaminante.

Na Figura 5.8, a seguir, são apresentados os cromatogramas relativos à caracterização, em termos de concentração de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP's) da primeira (A) e da segunda (B) remessas do solo 1. Estes cromatogramas foram fornecidos pela Gerência de Química Analítica do CENPES/Petrobras e foram obtidos segundo metodologia descrita por Santos *et al.* (2001).

Comparando-se os cromatogramas apresentados acima é possível observar que alguns picos representativos de compostos com menor número de átomos de carbono (C12 a C17), que eram nítidos no cromatograma A, desapareceram, ou reduziram significativamente de tamanho, no cromatograma B. Adicionalmente, verifica-se que para os compostos com maior número de átomos de carbono (maiores que C18) ocorreu também uma diminuição no tamanho dos picos representativos destes compostos. Essas observações indicam a degradação natural (ou intemperização) de parte do óleo presente no solo durante o período de tempo decorrido entre o envio da primeira e da segunda remessas de solo para o CETEM.



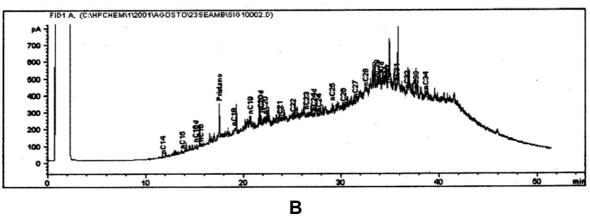


Figura 5.8. Perfis Cromatográficos do Solo 1; (A) Primeira Remessa e (B) Segunda Remessa

5.1.2. Solo 2

A partir dos dados de distribuição granulométrica do Solo 2 sem contaminação (73% de areia, 14% de silte e 11% de argila) e utilizando o Diagrama Triangular adotado pela Sociedade Brasileira do Solo, onde as diferentes classes texturais estão delimitadas, foi possível classificá-lo como sendo um solo FRANCO-ARENOSO.

Conforme citado anteriormente, a análise mineralógica do Solo 2, assim como ocorrido com o Solo 1, foi realizada a fim de obter informações a respeito do tipo de minerais presentes no solo, principalmente os argilo-minerais. A estrutura e arranjo dos argilominerais presentes em um solo conferem a este maior ou menor forças de atração e repulsão, influenciando no grau de coesão, principalmente quando este é umedecido (TRINDADE, 2002).

O solo sem contaminação foi empregado na caracterização mineralógica por microscopia eletrônica de varredura e por difração de raios X, já que a utilização do material contaminado poderia causar danos aos equipamentos.

A Figura 5.9, a seguir, apresenta duas micrografias obtidas para o solo virgem, com aumento de 50 e 1500 vezes.

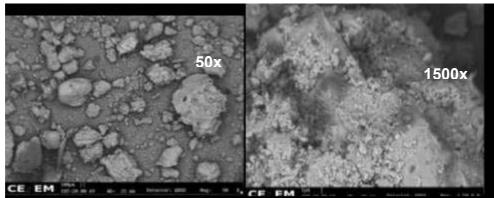


Figura 5.9. Micrografias obtidas pelo MEV de partículas do solo 2 sem contaminação.

Através do EDS (*Energy Dispersive System*) acoplado ao MEV, foram obtidos espectros de composição química qualitativa por dispersão de energia, em pontos de áreas de aproximadamente 2 µm, selecionados nas imagens apresentadas na Figura 5.9.

Desta forma, foi possível observar a predominância de elementos como Si, C, O, Al, Ca e Fe (em menor proporção). Assim como observado para o Solo 1, não foram detectados minerais pesados, tais como Zr, Ti e Terras Raras, apontando também para um solo originário do horizonte A.

A predominância do elemento carbono é um indicativo da presença de matéria orgânica agregada a partículas minerais do solo. Os argilo-minerais presentes no solo foram identificados como aluminossilicatos como vermiculita, montmorilonita, ilita, esmectita e/ou clorita.

Os resultados observados indicam que o Solo 2 apresenta características que propiciam uma elevação da aglomeração, o que seria agravado após a contaminação artificial do mesmo.

A seguir é apresentado o difratograma obtido da amostra de solo orientada após remoção da matéria orgânica (Figuras 5.10). Essa opção pela análise da amostra orientada após a remoção de matéria orgânica partiu das observações de Santos (2007), co-substanciada por Albers (2002), que verificou que o elevado teor de quartzo da amostra bruta e sua facilidade de orientar-se resultam em picos bem definidos e de

grande intensidade na fase cristalina de argilo-minerais, prejudicando muitas vezes a identificação e caracterização das demais fases.

Assim sendo, por indicação de especialista do SCT/COAM/MCT foi realizada a análise do material fino orientado, preparado pela sedimentação dos argilo-minerais seguida da remoção da matéria orgânica, possibilitando uma melhor caracterização da amostra na região de baixo ângulo, evidenciando picos em 14,38 e 9,94 Å. O primeiro pico pode estar relacionado à vermiculita, esmectita ou clorita, e o segundo à muscovita ou illita.

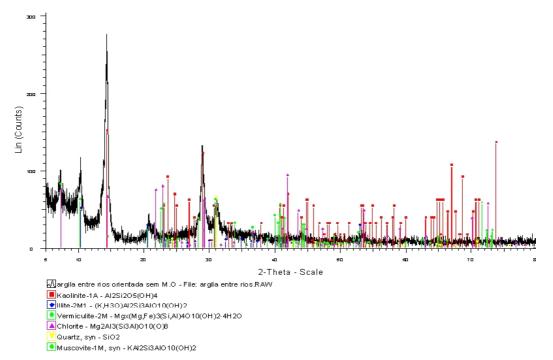


Figura 5.10. Difratograma de raios X da amostra solo orientada sem matéria orgânica.

A presença de matéria orgânica nos aglomerados minerais, conforme observado pelo MEV, em associação á observação, por difração de raios X, da presença de minerais argilosos identificados no solo sem contaminação, potencializa o efeito de aglomeração deste solo, principalmente quando da incorporação de óleo. Conforme citado por Santos (2007), o resultado dessa caracterização justifica a adição de agentes estruturantes durante o processo de biorremediação de um solo contaminado por petróleo, com o objetivo de reduzir a aglomeração do sistema solo/contaminante.

5.2. Definição da Configuração de Protótipo de Biorreator de Bancada

5.2.1. Avaliação Inicial do comportamento mecânico do solo 1 em diferentes protótipos de biorreatores em escala de bancada

5.2.1.1. Ensaios em homogeneizador de amostras

Ao final dos ensaios com o solo virgem, realizados em homogeneizador de amostras do tipo "Carrossel", observa-se que com o incremento da umidade (variada de 50 a 90% da CRA), ocorreu uma acentuação na formação de agregados (Figura 5.11).



Figura 5.11. Aspecto do Solo Virgem Após Homogeneização no Carrossel (50% de ocupação; umidade variando de 50 a 90% da CRA (na foto CC); agitação a 5 rpm, por 1 min)

Observando-se a aparência das amostras, registrada ao final do período da agitação, percebe-se que o limite superior para o teor de umidade a ser adotado para o solo virgem é o de 50% da CRA. Acima deste valor, intensifica-se a formação de agregados, o que tende a desfavorecer o ataque microbiano, devido à redução da área superficial de contato nos aglomerados.

Em função do comportamento mecânico observado para este tipo de solo, uma segunda bateria de testes foi executada, com amostras do solo contaminado, desta vez contemplando o binômio "Ocupação/Umidade".

De acordo com BANERJEE *et al.*, 1995, o estabelecimento de valores adequados para os graus de ocupação e de umidade é reconhecido como uma das etapas chaves para a implementação de processos de tratamento biológico de solos contaminados em biorreatores. Esta afirmativa justifica os esforços despendidos na fase de otimização

dessas variáveis. Cabe ressaltar, ainda, que tal binômio afeta variáveis extremamente importantes, tais como suprimento de oxigênio, disponibilização de nutrientes, manutenção da atividade microbiana e grau de homogeneização do sistema solo/microbiota/contaminantes. Por todos os motivos citados, valores base para o referido binômio foram cuidadosamente pesquisados na literatura.

Os valores escolhidos para as percentagens de ocupação testadas foram baseados em diversos trabalhos envolvendo reatores do tipo tambor rotativo (BANERJEE et al., 1995; KRÜGER et al., 1995; TRUAX et al., 1995; WOO e PARK, 1999). Nesses trabalhos predominam baixas percentagens de ocupação dos biorreatores: BANERJEE et al. (1995) – 10 a 25%; KRÜGER et al. (1995) – 20%; TRUAX et al. (1995) – 24 a 29% e WOO e PARK (1999) – 56%. A redução demasiada da taxa de ocupação do reator pode tornar inviável, sob o ponto de vista econômico, a adoção deste tipo de sistema de tratamento de solos contaminados. Assim, buscou-se pela otimização da ocupação em torno de valores ligeiramente mais elevados que os citados nos trabalhos consultados, sem perder de vista a adequação desta variável ao tipo de configuração proposta inicialmente (tambor rotativo).

O resultado final da homogeneização do conteúdo dos frascos ao final dessa segunda bateria de testes não foi fotografado. No entanto, foi possível observar que a taxa de ocupação de 20% não se mostrou satisfatória, face à grande dispersão das partículas sólidas. Entre as condições relativas à 30 e 40% de ocupação, nenhuma diferença significativa foi observada.

Quanto à umidade, menores aglomerações foram detectadas para os teores de 40% e 50% da CRA. Ao serem combinados os dois aspectos, ocupação e umidade, o melhor par de valores para o teste mecânico, conduzido em carrossel, com amostras do solo contaminado, foi o de 40% de ocupação e 50% da CRA. De forma a dar continuidade à realização de ensaios no homogeneizador de amostras cogitou-se a incorporação de aletas às paredes dos frascos utilizados nos testes. Tal modificação nos frascos levaria à configuração semelhante à dos tambores rotativos, motivo pelo qual, o homogeneizador foi abandonado.

5.2.1.2. Ensaios em tambor rotativo

Nos testes no protótipo de tambor rotativo, o comportamento do solo contaminado foi observado sob diferentes condições de ocupação (% do volume útil) e de umidade (%

da capacidade de retenção de água), sob rotação lenta (3–4 rpm), por aproximadamente 18 horas.

No primeiro teste no tambor rotativo foi empregado o teor de umidade de 50% da CRA, para a ocupação de 50% do volume útil. A visualização do solo após o término da agitação evidenciou não só a necessidade de se reduzir a taxa de ocupação, como também o teor de umidade adotado (Figura 5.12).



Figura 5.12. Aspecto do Solo 1 no Protótipo de Tambor Rotativo (50% de ocupação; 50% da CRA (na foto CC); aleta de 2 cm; agitação a 3-4 rpm, por 18h).



Figura 5.13. Aspecto do Solo 1 no Protótipo de Tambor Rotativo (40% de ocupação; 40% da CRA (na foto CC); aleta de 2 cm; agitação a 3-4 rpm, por 18h).

O experimento foi repetido para 40% de ocupação e 40% da CRA e observou-se, ainda, a formação menos intensa de aglomerados. A compactação de material sólido também ocorreu, especialmente nas proximidades das aletas, conforme se verifica na Figura 5.13.

A partir destas constatações, o tamanho das aletas foi reduzido para 1,5 cm e novo teste foi conduzido, mantendo-se as demais condições de ocupação, umidade, velocidade e tempo de agitação. Desta vez não houve agregação expressiva e a compactação pôde ser considerada desprezível (Figura 5.14)

A fim de explorar os limites máximos de disponibilização de água, um quarto teste foi feito, desta vez ampliando o teor de umidade para 50% da CRA. Os resultados não foram satisfatórios, uma vez que boa parte do material permaneceu aderida à parede do tambor (Figura 5.15).



Figura 5.14. Aspecto do Solo 1 no Protótipo de Tambor Rotativo (40% de ocupação; 40% da CRA (na foto CC); aleta de 1,5 cm; agitação a 3-4 rpm, por 18h).



Figura 5.15. Aspecto do Solo 1 no Protótipo de Tambor Rotativo (40% de ocupação; 50% da CRA (na foto CC); aleta de 1,5 cm; agitação a 3-4 rpm, por 18h).

A partir das fotos apresentadas nas Figuras 5.12, 5.13, 5.14 e 5.15, ficou evidente que o solo assume um comportamento mecânico mais favorável quando ocupa 40% do volume útil do reator e tem sua umidade corrigida para 40% da sua CRA; semelhantemente ao que foi observado nos experimentos conduzidos no homogeneizador do tipo carrossel. Tornou-se clara, também, a influência de elementos da geometria do sistema neste comportamento (como por exemplo o dimensionamento das aletas). Há que se ter em mente, no entanto, que outros fatores podem contribuir para os fenômenos de agregação e de compactação, tais como o tipo de solo e o seu teor de matéria orgânica.

Woo e Park (1999) ressaltam que a textura do solo contaminado determina, em grande parte, a umidade ótima requerida para a operação dos biorreatores, variável que se encontra intimamente relacionada ao grau de mistura e à aglomeração. Truax *et al.* (1995) e Boopathy (2000) vão mais além e chamam a atenção para o fato de que a forte dependência entre os parâmetros de processo (comportamento mecânico e biodegradabilidade) e a textura do solo, resulta das diferentes propriedades de superfície de frações tais como areia, silte e argila, que compõem o mesmo. Como o solo apresenta

elevada concentração de finos, é plenamente explicável a sua capacidade de absorver água e de formar aglomerados, quando sob agitação.

A partir de todas estas constatações, evidencia-se a imprescindibilidade de se estabelecer um compromisso entre a geometria do reator a ser empregado para o tratamento do solo, as variáveis de processo e as características do próprio solo.

5.2.1.3. Ensaios em parafuso transportador

O primeiro experimento no protótipo de parafuso transportador (Teste A) foi realizado para um comprimento de coluna de 10,5 cm, espaçamento entre a coluna e o limite externo do eixo central (Δ d) de 1,7 cm, percentagem de ocupação de 40% e umidade de 40% da CRA. Os resultados não foram satisfatórios, já que uma densa camada de solo permaneceu aderida à parede da coluna cilíndrica. Registrou-se, em contrapartida, a não formação de aglomerados nas demais regiões do reator.

Partiu-se, então, para a redução do espaçamento (∆d) para 0,2 cm, (coluna de 13 cm de comprimento), sendo que duas diferentes condições foram reproduzidas: 30% de ocupação; 40% da CRA (Teste B) e 40% de ocupação; 40% da CRA (Teste C). Ainda assim, o sistema não demonstrou bom desempenho, pois o eixo por várias vezes atritouse com a parede.

Nos Testes D e E (conduzidos em coluna cilíndrica de 10,5 cm de comprimento), um espaçamento intermediário foi fixado (Δd = 0,7 cm) e novamente o binômio "Ocupação & Umidade", foi variado: 40% de ocupação; 40% da CRA (Teste D) e 40% de ocupação; 50% da CRA (Teste E). Em ambos os testes não houve formação de filme sólido na parede da coluna, porém ocorreu uma grande compactação do material, inviabilizando a adoção deste sistema. Na tentativa de reproduzir uma "lama", água foi adicionada ao solo ao fim do último teste (Teste E), até o valor de 200% da CRA, porém a mistura continuou deficiente.

Ainda que desencorajadores, os experimentos com tambor fixo levaram a interessantes observações:

✓ O parafuso não se configura no melhor modelo de eixo de agitação, já que transporta o material e com isto reduz o tempo de residência do solo no interior do reator;

- ✓ Ainda assim, ficou visualmente claro que a presença do eixo aumenta o grau de mistura do solo no reator, o que favorece a aplicação de reatores do tipo tambor fixo frente os tambores rotativos;
- ✓ No caso de adoção da configuração de reator do tipo tambor fixo, faz-se imprescindível a criação/projeto de um outro modelo de eixo, que não só evite a adesão do solo às paredes do reator, como promova a mistura ideal do solo, sem transportá-lo.

5.2.2. Proposição e dimensionamento de configuração alternativa de biorreator

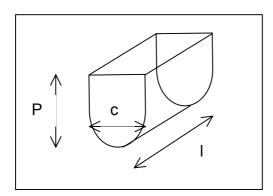
Nas Figuras 5.16 e 5.17, a seguir, são apresentados os registros fotográficos do primeiro protótipo de biorreator não convencional confeccionado pela equipe da oficina do CETEM/MCT.



Figura 5.16. Vista geral do primeiro protótipo de biorreator.

Figura 5.17. Detalhe do eixo central (agitador) instalado no biorreator.

As dimensões finais do biorreator após a confecção do mesmo, tendo como base o esquema apresentado na Figura 5.18 abaixo, ficaram:



- p = 32,3 cm;
- ♦ I = 42 cm;
- Volume da seção cilíndrica = 19 litros;
- Volume total do corpo do reator = 29,96 litros;

Figura 5.18. Representação esquemática do biorreator de bancada

Levando-se em consideração as dimensões dos componentes do agitador central, a saber:

- ♦ Diâmetro do eixo central = 3 cm
- ◆ Comprimento do eixo central = 42 cm
- ♦ Diâmetro dos eixos perpendiculares = 2 cm
- ◆ Comprimento dos eixos perpendiculares = 16,5 cm
- ♦ Número de eixos perpendiculares = 5

Calculou-se o volume ocupado pelo agitador central como sendo igual a aproximadamente 0,6 litros. Desta forma, o volume útil total do biorreator é igual a aproximadamente 29,36 litros e o volume útil da parte cilíndrica igual a aproximadamente 18,4 litros. Destaca-se que a ocupação do reator deverá ser estudada somente levando-se em conta o volume útil da parte cilíndrica, uma vez que é nesta região onde haverá efetiva homogeneização do material como conseqüência da movimentação do eixo central.

O protótipo do biorreator foi instalado no laboratório 2 da Coordenação de Metalurgia Extrativa do CETEM/MCT e a ele foi acoplado, inicialmente, um motor de 1/4HP com objetivo de movimentar o eixo central, provocando assim a homogeneização do material no interior do reator.

Tendo em vista que um dos principais testes a serem realizados inicialmente com o protótipo dizia respeito a avaliação da carga mássica passível de ser aplica a este, relacionou-se o percentual de ocupação da parte cilíndrica do reator com o volume e a massa de Solo 1 correspondentes, conforme Tabela 5.2 abaixo, levando-se em consideração o valor da densidade do Solo 1 como sendo de 1,1 g/cm³ (item 4.1, Materiais e Métodos).

Tabela 5.2. Correlação Percentual de Ocupação x Volume de Solo x Massa de Solo (ρ solo seco = 1,1 g/cm³)

Percentual de ocupação da parte cilíndrica	Volume de solo contaminado a ser adicionado (litros solo seco)	Massa de solo contaminado a ser adicionada (kg solo seco)
20 %	3,68	4
30 %	5,52	6
40 %	7,36	8
50 %	9,20	10
60 %	11,04	12
70 %	12,88	14

Assim que o protótipo foi instalado os primeiros testes relacionados à operacionalização do mesmo foram iniciados, utilizando-se para tal o solo sem contaminação (solo virgem).

No entanto, a adição de apenas 1 kg do solo virgem ao reator foi responsável pelo aquecimento excessivo do motor e, depois de alguns minutos de operação, não foi capaz de movimentar o agitador central. Pode-se concluir que a potência do motor, de ¼ de HP, não era suficiente para suportar o peso do agitador após a adição desta mínima quantidade de solo, sendo necessário, portanto, a substituição do motor por um de maior potência (1/2 HP, com redutor). Após a instalação do novo motor, prosseguiu-se com a adição gradativa do solo virgem seco até completar 12 kg (60 % de ocupação).

No que tange ao comportamento do solo no interior do reator, observou-se alguns pontos de acúmulo de material nas paredes do reator, o que foi sendo minimizado através do ajuste do posicionamento e inclinação das pás.

Após cerca de 16 horas de operação inicial do reator com 12 kg de solo virgem detectou-se que o eixo central do agitador estava cedendo, indicando que o material utilizado (PVC) não estava suportando o peso do solo. Decidiu-se então pela parada do sistema, esvaziamento o reator e substituição tanto do eixo central quanto dos eixos perpendiculares por eixos de iguais dimensões, porém de aço inox (material que apresenta maior resistência mecânica que o PVC anteriormente utilizado).

Após a substituição dos eixos, 12 kg de solo virgem seco foram novamente adicionados ao reator e este foi mantido inicialmente em operação por um período de tempo superior à 40 horas, sem que fosse observada qualquer alteração no eixo central.

Com objetivo de verificar a eficiência da homogeneização do solo no interior do biorreator, adicionou-se pedras de aquário coloridas (azuis) aos 12 kg de solo seco contidos no mesmo. Esta adição foi realizada somente em dois pontos localizados nas laterais do biorreator (L1 e L2, Figura 5.19). O conteúdo do biorreator foi mantido sob agitação pelo curto período de 10 minutos e em seguida, cessada a agitação, foram retirados 200 mL do material de 6 pontos distintos do reator (A, B, C, D, E e F) conforme esquema apresentado na Figura 5.19 abaixo.

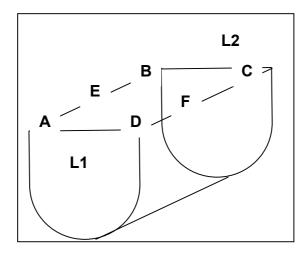


Figura 5.19. Representação esquemática dos locais de adição das pedras coloridas (L1 e L2) e dos locais de coleta de amostras (A, B, C, D, E e F) para avaliação da eficiência de homogeneização do conteúdo do Reator.

Em cada uma das amostras foi realizada a contagem do número de pedras coloridas existentes. Os resultados obtidos foram:

Ponto de Amostragem	Número de Pedras/200 mL de Solo
Α	24
В	17
С	16
D	19
Е	23
F	24

Observa-se que, em média, foram obtidas 21 pedras/200 mL de solo. Este resultado pode ser considerado satisfatório e indicativo da eficiência do sistema de homogeneização empregado neste primeiro protótipo de biorreator.

