PROGRAMA EQ-ANP

Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria do Petróleo e Gás Natural

Efeito da utilização de resíduos vegetais na biorremediação de um solo contaminado por borra oleosa do petróleo

Danielle Aparecida Duarte Nunes

Tese de Doutorado

Orientadores

Profa. Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc.

Profa. Claudia Duarte da Cunha, D.Sc.

Profa. Andrea Medeiros Salgado, D.Sc.

Junho de 2018

EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS VEGETAIS NA BIORREMEDIAÇÃO DE UM SOLO CONTAMINADO POR BORRA OLEOSA DO PETRÓLEO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadoras:
Profa. Eliana Flávia Camporese Sérvulo
Profa. Claudia Duarte da Cunha
Profa. Andrea Medeiros Salgado

RIO DE JANEIRO
2018

CIP - Catalogação na Publicação

Duarte Nunes, Danielle Aparecida

D972e Efeito da utilização de resíduos vegetais na biorremediação de um solo contaminado por borra oleosa do petróleo / Danielle Aparecida Duarte Nunes. -- Rio de Janeiro, 2018.

145 f.

Orientador: Eliana Flávia Camporese Sérvulo.

Coorientador: Cláudia Duarte da Cunha.

Coorientador: Andrea Medeiros Salgado.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2018.

1. Biorremediação. 2. Hidrocarbonetos. 3. Resíduos Vegetais. I. Camporese Sérvulo, Eliana Flávia, orient. II. Duarte da Cunha, Cláudia, coorient. III. Título

EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS VEGETAIS NA BIORREMEDIAÇÃO DE UM SOLO CONTAMINADO POR BORRA OLEOSA DO PETRÓLEO

Danielle Aparecida Duarte Nunes

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

Aprovada em 15/06/2018.

Eliana Flávia Camporese Sérvulo D.Sc. (EQ-UFRJ)

Claudia Duarte da Cunha D.Sc. (EQ-UFRJ)

Andrea Medeiros Salgado D.Sc. (EQ-UFRJ)

Vicelma Luiz Cardoso D.Sc. (UFU)

Fernando Jorge Santos de Oliveira D.Sc. (Petrobrás)

Magali Christe Cammarota D.Sc. (EQ-UFRJ)

“Todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus”

(Romanos 8: 28)

A Deus

Por ter me dado a vida e por estar sempre presente nela guiando meus passos, me amparando com imenso amor nos momentos mais difíceis e me dando saúde e forças para superar os obstáculos.

Aos meus queridos pais

João Nunes e Maria das Neves;

Pelo apoio, dedicação, incentivo, exemplo de vida e coragem, e amor incondicional que sempre me ofereceram.

Ao meu esposo

Israel;

Que está metade da minha vida ao meu lado, compartilhando momentos maravilhosos, mas também muito difíceis, sempre acreditando em meu potencial.

Aos meus filhos

Daniel Vinícius e João Lucas;

Que representam o amor, paciência, força e aprendizados que precisei ter para terminar essa etapa.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Nunca pensei que seria tão difícil escrever esta parte da tese! Eu só comecei a escrever e meus olhos se encheram de lágrima. Dessa vez são lágrima de agradecimento. Sim, porque embora eu tenha carregado comigo a frase “no final tudo dá certo” por toda trajetória, ano passado eu cheguei, por um momento, a achar que não conseguiria escrever esta tese. Mas eu consegui!!! Consegui porque percebi muitas mãos se estendendo para mim, e um Deus que me ajudou a buscar forças para superar dias difíceis. Percebi que mais importante que o “final”, eram os aprendizados colhidos durante o caminho, e que nem sempre a hora que escolhemos, ou o tempo que nos dão, é a hora certa. Assim, finalmente pude ver um futuro pela frente. Um futuro que vai muito além da defesa desta tese, que considero etapa muito importante na minha vida.

Começo agradecendo a minha família! Meus pais, marido, irmã, e sobrinha. Meus suportes em todas as áreas da vida. Não sei se seria possível chegar até aqui sem a ajuda e apoio de vocês. Talvez sim, mas o caminho teria sido muito mais árduo e muito menos iluminado com o amor e a força que eu precisava. Os meus filhos, amores eternos, se tornaram um grande motivo de força e incentivo para conquistar este título.

Agradeço muito a minha querida orientadora Eliana Flávia, mãezona de coração, daquelas que sempre teve palavras doces e de conforto para o meu coração, mas que brigava bastante, sempre me dando força, me encorajando, e nunca se esquecendo de dizer que só fazia isso porque gostava de mim. Foi maravilhoso conhecer a sua admiração pela ciência, ter conseguido enxergar a criança amorosa que habita em você e a grande profissional que me inspira tanto. Agradeço grandiosamente pelos conhecimentos a mim concedidos.

À minha querida co-orientadora Cláudia Cunha, uma anjinha que Deus colocou em minha vida após a defesa de qualificação, sempre muito carinhosa, atenciosa, compreensiva, e disposta a passar seus conhecimentos. Ela tornou possível a minha parceria com o CETEM, me ajudou no planejamento estatístico, e possibilitou a realização de algumas análises imprescindíveis para a minha tese.

Agradeço, inclusive, por ter colocado sua irmã Mônica Cunha em meu caminho, uma pessoa e médica dermatologista maravilhosa, que cuidou dos problemas de saúde do meu filho Lucas por diversas vezes, quando eu já estava muito desanimada. Nunca esquecerei o carinho e o apoio de vocês!

À co-orientadora Andréa Medeiros por ter me recebido em seu laboratório na época que precisei, e por se mostrar sempre receptiva, prestativa e carinhosa.

À maravilhosa professora Emanuela que está presente em minha vida acadêmica desde a minha primeira bolsa de IC, pelo seu grande carinho, incentivo, compartilhamento de seus conhecimentos, por me conceder meios para a obtenção e coleta da serapilheira do sabiá, e por permitir que as analises de caracterização dos meus resíduos vegetais fossem realizadas no laboratório de solos da UENF.

Ao querido professor José Carlos Polidoro da EMBRAPA Solos que me acompanha desde o meu estágio da graduação, por seu incentivo e prestatividade, inclusive para realizar as análises de caracterização do solo.

À querida professora Magali Cammarota, pelo carinho, prestatividade e por deixar sua aluna Verônica Marinho que tanto gosto, e sua ex-técnica de laboratório Suzana me auxiliarem em algumas análises químicas.

À linda professora Paula por seu carinho, prestatividade, incentivo e por ser sempre tão receptiva, esclarecendo minhas dúvidas na parte estatística.

À minha grande amiga ju, irmã de coração, co-orientadora informal, ajudante de laboratório, médica, psicóloga e mais um tantão de coisas. Ju, você é um grande presente que o doutorado me trouxe. Não tenho palavras para agradecer tudo o que você fez e ainda faz por mim.

Aos meus amigos de laboratório: Thiago, meu irmãozinho querido que sempre trouxe apoio para o meu coração; Lindomar, pelo seu grande carinho e prestatividade; Cris, por seu coração enorme, seus papos cabeças, almoços compartilhados, e por às vezes me dar uma forcinha nos trabalhos do laboratório; Paulinho, por sua alegria contagiante, e por ter me ajudado diversas vezes na etapa experimental; Diogo, por suas musiquinhas e dancinhas, e por trazer a

calma que eu precisava ter por perto; Vitor, por me ajudar no início do doutorado me apresentando aos “bichinhos do solo”, pelo seu carinho, e as gargalhadas que ainda me arranca; Douglas, pelo seu maravilhoso abraço de urso, que além de me acolher, sempre me trouxe o carinho e a paz que eu precisava; Tio Gui Gui, que apesar de implicante trazia a luz, alegria e as palavras amigas na hora que eu mais precisava (embora ele nem saiba disso); Tamara, por momentos de descontração maravilhosos; Liz, pelas palavras de incentivo; Mari, pelo carinho e preocupação a mim dedicados; Luíz que nos acompanhou por um tempo no laboratório; Querido Fábio sinistrão pelo carinho; e ao novato e alegre Rafael, por tornarem o meu tempo no laboratório mais alegre, feliz e gratificante!