Dando continuidade aos testes de verificação da eficiência do sistema de homogeneização no protótipo, adicionou-se aos 12 kg de solo virgem (cerca de 60% de ocupação) água suficiente para que fosse atingido um teor de umidade igual a 50% da capacidade de retenção de água deste solo (16,4 % de umidade).

Após meia hora de agitação contínua do conteúdo do reator, foram retiradas amostras dos pontos anteriormente indicados na Figura 5.19, com o objetivo de verificar a homogeneidade na distribuição da umidade ao longo do reator.

Em cada uma das amostras foi realizada a determinação do teor de umidade e os resultados obtidos foram:

Ponto de Amostragem	Teor de Umidade (%)
Α	15,16
В	15,18
С	15,08
D	15,04
Е	15,13
F	14,91

Observa-se que, em média, obteve-se 15,08 % de umidade, correspondendo a cerca de 45% da capacidade de retenção de água do solo virgem. Este resultado também pode ser considerado satisfatório, sendo mais um indicativo da eficiência do sistema de homogeneização empregado neste primeiro protótipo de biorreator.

Apesar da indicação da eficiência do sistema de agitação/homogeneização adotado, foi verificada a formação de um filme de solo agregado à parede do reator, principalmente nos cantos, após um longo período de operação do mesmo. Na tentativa de minimizar este efeito de aglomeração, retirou-se do biorreator material suficiente para que a taxa de ocupação do mesmo fosse reduzida de 60 para 40 %.

A continuidade dos testes indicou que com a nova taxa de ocupação o efeito de aglomeração do material foi significativamente reduzido, sendo então este valor selecionado, a princípio, para a realização dos posteriores testes de biodegradação empregando o solo contaminado com óleo cru.

Ao término desta etapa de condução dos testes relacionados à operacionalização do biorreator empregando-se o solo virgem, este encontrou-se apto a ser empregado nos primeiros testes de biodegradação utilizando-se o solo contaminado.

5.3. Ensaios de Biodegradabilidade em Microcosmos

5.3.1. Ensaios de biodegradabilidade com o solo 1

O TESTE INICIAL de biodegradação possibilitou uma avaliação inicial do comportamento do Solo 1 frente a aplicação da técnica de bioestímulo, bem como proporcionou um maior entendimento do processo de biorremediação em um solo contaminado com características argilosas.

A Figura 5.20, a seguir, apresenta as curvas de evolução de CO₂ acumulado durante os 42 dias de ensaio, para todas as condições testadas.

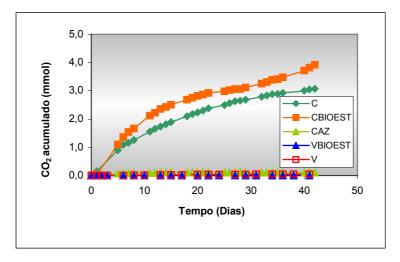


Figura 5.20. Curvas de evolução de CO₂ do TESTE INICIAL com Solo 1

Comparando-se o valor de CO₂ acumulado (expresso em termos de mmoles de CO₂) nas condições C (Solo 1) e CBIOEST (Solo 1 bioestimulado), verifica-se que houve uma resposta positiva da microbiota nativa no que toca a biodegradação do petróleo seja através apenas do ajuste da umidade do solo (Condição C) e um pouco mais acentuada quando do ajuste também do teor de nutrientes (condição CBIOEST). O efeito positivo, ainda que modesto do bioestímulo indicou a necessidade de uma investigação mais aprofundada quanto ao ajuste das concentrações de nutrientes no Solo 1 para que processo de biorremediação ocorresse de forma mais efetiva.

Adicionalmente, pôde-se observar que nem o Solo Virgem (condição V), nem o Solo Virgem bioestimulado (condição VBIOEST) apresentaram geração de CO₂ ao longo dos 42 dias de ensaio. Assim sendo, pode-se inferir que o CO₂ gerado nas condições C e CBIOEST foi resultados apenas da biodegradação do óleo contaminante e que a matéria orgânica original do solo não contribuiu de forma significativa para essa geração.

Comportamento semelhante foi verificado para o controle abiótico (condição CAZ), não sendo observada evolução de CO₂.

Com base nos perfis das curvas de evolução de CO₂, apresentados na Figura 5.20 e que exprimem indiretamente o nível de atividade microbiana, é possível concluir que embora os resultados obtidos após o bioestímulo não tenham sido da magnitude esperada, existe sim uma nítida influência positiva dessa prática neste sistema solo/contaminante. A reduzida atividade microbiana pode estar associada, em parte, ao

longo intervalo de tempo decorrido entre os eventos de contaminação e os ensaios de tratamento do solo. Outro fator que provavelmente concorreu para a reduzida geração de CO₂ pode estar associado à natureza das frações orgânicas presentes no solo, bastante resistentes ao ataque microbiano, conforme pode ser verificado através dos resultados da caracterização orgânica inicial, apresentados na Tabela 4.1.

As reduzidas taxas de biodegradação obtidas no TESTE INICIAL, mesmo após a aplicação da técnica de bioestímulo, suscitaram dúvidas também quanto à adequação das relações nutricionais praticadas (C:N:P = 100:10:1), bem como sobre à relevância ou não dos níveis de fertilidade do próprio solo contaminado.

As diferentes fontes consultadas na literatura (DEUEL e HOLLIDAY, 1997; WALWORTH *et al.*, 1997; BRINKMANN *et al.*, 1998; ALEXANDER, 1999; FOGHT *et al.*, 1999; WALWORTH *et al.*, 2007) levaram à suposição de que a alta concentração de nitrogênio (oriundo do solo e da fonte de nitrogênio - NaNO₃ - adicionado) empregada nos testes até então, estaria inibindo a microbiota nativa, provocando, desta forma, decréscimos consideráveis na atividade respiratória da microflora presente no solo contaminado. Caso esta suposição fosse de fato consistente, a princípio, a concentração de nitrogênio originalmente presente no solo (C:N = 100:1,25) já garantiria a manutenção dos microorganismos nativos.

A fim de validar estas suposições, um novo ensaio de biodegradação foi conduzido, denominado de ADEQUAÇÃO DE UMIDADE E RELAÇÃO NUTRICIONAL, no qual a atividade respiratória foi avaliada em diferentes condições de correção do teor de nutrientes: sem correção, com correção apenas de fósforo e com correção total de nutrientes. Face ao desafio proposto de se trabalhar com o menor teor de umidade possível, sendo o mesmo suficiente apenas para manter a atividade microbiana no solo contaminado, todas as condições acima descritas foram testadas com teores de umidade correspondentes a 30 e 50% da capacidade de retenção de água do solo contaminado (Solo 1).

Na Figura 5.21 são apresentadas as curvas de geração de CO₂ para as condições testadas com os teores de 30 e 50% da capacidade de campo do solo contaminado.

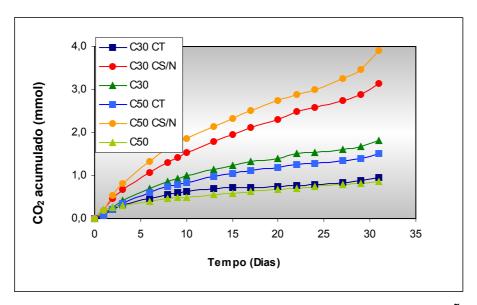


Figura 5.21. Curvas de evolução de CO₂ (mmol) do teste ADEQUAÇÃO DE UMIDADE E RELAÇÃO NUTRICIONAL

Observa-se na Figura 5.21 que para os dois teores de umidade testados (30 e 50% da CRA), os melhores resultados foram obtidos quando as amostras de solo foram submetidas apenas à correção de fósforo e, indiretamente, de potássio, resultado que não só mostra a importância de se suplementar o solo com tais nutrientes, como também aponta para a validade da suposição anteriormente feita, de que o nitrogênio presente no solo já estaria atendendo às necessidades metabólicas da população nativa. Resultados concordantes foram relatados por Foght *et al.* (1999) em seus estudos a respeito da biodegradabilidade de hidrocarbonetos aromáticos e poliaromáticos.

Cabe destacar que o fósforo, em especial, não só se configura como um importante nutriente para as células microbianas, como também atua como poderoso agente tamponante do sistema solo/contaminante (FOGHT et al, 1999), possibilitando a manutenção da faixa de pH ótima para a atuação das bactérias (em torno da neutralidade) e, conseqüentemente, garantindo a continuidade da metabolização dos hidrocarbonetos de petróleo mais pesados (aromáticos e poliaromáticos). Ressalta-se ainda que o fósforo e o potássio são nutrientes tão importantes, que em condições de umidade correspondentes à 50% da CRA, mesmo sob efeito de inibição pelo excesso de nitrogênio, os microorganismos se encontram mais ativos nas condições de correção total do que naquelas sem qualquer correção. Com condição de umidade correspondente a 30% da CRA, este comportamento não chega a ser observado, pois o impacto da superfertilização com N (condição de correção total) sobre o metabolismo celular é mais determinante do que a influência da sub-fertilização com P e K (ausência de correção). Este fato é perfeitamente explicável, já que para a umidade correspondente a 30% da

CRA o grau de diluição dos nutrientes no solo é reduzido, em função da baixa disponibilidade da água. Essas diferenças entre as respostas microbianas, associadas aos níveis de fertilização e à umidade dos solos foi muito bem resumida por Walworth *et al.* (1997): solos secos são facilmente super-fertilizados, enquanto solos úmidos são muito menos sensíveis aos excessos de N. Essa afirmação é justificada pelo fato de que a maioria dos fertilizantes, principalmente aqueles a base de nitrogênio, são compostos de sais solúveis que rapidamente se dissolvem na água presente nos poros do solo, causando, nos solos com menores teores de umidade, um aumento da concentração de sais na solução do solo e diminuição do potencial osmótico do solo, o que pode vir a inibir a atividade microbiana (WALWORTH *et al.*, 2007).

Aprofundando as discussões sobre o efeito da umidade na disponibilização de nutrientes, Walworth *et al.* (1997) apresentaram um conceito original para a adequação da dosagem de nitrogênio em solos (para fins de estímulo à biorremediação) e que serviria para estimar o impacto da fertilização no potencial osmótico do solo (WALWORTH *et al.*, 2007). Segundo estes autores, a relação "massa de nitrogênio/massa de água" é mais informativa do que as tradicionais relações "massa de nitrogênio/massa seca de solo" ou "massa de carbono/massa de nitrogênio" (relação C:N), tanto que a concentração de nitrogênio é expressa por N_{H2O}, obtido como:

$$N_{H2O} = mg N / kg H_2O = (mg N / kg solo) x (kg solo / kg H_2O)$$

De acordo com esta expressão, o valor de N_{H2O} para o Solo 1, sem qualquer adição de nutrientes e com 50% da CRA (13,45% de umidade) é de 4.460,97 mg N / kg H_2O e de 7.434,94 mg N / kg H_2O , após a correção de umidade para 30% da CRA (8,07% de umidade).

Em seus estudos, Walworth *et al.* (1997) mostraram que tanto para solos arenosos, quanto para solos siltosos, valores de N_{H2O} superiores à 2.500 mg N / kg H_2O provocam fenômenos de inibição metabólica (provavelmente em função de grandes alterações osmóticas), o que significa dizer que, o solo estudado, sem qualquer adição de nitrogênio, já apresenta concentração excessiva deste nutriente. De acordo com estes dados, é possível inferir que a aplicação de $NaNO_3$ neste sistema pode ter gerado um impacto negativo no processo, já que os valores de N_{H2O} evoluem assustadoramente para 35.639,9 mg N / kg H_2O (para a umidade de 50% da CRA) e 59.429,3 mg N / kg H_2O (para 30% da CRA), inferência que se mostra concordante com os resultados obtidos experimentalmente.

O 2º teste com o Solo 1 em muito contribuiu para a gradual otimização do processo de biorremediação, não só pela identificação da forma mais adequada de correção dos níveis de fertilidade deste solo, como pelo fato de ter apontado para a necessidade de se realizar esta correção correlacionando-a ao teor de umidade.

Ainda com o objetivo de otimização do processo de biorremediação do Solo 1, em escala de bancada, foi avaliada a eficiência da adição de um material estruturante de origem orgânica, no caso a serragem. Como citado no Capítulo 4 (item 4.3.1), a serragem foi escolhida como o material estruturante tendo em vista os resultados promissores obtidos em trabalhos anteriores (RAIMUNDO et al., 2004; AZEVEDO et al., 2005) e por ser esta uma estratégia a ser adotada quando o solo contaminado a ser tratado já passou por um acentuado processo de intemperização e os compostos orgânicos poluentes encontram-se fortemente aderidos à matriz do solo, como no caso do Solo 1.

Na Figura 5.22, a seguir são apresentadas as curvas de geração de CO₂ para as condições avaliadas no teste denominado de ADIÇÃO DE MATERIAL ESTRUTURANTE.

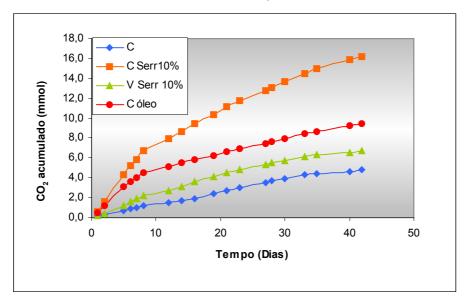


Figura 5.22. Curvas de evolução de CO₂ (mmol) do teste ADIÇÃO DE MATERIAL ESTRUTURANTE

Verifica-se na Figura 5.22 que a incorporação do material estruturante ao solo bioestimulado (Condição C Serr10%) foi responsável pelo aumento da atividade microbiana, quando comparado com a condição sem a adição do material estruturante (Condição C). Ressalta-se que em ambas as condições ocorreu idêntico bioestímulo da microbiota nativa através da adição de fósforo (C:N:P = 100:1,25:1) e correção do pH (7),

conforme definido no teste anterior (ADEQUAÇÃO DE UMIDADE E RELAÇÃO NUTRICIONAL).

Tendo em vista que o CO₂ gerado na condição C Serr10% pode ter origem não só na degradação do óleo contaminante, quanto também da degradação do próprio material estruturante e da matéria orgânica naturalmente contida no solo, aos valores de CO₂ desta condição foram descontados os valores de CO₂ gerado na condição V Serr10%. Assim, foi possível obter os valores de CO₂ gerado (mmol) apenas pela degradação do óleo, dando origem aos valores plotados na curva C óleo. Comparando-se os valores acumulados para as condições C e C óleo verifica-se que a adição da serragem praticamente dobrou o número de mmoles de CO₂ gerados a partir da degradação do óleo durante os 42 dias de ensaio.

Em função dos resultados obtidos, pode-se afirmar que a adição de serragem (ME) na concentração de 10% (p/p), associada ao bioestímulo foi responsável por um aumento substancial da biodegradação do contaminante e, por isso, pode ser adotada como uma técnica auxiliar ao processo de borremediação do Solo 1.

5.3.2. Ensaios de biodegradabilidade com o solo 2

A necessidade de uso do Solo 2 para continuidade do trabalho levou a realização de ensaios de biodegradação em microcosmos semelhantes aos realizados com o Solo 1, visando determinar as melhores condições para o tratamento do mesmo. Assim, o TESTE INICIAL como Solo 2 buscou estabelecer a relação nutricional (C:N:P) adequada para otimizar o processo de biorremediação, isto é a necessidade ou não de adição de nitrogênio e/ou fósforo e em que concentração.

A análise das curvas de geração de CO₂ para o TESTE INICIAL, apresentadas na Figura 5.23, a seguir, indicam que a condição na qual ocorreu apenas a correção do teor de nitrogênio de forma a se obter uma relação C:N:P de 100:10:0,39 (Condição 4) foi aquela que apresentou a melhor resposta em termos de aumento da atividade microbiana ao longo das 42 dias de ensaio. Essa resposta positiva significa a necessidade de adição de nitrogênio ao solo 2, comportamento este distinto ao observado com o Solo 1, onde a adição de N, ao contrário, foi responsável por um efeito inibitório à atividade da microbiota nativa.

No caso do Solo 2 sem adição suplementar de nitrogênio e com 50% da CRA (14% de umidade) o N_{H2O} é 16.428,5 mg N/kg H_2O . Após a adição de $NaNO_3$ para

obtenção da relação C:N igual a 100:10 esse valor passa para 25.214,28 mg N/kg H_2O e mesmo assim o impacto na atividade microbiana é positivo refletindo diretamente em um aumento na biodegradação do contaminante. No caso do Solo 1 um valor de N_{H2O} de 5.586,59 mg N/kg H_2O já era suficiente para manter a atividade biodegradadora elevada.

Essa diferença de comportamento dos dois solos estudados, frente aos diferentes teores de nitrogênio adicionados, indica que dificilmente poderá se chegar a um valor único (padrão) de N_{H2O}, e mesmo de relação C:N, a ser aplicado em processos de biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo. Isto pode ser facilmente explicado em função da diversidade de possibilidade de respostas das comunidades microbianas presentes nos diferentes tipos de solo, da alteração da biodisponibilidade dos diferentes níveis de sais inorgânicos não nitrogenados presentes no solo ao longo do tempo devido ao consumo destes como substrato ou geração como produtos de reações químicas e/ou bioquímicas que ocorrem durante todo o processo, dentre outros (WALWORTH *et al.*, 2007).

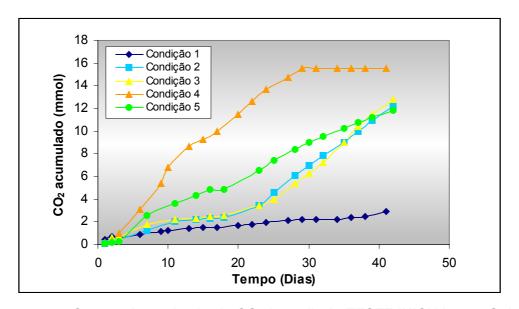


Figura 5.23. Curvas de evolução de CO₂ (mmol) do TESTE INICIAL com Solo 2

As respostas às condições para as quais ocorreu apenas a adição de fósforo (Condição 3; C:N:P = 100:6,86:1), ou a adição conjunta de nitrogênio e fósforo (Condição 5; C:N:P = 100:10:1) foram semelhantes àquela observada para a condição não bioestimulada do solo 2 (Condição 2; C:N:P = 100:6,86:0,39) onde ocorreu apenas a correção da umidade inicial do solo. Logo, a adição de fósforo não apresentou efeito positivo. Resultados semelhantes foram observados por Seabra (2005) e Santos (2007). Os autores verificaram que a adição de fósforo (C:P = 100:1) a um solo tropical

contaminado com 5% p/p de óleo cru não apresentou resultado positivo na degradação do óleo.

Frente ao exposto, é possível afirmar que a correção de nitrogênio mostrou-se fundamental para o aumento da degradação do óleo, tendo em vista que nas duas condições onde o teor de nitrogênio foi corrigido para C:N = 100:10 (condições 4 e 5) a fase exponencial de aumento da atividade microbiana foi significativamente mais acentuada do que nas condições onde esse nutriente não foi adicionado ao solo.

Além disso, observa-se que todas as condições, exceto a Condição 1 (Solo sem contaminação) apresentaram uma fase inicial de adaptação ao contaminante (fase *lag*) de cerca de três dias. Essa fase de adaptação não foi observada nos ensaios com o Solo 1, uma vez que o a exposição prévia da comunidade microbiana ao contaminate reduz ou extingue esse período. Já para o Solo 2, onde a contaminação foi simulada, essa adaptação torna-se necessária.

O comportamento distinto dos solos estudados, principalmente quanto ao estabelecimento da melhor relação nutricional a ser adotada, só vem a reforçar a afirmação feita por Santos (2007) de que o sucesso de um processo de biorremediação depende fundamentalmente da realização de ensaios preliminares, como os realizados em microcosmos, buscando um maior conhecimento do sistema solo/contaminante e o estabelecimento de condições de processo específicas para cada solo estudado.

Após o estabelecimento da relação nutricional mais adequada à biorremediação do Solo 2 (C:N:P = 100:10:0,39), buscou-se avaliar a eficácia da adição da serragem (10% p/p) como material estruturante além de uma fonte de nitrogênio alternativa ao nitrato de sódio, no caso a uréia.

Na Figura 5.24, a seguir, são apresentados os resultados de acúmulo de CO₂ (mmoles) ao longo do TESTE ADIÇÃO DE MATERIAL ESTRUTURANTE E FONTE DE NITROGÊNIO com Solo 2.

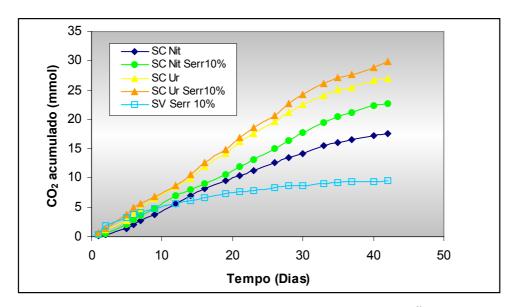


Figura 5.24. Curvas de evolução de CO₂ (mmol) do Teste ADIÇÃO DE MATERIAL ESTRUTURANTE E FONTE DE NITROGÊNIO com Solo 2

Os resultados obtidos com a adição de uréia foram encorajadores quanto ao uso desse insumo tendo em vista que superaram os obtidos com o nitrato de sódio, conforme pode ser observado na Figura 5.24. Valores mais elevados de CO₂ acumulado foram obtidos tanto para a condição sem a adição da serragem quanto para a condição onde ocorreu a adição do material estruturante (SC Ur e SC Ur Serr10%, respectivamente).

Nas condições SC Nit Serr10% e SC Ur Serr10% foram obtidas concentrações finais de CO₂ de 22,8 e 29,9 mmol, respectivamente. Essas concentrações foram superiores aos correspondentes controles (17,6 e 26,9 mmol, respectivamente), indicando que a utilização da serragem seria potencialmente favorável na remoção do contaminante. O mesmo foi observado no trabalho desenvolvido por Raimundo *et al.* (2004) onde a serragem foi utilizada como agente estruturante no tratamento de um solo contaminado por petróleo, e a condição na qual foi aplicada ocorreu uma remoção de 20% do contaminante, enquanto a condição somente bioestimulada, houve apenas cerca de 10% de remoção.

Em trabalho comparando o uso da serragem e da fibra de coco como estruturantes em teste respirométrico, Seabra (2005) observou que no solo contaminado com 5% de óleo cru, os melhores resultados observados para a condição com adição da serragem, com um consumo médio de oxigênio de 0,3261 mg/g de óleo.h, valor este muito superior ao obtido para a aplicação da fibra de coco, que foi de 0,0441 mg/g de óleo.h.

Já Santos (2007) comparou o uso da serragem e da vermiculita como agentes estruturantes no tratamento de solo contaminado com petróleo em testes de biodegradabilidade realizados em microcosmos durante 42 dias. O autor verificou remoção de 22% de HTP com a adição da serragem e de apenas 14% com a adição da vermiculita. O autor associa esse aumento de degradação do contaminante após a adição da serragem a um maior crescimento microbiano, principalmente dos microrganismos degradadores de petróleo, tendo em vista a maior aeração promovida por esse material. Foi observado aumento de cerca de 3 ordens de grandeza do início para o final do teste passando de 10³ NMP/ g solo para 10⁶ NMP/g solo na condição corrigida com uréia.

5.4. Experimentos em Biorreator de Bancada

Durante a apresentação e a discussão dos resultados relativos aos ensaios desenvolvidos nos biorreatores de bancada, poucas referências bibliográficas serão citadas tendo em vista o número reduzido de trabalhos disponíveis na literatura que contemplem processos semelhantes ao proposto no presente trabalho de tese. Destacase que inexistem trabalhos técnicos que utilizam biorreatores do tipo tambor fixo para o tratamento de um solo tropical contaminado com óleo cru pesado.

5.4.1. Ensaios de biorremediação com solo 1 no protótipo 1

O primeiro teste realizado no protótipo do biorreator baseou-se apenas na aplicação da técnica de bioestimulo da população nativa do Solo 1 (contaminado), através da correção do teor de fósforo de forma a se obter uma relação C:P de 100:1 (40% ocupação, 50% capacidade de retenção de água, pH 7). Não houve adição de nitrogênio, uma vez que testes anteriores realizados em microcosmos indicaram que o teor deste macro-nutriente existente naturalmente no solo contaminado (C:N = 100:1,25) já era suficiente para a manutenção da atividade microbiana responsável pela biodegradação dos poluentes orgânicos.

Para a avaliação da eficiência do tratamento no biorreator, amostras do solo contaminado no início e no fim do teste foram encaminhadas para análise de HTP, cujos cromatogramas são apresentados na Figura 5.25, a seguir. A concentração inicial de 19,57 mg/g solo seco foi reduzida para 12,24 mg/g solo seco ao final de 42 dias de ensaio, indicando uma remoção de 37,50% no período a uma taxa de remoção diária de 0,17 mg HTP/g solo. dia.

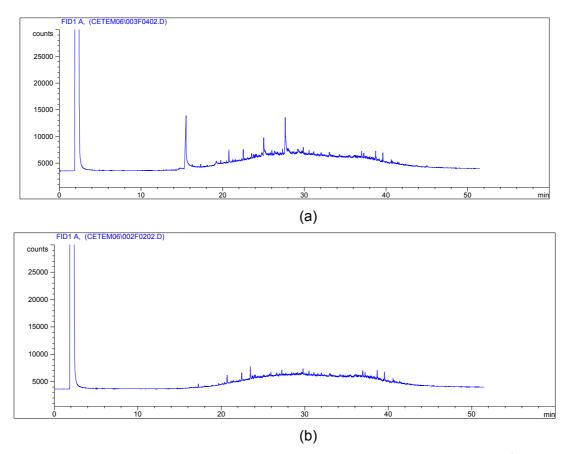
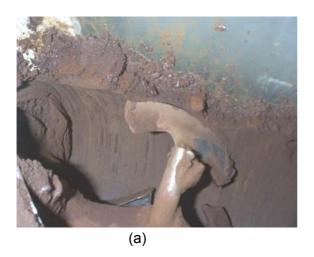


Figura 5.25. Cromatogramas relativos às amostra inicial (a) e final (b) do 1° teste no biorreator como Solo 1.

Verifica-se, na Figura 5.25, uma nítida redução dos tamanhos dos picos dos nalcanos ao final do tratamento.

O resultado obtido neste primeiro teste foi bastante encorajador tendo em vista as dificuldades operacionais observadas durante o experimento (acentuada formação de um filme de solo nas paredes do biorreator como conseqüência do desgaste excessivo das pás de aço inoxidável, Figuras 5.26 e 5.27) e o mínimo incremento de aditivos realizado (ajuste de pH e correções dos teores de fósforo e de umidade).

Com a formação deste filme, a ação microbiana pode ter sido prejudicada devido a não homogeneização deste percentual de solo, acarretando na menor incorporação de oxigênio e de nutrientes.



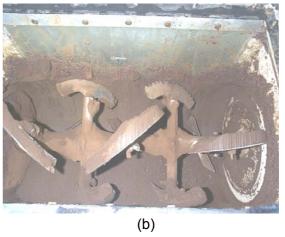
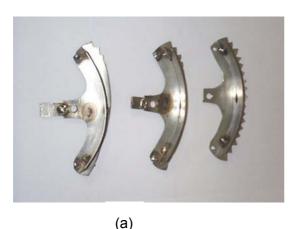


Figura 5.26. Registro do protótipo de biorreator utilizado para o ensaio de biodegradação, ao fim do experimento (a- detalhe do acúmulo de material; b – vista superior)



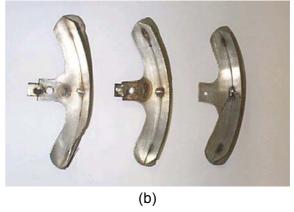


Figura 5.27. Registro do desgaste das pás de aço-inóx, ao fim do experimento (a- detalhe das pás dentadas; b- detalhe das pás lisas)

Os resultados de monitoramento do teor de óleos e graxas (OG) indicaram uma remoção de 32,58% (de 3,35± 0,02% para 2,26±0,01%). Possivelmente, a aplicação da técnica de bioestímulo proporcionou um aumento da atividade da população microbiana nativa já adaptada à presença da fração pesada dos contaminantes biodisponíveis acarretando em uma maior eficiência de remoção de OG. Por este motivo a eficiência de remoção desta fração (32,58%) foi bastante próxima à obtida na remoção de HTP (37,50%).

Os resultados da quantificação de microrganismos degradadores de óleo cru indicaram um crescimento de duas ordens de grandeza do início até os primeiros 15 dias de ensaio (de 2,38x10⁶ NMP/g solo para 1,05x10⁸ NMP/g solo), seguido de uma queda da concentração e praticamente retorno à população inicial ao término dos 42 dias de teste (4,48x10⁶ NMP/g solo).

Em função do desgaste apresentado, foi realizada a substituição das pás confeccionadas inicialmente em aço-inox de 1,5mm de espessura, por pás confeccionadas em aço-inox 316 de 6,5mm de espessura, de maior resistência.

Além disso, foi realizada alteração do sistema de descarte de material localizado no fundo do reator, em função da dificuldade operacional inerente a remoção do solo após o tratamento. A placa de acrílico inicialmente utilizada foi substituída por um tampão de PVC rosqueado, conforme Figura 5.28.



Figura 5.28. Alteração do sistema de descarte de material pelo fundo do biorreator

Após as alterações acima descritas o reator encontrava-se apto a ser utilizado no desenvolvimento de novos ensaios de biorremediação como o Solo 1, sendo o próximo o ensaio identificado como 2º TESTE S1.

Ao longo do 2º TESTE S1, onde ocorreu a aplicação da técnica de bioestímulo em associação a adição da serragem como estruturante, foi possível a realização de um monitoramento semanal da concentração de HTP, cujos resultados obtidos ao longo dos 42 dias de ensaio são apresentados na Figura 5.29.

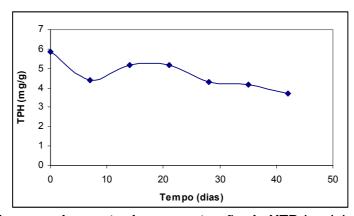


Figura 5.29. Acompanhamento da concentração de HTP (mg/g) ao longo do 2° TESTE S1 no protótipo 1 de biorreator.

Verifica-se que houve uma pequena queda na concentração de HTP no solo até o 7° dia, seguida de ligeiro aumento entre o 14° e 21° dias de teste e, finalmente nova queda até o 42° dia de ensaio, resultando na remoção global de 36,40% do HTP inicial. As freqüentes quedas e elevações observadas ao longo do teste podem ser atribuídas a erros associados à metodologia analítica empregada ou mesmo à homogeneidade das amostras coletadas no interior do reator. A queda na concentração inicial de 5,85 mg HTP/g solo para 3,72 mg HTP/g solo, representou uma taxa de remoção diária de 0,05 mg HTP/g solo.dia, sendo esta inferior à obtida no 1° TESTE S1 (0,17 mg HTP/g solo.dia).

Lee *et al.* (2007) obtiveram taxas diárias de remoção de HTP da ordem de 0,03 mg HTP/g solo. dia, após 105 dias de monitoramento do processo de biorremediação *insitu* (atenuação natural monitorada) de um solo contaminado com óleo mineral pesado (7.490 mg HTP/kg solo) quando da adição de materiais estruturantes (serragem, composto). Já Seabra *et al.* (2006) obtiveram taxas variando entre 0,28 a 0,36 mg HTP/g solo. dia nos primeiros 56 dias de tratamento em biopilha de um solo recém contaminado com 5% de óleo cru. No caso do solo1, onde a contaminação era bastante antiga, a taxa obtida pode ser considerada satisfatória tendo em vista as características peculiares do sistema solo- contaminante.

O resultado obtido neste teste foi considerado extremamente satisfatório, principalmente quando comparado aos resultados obtidos em outros testes realizados no biorreator e que não fazem parte do escopo do presente trabalho de tese. Cabe lembrar que o trabalho de tese aqui apresentado é parte de um projeto de desenvolvimento científico e tecnológico mais amplo. Assim, outros ensaios foram realizados pela equipe envolvida no projeto, antes da realização do 2º TESTE S1, e apesar dos mesmos não terem sido incluídos no presente trabalho, alguns dos resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.3. Os mesmos servem para confirmar o processo de atenuação natural pelo qual o Solo 1 passou ao longo do período de estocagem, conforme esclarecido anteriormente no capítulo 4 (materiais e métodos) (RIZZO *et al.*, 2004).

Tabela 5.3. Resultados inicias e finais de HTP (mg/g) para os testes em biorreator

Ensajo	HTP (r	Remoção	
	Inicial	Final	(%)
1° TESTE S1– Bioestímulo	19,57	12,24	37,46
TESTE A – Bioestímulo e Biossurfactante, 10% p/p	19,57	7,96	59,33
TESTE B – Bioestímulo e Enzima comercial	41,42	36,20	12,60
TESTE D – Bioestímulo e Biossurfactante, 2% p/p	4,76	3,99	16,18
TESTE F – Bioestímulo, Bioaumento microbiota nativa e Biossurfactante 2% p/p	8,67	7,20	16,96
2° TESTE S1 – Bioestímulo e Material Estruturante (serragem 10% p/p)	5,85	3,72	36,41

Fonte: Rizzo et al., 2004

Avaliando-se os resultados de HTP das amostras iniciais de todos os testes realizados, verifica-se que ao longo do tempo ocorreu uma queda considerável do teor de contaminação nas amostras utilizadas para a condução dos experimentos, conforme citado no capítulo 4 (materiais e métodos). Essa queda tornou-se evidente nos testes D e F (destacados na tabela).

Na Figura 5.30 a seguir, são apresentados os cromatogramas relativos à análise do teor de HTP (por CG/FID) das amostras inicias de solo empregadas nos 5 testes de biodegradação apresentados na Tabela 5.3.

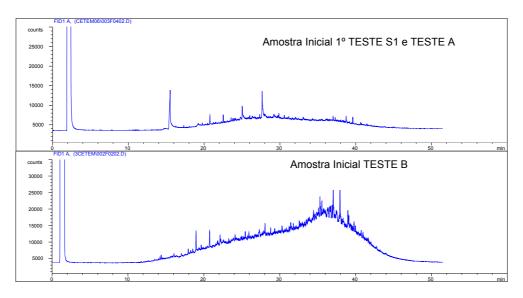


Figura 5.30. Cromatogramas das análises de HTP realizadas nas amostras iniciais de solo contaminado empregadas nos testes realizados em biorreator de bancada.

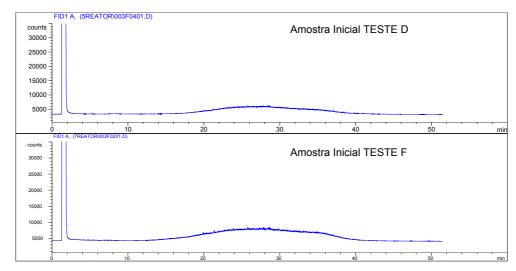


Figura 5.30 (cont.). Cromatogramas das análises de HTP realizadas nas amostras iniciais de solo contaminado empregadas nos testes realizados em biorreator de bancada.

Verifica-se que, nos cromatogramas correspondentes aos TESTES D e F, praticamente não há presença dos picos correspondentes aos compostos resolvidos (alcanos), detectados anteriormente nos cromatogramas do 1º TESTE S1 e dos TESTES A e B. Ao contrário, pelo deslocamento da linha de base, só é possível constatar a presença da fração de compostos não resolvidos (UCM) — aromáticos, resinas e asfaltenos. Essa sensível alteração no perfil cromatográfico das três últimas amostras vem a confirmar a intemperização sofrida pelo solo contaminado e a conseqüente redução do teor inicial de hidrocarbonetos de petróleo.

O teor residual de contaminação orgânica (0,5 a 1% de HTP (p/p)) corresponde apenas à presença de compostos extremamente recalcitrantes e de difícil degradação.

Em face ao exposto, foi possível concluir que qualquer esforço para aplicação de técnicas que visassem o aumento da eficiência de biodegradação, tenderia a não surtir o efeito esperado devido às características da contaminação residual presente no Solo1, porém, ainda assim, a adição de material estruturante apresentou efeito positivo mesmo nas frações recalcitrantes da contaminação orgânica residual.

Na Figura 5.31, a seguir, são apresentados os cromatogramas da análise do teor de HTP das amostras coletadas semanalmente durante o período de condução do 2° TESTE S1 (42 dias).

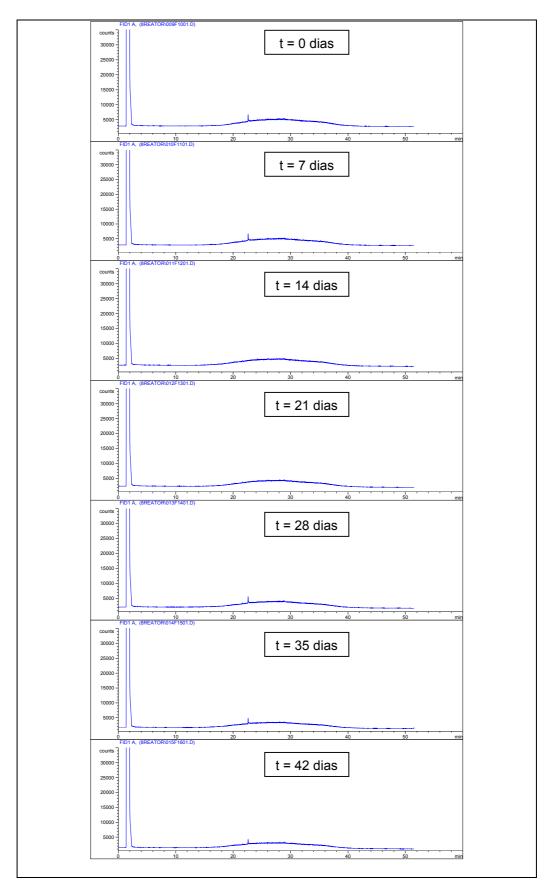


Figura 5.31. Cromatogramas das análises de HTP realizadas nas amostras do 2° TESTE S1.

Nos cromatogramas da Figura 5.31 verifica-se que, praticamente, não há presença dos picos correspondentes aos compostos resolvidos (alcanos), sendo possível apenas constatar a presença da fração de compostos não resolvidos (UCM) — aromáticos, resinas e asfaltenos. Esses perfis cromatográficos confirmam, mais uma vez, a intemperização sofrida pelo solo contaminado e a conseqüente redução do teor inicial de hidrocarbonetos de petróleo. Apesar disto, a adição do material estruturante proporcionou uma degradação de parte da fração não resolvida, provavelmente dos compostos aromáticos, contribuindo assim para a remoção total de 36,41% da concentração dos hidrocarbonetos presentes na amostra de solo. Isto pode ser evidenciado pela discreta diminuição da alteração da linha de base indicativa da fração UCM.

Destaca-se que o processo de atenuação natural dos contaminantes orgânicos no Solo 1, durante o armazenamento deste no dique, foi responsável por uma redução de 51,20% na concentração de HTP após 21 meses, significando uma redução de 2,44% ao mês. Já os resultados obtidos no 1º e 2º testes mostraram reduções mensais de 26,79 e 25,93%, respectivamente, indicando um aumento de mais do que 10 vezes na eficiência do processo quando o mesmo é conduzido no biorreator em condições otimizadas.

O acompanhamento do teor de óleos e graxas (OG) ao longo do 2º TESTE S1 é apresentado na Figura 5.32. Os resultados identificados com CENPES dizem respeito às análises realizadas pelo CENPES/PDEDS/BTA nas amostras de solo contendo material estruturante para que fosse mantida uma coerência/concordância com os resultados analíticos de HTP anteriormente apresentados, os quais foram obtidos pelo mesmo laboratório. São também apresentados os resultados obtidos pelo CETEM, tanto com as amostras de solo contendo material estruturante (identificadas como C/ME), quanto com as amostras coletadas na mesma data mas que passaram por um processo de peneiramento para a remoção do material estruturante (identificadas como S/ME). A realização de análises de OG nas amostras com e sem material estruturante objetivou verificar a interferência dos compostos naturalmente presentes no estruturante, e passíveis de serem extraídos com o n-hexano, no resultado final da análise.

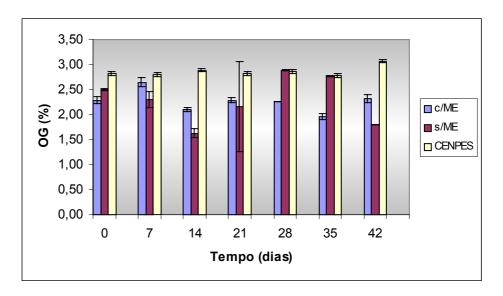


Figura 5.32. Acompanhamento do teor de óleos e graxas (OG) ao longo do 2º TESTE S1

Os valores obtidos para as amostras contendo material estruturante, tanto para as amostras encaminhadas para o CENPES, quanto para aquelas analisadas no CETEM não apontam redução significativa no teor do óleo contaminante. Entretanto, considerando-se as amostras sem material estruturante, foi verificada uma remoção de 28% do teor inicial de OG. Esses resultados indicam que compostos naturalmente presentes no material estruturante, e passíveis de serem extraídos com o n-hexano podem interferir negativamente no resultado da determinação gravimétrica de óleos e graxas, sendo necessária a remoção do estruturante para que se possa obter resultado real do teor de óleo contaminante expresso como OG.

O resultado de remoção de OG obtido no 2º TESTE S1, após a remoção de material estruturante (28%), vem a comprovar o observado após a análise dos resultados de HTP, apresentados anteriormente, de que a adição do material estruturante auxiliou significativamente o processo de biorremediação de um solo contaminado que já passou por um acentuado processo de intemperização como o solo 1.

A Figura 5.33 apresenta os resultados das contagens de microrganismos degradadores de óleo cru realizadas para as amostras coletadas semanalmente, ao longo do 2º TESTE S1.

Observa-se que não ficou evidenciada uma alteração significativa na densidade microbiana durante o teste. Esse fato indica que a adição do material estruturante não resultou num aumento significativo da população de microrganismos envolvidos no processo de degradação do óleo, mas sim uma interferência positiva nas características

críticas do solo (como permeabilidade, porosidade, densidade, etc) refletindo diretamente nas taxas de biodegradação.

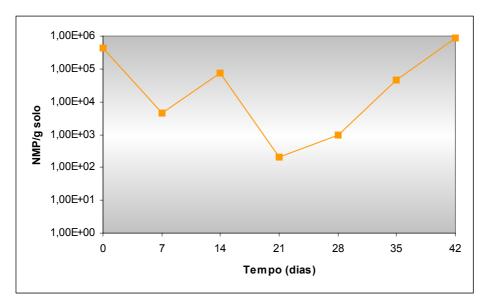


Figura 5.33. Acompanhamento da concentração dos microrganismos degradadores no solo durante o 2º TESTE S1.

Em função dos resultados obtidos no 1º e no 2º testes com o Solo 1 pode-se concluir que tornava-se imprescindível, para a continuidade do trabalho, a seleção de um novo solo contaminado com características físico-químicas semelhantes às do Solo 1. Assim sendo, foi selecionado o Solo 2, como qual deveriam ser repetidos os testes realizados com o solo 1 no primeiro protótipo de biorreator.