Aos queridos Dani Leonel, Luciano, Fábio e Leonard, por serem tão prestativos, por terem me ajudado nas análises de HTP no CETEM, e por me dedicarem tanto carinho.

Às minhas queridas alunas de IC e filhas de coração, Clara e Nathalie, por me ajudarem a realizar a parte experimental do trabalho, por serem tão lindas, meigas, e inteligentes, para que pudéssemos trocar conhecimentos acadêmicos, profissionais e da vida.

Às estagiárias Amanda e Mari, pelo carinho, por me fazerem ficar até altas horas de quinta e sexta feira junto com minha amiga Jujú para passarmos nossos conhecimentos e aprendermos ao mesmo tempo. Foi gratificante assistir a apresentação de estágio de vocês e perceber o quanto fomos importantes na vidinha de vocês.

Às queridas amigas Verônica Ferreira, Débora Monteiro e Sabrina Mesquita por serem tão especiais, atenciosas, carinhosas e prestativas. As mãos que vocês se prontificaram a me estender, ajudaram a me reerguer em um momento muito difícil. Muito obrigada.

À minha querida amiga Lidiane, desde a graduação, pelo seu apoio e carinho.

Ao meu querido amigo irmão de coração, Rodrigo, por toda ajuda, amor e incentivo dedicados.

À minha querida amiga irmã de coração, Carmen, por todo carinho e apoio.

Ao meu “mundo dos bichos”, em especial dos gatinhos e dos buldogues. Através deles eu enxerguei a vida com outro olhar, o que certamente foi um empurrão para escrever esta tese. Eles me trouxeram grandes amigos (Daniely Ribeiro, Thatiane Balzana, Renan Freitas, Laiza Gomes, Débora vieira, Solange Vidakovics, Camilla, Rodrigo, e muitos outros.), me “levaram” a ajudar em adoções de animais e a trabalhar mais com caridade humana. Sempre aprendo muito com os animais.

Aos meus grandes amigos Leandro, Neia, Priscilla, Valéria e Gabriela por estarem sempre dividindo suas vidas comigo, e por me ofertarem tanto carinho ao longo de anos.

Ao psicólogo Paulo, grande incentivador da escrita deste trabalho, por também me ajudar a enxergar a vida com “outros olhos”. Nunca vou esquecer os seus abraços de urso, e a frase escrita em um papel colado na porta de seu consultório: “Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar o autor da própria história”.

Ao querido professor Perlingeiro (in-memorian), a secretária Alzirene e ao professor Pelegrine pelo carinho dedicado, e por tornarem possível a minha participação no PRH13 da ANP.

Ao Programa de EPQB da UFRJ, e ao Programa de Recursos Humanos da UFRJ (PRH13 – ANP) pelo apoio financeiro concedendo a bolsa de doutorado e a taxa de bancada.

Aos companheiros que não me lembrei de agradecer, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, que considero mais uma vitória em minha vida.

“Melhor é serem dois do que um,... Porque se um cair, o outro levanta o seu companheiro; mas ai do que estiver só, pois caindo, não haverá outro que o levante”

Eclesiastes 4: 9-10

MUITO OBRIGADA!!!