5.4.2. Ensaios de biorremediação com solo 2 no protótipo 1

Os ensaios de biorremediação com o Solo 2 no protótipo 1 reproduziram condições de processo anteriormente testadas com o Solo 1 (aplicação das técnicas de bioestímulo e bioestímulo associado à adição de material estruturante) e, adicionalmente, a avaliação da eficácia da substituição da fonte de nitrogênio (nitrato de sódio por uréia).

Os resultados obtidos para o monitoramento da concentração de HTP (mg/g solo) e OG (%) no início e ao final dos 42 dias de ensaios são apresentados na Tabela 5.4, a seguir, bem como as respectivas remoções percentuais obtidas para esses parâmetros.

Tabela 5.4. Resultados dos ensaios de biorremediação com o Solo 2 no Protótipo 1

Identificação	HTP (mg/g solo)		Remoção	Taxa Remoção OG (%		(%)	Remoção
do ensaio	Inicial	Final	HTP (%)	Diária (mg HTP/g solo.dia)	Inicial	Final	OG (%)
1° TESTE S2	22,24	19,46	12,48	0,07	3,48±0,07	3,15±0,00	9,48±0,04
2° TESTE S2	19,46	16,93	12,98	0,06	2,54±0,04	2,21±0,04	14,93±0,04
3° TESTE S2	21,67	18,66	13,86	0,07	2,69±0,05	2,41±0,10	10,41±0,08
4° TESTE S2	32,38	26,04	19,58	0,15	3,69±0,05	3,11±0,02	15,91±0,04

Assim com foi constatado nos ensaios anteriores realizados com o solo 1, não foi verificada diferença significativa nos resultados de HTP obtidos tanto com a adição de material estruturante (2° TESTE S2) comparando-o com o resultado obtido apenas com a aplicação do bioestímulo (1° TESTE S2), quando a fonte de nitrogênio utilizada foi o nitrato de sódio. Nesse caso, a adição da serragem teve como conseqüência um aumento de apenas 4% na eficiência do processo e as taxas de remoção diárias de HTP se mantiveram praticamente iguais (0,07 – 0,06 mg HTP/g solo. dia). O principal benefício observado foi, no entanto, a melhor homogeneização do solo no interior do biorreator, quando da adição da serragem.

Já quando a fonte de nitrogênio foi substituída pela uréia (3° TESTE S2) a remoção de HTP foi elevada de 12,48% para 13,86% quando da aplicação apenas da técnica de biestímulo, representando assim uma aumento de cerca de 11% na eficiência do processo, apesar da taxa de remoção diária de HTP se manter idêntica (0,07 mg HTP/g solo. dia) . A associação do bioestímulo com uréia com a adição da serragem (4° TESTE S2) acarretou, no entanto, em uma elevação da remoção de HTP de 12,98% para 19,58%, representando em aumento significativo da taxa diária de remoção de HTP de 0,06 para 0,15 mg HTP/g solo.dia, comprovando assim, a eficácia da adição do material estruturante na aceleração do processo de biorremediação do Solo 2 no protótipo de biorreator.

Comparando-se os valores de remoções percentuais de HTP obtidas para o Solo 1 nos ensaios no Protótipo 1 com as obtidas para o Solo 2, verifica-se que essas últimas são bastante inferiores às primeiras (praticamente a metade). Uma das possíveis explicações estaria associada ao fato do Solo 2 ser um solo recém contaminado (simulação), o que pode ter causado um impacto negativo na microbiota nativa do solo. Por outro lado, o Solo 1, por se tratar de uma contaminação antiga, já possuía uma população nativa bastante adaptada à contaminação. Essa hipótese de que houve um impacto à população no Solo 2 pode ser sustentada, observando-se os resultados

obtidos no monitoramento semanal da concentração de microrganismos degradadores de óleo cru (Tabela 5.5). De uma forma geral houve, para as quatro condições testadas, uma redução nas concentrações da população degradadora ao longo das 7 semanas de ensaio. No entanto, esse impacto negativo foi evidenciado apenas a partir da 2ª ou 3ª semana. Possivelmente, no período anterior houve um pequeno aumento da população nativa como conseqüência do estímulo à degradação da própria matéria orgânica natural do solo, associado à técnica de bioestímulo adotada (correção de umidade, adição de nitrogênio, aeração e agitação), superando assim o efeito negativo da adição da elevada concentração de óleo cru.

Destaca-se ainda, que no 3° e 4° testes, onde a uréia foi utilizada como fonte adicional de nitrogênio, parece que a queda da população microbiana degradadora foi menos intensa que a observada no 1° e 2° testes (com nitrato de sódio)

Tabela 5.5. Acompanhamento do crescimento microbiano no 1°, 2°, 3° e 4° testes com Solo 2 no biorreator P1.

Tempo	Microrganismos Degradadores (NMP/g solo)						
(semanas)	1° Teste S2	2° Teste S2	3° Teste S2	4° Teste S2			
0	2x10 ²	9x10 ⁴	6x10 ⁴	2x10 ²			
1	6x10 ⁴	1x10 ⁵	6x10 ³	2x10 ³			
2	6x10 ⁴	6x10 ³	6x10 ⁴	2,10 ⁵			
3	6x10 ⁴	6x10 ⁵	3x10 ³	3x10 ⁴			
4	7x10 ³	6x10 ³	8x10 ³	1x10 ⁴			
5	9x10 ¹	3x10 ²	6x10 ⁴	3x10 ²			
6	5x10 ¹	1x10 ³	2x10 ⁴	1x10 ⁴			
7	3x10 ²	1x10 ³	8x10 ³	5x10 ⁴			

Ao final dos testes realizados com o Solo 2 no primeiro protótipo de biorreator de bancada pode-se afirmar que a adição da serragem em associação ao uso da uréia como fonte complementar de nitrogênio foram fundamentais para a melhoria do processo de biodegradação do óleo contaminante. Essas condições foram então adotadas nos testes complementares com o Solo 2 nos 3 novos protótipos de bancada, bem como no biorreator piloto.

5.4.3. Confecção de novos protótipos de biorreator em escala de bancada e ensaios de biorremediação com solo 2 nos protótipos com novas pás

Os resultados obtidos para o monitoramento da concentração de HTP (mg/g solo) e OG (%) no início e ao final dos 42 dias de ensaios são apresentados na Tabela 5.6, a seguir, bem como as respectivas taxas de remoção diárias de HTP e remoções percentuais obtidas para esses parâmetros.

Tabela 5.6. Resultados dos ensaios de biorremediação com o Solo 2 nos Protótipos 2, 3 e 4.

Identificação	HTP (mg/g solo)		Remoção	Taxa Remoção	OG	Remoção	
do ensaio	Inicial	Final	HTP (%)	Diária (mg HTP/g solo.dia)	Inicial	Final	OG (%)
1° TESTE S2 P2	32,81	25,13	23,41	0,18	3,15±0,32	2,93±0,17	6,98±0,11
2° TESTE S2 P2	35,94	28,28	21,31	0,17	3,15±0,05	2,54±0,10	19,37±0,08
1° TESTE S2 P3	20,65	18,78	9,06	0,04	2,69±0,07	2,46±0,04	8,58±0,05
2° TESTE S2 P3	48,28*	46,69*	3,29*	0,04	2,73±0,26	2,32±0,07	15,01±0,13
1° TESTE S2 P4	21,76	18,89	13,19	0,07	2,69±0,02	2,40±0,06	10,09±0,04
2° TESTE S2 P4	34,30	27,35	20,26	0,17	3,26±0,17	2,73±0,03	16,26±0,10

^{*} Resultado considerado inconsistente. Possivelmente associado às características intrínsecas da matriz solo/contaminante.

Os resultados de remoção percentual de OG e TPH obtidos nos três protótipos de biorreator (P2, P3 e P4) confirmam que o uso da serragem é, de um modo geral, responsável por aumento significativo na remoção do contaminante orgânico, como anteriormente observado nos ensaios conduzidos no protótipo 1.

No que tange à configuração das pás instaladas, os resultados obtidos apresentaram convergência no emprego de pás que premiam o uso de espaçamento maior entre os dentes (caso do P2), bem como o de uso de dentes mais longos (caso do P4). No entanto, verifica-se que no protótipo 2 as elevadas taxas de remoção diárias de HTP com e sem a adição do material estruturante foram praticamente iguais, indicando assim uma influência significativa da configuração da pá na eficiência do processo, provavelmente como resultado direto da adequada homogeneização do conteúdo do reator. Como conseqüência do bom resultado obtido e deste comportamento peculiar observado no protótipo 2, esta configuração de pá foi selecionada, inicialmente, para instalação no biorreator piloto.

Na Tabela 5.7 são apresentados os resultados obtidos no monitoramento semanal da concentração de microrganismos degradadores de óleo cru realizado durante os ensaios nos Protótipos 2, 3 e 4.

Tabela 5.7. Resultados de quantificação da população microbiana degradadora de óleo cru dos ensaios de biorremediação com o Solo 2 nos Protótipos 2, 3 e 4

Tempo	Microrganismos Degradadores (NMP/g solo)							
(semanas)	1° Teste S2 P2	2° Teste S2 P2	1° Teste S2 P3	2° Teste S2 P3	1° Teste S2 P4	2° Teste S2 P4		
0	1x10 ²	3x10 ²	6x10 ²	3x10 ²	8x10 ²	1x10 ²		
1	1x10 ³	5x10 ²	5x10 ⁴	2x10 ⁴	3x10 ⁴	3x10 ³		
2	3x10 ⁴	7x10 ²	4x10 ³	3x10 ⁵	6x10 ³	2x10 ⁴		
3	8 x10 ³	7x10 ²	1x10 ³	6x10 ⁴	6x10 ³	3x10 ⁴		
4	9x10 ⁴	5x10 ²	NA	6x10 ⁴	NA	6x10 ⁴		
5	1x10 ⁴	7x10 ³	1x10 ⁴	1x10 ⁷	6x10 ⁴	6x10 ⁴		
6	9x10 ⁴	7x10 ³	7x10 ²	6x10 ⁴	2x10 ⁴	5x10 ³		
7	3x10 ³	5x10 ⁴	3x10 ³	2x10 ⁴	5x10 ³	2x10 ⁵		

NA – amostras não analisadas

De uma forma geral houve, para as duas condições testadas em cada um dos três protótipos (P2, P3 e P4), uma tendência ao aumento nas concentrações da população degradadora ao longo das 7 semanas de ensaio. No entanto, nas condições em que ocorreu a adição da serragem (2º Teste S2 P2, 2º Teste S2 P3 e 2º Teste S2 P4) o aumento foi mais significativo que nas demais condições.

5.5. Projeto e Confecção de Biorreator Piloto

Como citado no Capítulo 4 (Materiais e Métodos, subitem 4.5), apesar dessa etapa não estar prevista no cronograma inicial do projeto de tese, a mesma foi incluída por fazer parte do escopo do projeto existente entre a EQ/UFRJ, o CETEM/MCT e a Petrobras, e se constitui basicamente da aplicação, em escala ampliada, de todo o conhecimento gerado ao longo do trabalho de tese.

Na Figura 5.34, a seguir, é apresentado o biorreator piloto construído pela Albrecht Equipamentos Industriais Ltda a partir do projeto conceitual elaborado pelo CETEM. Esse reator, com volume útil de 876 litros, foi instalado na usina piloto do CETEM onde foram realizados os primeiros testes operacionais do mesmo (etapa de pré-operação).



Figura 5.34. Biorreator Piloto

A configuração de pá instalada no biorreator piloto foi selecionada em função dos melhores resultados obtidos no item 5.4.3 e contemplou a pá instalada no protótipo de biorreator de bancada P2.

A etapa de pré-operação do equipamento visou o ajuste e adequação de condições operacionais e verificação de funcionamento dos itens, que compõem a unidade (biorreator e periféricos).

As atividades realizadas durante a etapa de pré-operação foram:

⇒ Realização de bateria de testes com areia lavada comercial:

Esses testes tiveram como principal objetivo a melhor compreensão dos mecanismos de funcionamento do sistema, incluindo o biorreator e todo o sistema supervisório (programação, controles, *set-points*). Inicialmente o biorreator foi alimentado com 300 kg de areia lavada (221 litros), representando cerca de 37 % de ocupação da parte cilíndrica do reator. A essa quantidade de areia foram adicionados 15 litros de água, de forma que fosse mantida, aproximadamente, a proporcionalidade equivalente a 50% da capacidade de retenção de água da areia (11% de umidade), previamente determinada em laboratório. Como a ocupação inicialmente obtida (37%) se mostrou baixa em termos de volume ocupado pelo solo, bem como de pouca representatividade

na reprodução da movimentação típica do material no reator, a carga foi elevada para aproximadamente 50% (310 litros), totalizando 422 kg de material (areia e água).

⇒ Realização de bateria de testes com solo 2 não contaminado:

Esses testes tiveram como principal objetivo verificar a eficácia do sistema de homogeneização com solo a ser empregado na continuidade do projeto na unidade de demonstração. Para isso, o biorreator foi alimentado com 395 kg de solo 2 não contaminado (313 litros), seco a temperatura ambiente por uma semana, representando 52% de ocupação da parte cilíndrica do reator.

Após a comprovação da operacionalidade do biorreator piloto, dois testes foram realizados, sendo os mesmo monitorados através da quantificação de concentração de HTP e OG, bem como através da determinação da densidade microbiana existente durante o processo de tratamento do Solo 2.

5.6. Experimentos em Biorreator Piloto

Na Tabela 5.8, a seguir, são apresentados os resultados das análises de óleos e graxas e HTP realizadas nas amostras iniciais e finais (após 7 semanas) dos dois testes realizados no biorreator piloto. Destaca-se que o 2º teste foi prolongado por mais 7 semanas (totalizando 14 semanas) tendo em vista os resultados parciais promissores obtidos após as primeiras 7 semanas e tendo como principal objetivo verificar a eficácia do processo por maior período.

Tabela 5.8. Resultados dos ensaios de biorremediação com o solo 2 no biorreator piloto

	1°	Teste	2°	Teste
	OG (%)	HTP (mg/g solo)	OG (%)	HTP (mg/g solo)
Inicial (t=0)	4,06±0,03	45,06	2,53±0,10	36,91
t=7 semanas	2,55±0,01	37,97	1,93±0,08	23,94
Remoção (%)	37,19±0,02	15,73	23,72±0,09	35,14
Taxa Remoção Diária (mg HTP/g solo.dia) primeiras 7 semanas		0,14		0,26
t= 14 semanas	NA	NA	2,29±0,03	18,29
Remoção (%)	ND	ND	9,49±0,05	50,45
Taxa Remoção Diária (mg HTP/g solo.dia) período 14 semanas		ND		0,19*

^{*} nas últimas 7 semanas de teste a taxa de remoção diária foi de 0,12 mg HTP/g solo. dia.

Verifica-se que as percentagens de remoção de HTP ficaram em torno de 15% em 7 semanas para o 1° teste (bioestímulo), enquanto que para o 2° teste (bioestímulo e serragem) essa remoção foi elevada para em 35% após 7 semanas, representando um aumento de cerca de 2,3 vezes na eficiência do processo após a adição do material estruturante. Após 14 semanas de ensaio, o 2° teste apresentou uma remoção de 51% da concentração inicial de HTP presente no solo 2, indicando a possibilidade de resultados ainda melhores caso o tempo de processo seja prolongado e não represente aumento significativo no custo de tratamento.

Os resultados das taxas diárias de remoção de HTP reproduziram o comportamento observado nos biorreatores de bancada P1, P2 e P4. A adição da serragem praticamente dobrou a taxa obtida apenas com a adição da uréia (de 0,14 para 0,26 após 7 semanas), indicando o efeito positivo na aceleração do processo de biorremediação do solo 2. Da 7ª até a 14ª semana de ensaio, a taxa de remoção diária caiu para 0,19 mg HTP/g solo. dia, provavelmente devido a redução da biodisponibilidade do óleo como resultado do processo de biodegradação acelerado nas primeiras 7 semanas. Resultado semelhante ao obtido por Seabra *et al.* (2006) no tratamento de solo contaminado com óleo cru em biopilhas, onde os autores verificaram que uma maior degradação de HTP ocorreu nas primeiras 8 semanas (56 dias) de tratamento (0,28 a 0,36 mg HTP/g solo.dia) sendo a mesma reduzida gradativamente até o final das 16 semanas (112 dias) de ensaio (0,05 a 0,16 mg HTP/g solo.dia).

Adicionalmente, verifica-se que a ampliação de escala do biorreator resultou ainda no aumento de cerca de duas vezes no valor da taxa após a adição do estruturante. Na escala de bancada o valor máximo obtido foi de 0,18 mg HTP/g solo.dia (1° TESTE S2 P2) enquanto que no biorreator piloto, para essa mesma condição, o valor chegou a 0,26 mg HTP/g solo.dia.

A análise dos resultados de OG apresentados na Tabela 5.8, por outro lado, não conduziu a conclusões consistentes quanto à eficiência do processo após a adição da serragem, uma vez que o resultado obtido sem este aditivo (37,19% de remoção) foi maior do que com o mesmo (23,72% de remoção).

Na Figura 5.35 são apresentados os cromatogramas relativos as amostra inicial e final do 1º teste no biorreator piloto, sendo possível evidenciar uma acentuada redução na concentração de HTP, por meio da diminuição da abundância relativa da maioria dos

picos característicos dos n-alcanos inicialmente presentes na amostra contaminada, bem como da fração não resolvida (UCM).

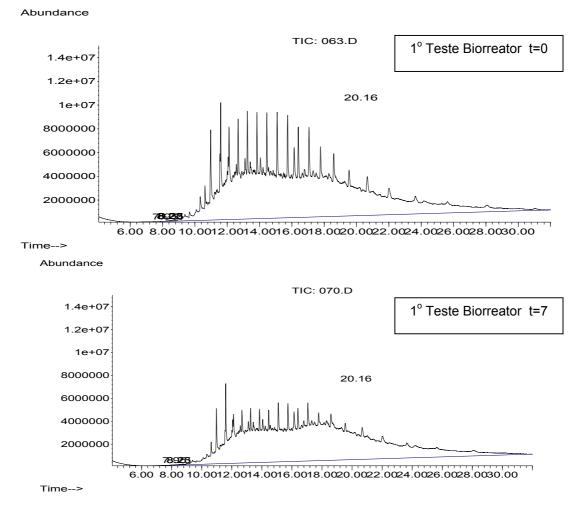


Figura 5.35. Cromatogramas das amostras inicial (a) e final (7 semanas) do 1° teste com Solo 2 no biorreator piloto.

Na Figura 5.36, são apresentados os cromatogramas das amostras inicial, após 7 semanas e final (após 14 semanas) do 2º teste no biorreator piloto. Na avaliação desses cromatogramas também é perceptível a redução tanto dos picos característicos dos nalcanos quanto da fração não resolvida (UCM), principalmente no cromatograma correspondente à amostra final.

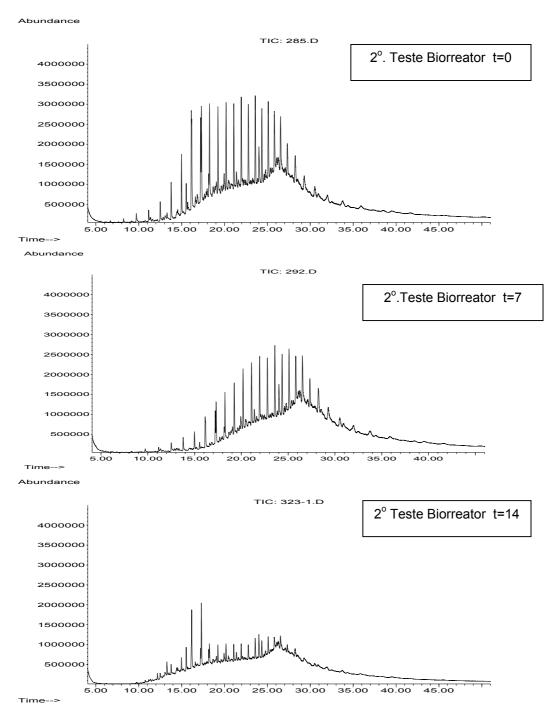


Figura 5.36. Cromatogramas das amostras inicial (a), intermediária (7 semanas) e final (14 semanas) do 2° teste com Solo 2 no biorreator piloto.

Na Tabela 5.9, são apresentados os resultados do monitoramento da população microbiana degradadora ao longo dos dois testes.

Tabela 5.9. Monitoramento da população microbiana degradadora durante os testes no bioreator piloto

Tempo	Degradadores (NMP/g solo)				
(semanas)	1º Teste	2º Teste			
0	<1x10 ²	1x10 ¹			
1	<1x10 ²	4x10 ²			
2	1x10 ²	3x10 ²			
3	1x10 ²	5x10 ²			
4	1x10 ¹	5x10 ³			
5	2x10 ²	8x10 ⁴			
6	3x10 ²	6x10 ⁴			
7	5x10 ²	5x10 ²			
8	NA	5x10 ⁶			
9	NA	1x10 ⁵			
10	NA	8x10 ³			
11	NA	1x10 ⁴			
12	NA	6x10 ⁴			
13	NA	3x10 ⁴			
14	NA	8x10 ⁴			

O processo de adaptação lenta e gradual da população microbiana ao óleo pode ser evidenciado através dos resultados obtidos durante o monitoramento semanal do conteúdo do biorreator para as duas condições testadas. No entanto, observa-se que no 2º teste, no qual além do bioestímulo houve a adição da serragem, o crescimento da população degradadora foi mais acentuado, reforçando o efeito benéfico da adição do material estruturante e justificando assim a maior redução da concentração do contaminante, anteriormente discutida.