RESUMO

NUNES, Danielle Aparecida Duarte. **Efeito da utilização de resíduos vegetais na biorremediação de um solo contaminado por borra oleosa de petróleo**. 2018. 145 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

A adição de resíduos vegetais em solos contaminados com hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP) pode incrementar a biodegradação destes contaminantes, ao promoverem, principalmente, a melhoria da qualidade nutricional e difusão de oxigênio. O bagaço de cana-de-açúcar (BC) e a serapilheira da leguminosa florestal *Mimosa caesalpiniifolia* (SS) podem ser uma alternativa rentável, particularmente as leguminosas, pela capacidade de associação simbiótica com bactérias fixadoras de N_2, suprindo o solo com N. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição do BC e da SS na biorremediação de um solo de *landfarming* contaminado por borra oleosa do petróleo. Os resíduos vegetais foram avaliados quanto à possível atuação como fonte de C e/ ou N para os microorganismos do solo, e foi verificada a evolução acumulada de CO_2 no solo como medida indireta da biorremediação no solo. Posteriormente foram realizados dois experimentos. O primeiro experimento foi realizado com 1 kg de solo, e avaliou a mistura do BC (20 e 40 g kg^{-1}solo) e SS (10 e 20 g kg^{-1} solo) separadamente ou em combinação na temperatura média de 35°C. A partir destes resultados foi realizado um planejamento fatorial 3^2, que indicou que a associação de BC e SS na concentração de 20 g kg^{-1} promove a maior remoção de HTP. Com esta concentração de BC e SS foi realizado um experimento em maior escala (5kg de solo) em temperatura média de 26°C. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação por 90 dias, a umidade foi ajustada quando necessário ao valor inicial (40%), e periodicamente foi feito o revolvimento do solo. A cada 30 dias, foi avaliada a remoção de HTP, análise de biologia molecular por sequenciamento de nova geração, e o crescimento de bactérias heterotróficas totais (BHT), fungos filamentosos (FF) e microrganismos degradadores de óleo (MDO), cujas concentrações iniciais no solo (controle) foram de 1,12 x 10^8 UFC g^{-1}, 4,35 x 10^4 UFC g^{-1}, e 2,50 x 10^5 NMP g^{-1}, respectivamente. Foi verificado que os microrganismos utilizam o BC como fonte de C, a SS como fonte de C e N, e que a

maior evolução acumulada de CO_2 (7942,49 mg CO_2 kg^{-1} solo) ocorreu nos solos com BC e SS combinados na concentração de 20 g kg^{-1} solo. No experimento em menor escala, o crescimento de BHT, FF, e MDO foi maior nos solos que receberam BC e SS combinados (3, 2 e 5 ordens de grandeza, respectivamente, em relação ao controle). No solo do experimento em maior escala, o crescimento de BHT, FF e MDO foi de 5, 2 e 6 ordens de grandeza maior que no controle. Foi verificada maior abundância da classe Alphaproteobacteria nos solos tratados com SS, grupo geralmente associado a ambientes impactados por HTP. A maior remoção de HTP (33%) foi verificada na combinação de BC e SS na concentração de 20 g kg^{-1} solo, e por ser em solo de área industrial saturado com contaminantes recalcitrantes, é um resultado promissor, podendo ainda promover redução de gastos com fertilização e aeração do solo.

Palavras-chave: biorremediação, hidrocarbonetos, resíduos vegetais.

ABSTRACT

NUNES, Danielle Aparecida Duarte. **Effect of the use of vegetal residues on the bioremediation of a soil contaminated by oil sludge**. 2018. 145 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

The addition of plant residues in soils contaminated with total petroleum hydrocarbons (TPH) may increase the biodegradation of those contaminants mainly by improving the soil nutritional characteristics and the diffusion of gases on it. Sugarcane bagasse (SB) and leaf litter of forest legume called *Mimosa caesalpiniifolia* (LL) can be a feasible alternative, mainly the legumes because of the ability of symbiotic association with N_2-fixing bacteria, supplying the soil with N. The objective of this study was to evaluate the effect of the addition of SB and LL to the bioremediation of a landfarming soil contaminated by oil sludge. It was evaluated whether the plant residues may be C and/ or N sources for microorganisms in soil, and the soil bioremediation was indirectly evaluated by the cumulative CO_2 evolution in the soil containing the plant residues. Subsequently, two experiments were carried out. The first was carried out with 1 kg of soil and SB (20 and 40 g kg^{-1} sol) and LL (10 and 20 g kg^{-1} soil) separately or together at around 35°C. From those results a factorial design 3^2 was carried out, which indicated that the association of SB and SS in the concentration of 20 g kg^{-1} promoted the highest removal of TPH. With that concentration of SB and LL an experiment was carried out on a larger scale (5 kg of soil) at around 26°C. The experiments were conducted in greenhouse for 90 days, the humidity was adjusted when necessary to the initial value (40%), and the soil was revolved periodically. Every 30 days, it was analysed the TPH removal, molecular biology analysis by new generation sequencing, and the growth of total heterotrophic bacteria (THB), filamentous fungi (FF) and oil degrading microorganisms (ODM), which presented as initial (control) as respectively 1.12 x 10^8 CFU g^{-1}, 4.35 x 10^4 CFU g^{-1}, and 2.50 x 10^5 NMP g^{-1}. It was verified that the microorganisms use SB as source of C, LL as source of C and N, and that the largest cumulative CO_2 evolution (7942,49 mg CO_2 kg^{-1} soil) was observed in soils with SB and LL together at 20 g kg^{-1} soil. For the small scale experiment, the growth of THB, FF, and ODM was higher in soils that received SB and LL together (respectively 3, 2 and 5

orders of magnitude, relative to the control). The experiment in large scale showed that the growth of THB, FF and ODM was respectively 5, 2 and 6 orders of magnitude higher than the control. It was observed a greater concentration of the Alphaproteobacteria class in the soil treated with LL, which is a group of microorganisms usually associated with TPH impacted environments. The highest removal of TPH (33%) was verified with SB and LL used together in the concentration of 20 g kg^{-1}. Because it was applied in industrial area soil saturated with recalcitrant contaminants it is a promising result, since it may promote cost reduction for fertilization and aeration of the soil.

Keywords: bioremediation, hydrocarbons, plant residues.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO 1
CAPÍTULO 2: JUSTIFICATIVA 4
CAPÍTULO 3: OBJETIVOS 5
3.1 Objetivo geral 5
3.2 objetivos específicos 5
CAPÍTULO 4: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 6
4.1 Solo: definição, formação e influência sobre a biodegradação de contaminantes 6
4.2 Petróleo: definição, utilização e atividades potencialmente poluidoras e resíduos gerados pela indústria do petróleo 12
4.3 Meio ambiente, solo, e a legislação 16
4.4 Biorremediação de solos contaminados por resíduos do petróleo 21
4.4.1 Biorremediação assistida por microrganismos 23
4.4.2 Fatores que influenciam a atuação dos microrganismos no processo de biorremediação 26
4.4.3 Biologia molecular 29
4.4.4 Técnicas de biorremediação do solo 31
4.4.5 Biorremediação de solo com resíduos do petróleo pela técnica de *landfarming* 33
4.5 Adição de resíduos vegetais como ferramenta auxiliar na biorremediação de solos contaminados 36
4.5.1 Bagaço de cana-de-açúcar 40
4.5.2 Leguminosas florestais 43
CAPÍTULO 5: MATERIAIS E MÉTODOS 46
5.1 Solo: descrição, coleta e preparo 46
5.2 Materiais vegetais: descrição, coleta e preparo 47
5.3 Ensaios preliminares 49
5.3.1 Teste para avaliação dos resíduos vegetais como fonte de C e N para os microrganismos do solo. 49
5.3.2 Evolução de CO_2 acumulado 51
5.4 Avaliação do efeito dos resíduos vegetais na biorremediação do solo 51