Pode-se afirmar que o bom resultado obtido nesses primeiros ensaios no biorreator piloto é um indicativo da viabilidade técnica da aplicação do sistema proposto para o tratamento de solos tropicais contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. Essa afirmação é fortalecida quando se compara as taxas médias de degradação mensais, obtidas para o solo estudado, durante um processo de atenuação natural, nos testes nos biorreatores de bancada (bioestímulo com uréia e/ou adição de serragem) e nos testes na unidade piloto (Tabela 5.10).

Tabela 5.10. Comparação dos resultados de eficiência mensal de degradação de HTP.

Condição Testada	Eficiência de Degradação de HTP Média/Mês		
Atenuação Natural	4 %		
3° Teste S2 P1 (bioestímulo)	8%		
4° Teste S2 P1 (bioestímulo + serragem)	11%		
1° Teste S2 P2 (bioestímulo)	13%		
2° Teste S2 P2 (bioestímulo + serragem)	12%		
1° Teste S2 P3 (bioestímulo)	7%		
2° Teste S2 P3 (bioestímulo + serragem)	2%*		
1° Teste S2 P4 (bioestímulo)	8%		
2° Teste S2 P4 (bioestímulo + serragem)	12%		
1º Teste Unidade Demonstração (bioestímulo)	9%		
2º Teste Unidade Demonstração (bioestímulo + serragem)	20%		

^{*} Resultado considerado inconsistente

O resumo dos principais resultados obtidos apresentado na Tabela 5.10 torna clara a observação do efeito da adição do material estruturante em associação ao bioestímulo da microbiota nativa pela adição da uréia e do impacto positivo da ampliação da escala do biorreator para o aumento da eficiência do processo de biorremediação do Solo 2.

5.7. Ensaios Complementares

5.7.1. Ensaios ecotoxicológicos

O ensaio com *Vibrio fischeri* não indicou toxicidade para as amostras finais do 1° e 2° testes com Solo 1 (CE50 90% e 54,9%, respectivamente), porém indicou toxicidade para a amostra final do 2° teste com Solo 2 (CE₅₀ 13,8%). Esse resultado pode, provavelmente, estar associado ao fato de o Solo 2 representar uma contaminação recente (simulada) e que, mesmo após o tratamento, há a permanência de frações mais tóxicas dos hidrocarbonetos de petróleo. Já no Solo 1, a fração residual intemperizada possivelmente apresenta menor toxicidade para a bactéria marinha.

Ressalta-se que, apesar de freqüentemente indicado pelos órgãos de controle ambiental como parâmetro de monitoramento da qualidade de solo, o ensaio com *Vibrio fischeri* não parece ser o mais indicado para esse fim, tendo em vista que o organismo utilizado é de origem marinha e não terrestre.

Os resultados para o ensaio de fuga das amostras relativas ao 1° e 2° testes com Solo 1 e 2° teste com Solo 2 foram, respectivamente, 52%, 50% e 29%. Esses resultados não indicaram toxicidade, uma vez que o critério para uma amostra ser considerada tóxica é que mais de 80% do total de organismos esteja no solo-controle ao final do ensaio.

Esses resultados sugerem que, além da importância da inclusão dos ensaios ecotoxicológicos para complementação da avaliação de processos de biorremediação, devem ser realizados pelo menos dois ensaios com organismos diferentes para uma melhor consideração sobre a avaliação ecotoxicológica das amostras.

5.7.2. Avaliação da diversidade microbiana

Os experimentos conduzidos nesta etapa tiveram como objetivo avaliar a estrutura da comunidade microbiana dominante no Solo 2 antes (Solo Virgem) e após a contaminação por óleo cru (Solo Contaminado Inicial) e também ao final dos quatro diferentes testes conduzidos no primeiro protótipo de biorreator de bancada, identificado como P1, e nos dois testes realizados no biorreator piloto.

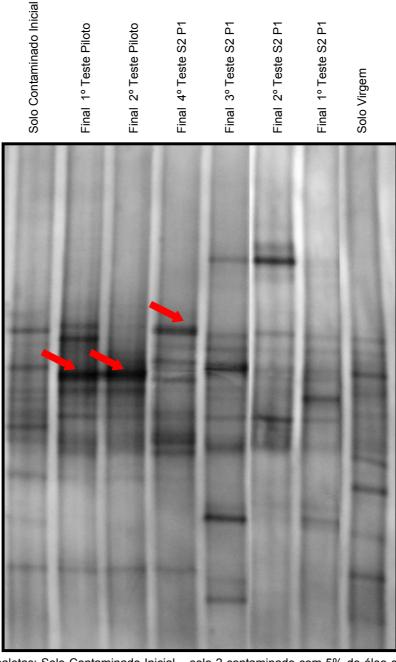
A avaliação da estrutura da comunidade bacteriana dominante, após as diferentes condições de tratamento em biorreator (bancada e piloto) fornece informações complementares sobre a aplicabilidade do tratamento biológico adotado.

Com os produtos obtidos após as etapas de extração do DNA das amostras selecionadas e amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando um par de iniciadores Universais (rDNA 16S), foi feita uma Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturantes (DGGE) para verificar o perfil de bandas obtido, construir a matriz de presença e ausência e compará-las através da análise de agrupamento. Esta análise é uma técnica exploratória cuja aplicação tem por objetivo a formação de grupos homogêneos de objetos ou variáveis (CUNHA, 2004).

Foi realizada também a análise dos componentes principais que relaciona o entendimento da estrutura da matriz de covariância (correlação) das variáveis estudadas. Os principais objetivos são a interpretação e a redução da dimensionalidade dos casos, mostrando através dos gráficos obtidos a correlação entre as amostras (CUNHA, 2004).

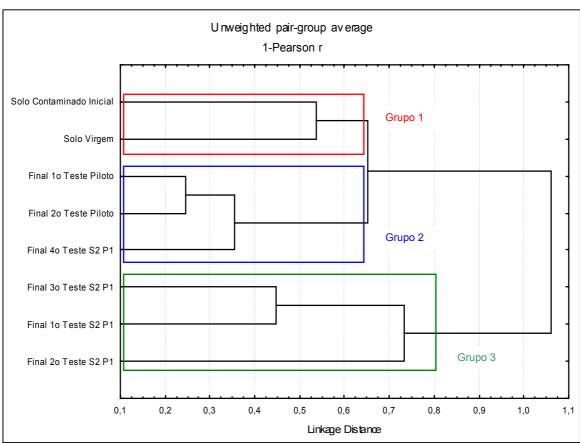
O perfil de bandas do gel de DGGE obtido com os produtos de PCR para cada amostra avaliada está apresentado na Figura 5.37. Foi possível verificar uma variação no perfil de bandas para todas as amostras testadas.

Esta variação no perfil da comunidade das amostras de Solo 2 pode ser melhor entendida através do dendrograma apresentado na Figura 5.38. Este foi construído a partir da matriz gerada pelo sistema de análise de imagem, considerando o método do UPGA (*Unweighted pair-group average*) para a formação dos grupos e o coeficiente de correlação de Pearson, considerado por Boon *et al.* (2002) como o mais adequado nos cálculos de similaridade.



Legenda das canaletas: Solo Contaminado Inicial – solo 2 contaminado com 5% de óleo cru referente ao T0 de todos os testes; Solo Virgem – solo 2 sem contaminação; Final 1º Teste S2 P1 – amostra final 1º teste com solo 2 no biorreator de bancada P1 e bioestímulo com nitrato de sódio; Final 2º Teste S2 P1 – amostra final 2º teste com solo 2 no biorreator de bancada P1 e bioestímulo com nitrato de sódio e adição de serragem; Final 3º Teste S2 P1 – amostra final 3º teste com solo 2 no biorreator de bancada P1 e bioestímulo uréia; Final 4º Teste S2 P1 – amostra final 4º teste com solo 2 no biorreator de bancada P1 e bioestímulo com uréia e adição de serragem; Final 1º teste Piloto – amostra final do 1º teste com solo 2 no biorreator piloto e bioestímulo uréia; Final 2º teste Piloto - amostra final 2º teste com solo 2 no biorreator piloto e bioestímulo com uréia e adição de serragem.

Figura 5.37. Gel de DGGE-16S para as diferentes amostras avaliadas.



Legenda: Solo Contaminado Inicial – solo 2 contaminado com 5% de óleo cru referente ao T0 de todos os testes; Solo Virgem – solo 2 sem contaminação; Final 1º Teste S2 P1 – amostra final 1º teste com solo 2 no biorreator de bancada P1 e bioestímulo com nitrato de sódio; Final 2º Teste S2 P1 – amostra final 2º teste com solo 2 no biorreator de bancada P1 e bioestímulo com nitrato de sódio e adição de serragem; Final 3º Teste S2 P1 – amostra final 3º teste com solo 2 no biorreator de bancada P1 e bioestímulo uréia; Final 4º Teste S2 P1 – amostra final 4º teste com solo 2 no biorreator de bancada P1 e bioestímulo com uréia e adição de serragem; Final 1º teste Piloto – amostra final do 1º teste com solo 2 no biorreator piloto e bioestímulo uréia; Final 2º teste Piloto - amostra final 2º teste com solo 2 no biorreator piloto e bioestímulo com uréia e adição de serragem.

Figura 5.38. Dendograma obtido para o gel de DGGE-16S com as amostras avaliadas.

De acordo com o dendrograma obtido para a matriz construída a partir do gel de DGGE-16S (Figura 5.38), é possível observar a formação de 3 grupos distintos. O primeiro (Grupo 1) formado pelo Solo Virgem e o Solo Contaminado Inicial, este último aproximando-se do primeiro provavelmente pelo fato de em se tratando de contaminação recente simulada não ter havido tempo de ocorrer impacto significativo na população microbiana original do Solo Virgem. As amostras finais dos testes conduzidos no biorreator piloto, bem como a amostra final do 4º Teste no protótipo de biorreator P1, formam o Grupo 2, apresentando, no entanto, uma significativa alteração na comunidade microbiana em relação ao Solo Virgem (Grupo 1). Destaca-se que as amostras finais citadas representam condições em que a uréia foi utilizada como fonte de nitrogênio, sendo um indicativo de que o uso da mesma causou uma alteração na comunidade

microbiana menor que os tratamentos utilizando nitrato (amostras finais do 1º e 2º testes no protótipo de biorreator P1, Grupo 3), em relação à comunidade presente inicialmente no solo virgem e no solo contaminado inicial. Apesar da amostra final do 3º teste no protótipo de biorreator P1 ter tido a incorporação da uréia como fonte de nitrogênio, a mesma foi também agrupada no grupo 3.

Verifica-se, a partir da análise do dendograma, que o grupo 2 foi formado pelas condições em que ocorreram as maiores remoções percentuais de HTP's (35,14% Final 2º Teste Piloto; 15,73% Final 1º Teste Piloto e 19,58% Final 4º Teste S2 P1). No terceiro grupos as condições agrupadas apresentaram remoções percentuais de HTP's inferiores a 14% (12,48% final 1º Teste S2 P1 e 12,98% Final 2º Teste S2 P1; 13,86% Final 3º Teste S2 P1).

Macnaughton et al. apud Cunha (2004) avaliaram através da análise de rDNA16S PCR/DGGE a comunidade bacteriana de um solo contaminado com óleo cru e após a aplicação de diferentes técnicas de Biorremediação. Eles verificaram que houve uma variação na estrutura e diversidade da comunidade microbiana dominante, que mudou substancialmente após a contaminação e após os tratamentos propostos, não havendo grandes diferenças entre estes últimos.

Cunha (2004) utilizou técnicas de biologia molecular para avaliar o impacto da contaminação por diferentes concentrações de gasolina com etanol em um solo de Vargem Grande (Rio de Janeiro Brasil) e dos tratamentos implementados (bioestímulo ou bioaumento) sobre a comunidade microbiana. O *fingerprinting* molecular realizado através da técnica de PCR-16S associada à técnica de DGGE mostrou que no tempo de 240 h a alteração observada na estrutura da comunidade para estes tratamentos, envolvendo a menor concentração de gasolina, foi menor do que o que a própria atenuação natural proporcionou. Segundo o autor, estes resultados reforçam a tendência atual de que o uso da biorremediação representa um excelente potencial para tratamentos de sítios contaminados com hidrocarbonetos.

Foi possível verificar para as diversas amostras de solo tratado avaliadas o aumento da intensidade de algumas bandas inicialmente presentes tanto no Solo Virgem, como no Solo Contaminado Inicial, como mostram as setas da Figura 5.37, podendo representar o enriquecimento de populações bacterianas degradadoras. Este aumento de intensidade também foi verificado por Cunha (2004) que relacionou o mesmo à

especialização da comunidade bacteriana dominante à presença do contaminante orgânico.

Os resultados obtidos nesta etapa indicam que a análise da estrutura da comunidade bacteriana dominante pode ser utilizada como uma ferramenta complementar de avaliação do impacto do tratamento biológico aplicado a solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo.

5.7.3. Avaliação da biodisponibilidade do óleo contaminante no solo 1

Na Figura 5.39, a seguir, são apresentadas as curvas representativas do acúmulo de CO_2 durante o período de condução dos experimentos em meio líquido, para cada uma das condições testadas.

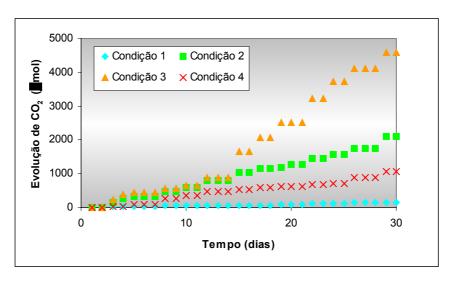


Figura 5.39. Evolução de CO₂ dos experimentos em meio líquido. (condição 1- meio inorgânico +extrato orgânico; condição 2 – meio inorgânico + extrato orgânico + SEM; condição 3 - meio inorgânico + extrato orgânico + SEM + HDC; condição 4 - meio inorgânico + extrato orgânico + HDC)

Pode-se observar que durante os primeiros 15 dias de ensaio as curvas relativas às condições 2, 3 e 4 apresentaram comportamento semelhante, indicando um período de adaptação para os dois tipos de inóculo empregados: microrganismos nativos extraídos do próprio Solo 1 (SEM) e consórcio degradador de hidrocarbonetos (HDC) previamente isolado e identificado.

Após 15 dias as condições 2 e 3 passaram a apresentar maior desprendimento de CO₂ que a condição 4. Esse comportamento está provavelmente associado ao período de adaptação prévia pelo qual a microbiota nativa do Solo 1 foi submetida desde o evento

que originou a contaminação deste solo, além da forte interação existente entre as diferentes espécies microbianas nativas presentes no mesmo.

Esse comportamento pode ser confirmado analisando-se a Figura 5.40, onde são apresentados os valores de percentual de biodegradação (PB) obtidos após 30 dias de ensaio.

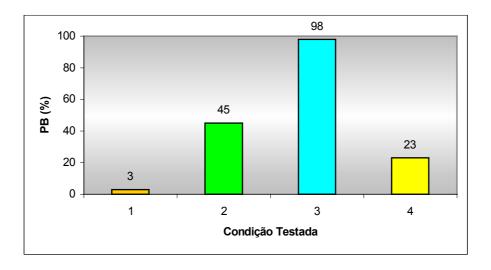


Figura 5.40. Percentuais de biodegradação (PB) obtidos nos ensaios em meio líquido.

Com o valor do número de µmoles de CO₂ acumuldado ao final do experimento, para cada uma das condições testadas e baseando-se na estimativa de incorporação do contaminante à biomassa (aproximadamente 50% em processos aeróbios), o percentual de biodegradação (PB) foi calculado da seguinte forma:

Massa de carbono biodegrada = $2 \times massa$ de carbono proveniente do CO_2 gerado PB (%) = (Massa de carbono biodegradada) $\times 100$ /Massa de carbono orgânico total do solo

Verifica-se que o inóculo constituído de microrganismos nativos (SEM) foi capaz de biodegradar, em meio líquido, 45% do contaminante (condição 2), enquanto que com a adição apenas do inóculo degradador (HDC) (condição 4) esse percentual não passou de 23%. Quando o inóculo HDC foi incorporado ao meio líquido juntamente com o inóculo SEM (condição 3) o percentual de biodegradação do óleo chegou a 98%. Esse resultado indica que o efeito sinérgico obtido pela adição do consórcio degradador foi de extrema importância para a maximização da degradação do óleo.

Na Figura 5.41 são apresentadas as curvas representativas de CO₂ gerado durante o período de condução dos experimentos em microcosmos (meio sólido) para as duas condições testadas.

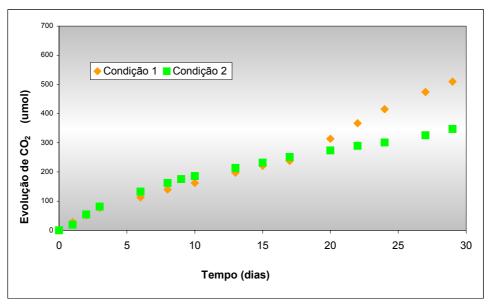


Figura 5.41. Evolução de CO₂ dos experimentos em meio sólido (microcosmos). (condição 1 – solo bioestimulado + HDC; condição 2 – solo bioestimulado).

Os percentuais de biodegradação (PB), obtidos a partir do valor acumulado de CO_2 , para o sistema bioestimulado contendo microrganismos nativos (Condição 2) e para o sistema onde ocorreu o biaumento (Condição 1) com o inóculo HDC (*Rhodotorula glutinis* e *Nocardia nova*) foram 8 e 13%, respectivamente. Comparando-se os resultados obtidos para condições equivalentes no meio líquido e no solo (condição 2 no meio líquido com condição 2 no microcosmo; condição 3 em meio líquido com condição 1 no microcosmo) verifica-se um aumento significativo dos PB's como conseqüência da maior biodisponibilidade do óleo em meio líquido. Em meio líquido o PB foi aumentado em 6 vezes quando apenas a população nativa estava presente (8% no solo e 45% no meio líquido). De forma semelhante, quando essa população foi acrescida do inóculo HDC, o PB foi aumentado em 7,5 vezes (13% no solo e 98% no meio líquido).

Os resultados acima apresentados indicam que os reduzidos percentuais de biodegradação do óleo no Solo 1, até então obtidos, podem estar associados à forte interação existente entre o contaminante e a matriz do solo, reduzindo assim a biodisponibilidade deste. Desta forma, a reduzida biodegradação do óleo não deve estar relacionada apenas com a recalcitrância deste, como suposto inicialmente.

Sabe-se que o processo de intemperização contribui para maior adesão dos constituintes orgânicos do contaminante à matriz do solo reduzindo assim a sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, sua biodegradação. A extensão da redução da biodisponibilidade durante o processo de intemperização está diretamente associada a concentração do contaminante, as condições as quais o solo é submetido e às características do mesmo. A adesão é maior em concentrações menores de contaminante; a ocorrência de ciclos de secagem e umidificação da amostra aumentam a extensão da adesão; tanto a taxa quanto a extensão da adesão variam significativamente com o tipo de solo (CUYPERS, 2001), sendo maiores em solos arenosos do que em solos argilosos.

A realização de testes preliminares visando a estimativa da fração efetivamente biodisponível do contaminante pode vir a representar uma ferramenta útil para determinação do nível máximo de biodegradação a ser atingido antes do desenvolvimento propriamente dito de um projeto de biorremediação de solos contaminados.

Loehr et al. (2001) mostraram que um solo contaminado com óleo cru intemperizado não estava apto a ser submetido a um processo de biorremediação em fase sólida uma vez que, apesar de uma concentração substancial do contaminante ainda permanecer no solo, os hidrocarbonetos residuais eram altamente recalcitrantes e fortemente aderidos a matriz sólida.

Diferentes tecnologias ou estratégias podem ser aplicadas para aumentar a biodisponibilidade do óleo no solo sejam por meios físicos (moagem ou mistura enérgica) ou meios químicos (adição de surfatantes, co-solventes ou de agentes quelantes). Em ambos os casos, a meta principal é aumentar transferência de massa da fase aderida, aumentando assim a solubilidade de óleo residual (EHLERS e LUTHY, 2003).

É importante ressaltar que o conceito de biodisponibilidade apenas recentemente chamou a atenção dos setores industrial e ambiental como sendo um fator importante a ser considerado na decisão de como tratar um determinado solo contaminado (biológica ou quimicamente) e do estabelecimento dos padrões de qualidade pós tratamento a serem atingidos. No último caso, torna-se racional que se um contaminante está presente no solo em uma forma não biodisponível, maior concentração deste pode ser "deixada" no solo sem que signifique um risco adicional. Assim, torna-se possível economizar

tempo e dinheiro com um estudo preliminar de determinação de biodisponibilidade. (EHLERS e LUTHY, 2003).

Neste contexto, esse ensaio complementar ao trabalho de tese forneceu uma contribuição inicial para o estabelecimento de um procedimento preliminar de identificação do principal fator (recalcitrância do hidrocarboneto ou biodisponibilidade reduzida) que limita a biodegradação de um solo contaminado com óleo cru (Solo1) intemperizado.

5.7.4. Simulação do processo de atenuação natural do solo 2

A quantificação de óleos e graxas (OG) durante o experimento de simulação do processo de atenuação natural monitorada (ANM) permitiu uma avaliação preliminar da degradação do óleo cru para ambos os teores de contaminação simulados (5 e 10%) (Figura 5.42).

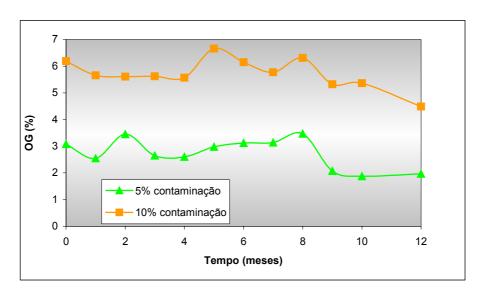


Figura 5.42. Concentração de óleos e graxas durante o experimento de atenuação natural monitorada (ANM).