5.4.1 Experimento de biorremediação em microcosmo 52
5.4.2 Experimento de biorremediação em escala maior 55
5.5 Procedimentos analíticos realizados com o solo e os resíduos vegetais 56
5.5.1 Elementos químicos 56
5.5.2 Textura 57
5.5.3 Capacidade de retenção de água 58
5.5.4 Umidade 59
5.5.5 pH 59
5.5.6 Determinação de hidrocarbonetos totais do petróleo 59
5.5.7 Bactérias heterotróficas totais 59
5.5.8 Fungos filamentosos 60
5.5.9 Microrganismos degradadores de óleo 61
5.5.10 Biologia molecular do solo pela tecnologia de sequenciamento de nova geração 62
5.5.11 Avaliação da evolução de CO_2 acumulado do solo 63
5.5.12 Planejamento fatorial 3^2 do experimento em microcosmo 63
CAPÍTULO 6: RESULTADOS E DISCUSSÃO 65
6.1 Caracterização do solo 66
6.2 Caracterização dos materiais vegetais 71
6.3 Ensaios preliminares 73
6.3.1 Ensaio para avaliar os resíduos vegetais como fontes de C e N para os microrganismos do solo. 73
6.3.2 Evolução de CO_2 acumulado 75
6.4 Experimento de biorremediação em microcosmo 78
6.4.1 Microbiologia do solo tratado com bagaço de cana-de-açúcar 78
6.4.2 Microbiologia do solo tratado com a serapilheira do sabiá 81
6.4.3 Microbiologia do solo tratado com bagaço de cana-de-açúcar e a serapilheira do sabiá 84
6.4.4 Remoção de hidrocarbonetos totais do petróleo 87
6.4.5 Biologia molecular pela tecnologia de sequenciamento de nova geração 93
6.4.6 Planejamento fatorial 3^2 do experimento em microcosmo 97
6.5 Experimento de biorremediação em escala maior 99
6.5.1 Microbiologia do solo tratado com bagaço de cana-de-açúcar e a 99

serapilheira do sabiá
6.5.2 Remoção de hidrocarbonetos totais do petróleo 102
CAPÍTULO 7: CONSIDERAÇÕES FINAIS 104
CAPÍTULO 8: CONCLUSÕES 105
CAPÍTULO 9: SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 108

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 Representação dos cinco horizontes de um solo maduro 7
Figura 4.2 Composição do solo 8
Figura 4.3 Triangulo textural com as classes da fração terra fina 10
Figura 4.4 Petróleo na matriz energética mundial e brasileira 13
Figura 4.5 Funcionamento de um sistema *Landfarming* 35
Figura 4.6 Ilustração da parede celular vegetal 38
Figura 5.1 Sistema *landfarming* 46
Figura 5.2 Bagaço de cana-de-açúcar 47
Figura 5.3 Serapilheira da leguminosa *Mimosa caesalpiniifolia* (sabiá) 48
Figura 5.4 Ferramenta utilizada para coletar a serapilheira do sabiá 48
Figura 5.5 Teste para avaliar o efeito da adição do bagaço de cana-de-açúcar e da serapilheira do sabiá como fontes de C e N 50
Figura 5.6 Recipiente com NaOH e solo para determinar a evolução de CO_2 51
Figura 5.7 Casa de vegetação onde os experimentos foram conduzidos 52
Figura 5.8 Experimento de biorremediação em microcosmo 52
Figura 5.9 Solo sem e com a adição dos materiais vegetais 53
Figura 5.10 Experimento de biorremediação em escala maior 55
Figura 5.11 Placa de cultura de células de 24 poços 62
Figura 6.1 Composição textural do solo 66
Figura 6.2 Curvas da evolução de CO_2 acumulado dos solos 75
Figura 6.3 Gráfico do crescimento de bactérias heterotróficas totais, fungos filamentosos, e microrganismos degradadores de óleo dos solos com bagaço de cana-de-açúcar do experimento em microcosmo 78
Figura 6.4 Gráfico do crescimento de bactérias heterotróficas totais, fungos filamentosos, e microrganismos degradadores de óleo dos solos com a serapilheira do sabiá do experimento em microcosmo 82
Figura 6.5 Solos do experimento em microcosmo com adição da serapilheira do sabiá e do bagaço de cana-de-açúcar no início e no final do experimento 83
Figura 6.6 Gráfico do crescimento de bactérias heterotróficas totais, fungos filamentosos, e microrganismos degradadores de óleo dos solos com bagaço de cana-de-açúcar e serapilheira do sabiá do experimento em microcosmo 85

Figura 6.7 Gráfico com percentual de remoção dos hidrocarbonetos totais do petróleo do solo do experimento em microcosmo 88
Figura 6.8 Análise de Componentes Principais do solo do experimento em microcosmo 94
Figura 6.9 Classificação taxonômica das sequencias do gene rrs do solo do experimento em microcosmo 95
Figura 6.10 Número de unidades taxonômicas operacionais do solo do experimento em microcosmo 96
Figura 6.11 Diagrama de Pareto obtido através do planejamento fatorial 3^2 do experimento em microcosmo 97
Figura 6.12 Gráfico da superfície resposta para remoção de hidrocarbonetos totais do petróleo do experimento em microcosmo 98
Figura 6.13 Gráfico do crescimento de bactérias heterotróficas totais, fungos filamentosos, e microrganismos degradadores de óleo dos solos com bagaço de cana-de-açúcar e serapilheira do sabiá do experimento em escala maior 100
Figura 6.14 Gráfico com percentual de remoção dos hidrocarbonetos totais do petróleo do solo em escala maior 102

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 Avaliação do crescimento microbiano na presença do bagaço de cana-de-açúcar e da serapilheira do sabiá como fonte de C e N. 50
Tabela 5.2 Descrição do experimento de biorremediação em microcosmo 54
Tabela 5.3 Parâmetros avaliados durante os experimentos de biorremediação 54
Tabela 5.4 Composição do meio de cultivo Agar Nutriente 60
Tabela 5.5 Composição do meio de cultivo Agar Sabouraud 61
Tabela 5.6 Composição do meio de cultivo Bushnell Haas. 62
Tabela 5.7 Descrição do experimento analisado estatisticamente pelo planejamento fatorial 3^2 64
Tabela 6.1 Caracterização físico-química, química e microbiológica das amostras de solo coletadas no sistema *landfarming* de refinaria 68
Tabela 6.2 Caracterização dos resíduos vegetais 71
Tabela 6.3 Relações entre alguns componentes presentes nos resíduos vegetais 72
Tabela 6.4 Resultado da avaliação do crescimento microbiano na presença do bagaço de cana-de-açúcar e da serapilheira do sabiá como fonte de C e N 74
Tabela 6.5 Analise de variância do delineamento experimental fatorial 3^2 97

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1 Composição textural do solo 9
Quadro 4.2 Geração de borra oleosa nas refinarias brasileiras 15
Quadro 4.3 Lista de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos que representam risco a saúde humana e ambiental 16
Quadro 4.4 Valores de referência para alguns contaminantes de solos e águas subterrâneas (CONAMA) 18
Quadro 4.5 Lista holandesa com valores de referência para alguns contaminantes em solos (CETESB) 20
Quadro 4.6 Tecnologias de remediação para descontaminação de solos 22
Quadro 4.7 Custos de alguns tratamentos utilizados para remediação de solos contaminados 23
Quadro 4.8 Composição da cana-de-açúcar e de sólidos solúveis no caldo 41
Quadro 4.9 Composição química do bagaço de cana-de-açúcar 42
Quadro 6.1 Referências de trabalhos com remoção de hidrocarbonetos totais do petróleo em solos que receberam bagaço de cana-de-açúcar 89