Observa-se que, durante os oito primeiros meses de ensaio, a queda da concentração de OG, para ambas as condições, ocorreu lentamente, provavelmente devido à adaptação gradual da microbiota nativa à presença do contaminante. É possível, também, que nesse período a biodegradação tenha ocorrido em associação com outros processos físicos ou químicos, como por exemplo, sorção e volatilização. Após 8 meses, especialmente para a condição com 5% de contaminação, pode ser verificada uma redução acentuada do teor de OG. Para ao solo contaminado com 10% de óleo verificase uma tendência a uma maior redução da concentração de OG caso o tempo de ensaio

fosse prolongado um pouco mais. No entanto, ao final de 12 meses obteve-se uma redução de 36% do teor de OG para a condição com 5% de contaminação e de 28% no solo contaminado com 10% de óleo. Esse resultado indica uma degradação mais intensa na condição com menor nível de contaminação orgânica.

Na Tabela 5.11 são apresentados os resultados de remoção de HTP ao longo do período de realização do teste.

Tabela 5.11. Resultados de HTP no início (t = 0), no meio (t= 6 meses) e ao final do processo de atenuação natural (t= 12 meses)

	Solo	contamina	do 5%	Solo contaminado10%		
Parâmetro	t = 0	t = 6 meses	t = 12 meses	t = 0	t = 6 meses	t = 12 meses
HTP (mg/ g solo)	37,36	29,80	14,22	37,47 ^a	36,44	22,84
Remoção HTP (%)	-	20,24	61,94	-	2,75	39,04
Taxa remoção	-	0,04	0,09 ^b	-	0,01	0,08 ^b
diária (mg HTP/g solo. dia)			0,06°			0,04 ^c

^a Valor inconsistente associado à limitação da metodologia analítica empregada.

A condição com 5% de contaminação foi a que apresentou maior redução percentual do teor de HTP após 6 meses (20,24%) alcançando 61,94% de remoção ao final de 12 meses. Já o ensaio empregando solo contaminado com 10% de óleo alcançou apenas 2,75% de redução de HTP após 6 meses, podendo a mesma ser associada ao valor de HTP inicialmente obtido ou também a uma reduzida atividade biológica durante este período. No entanto, ao final do teste uma redução de 39,04% de HTP foi obtida.

As taxas de remoção do contaminante, expressas como mg HTP/g solo.dia, para cada período de 6 meses, são também apresentadas na Tabela 5.11.

A degradação dos HTP é significativamente maior nos últimos 6 meses de ensaios para ambos os teores de contaminação, provavelmente devido a efetiva adaptação da microbiota nativa a presença do contaminante. Esse comportamento difere do observado por Seabra *et al.* (2006) em biopilhas utilizadas para o tratamento de um solo contaminado semelhante ao solo 2. Nesse estudo os autores verificaram que uma maior degradação de HTP ocorreu nas primeiras 8 semanas (56 dias) de tratamento

^b Valor correspondente ao período de 6 a 12 meses de teste

^c Valor correspondente ao período total de teste (de 0 a 12 meses)

(0,28 a 0,36 mg HTP/g solo.dia) sendo a mesma reduzida gradativamente até o final das 16 semanas (112 dias) de ensaio (0,05 a 0,16 mg HTP/g solo.dia) provavelmente devido a redução da biodisponibilidade do óleo como resultado do processo de biodegradação. A diferença observada no processo de ATN e na biopilha pode ser atribuída, nesse caso, aos diferentes tempos de resposta esperados para cada uma das tecnologias aplicadas.

Ainda da análise da Tabela 5.11 é possível verificar que uma degradação mais intensa na condição com menor teor de contaminação (5%). No documento intitulado "How to evaluate alternative cleanup technologies for underground storage tank sites: A guide for corrective action plan reviewers" (United States Environmental Protect Agency, 2004), a agência de proteção ambiental americana afirma que processos de biorremediação como atenuação natural, biopilhas, landfarming e biorreatores tendem a não serem efetivos para concentrações elevadas de contaminantes (> 5% de HTP). Já Del'Árco e de França (2001) afirmam que 4% de HTP pode ser considerado como um valor acima do qual a biodegradação do óleo ocorre muito lentamente.

Os cromatogramas obtidos durante a análise de HTP nas amostras de solo contaminado ao longo do desenvolvimento dos experimentos (Figuras 5.43 e 5.44) demonstram que apenas os compostos orgânicos de maior peso molecular permanecem no solo ao final dos 12 meses de ensaio. Nos primeiros 6 meses, o cromatograma da amostra de solo contaminado com 5% de óleo (Figura 5.43) apresenta picos mais degradados do que a amostra de solo contaminado com 10% de óleo (Figura 5.44), indicando assim uma maior redução da contaminação. Sarkar *et al.* (2005) obtiveram resultados semelhantes com um solo contaminado com óleo diesel e concluíram que a fração mais pesada do diesel foi reduzida em taxas menores do que as verificadas para as frações mais leves, permanecendo as primeiras por um maior período de tempo no solo.

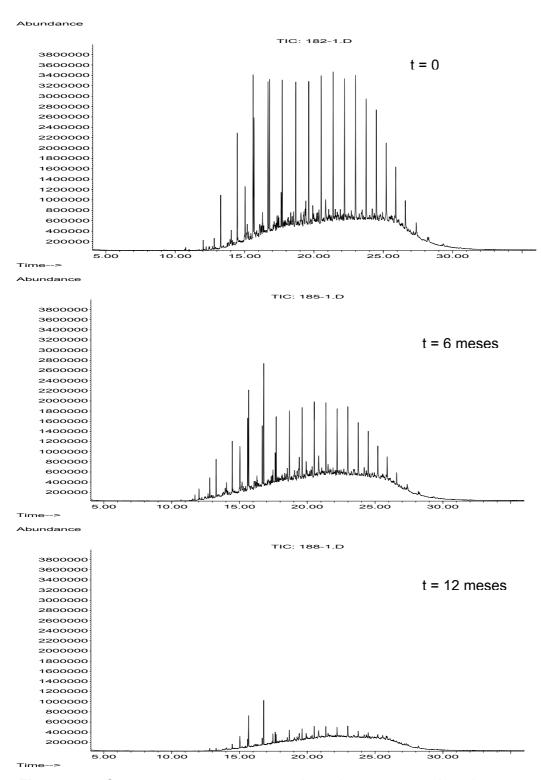


Figura 5.43. Cromatogramas representativos das amostras de solo contendo 5% de óleo retiradas do experimento de ANM nos tempos de 0, 6 e 12 meses.

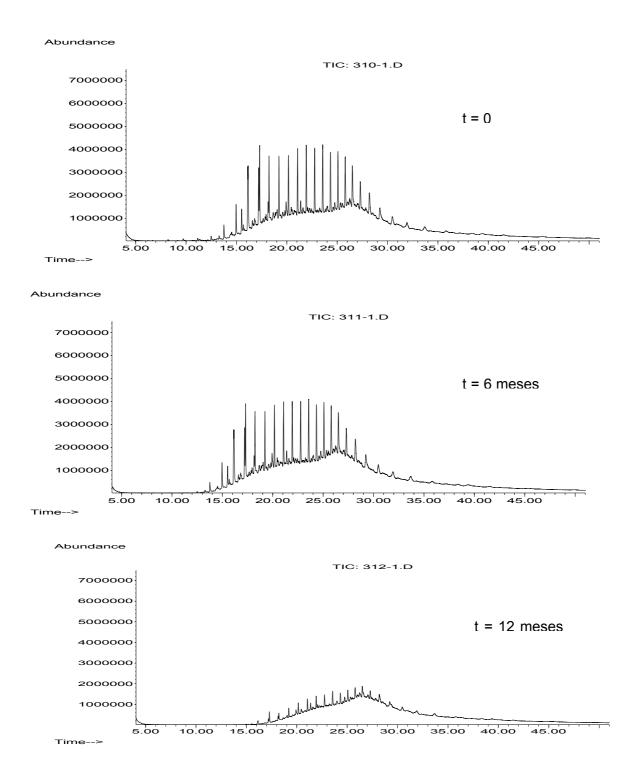


Figura 5.44. Cromatogramas representativos das amostras de solo contendo 10% de óleo retiradas do experimento de ANM nos tempos de 0, 6 e 12 meses.

A elevada redução da concentração de HTP após um ano de experimento, para ambos os teores de contaminação simulados, demonstram que os microrganismos nativos são capazes de biodegradar de forma satisfatória o óleo contaminante. Apesar de uma parte desta redução estar possivelmente associada à volatilização de alguns dos compostos orgânicos constituintes do óleo, as perdas abióticas associadas a óleos pesados não costumam exceder 20% (ATLAS, 1975; FRANCO *et al.*, 2004). Além disso, não foi verificado durante o experimento solubilização e/ou dispersão do óleo.

A atividade microbiana durante os experimentos de ANM foi monitorada indiretamente através da quantificação da população heterotrófica total e degradadora de óleo cru, cujos resultados são apresentados na Figura 5.45.

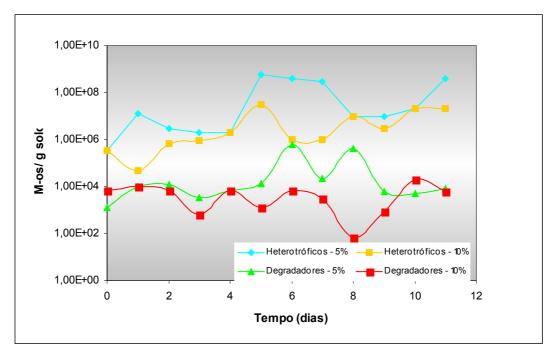


Figura 5.45. Acompanhamento da densidade microbiana ao longo dos experimentos de ANM.

A quantificação da população heterotrófica total indica uma oscilação com o tempo, para ambos os teores de contaminação simulados, e pode ser associada tanto à adaptação da população nativa à presença do óleo contaminante quanto à oscilação natural resultante das alterações climáticas (calor, frio, seca, chuva) às quais os solos foram submetidos. No início do experimento de ANM a concentração de microrganismos heterotróficos era de 3,35x10⁵ e 3,55x10⁵ UFC/g solo para 5 e 10% de contaminação, respectivamente. Após 4 meses, a população heterotrófica atingiu os valores máximos de 6,00x10⁸ UFC/g solo para 5% e de 3,00x10⁷ UFC/g solo para 10% de contaminação. Em

seguida, pode-se observar uma oscilação entre 10⁷ e 10⁸ UFC/g solo para o solo contaminado com 5% de óleo, sendo reduzida para 10⁶ UFC/g solo ao final do experimento provavelmente devido à limitação da fonte de carbono (baixa concentração e/ biodisponibilidade). Comportamento similar foi observado para o solo contaminado com 10% de óleo. No entanto, a oscilação da densidade microbiana variou entre 10⁶ a 10⁷ UFC/g solo após os 4 primeiros meses até o final do experimento.

A população microbiana degradadora de óleo variou entre 10² a 10⁵ NMP/g solo em ambas as condições durante todo o experimento (12 meses). Para o solo contaminado com 5% de óleo, foi possível observar um crescimento significativo da população degradadora após 4 meses, atingindo valores entre 10⁴ e 10⁵ NMP/g solo. No entanto, após 8 meses de monitoramento e até o final do experimento, a concentração microbiana tornou a cair atingindo valores entre 10² a 10³ NMP/g solo, provavelmente devido à limitação da fonte de carbono, como citado anteriormente para a população heterotrófica.

Para o solo contaminado com 10% de óleo foi observado um crescimento significativo apenas após 9 meses de ensaio, quando então a população degradadora aumento de 10² para 10⁴ NMP/g solo, permanecendo nessa ordem de grandeza até o final do experimento (12 meses). Esse comportamento pode ser atribuído a um tardio processo de adaptação desses microrganismos à elevada concentração do óleo (10%).

Verifica-se na Figura 5.45 que tanto a densidade microbiana heterotrófica total quanto a degradadora de óleo para a condição com 5% de óleo apresenta valores sempre superiores aos observados para a condição com 10% o, indicando mais uma vez uma melhor adaptação da população nativa a uma menor concentração do contaminante.

Ao longo do experimento de ANM verificou-se que o aumento da degradação de HTP observado com o tempo de ensaio não foi linearmente proporcional ao aumento da população degradadora de óleo ou mesmo da população heterotrófica total, para as duas condições simuladas de contaminação. Como observado por Bento *et al.* (2005), essa relação negativa pode indicar que os microrganismos degradadores específicos estariam ajustando seu metabolismo à presença do novo substrato, aumentando sua atividade metabólica em uma condição de estresse e assim, limitando o seu crescimento populacional. Os autores observaram comportamento semelhante quando do estudo de um processo de atenuação natural monitorada de um solo contaminado com diesel. Nesse trabalho eles não verificaram uma relação direta entre a densidade e a atividade

microbiana (atividade desidrogenásica) durante 12 semanas de ensaio, apesar da elevada remoção de HTP (75%) obtida.

Esse ensaio complementar realizado durante o período de desenvolvimento do trabalho de tese forneceu uma contribuição no que toca ao entendimento do processo de biodegradação natural do óleo cru no Solo 2. Os resultados obtidos para o menor teor de contaminação (< 5% HTP) demonstram que o processo de atenuação natural monitorada (ANM) pode vir a ser uma alternativa para o tratamento do referido solo, uma vez que pode ser atingida uma concentração residual aceitável do contaminante após 1 ano. Para um teor mais elevado de óleo (> 5% HTP) o processo de ANM precisa ser melhor avaliado.

Em contraste com as outras tecnologias de tratamento biológico (biopilhas, biorreatores, landfarming) a ANM, se efetiva, proporciona benefícios relacionados principalmente ao custo do processo. No entanto, o tempo envolvido é significativamente superior ao gasto nas tecnologias citadas.

Capítulo 6

6. CONCLUSÕES

6.1. Quanto à Definição da Configuração de Protótipo de Biorreator de Bancada

✓ Com base nas observações e nos resultados obtidos na etapa de avaliação do comportamento mecânico/reológico do solo contaminado nos diferentes protótipos de biorreatores em escala reduzida (tambor rotativo e tambor fixo), foi confeccionado um biorreator de tambor fixo com agitador do tipo pás. Testes mecânicos preliminares indicaram que o sistema de homogeneização empregado no primeiro protótipo de biorreator foi considerado eficiente e que a taxa de ocupação a ser adotada é de 40 % do volume da parte cilíndrica do biorreator.

6.2. Quanto aos Ensaios de Biodegradabilidade em Microcosmos

Os ensaios de biodegradabilidade conduzidos com o Solo 1 conduziram as seguintes observações:

- ✓ Existe uma influência positiva da prática do bioestímulo no tratamento do Solo 1. No entanto, a reduzida atividade microbiana observada pode estar associada ao longo intervalo de tempo decorrido entre os eventos de contaminação e os ensaios de biodegradabilidade, bem como à natureza das frações orgânicas presentes no solo, bastante resistentes ao ataque microbiano.
- ✓ Os melhores resultados foram obtidos com 50% da CRA e quando as amostras de Solo 1 foram submetidas apenas à correção de fósforo, não sendo verificada a necessidade de adição de fonte suplementar de nitrogênio.
- ✓ A incorporação do material estruturante (serragem) ao solo bioestimulado refletiu positivamente na atividade microbiana e, por isso, pode ser adotada como uma técnica auxiliar ao processo de borremediação do Solo 1.

Já nos ensaios de conduzidos com o Solo 2 conclui-se que:

✓ Existe a necessidade de adição de nitrogênio quando da adoção da prática de bioestímulo da atividade microbiana degradadora, comportamento este distinto ao observado com o Solo 1, para o qual a adição de N, ao contrário, era responsável por um efeito inibitório à atividade da microbiota nativa.

- ✓ Os resultados obtidos com a adição de uréia superaram os obtidos com o nitrato de sódio. Adicionalmente verificou-se que a utilização da serragem é potencialmente favorável à aceleração do processo biodegradação do contaminante no solo 2.
- ✓ A diferença na resposta dos solos 1 e 2 indica que dificilmente poderá se chegar a um valor único (padrão) de correção do teor de nitrogênio a ser aplicado em processos de biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo.
- ✓ Foi reforçada a idéia de que o sucesso da aplicação de um processo/tecnologia de biorremediação depende fundamentalmente da realização de ensaios preliminares, como os de biodegradabilidade realizados em microcosmos, buscando um maior conhecimento do sistema solo/contaminante e o estabelecimento de condições de processo específicas para cada solo estudado.

6.3. Dos Experimentos em Biorreatores de Bancada

No Protótipo 1

- ✓ A aplicação da técnica de bioestímulo ao Solo 1, resultou na redução de 37,50% da concentração inicial de HTP ao final de 42 dias de ensaio, a uma taxa de remoção diária de 0,17 mg HTP/g solo.dia, apesar das dificuldades operacionais observadas durante o experimento (acentuada formação de um filme de solo nas paredes do biorreator como conseqüência do desgaste excessivo das pás de aço inoxidável) e do mínimo incremento de aditivos realizado (ajuste de pH e correções dos teores de fósforo e de umidade).
- ✓ A aplicação da técnica de bioestímulo em associação a adição da serragem no 2° teste com o Solo 1 resultou na redução de 36,41% da concentração inicial de HTP ao final de 42 dias de ensaio, a uma taxa de remoção diária de 0,05 mg HTP/g solo.dia, sendo esta inferior à obtida no 1° teste. Essa diferença esta associada ao processo de atenuação natural pelo qual o Solo 1 passou ao longo do período de estocagem entre o 1° e o 2° testes. Na amostra utilizada no 2° teste o teor residual de contaminação orgânica (0,5 a 1% de HTP (p/p)) correspondeu apenas à presença de compostos extremamente recalcitrantes e de difícil degradação. Ainda assim, a adição de material estruturante apresentou efeito positivo mesmo nas frações recalcitrantes da contaminação orgânica residual.

- ✓ A substituição do nitrato de sódio pela uréia representou um aumento de 11% na eficiência do processo quando da aplicação penas da técnica de bioestímulo ao Solo 2.
- ✓ A associação do bioestímulo com uréia e a adição da serragem ao Solo 2 acarretou em uma elevação da remoção de HTP de 12,98% para 19,58%, além de um aumento da taxa diária de remoção de HTP de 0,06 para 0,15 mg HTP/g solo.dia, comprovando assim a aceleração do processo de biorremediação.
- ✓ Comparando-se os valores de remoções percentuais de HTP obtidas para o Solo 1 com as obtidas para o Solo 2, verifica-se que essas últimas são inferiores as primeiras (praticamente a metade), podendo esse resultado estar associado ao fato do Solo 2 ser um solo recém contaminado, o que pode ter causado um impacto negativo na microbiota nativa. Por outro lado, o Solo 1, por se tratar de uma contaminação antiga, já possuía uma população nativa bastante adaptada à contaminação orgânica.

Nos Protótipos 2, 3 e 4

- ✓ Os resultados de remoção percentual de OG e HTP obtidos nos protótipos de biorreator P2, P3 e P4 confirmam que o uso da serragem é responsável por aumento significativo na remoção do contaminante orgânico, elevando as taxas diárias de remoção de HTP de 0,04 para 0,18 mg HTP/g solo.dia (sem e com a adição de serragem, respectivamente), em média.
- ✓ Das configurações testadas, há convergência no emprego de pás que premiam o uso de espaçamento maior entre os dentes (P2), bem como o de uso de dentes mais longos (P4).
- ✓ A configuração de pá instalada no protótipo 2 de biorreator (P2) foi selecionada, inicialmente, para instalação no biorreator piloto tendo em vista o melhor desempenho apresentado (elevada remoção percentual do contaminante orgânico e homogeneização eficaz do conteúdo do biorreator).
- ✓ O protótipo de biorreator de bancada desenvolvido apresentou desempenho satisfatório na condução do processo de biorremediação. Ficou comprovado que o

sistema de homogeneização composto de eixo agitador com pás tem papel fundamental na eficiência de biodegradação do contaminante. Adicionalmente, a conformação da pá instalada interfere na eficiência da homogeneização do solo em tratamento e, consequentemente, na eficiência do processo.

6.4. Dos Ensaios no Biorreator Piloto

- ✓ Os testes mecânicos realizados comprovaram a operacionalidade do biorreator piloto.
- ✓ As percentagens de remoção de HTP ficaram em torno de 15% em 7 semanas para o 1° teste (bioestímulo), enquanto que para o 2° teste (bioestímulo e serragem) essa remoção foi elevada para em 35% após 7 semanas, representando um aumento de cerca de 2,3 vezes na eficiência do processo após a adição do material estruturante. Após 14 semanas de ensaio, o 2° teste apresentou uma remoção de 51% da concentração inicial de HTP, indicando a possibilidade de resultados ainda melhores caso o tempo de processo seja prolongado e não represente aumento significativo no custo de tratamento. A adição da serragem praticamente dobrou a taxa obtida apenas com a adição da uréia (de 0,14 para 0,26 mg HTP/g solo.dia após 7 semanas), indicando o efeito positivo na aceleração do processo de biorremediação do Solo 2.
- ✓ O aumento de escala refletiu diretamente no aumento na eficiência de biodegradação do contaminante. A ampliação de escala do biorreator resultou ainda no aumento de cerca de duas vezes no valor da taxa após a adição do estruturante. Na escala de bancada o valor máximo obtido foi de 0,18 mg HTP/g solo.dia enquanto que no biorreator piloto, para essa mesma condição, o valor chegou a 0,26 mg HTP/g solo.dia. Este comportamento comprova que o sistema de automação e controle instalado no biorreator piloto influenciou positivamente na condução do processo de remediação do solo como um todo. Destaca-se a facilidade operacional e a segurança do sistema de tratamento desenvolvido.

6.5. Geral

✓ Os resultados de eficiência de biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo presentes nos solos estudados, tanto nos biorreatores de bancada quanto no piloto, comprovam que o sistema de tratamento desenvolvido acelera consideravelmente o processo natural de biodegradação do contaminante (ANM). Essa aceleração reflete diretamente nos custos envolvidos no tratamento e no monitoramento dos solos, bem

como na minimização dos riscos à saúde e ao meio ambiente associados à exposição prolongada a esses resíduos.

- ✓ As análises de óleos e graxas, apesar de comumente utilizadas no monitoramento dos processos de biorremediação de solos contaminados por petróleo, pela sua simplicidade analítica em comparação aos métodos cromatográficos, nem sempre conduzem à conclusões consistentes quanto à eficiência do processo de tratamento adotado e por esse motivo devem ser empregadas apenas como um indicativo da eficácia do mesmo.
- ✓ O biorreator de fase sólida poderá ser utilizado como uma tecnologia de tratamento tanto isoladamente quanto em associação (pré ou pós tratamento) com tecnologias de biorremediação classicamente empregadas (landfarming, biopilhas).
- ✓ Geralmente a confirmação da eficácia da aplicação de um processo de biorremediação ocorre através da avaliação de resultados obtidos na quantificação de parâmetros químicos e/ou físico-químicos pré-estabelecidos em leis e regulamentos, como por exemplo, concentração residual de hidrocarbonetos e/ou metais. No entanto, as metodologias analíticas associadas à quantificação desses valores envolvem, em sua maioria, pelo menos uma etapa de extração química intensiva para que o composto passe para uma fase líquida e nessa seja quantificado. Esse processo pelo qual a amostra sólida, ou semi-sólida, é submetida frequentemente não representa a real condição de extração (lixiviação e/ou solubilização) a qual aquela amostra será submetida no ambiente. Quando avaliado dessa forma, um processo de biorremediação muitas vezes não é considerado eficiente uma vez que a concentração residual do poluente pode vir a permanecer acima dos valores de referência estabelecidos na legislação ambiental pertinente. Por outro lado, essa concentração residual pode representar apenas a fração não biodisponível do contaminante, isto é, a fração recalcitrante de difícil eliminação por processo biológico.

Capítulo 7

7. SUGESTÕES

- ✓ Realizar ensaios com o biorreator para o tratamento de solos com características distintas visando a comprovar a versatilidade da tecnologia desenvolvida. Dentre as características a serem a avaliadas destacam-se: texturas; tipos de contaminantes orgânicos e/ou inorgânicos; tempo de contaminação.
- ✓ Realizar testes em campo com o biorreator piloto para adequar e otimizar a operacionalidade do mesmo, incluindo a elaboração de um manual prático de operação para os operadores do campo.
- ✓ Realizar uma avaliação integrada da qualidade do solo pós-tratamento no biorreator premiando a inclusão de protocolos/ensaios que envolvam a exposição de organismos de diferentes níveis tróficos (microrganismos, minhocas, vegetais) a amostras contaminadas e verificação da resposta a essa exposição, a utilização das técnicas de biologia molecular como forma de observação da alteração da diversidade microbiana do solo após o tratamento e comparação com a condição logo após a contaminação, bem como a utilização de biosensores microbianos como forma de estimativa da fração biodisponível do contaminante para o organismo empregado como sensor.

Capítulo 8

8. BIBLIOGRAFIA

- ALBERS, A. P. F.; MELCHIADES, F. G.; MACHADO, R.; BALDO, J. B.; BOSCHI, A. O. Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X. **Cerâmica**, v. 48, n. 305, 2002.
- ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry.** 1^a ed., San Diego, U.S.A: Academic Press, 1995, 576 p.
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**. 2^a ed., San Diego, U.S.A.: Academic Press, 1999, 453p.
- ARRAR, J.; CHEKIR, N.; BENTAHAR, F. Treatment of diesel fuel contaminated soil in jet-fluidized bed. **Biochemichal Engeneering Journal**, doi: 10.1016/j.bej.2007.04.016, 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 7181**: Solo Análise granulométrica (Método de ensaio). **Rio de Janeiro, 1984 (Errata- Abril/1988).**
- ATLAS R.M. Effects of temperature and crude-oil composition on petroleum biodegradation. **Applied Microbiology**, v. 30, p. 396-403, 1975.
- ATLAS, R. M. Bioremediation of petroleum pollutants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p.317-327, 1995.
- ATLAS, R.M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiological Reviews**, 45(1): 180-209,1981.
- ATLAS, R.M. Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 52, p. 149-156, 1991.
- AULENTA, F.; BIANCHI, A.; MAJONE, M.; PAPINI, M. P.; POTALIVO, M.; TANDOI. Assessment of natural or enhanced in situ bioremediation at a chlorinated solvent-contaminated aquifer in Italy: a microcosm study. **Environment International**, v. 31, p.185-190, 2005.
- AYOTAMUNO, M. J.; KOGBARA, R. B.; OGAJI, S. O. T.; PROBERT, S.D. Bioremediation of a crude-oil polluted agricultural-soil at Port Harcourt, Nigeria. **Applied Energy**, v.83, p. 1249-1257, 2006.
- AZEVEDO, B. S. M.; BAPTISTA, P. M.; SANTOS, R. M.; RIZZO, A. C. L. Utilização da serragem como material estruturante na biorremediação de solos contaminados por petróleo. In: 28° REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA,

- 30/05 a 02/06/05, Poços de Caldas, MG, Brasil, **Livro de Resumos**, v. 1, AB-062, 2005.
- BAHERI, H.; MEYSAMI, P. Feasibility of fungi bioaugmentation in composting a flare pit soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. B89, p. 279–286, 2002.
- BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 1-12, 1995.
- BANAT, I.M. Enhanced bioremediation of n-alcane inpetroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. **Bioresource Technology**, v. 90, p. 159-168, 2003.
- BANERJEE, D. K.; FEDORAK, P. M.; HASHIMOTO, A.; MASLIYAH, J. H.; PICKARD, M. A.; GRAY, M. R. Monitoring the biological treatment of anthracene-contaminated soil in a rotating-drum bioreactor. **Applied Microbiology & Biotechnology**, v. 43, p. 521-528, 1995.
- BANERJI, S. K.; ZAPPI, M. E.; TEETER, C.L., GUNNISON, D.; CULLINANE, M. J.; MORGAN, R. T. **Bioremediation of soils contaminated with petroleum hydrocarbons using bioslurry rectors.** Washington, DC: U.S. Army Corps of Engineers, 1995, 61p.
- BARKER, J.; CHATZIS, J.; OLIVEIRA, E. In: Petrochemical contamination in the subsurface: processes, site assessment, remediation. **Palestra.** CENPES/PETROBRAS, 21 a 24 de agosto de 1995, Rio de Janeiro, Brasil, 1995.
- BARRINGTON, S.; CHOINIÉRE, D.; TRIGUI, M.; KNIGHT, W. Effect of carbon source on compost nitrogen and carbon losses. **Bioresource Technology**, v. 83, p.189–194, 2002.
- BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE. B. C.; FRANKENBERGER, W.T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 96, p.1049-1055, 2005.
- BERNOTH, L.; FIRTH, I.; McALLISTER, P.; RHODES, S. Biotechnologies for remediation and pollution control in the mining industry. **Minerals & Metallurgical Processing**, v. 17, n. 2, p. 105-111, 2000.
- BOON, N.; DE WINDT, W.; VERSTRAETE, W.; TOP, E. M. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel eletrophoresis) with group-specific 16S rRNA

- primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. **FEMS Microbiology Ecology** 39: 101-112, 2002.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, v. 74, p.63-67, 2000.
- BRASIL, **Lei nº 11.105**, de 24 de março de 2005. Disponível em http://www.planalto.gov.br/CCIVIL/_Ato2004-2006/2005/Lei/L11105.htm. Consultado em 25 de junho de 2007.
- BRINKMANN, D.; RÖHRS, J.; SCHÜGERL, K. bioremediation of diesel fuel contaminated soil in a rotating bioreactor. Part I: Influence of oxygen saturation. **Chemical Engineering Technology**, v. 21, p.168-172, 1998.
- BUENO, B. S.; VILAR, O. M. **Mecânica dos solos**. 1ª ed., Viçosa, Brasil: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 1980, 131p.
- CENTRO DE TECNOLOGIA MINERAL CETEM. **IT2003-001-00**: Determinação de óleos e graxas, em solo, por gravimetria empregando método de extração com ultrassom. Instrução de trabalho, 2003.
- CERNIGLIA, C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Biodegradation**, v. 3, p. 351-368, 1992.
- CHO, B.; CHINO, H.; TSUJI, H.; KUNITO, T.; NAGAOKA, K.; OTSUKA, S.; YAMASHITA, K.; MATSUMOTO, S.; OYAIZU, H. Laboratory-scale bioremediation of oil-contaminated soil of Kuwait with soil amendment materials. **Chemosphere**, v. 35, n. 7, p.1599-1611, 1997.
- CHOI, S.; LEE, Y.; OH, Y. Treatability tests for the bioremediation of unsanitary landfill waste soils. **The Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p.169-173, 2003.
- CLARK, B.; BOOPATHY, R. Evaluation of bioremediation methods for the treatment of soil contaminated with explosives in Louisiana Army Ammunition Plant, Minden, Louisiana. **Journal of Hazardous Materials**, v. 143, p. 643-648, 2007.
- COLLINA, E.; BESTETTI, G.; DII GENNARO, P.; FRANZETTI, A.; GUGLIERSI, F.; LASAGNI, M.; PITEA, D. Naphthalene biodegradation kinetics in an aerobic slurry-phase bioreactor. **Environment International**, v. 31, n.2, p. 167-171, 2005.
- COLOMBO, J. C.; CABELLO, M.; ARAMBARRI, A. M. Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure cultures of imperfect and lignolitic fungi. **Environmental Pollution**, v. 94, n.3, p. 355-362, 1996.

- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL CETESB. **Áreas Contaminadas**. Disponível em: www.cetesb.sp.gov.br. Acesso em 27 de maio de 2005.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL CETESB. **Norma Técnica L5.227**. Teste de toxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*: método de ensaio. Dez/2001, 13p.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL CETESB. **Resíduos Sólidos Industriais**. 2ª ed., São Paulo, Brasil: *CETESB*, 1992, 234p.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA. **RESOLUÇÃO Nº 314,** DE 29 DE OUTUBRO DE 2002.
- CORRÊA, O. L. S. Petróleo: noções sobre exploração, perfuração, produção e microbiologia. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 2003.
- CUNHA, C. D. Avaliação de diferentes tecnologias de biorremediação de água subterrânea contaminada com gasolina e análise molecular da comunidade bacteriana presente, 2004, 176p. Tese Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 2004.
- CUYPERS, C. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils and sediments: Prediction of bioavailability and characterization of organic matter domains, 161p. 2001. PhD.Thesis, Wageningen University, The Netherlands, 2001.
- DAS, K.; MUKHERJEE, A. K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus* subtilis and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum oil contaminated soil from North-East India. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1339-1345, 2007.
- DAVIS, J. G.; WILSON, C. R. Choosing a soil amendment. **Gardening Series,** n. 7.235, Colorado State University, Cooperative Extension 6/00, 2000.
- DEL`ARCO, J.P. Degradação de hidrocarbonetos por báctérias e fungos em sedimento arenoso, 1999, 171p. Tese Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 1999.
- DEL'ARCO J.P.; DE FRANÇA F.P. Influence of oil contamination levels on hydrocarbon biodegradation in sandy sediment. **Environmental Pollution**, v. 110, p. 515-519, 2001.

- DERUDI, M.; VENTURINI, G.; LOMBARDI, G.; NANO, G.; ROTA, R.Biodegradation combined with ozone for the remediation of contamianted soils. **European Journal of Soil Biology**, doi:10.1016/j.ejsobi.2007.03.001, 2007.
- DEUEL, L.E.; HOLLIDAY, G. H. Soil remediation for the petroleum extraction industry. 2^a ed., Tulsa, U.S.A.: PennWell, 1997, 242 p.
- DRITSA, V.; RIGAS, F.; NATSIS, K.; MARCHANT, R. Characterization of a fungal strain isolated from a polyphenol polluted site. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1741-1747, 2007.
- EHLERS, L. J.; LUTHY, R. G. Contaminant bioavailability in soil and sediment. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 15, p.295A – 302A, 2003.
- ELEKTOROWICZ, M. Bioremediation of petroleum-contaminated clayey soil with pretreatment. **Environmental Technology**, v.15, p. 373-380, 1994.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de classificação de solos.** Centro Nacional de Pesquisa de Solos, Rio de Janeiro, Brasil: Embrapa, 1999.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA EMBRAPA. **Manual de Métodos de Análise de Solo.** Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 2ª ed., Rio de Janeiro, Brasil: Embrapa, 1997, 212p.
- FIELD, S. D. Advanced biological treatment and separation of hazardous constituents from petrochemical sludges. **Journal of Hazardous Materials**, v. 28, p.101-113, 1991.
- FIUZA, A. M. A.; VILA; M. C. C. An insight into soil bioremediation through respirometry. **Environment International**, v. 31, p. 179–183, 2005.
- FOGHT, J.; SEMPLE, K.; GAUTHIER, C.; WESTLAKE, D. W. S.; BLENKINSOPP, S.; SERGY, G.; WANG, Z.; FINGAS, M. Effect of nitrogen source on biodegradation of crude oil by a defined bacterial consortium incubated under cold, marine conditions. **Environmental Technology,** v. 20, p. 839-849, 1999.
- FRANCO I.; CONTIN M.; BRAGATO G.; DE NOBILI M. Microbiological resilience of soils contaminated with crude oil. **Geoderma**, v. 121, p. 17-30, 2004.
- GHAZALI, F. M.; RAHMAN, R. N. Z. A.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 54, p. 61-67, 2004.

- GIBB, A., CHU, A., WONG, R. C. K. e GOODMAN, R. H. Bioremediation Kinetics of crude oil at 5° C. **Journal of Bioremediation Engineering**, 127 (9): 818-824 (2001).
- GOGOI, B. K.; DUTTA, N. N.; GOSWAMI, P.; KRISHNA MOHAN, T. R. A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site.

 Advances in Environmental Research, v. 7, p.767-782, 2003.
- GRAY, M. R.; BANERJEE, D. K.; FEDORAK, P. M.; HASHIMOTO, A.; MASLIYAH, J. H.; PICKARD, M. A. Biological Remediation of Anthracene-contaminated Soil in Rotating Bioreactors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.40, p. 933-940, 1994.
- GROTENHUIS, T.; FIELD, J.; WASSEVELD, R. ;RULKENS, W. Biodegradation of polyaromatic hydrocarbons (PAH) in polluted soil by the white-rot fungus *Bjerkandera*. In: Extended summaries Biochemistry of bioremediation by fungi.

 Journal of Chemistry Technology and Biotechnology, v. 71, p. 356-367, 1998.
- HAHN, W. J.; LOEHR, R. C. Biological treatment of petroleum oily sludges. In: SPE Society of Petroleum Engineers Permian Basin Oil and Gas Recovery Conference.

 Anais ... Midland, Texas, march 18-20, U.S.A, p. 519-530,1992.
- HAMDIA, H.; BENZARTIB, S.; MANUSADZIANASC, L.; AOYAMAA, I.; JEDIDID, N. Bioaugmentation and biostimulations effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, p. 1926-1935, 2007.
- HAWS, N. W.; BALL, W. P.; BOUWER, E. J. Modeling and interpreting bioavailability of organic contaminant mixtures in subsurface environments. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 82, p. 255-292, 2006.
- HEITZER, A.; SAYLER, G. S. Monitoring the efficacy of bioremediation. **Trends in Biotechnology**, v. 11, n. 8, p. 334-343, 1993.
- http://www.ambientebrasil.com.br. Site consultado em 24/02/05
- http://www.hcdavis.com/agitator.htm. Site consultado em dezembro de 2003.
- http://www.icp.ecp.com/home/oferta/icp/pros-semi-biodegradacion.htm. Site consultado em dezembro de 2003.
- http://www.mueller-trade.com/Mixing/Agitator Types.htm Site consultado em dezembro de 2003.

- HUANG, Y. F.; WANG, G. Q.; HUANG, G. H.; XIAO, H. N.; CHAKMA, A.). IPCS: An integrated process control system for enhanced in-situ bioremediation. **Environmental Pollution**, doi: 10.1016/j.envpol.2007.04.010, 2007.
- HUBÁLEK, T.; VOSÁHLOVÁ, S.; MATEJU, V.; KOVÁCOVÁ, N.; NOVOTONY, C. Ecotoxicity monitoring of hydrocarbon-contaminated soil during bioremediation: a case study. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 52, p. 1-7, 2007.
- HUESEMANN, M. H.; MOORE, K. O.; JOHNSON, R. N. The fate of BDAT polynuclear aromatic compounds during biotreatment of refinery API oil separator sludge. **Environmental Progress**, v. 12, n. 1, p. 30-38, 1993.
- HUND, K.; TRAUNSPURGER, W. Ecotox Evaluation Strategy for Soil Bioremediation Exemplified for a PAH Contaminated Site. **Chemosphere**, v. 29, p. 371-390, 1994.
- INFANTE, C.; GONZÁLEZ, O. Comparacion del processo de biodegradacion de lodos petrolizados en biorreactores y en suelos. **Vision Tecnologica**, v. 3, n. 1, p. 29-34,1995.
- ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION), **ISO 11348-3**. Water quality Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Lumescent bacteria test) Part 3: Method using freezedried bacteria. Geneva: ISO, 1998.
- ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION), **ISO/CD**. **Draft**. Soil quality Avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behavior Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida and Eisenia andrei*). Geneva: ISO, 2005.
- ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION). **ISO/CD 17512.**Draft. Soil Quality Avoidance test for testing the quality of soils and the toxicity of chemicals Test with earthworms (*Eisenia fetida*). Geneva: ISO, 2004.
- IWAMOTO, T.; NASU, M. Current bioremediation practice and perspective. Journal of **Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 1, p. 1-8, 2001.
- JANSSON, J. K.; BJÖRKLÖF, K.; ELVANG, A. M.; JORGENSEN, K. S. Biomarkers for monitoring efficacy of bioremediation by microbial inoculants. **Environmental Pollution**, v. 107, p. 217-223, 2000.
- JORGENSEN, K. S.; PUUSTINEN, J.; SUORTTI, A. M. Bioremediation of petroleum hydroarbon-contaminated soil by composting in biopiles. **Environmental Polllution**, v. 107, p. 245-254, 2000.

- KHAN, F. I.; HUSAIN, T.; HEJAZI, R. An overview and analysis of site remediation technologies. **Journal of Environmental Management**, v. 71, p. 95–122, 2004.
- KRÜGER, M.; HARRISON, A. B.; BETTS, W. B. Treatment of hydrocarbon contaminated soil using a rotating-drum bioreactor. **Microbios**, v. 83, p. 243-247, 1995.
- LALLY, C.; RUSSEL, M. Soil and water bioremediation using bioreactors. 1996. Disponível em http://www.ce.vt.edu/enviro2/gwprimer/bioreact/bior.htm. Consultado em janeiro 2004.
- LAUCH, R.P.; HERRMAN, J. G.; MAHAFFEY, W. R.; JONES, A. B.; DOSANI, M.; HESSLING, J. Removal of creosote from soil by bioslurry reactors. **Environmental Progress,** v. 11, n. 4, p. 265-271, 1992.
- LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R. Microbial Degradation of Hydrocarbons in The Environment. **Microbiological Reviews**, v. 54, n. 3, p. 305-315, 1990.
- LEBLANC, L.; FITZGERALD, A. Bioremediation: striking successes in spill cleanup, but obstacles remain. **Offshore**, September, p. 26-30, 1990.
- LEE, S. –H; OH, B., -I; KIM, J., -G. Effect of various amendments on heavy mineral oil bioremediation and soil microbial activity. **Bioresource Technology**, doi:10.1016/j.biortech.2007.04.039, 2007.
- LEONARDI, V.; SASEK, V.; PETRUCCIOLI, M.; DÁNNIBALE, A.; ERBANOVA, P.; CAJTHAM, T. Bioavailability modification and fungal biodegradation of PAHs in aged industrial soils. *International* **Biodeterioration and Biodegradation**, v. 60, p. 165-170, 2007.
- LIN, Q.; MENDELSSOHN, I.A; HENRY JR, C.B; ROBERTS, P.O; WALSH, M.M.; OVERTON, E.B.; PORTIER, R.J. Effects of bioremediation agents on oil degradation in mineral and sandy salt marsh sediments. **Environmental Technology**, v. 20, p. 825-837, 1999.
- LINDLEY, N.D. Bioconversion and biodegradation of aliphatic hydrocarbons. **Canadian Journal of Botanic**, v. 43, n. 1, p. S1034-S1042, 1995.
- LOEHR, R.C.; MCMILLEN, S.J.; WEBSTER, M.T. Predictions of biotreatability, and actual results: soils with petroleum hydrocarbons. **Pratice periodical of hazardous, toxic, and radioactive waste management**, v.5, n. 2, april, p. 78-87, 2001.
- LUCHESE, E. B.; FAVERO, L. O. B.; LENZI, E. **Fundamentos da química do solo**. Rio de Janeiro: Ed. Freitas Bastos, 2001.

- MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Efficiency of indigenous and inoculation cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpine soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p.2660-2664, 1997.
- 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. Biorremediação. III Fórum de Estudos Contábeis, Faculdades Integradas Claretianas, Rio Claro, SP, 2003. Disponível em: www.ceset.unicamp.br/lte/artigos/3fec2401 Pesquisado em 16/08/2006 as 11:46. Site acessado em outubro, 2004.
- MASLIYAH, J. H.; AFACAN, A.; WONG. A. K. M. Flow of slightly settling slurries in a horizontal rotary drum. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 70, p.1083-1089, 1992.
- MESARCH, M. B.; NAKATSU, C. H.; NIES, L. Development of catechol 2,3-dioxygenase-specific primers for monitoring bioremediation by competitive quantitative PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 678-683, 2000.
- MEYSAMI, P.; BAHERI, H. Pre-screening of fungi and bulking agents for contaminated soil bioremediation. **Advances in Environmental Research**, v. 7, p. 881-887, 2003.
- MILLIOLI, V. S.; SANTOS, L. C.; RIZZO, A. C. L.; SANTOS, R. L. C.; SORIANO, A. U. Evaluation of optimum concentration of two anionic surfactant in the biodegradation of crude oil contaminated soil. In: CONSOIL, 3-7 outubro, Bordeaux, França, 2005.
 Proceedings of the 9th International FZK/TNQ Conference on Soil-Water Systems, 1 CD-ROM, 2005.
- MOHAN, S. V.; RAMAKRISHNA, M.; SHAILAJA, S.; SARMA, P. N.Influence of soil-water ratio on the performance of slurry phase bioreactor treating herbicide contaminated soil. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2584-2589, 2007.
- MOLINA-BARAHONA, L.; RODRÝGUEZ-VÁZQUEZ, R.; HERNÁNDEZ-VELASCO, M.; VEGA-JARQUÝN, C.; ZAPATA-PÉREZ, O.; MENDOZA-CANTÚ, A.; ALBORES, A. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. **Applied Soil Ecology**, v. 27, p.165–175, 2004.
- MOORE, D. M.; REYNOLDS JR, R. C. X-Ray diffraction and the identification and analysis of clay minerals. New York: Oxford University Press, 1989.
- MORAIS, E. B. Biodegradação de resíduos oleosos provenientes de refinaria de petróleo através do sistema de biopilhas, 150 p, 2005. Dissertação de mestrado

- apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 2005.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002.
- MUELLER, J. G.; LANTZ, S. E.; BLATTMANN, B. O.; CHAPMAN, P. J. Bench-scale evaluation of alternative biological treatment processes for the remediation of pentachlorophenol- and creosote-contaminated materials: slurry-phase bioremediation. **Environmental Science and Technology**, v. 25, p.1055-1061, 1991.
- MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel eletrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.
- NAKAGAWA, L. E.; ANDRÉA, M.M. Efeito de Alterações nas Características do Solo sobre a Degradação de Hexaclorobenzeno. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, p. 575-582, 2006.
- NANO, G., BORRONI, A e ROTA, R. Combined Slurry and Solid-Phase Bioremediation of Diesel Contaminated Soils. **Journal of Hazardous Materials**, B100: 79-94 (2003).
- NASCIMENTO, A.R.; ARARUNA JUNIOR, J.; ZIOLLI, R.L. Otimização e Avaliação do Desempenho de um Método de Determinação de TPH (*Total Petroleum Hydrocarbons*) em Areia por Detecção no Infravermelho. In: METROLOGIA-2003 Metrologia para a Vida Sociedade Brasileira de Metrologia (SBM), Recife, Pernambuco, 2003, **Anais ...**, 2003.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.
- NONCENTIN, M.; PINELLI, D.; FAVA, F. Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixtures: the residual concentration problem. **Chemosphere**, v. 41, p.1115-1123, 2000.
- NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; KÜHL, M.; MUYZER, G. Quantifying microbial diversity: morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 422-430, 1999.

- NUNES-HALLDORSON, V. S.; STEINER, R L.; SMITH, G. B. Residual toxicity after biodegradation: Interaction among benzene, toluene, and chloroform. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, p.162-167, 2004
- **OECD 207 -** OECD Guideline for Testing of Chemicals: Eartworm, Acute Toxicity Tests, 1984.
- OKUDA, T.; ALCANTARA-GARDUNO, M. E.; SUZUKI, M.; MATSUI, C.; KOSE, T.; NISHIJIMA, W.; OKADA, M. Enhancement of biodegradadtion of oil adsorbed on fine soils in a bioslurry reactor". **Chemosphere**, v. 68, p. 281-286, 2007.
- ORTIZ, I.; VELASCO, A.; REVAH, S. Effect of toluene as gaseous cosubstrate in bioremediation of hydrocarbon-polluted soil. **Journal of Hazardous Materials**, p. B131: 112–117, 2006.
- PALA, D. M.; CARVALHO, D. D.; PINTO, J. C.; SANTÁNNA Jr, G. L. A suitable model to describe bioremediation of a petroleum-contaminated soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 58, p. 254-260, 2006.
- PARTHEN J.; SPRENGER, B.; EBNER, H. G.; SCUGERL, K. Determination of Technical Parameters for Microbial Soil Cleaning in Bioreactors. **DECHEMA Biotechnology Conferences**, v. 4, p. 563-566, 1990.
- PETROBRAS, 2005. **O** petróleo e a Petrobrás, para estudantes do Ensino Médio.

 Disponível em http://www2.petrobras.com.br/minisite/sala_de_aula/petroleo/petroleo imp.as. Site consultado em 24/02/05.
- PIEPER, D. H.; REINEKE, W. Engineering bacteria for bioremediation. **Current Opinion** in **Biotechnology**, v. 11, p. 262-270, 2000.
- PLAZA, G.; NALECZ-JAWECKI, G; ULFIG, K e BRIGMON, R.L. The application of bioassays as indicator of petroleum-contaminated soil remediation. **Chemosphere**, v. 59, p.289-296, 2005.
- PRINCE, R.C. Petroleum spill bioremediation in marine environments. **Critical Reviews** in **Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 217-242, 1993.
- PRINCE, R.C; VARADARAJ, R.; FIOCCO, R.J.; LESSARD R.R. Bioremediation as an oil spill response tool. **Environmental Technology**, v. 20, p. 891-896, 1999.
- PROVIDENTI, M. A.; LEE, H.E TREVORS, J. T. Selected Factors Limiting the Microbial Degradation of Recalcitrant Compounds". **Journal of industrial Microbiology**, v. 12, p. 379-395, 1993.

- PURWANINGSIHA, S.; HILLA, G. A.; HEADLEY, J.V. Mass transfer and bioremediation of naphthalene particles in a roller bioreactor. **Water Research**, v. 38, p. 2027-2034, 2004.
- PUSKAS, K.; AL-AWADHI, N.; ABDULLAH, F.; LITERATHY, P. Remediation of oil-contaminated sandy soil in a slurry reactor. **Environment International**, v. 21, n. 4, p. 413-421, 1995
- RAHMAN, K.S.M.; THAHIRA-RAHMAN, J.; KORKOUTAS, Y.; MARCHANT, I.P.R.;
- RAIMUNDO, R. S.; MACEDO, R. C.; RIZZO, A. C. L. Tratamento de solo contaminado por petróleo empregando material estruturante. In: 44° CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA REALIZADO PELA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE QUÍMICA (ABQ), de 20 a 24 de Setembro de 2004, Fortaleza, Ceará. **Anais ...**, 2004.
- RAMÍREZ, N.; GROSSO, J.; CASTRO, A.; AMADOR, L. Y LEÓN, G. Nuevas tecnologias para biodegradacion de lodos aceitosos. In: CONEXPO ARPEL'92. **Anais...**, 1992.
- RATLEDGE, C. **Biochemistry of microbial degradation**. The Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 1994.
- RHYKERD, R. L.; CREWS, B.; MCINNES, K. J.; WEAVER, R. W. Impact of bulking agents, forced aeration, and tillage on remediation of oil-contaminated soil. **Bioresource Technology**, v. 67, p. 279-285, 1999.
- RICHNOW, H. H.; ANNWEILER, E.; KONING, M.; LUTH, J. C.; STEGMANN, R.; GARMS, C.; FRANCKE, W.; MICHAELIS, W. Tracing the transformation of labelled [1-¹³C] phenanthrene in a soil bioreactor. **Environmental Pollution,** v. 108, p. 91-101, 2000.
- RIZZO, A. C. L.; SANTOS, R. L. C.; LEMOS, J. L. S.; MILLIOLI, V. S.; LEITE, S. G. F. Emprego de biorreatores não convencionais no tratamento de solos contaminados por petróleo: escala piloto. **RT2006-026-00 CETEM/MCT**: Relatório Técnico final de projeto Ação 310219 elaborado para o CENPES/Petrobras (confidencial), 2006.
- RIZZO, A. C. L.; SANTOS, R. L. C.; LEMOS, J. L. S.; VALDMANN, E.; MILLIOLI, V. S.; LEITE, S. G. F. Emprego de biorreatores não convencionais no tratamento de solos contaminados por petróleo, escala piloto. **RI2004-052-00 CETEM/MCT**: Relatório Interno do Projeto CETEM 601589 elaborado para o CENPES/Petrobras (confidencial), 2004.
- RIZZO, A. C. L.; SANTOS, R.L. C.; SORIANO, A. U.; SEABRA, P. N.; LEITE, S. G. F. Bioremediation of crude oil contaminated soil. In: THE FOURTH INTERNATIONAL CONGRESS ON ENVIRONMENTAL GEOTECHNICS (4th ICEG), Rio de Janeiro,

- Brazil, 11-15 agosto, 2002. **Proceedings of ...**, Rio de Janeiro: A. A. Balkema Publishers, v. 2, p. 793 798, 2002.
- ROJAS-ALVELIZAPA, N. G.; ROLDA'N-CARRILO, T.; ZEGARRA-MARTYNEZ, H.; MUNOZ-COLUNGA, A. M.; FERNADEZ-LINARES, L. C. A field trial for an ex-situ bioremediation of a drilling mud-polluted site". **Chemosphere**, v. 66, p. 1595-1600, 2007.
- ROLDA'N-MARTY'N, A.; CALVA-CALVA, G.; ROJAS-AVELIZAPA, N.; DYAZ-CERVANTES, Ma. D.; RODIGUES-VAZQUEZ, R. Solid culture amended with small amounts of raw coffee beans for the removal of petroleum hydrocarbon from weathered contaminated soil. *International* Biodeterioration and Biodegradation, doi: 10.1016/j.ibiod.2006.10.008, 2007.
- ROMANTSCHUK, M.; SARAND, I.; PETÄNEN, T.; PELTOLA, R.; JONSSON-VIHANNE, M.; KOIVULA, T.; YRJÄLÄ, K.; HAAHTELA, K. Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. **Environmental Pollution,** v. 107, p. 179-185, 2000.
- ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F. Utilização de eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura (TGGE) para estudar diversidade microbiana. In: MELLO, I. S. **Genética e Melhoramento de Microrganismos**. São Paulo: EdUSP, 2002.
- ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F.; SELDIN, L.; van ELSAS, J. D. Molecular microbial ecology: a minireview. **Revista de Microbiologia**, v. 28, p. 135-147, 1997.
- ROSS, D. Slurry-phase bioremediation: Case studies and cost comparisons. **Remediation**, v. 1, n. 1, p. 61-74, 1990/91.
- SÁ, M. C. C. Tratamento de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo, 116p, 2002. Tese M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 2002.
- SALAMEH, M. F.; KABRICK, R. M. Treatment of petroleum oily sludges in liquid/solid contact reactors Results of batch testing. In: 46TH INDUSTRIAL WASTE CONFERENCE, Purdue University, West Lafayette, Indiana, U.S.A, 1992.

 Proceedings ..., Purdue University, West Lafayette, Indiana, p. 55-64,1992.
- SALINAS-MARTINEZ, A; SANTOS-CORDOVA, M. L.; SOTO-CRUZA, O.; DELGADOA, E.; PEREZ-ANDRADE, H.; HAUAD-MARROQUYN, L. A.; MEDRANO-ROLDA, H. Develpment of a bioremediation process by biostimulation of native microbial

- consortium through the heap leaching technique. **Journal of Environmental Management**, doi: 10.1016/j/jenvman.2007.01.038, 2007.
- SANER, M.; BACHOFEN, R.; SCHNEIDER, K. Simulation of onsite vacuum heap aeration and soil surface enlargement by a closed agitated soil bioreactor.

 Microbiological Reseach, v. 151, p. 29-35, 1996a.
- SANER, M.; BOLLIER, D.; SCHNEIDER, K.; BACHOFEN, R. Mass transfer improvement of contaminants and nutrients in soil new type of closed bioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 48, p. 25-35, 1996 b.
- SANTOS, R. L. C.; RIZZO, A. C. L.; SORIANO, A. U.; SEABRA, P. N.; LEITE, S. G. F. Tratamento de Solos Argilosos Contaminados por Hidrocarbonetos de Petróleo. **RT 36/01CETEM/MCT:** Relatório Técnico do Projeto CTPETRO 770, 2001.
- SANTOS, R. M. Avaliação da adição da casca de coco verde, como material estruturante, na biorremediação de solo contaminado por petróleo, 143p. 2007. Tese M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 2007.
- SARKAR D.; FERGUNSON M.; DATTA R., BIRNBAUM S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, v. 136, p. 187-195, 2005.
- SCHERR, K.; AICHBERGER, H.; BRAUN, R.; LOIBNER, A. P. Influence of soil fractions on microbial degradation behaviour of mineral hydrocarbons. **European Journal of Soil Biology**, doi: 10.1016/j.ejsobi.2007.03.009, 2007.
- SCHMIDT, C. A. B.; BARBOSA, M. C.; ALMEIDA, M. S. S.A laboratory feasibility study on electrokinetic injection of nutrients on an organic, tropical, clayey soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 143, p. 655-661, 2007.
- SEABRA P.; SANT'ANNA JR. G.; CARVALHO. D.; RIZZO A. Bioremediation of crude oil-contaminated tropical soil in bench-scale piles. **Environmental Engineering and Managment Journal**, v. 5, p. 399-406, 2006.
- SEABRA, P.N.C. Aplicação de biopilha na biorremediação de solos contaminados com petróleo, 169p, 2005. Tese D. SC. submetida ao Programa de Engenharia Química da COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.
- SEMA (SECRETARIA ESPECIAL DO MEIO AMBIENTE). **Manual de Testes para Avaliação da Ecotoxicidade de Agentes Químicos**. Brasília:SEMA, 1988.

- SEMPLE, K. T.; DOICK, K. J.; JONES, K. C.; BURAUEL, P.; CRAVEN, A.; HARMS. H. Defining bioavailability and bioaccessibility of contamnated soil and sediment is complicated. **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 12, p. 228A 231A, 2004.
- SEMPLE, K. T.; REID, B. J.; FERMOR, T. R.Impact of Strategies on the Treatment of Soils contaminated With Organic Pollutants. **Environmental Pollution**, v. 112, p. 269-283, 2001.
- SHAILAJA, S.; RAMAKRISHNA, M.; MOHAN, S. V.; SARMA, P. N. Biodegradation of din-butyl phthalate (DnBP) in bioaugmented bioslurry phase reactor. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1561-1566, 2007.
- SISINNO, C.; BULUS, M.; RIZZO, A. e MOREIRA, J. Ensaios de comportamento com minhocas (*Eisenia fetida*) para Avaliação de Áreas Contaminadas: resultados preliminares para contaminação por hidrocarbonetos, p.41. In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECOTOXICOLOGIA, Florianópolis. 2004. **Anais ...**, Florianópolis. 2004a.
- SISINNO, C.; BULUS, M.; RIZZO, A.; e MOREIRA, J. Avoidance test using earthworms as a complement for metal contaminated site evaluation: preliminary results. In: XIII INTERNATIONAL CONFERENCE OF HEAVY METALS IN THE ENVIRONMENT, Rio de Janeiro, 2005. **Proceedings ...**, Riod e Janeiro: CETEM, p.322-324, 2005.
- SISINNO, C.; BULUS, M.; RIZZO, A.; SÁFADI, R.; FONTES, A.; MOREIRA, J. Ensaios ecotoxicológicos como um instrumento de complementação da avaliação de áreas contaminadas: resultados preliminares em áreas contaminadas por hidrocarbonetos, pp.150-154. In: III SEMINÁRIO NACIONAL DE SAÚDE E AMBIENTE, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004. **Anais...**, Rio de Janeiro: Ed. FIOCRUZ, 164p, 2004b.
- SMITH, M.J.; LETHBRIDGE, G.; BURNS, R.G. Bioavailability and Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils. **FEMS Microbiology Letters**, v. 152, p. 141-147, 1997.
- SOLANO-SERENA, F.; MARCHAL, R.; BLANCHET, D.; VANDECASTEELE, J. P. Intrinsic capacities of soil microflorae for gasoline degradation. **Biodegradation**, v. 9, p. 319-326, 1998.
- SORIANO, A. U. **RT 08/2001 CETEM/MCT:** Tratamento de solos argilosos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. Relatório de Atividades Apresentado ao CNPq, Processo nº 300479/99-9, Área Engenharia Química, 2001.

- STRAUBE, W. L.; NESTLER, C. C.; HANSEN, L. D.; RINGLEBERG, D.; PRITCHARD, P. H.; JONES-MEEHAN, J. Remediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) through landfarming with biostimulations and bioaugmentation. **Acta Biotechnologica**, v. 23, n. 2-3, p.179-196, 2003.
- STROO, H. F.; SMITH, J. R.; TORPY, M. F.; COOVER, M. V.; KABRICK, R. M. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated solids using liquid/solids contact reactors. **Bioremediation**, p. 332-337, 1997.
- TRINDADE P. V. O.; RIZZO, A. C. L.; SORIANO, A. U.; SOBRAL, L. G. S.; LEITE, S. G. F. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study . **Chemosphere**, v. 58, p. 515-522, 2005.
- TRINDADE, P. V. O. Avaliação das Técnicas de bioaumentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo, 127p, 2002. Tese M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 2002.
- TROQUET, J., LARROCHE, C.; DUSSAP, C. G. Evidence for the occurance of na oxygen limitantion during soil bioremediation by solid-state fermentation.

 Biochemical Engineering Journal, v. 13, p. 103-112, 2003.
- TRUAX, D. D.; BRITTO, R. E SHERRARD, J. H. Bench-scale studies of reactor-based treatment of fuel-contaminated soils. **Waste Management**, v. 15, n. 5/6, p. 351-357, 1995.
- U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY USEPA. EPA 823/B-98-004.
 Evaluation of Dredged Material Proposed for Discharge in Waters of the U.S. –
 Testing Manual. Disponível em http://www.epa.gov/ost/itm/ITM/,1998.
- U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY USEPA. How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers. (EPA 510-B-94-003, EPA 510-B-95-007, and EPA 510-R-04-002). Disponível em: http://www.epa.gov/oust/pubs/tums.htm. Consultado em: outubro de 2004.
- U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY USEPA. **USEPA 3550B:** Ultrasonic Extraction. EPA, Revision 2, 14p, 1996.
- U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY USEPA. USEPA 8015B: Nonhalogenated Organics Using GC/FID. EPA, Revision 2, 28p, 1996.

- U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY USEPA. USEPA 8270C: Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. EPA, Revision 2, 26 p, 1996.
- URURAHY, A. F. P. **Biodegradação de resíduo oleoso proveniente de refinaria de petróleo**, 344p, 1998. Tese DSc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil,1998.
- VASUDEVAN, N.; RAJARAM, P. Bioremediation of oil sludge contaminated soil. **Environmental International**, v. 26, p. 409-411, 2001.
- VENOSA, A.D; SUIDAN, M.T; KING, D.; WRENN, B.A. Use of hopane as conservative biomarker for monitoring the bioremediation effectiveness of crude oil contaminating a sandy beach". **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 131-139, 1997.
- VOGEL, T. M. Biaougmentation as a soil bioremediation approach. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 311-316, 1996.
- VON DER WIED, I.; MARQUES, J. M.; CUNHA, C. C.; LIPPI, R. K.; SANTOS, S. C. C.; ROSADO; LINS, U.; SELDIN, L.Identification of biodegradation potential of a novel strain of *Dietzia cinnamea* isolated from a petroleum-contaminated tropical soil. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, p. 331-339, 2007.
- WALWORTH, J. L.; WOOLARD, C. R.; BRADDOCK, J. F. E REYNOLDS, C. M. The role of soil nitrogen concentration in bioremediation. In: FOURTH INTERNATIONAL IN SITU AND ON SITE REMEDIATION SYMPOSIUM, New Orleans, April 28–May 1, Battelle Bioremediation. **Proceedings ...**, New Orleans: Batelle, v. 4, n. 4, p. 283-288, 1997.
- WALWORTH, J.; BRADDOCK, J.; WOOLARD, C. (2001). "Nutrient and temperature interactions in bioremediation of cryic soils". *Cold Regions Science and Technology*, **32**, 85-91.
- WALWORTH, J.; POND, A.; SNAPE, I.; RAYNER, J.; FERGUSON, S.; HARVEY, P. Nitrogen requirements for maximizing petroleum bioremediation in a sub-Antartic soil. **Cold Regions Science and Technology**, v. 48, p. 84-91, 2007.
- WARD, O.; SINGH, A.; VAN HAMME, J. Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 260 270, 2003.

- WATANABE, K,; KODAMA, Y.; HARAYAMA, S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, p. 253-262, 2001.
- WATANABE, K. Microorganisms relevant to bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, p. 237-241, 2001.
- WESTON, R. F. Remediation of diesel and fuel oil hydrocarbons in high clay content soils: a field comparison of amendment performance conducted at the Maré Island Naval Shipyard, 2000. Disponível em (http://enviornfesc.navy.mil/erb/restoration/technologies/remed/bio. Consultado em 14/07/04.
- WICK, L.; SHI, L.; HARMS, H. Electro-bioremediation of hydrophobic organic soil-contaminants: A review of fundamental interactions. **Electrochimica Acta**, v. 52, p. 3441-3448, 2007.
- WILKSTRÖM, P.; WIKLUND, A.; ANDERSSON, A-C.; FORSMAN, M. DNA recovery and PCR quantification of catechol 2,3-dioxygenase genes from different soil types.

 Journal of Biotechnology, v. 52, p.107-120, 1996.
- WOO, S. H. New Orleans; PARK, J. M. Evaluation of Drum Bioreactor Performance Used for Decontamination of Soil Polluted with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.

 Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 74, p. 937-944, 1999.