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 5.1 Cálculo para quantidade de silte 58
Equação 5.2 Cálculo para quantidade de argila 58
Equação 5.3 Cálculo para quantidade de areia 58
Equação 5.4 Cálculo para capacidade de retenção de água 58
Equação 5.5 Equação do planejamento estatístico 3^2 utilizado no trabalho 96

LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Analise de variância
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Bicombustíveis
BDO	Bactérias Degradadoras de óleo
BHT	Bactérias Heterotróficas Totais
BTEX	Hidrocarbonetos monoaromáticos (benzeno, tolueno, etil-benzeno e xileno)
CETEM	Centro de Técnologia Mineral
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
CRA	Capacidade de Retenção de Água
DGGE	Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (Denaturing Greadient Gel Eletrophoresis)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPE	Empresa de Pesquisa Energética
FF	Fungos Filamentosos
HGS	Sequenciamento em larga escala (High throughput sequencing)
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HTP	Hidrocarbonetos Totais do Petróleo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ITOPF	International Tanker Owners Pollution Federation Limited
MOS	Matéria Orgânica do Solo
NGS	Sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing)*
POAs	Processos oxidativos avançados
PRH	Programa de Recursos Humanos
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
UENF	Universidade Estadual do Norte Fluminense
UTOs	Unidades Taxonômicas Operacionais

USEPA	United States Environmental Protection Agency
VRQ	Valores de referência de Qualidade

Capítulo 1

Introdução

A conscientização da população acerca dos perigos provocados pelos constituintes do petróleo tem refletido em esforços das comunidades científicas e políticas. Não obstante, mundialmente, o desenvolvimento tecnológico e a oferta de bens de consumo ainda são fortemente atrelados ao petróleo. Esta matéria prima fóssil tem sido a principal causa de contaminação do meio ambiente devido a vazamentos e derramamentos acidentais, e a disposição inadequada de resíduos produzidos durante a exploração, refino, transporte e operações de armazenamento do petróleo e seus derivados (SINGH E LIN, 2008; ANDRADE et al., 2010). Aproximadamente 40 milhões de litros de óleo e derivados são frequentemente lançados acidentalmente no meio ambiente, impactando solos, rios, manguezais e praias no Brasil entre 1975 e 2004 (ACSELRAD E MELLO, 2002).

No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) através da resolução n° 420, de 28 de dezembro de 2009, dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas. Quando ocorrem acidentes ambientais, ou falhas nas medidas de controle que evitam a contaminação dos diferentes ecossistemas, e o nível das substâncias estão acima do permitido pela legislação, o foco tende a ser o tratamento das áreas contaminadas (CONAMA, 2014).

O solo, dentre os recursos naturais existentes no planeta, é o que mais sofre danos como consequência de atividades antropogênicas, devido ao seu grau de exposição. Por sua vez, a contaminação de um solo pode provocar múltiplas consequências negativas para a cadeia alimentar, para a saúde pública e para os diversos recursos naturais (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006). Portanto, uma vez contaminado, o solo deve ser recuperado, existindo diferentes alternativas tecnológicas disponíveis. A escolha deve levar em consideração a urgência de ações corretivas, os níveis de remediação desejados e as tecnologias aplicáveis (CERQUEIRA et al., 2014). Tem sido consenso contemplar eficiência da descontaminação, simplicidade na execução, curto tempo e baixo custo (ROS et al.,

2010). Neste contexto, cresce o interesse pela biorremediação, técnica utilizada para descontaminação do solo pela ação efetiva de microrganismos. Neste processo deve-se estimular a atividade dos microrganismos degradadores do(s) poluente(s) mediante adequação das condições do ambiente a fim de assegurar seu pleno metabolismo (HAMZAH et al., 2014). Muitas vezes há necessidade de se adotar medidas para aumentar a biomassa microbiana do solo através da adição de microrganismos (bioaumento) e/ou adicionar fontes nutricionais e/ou oxigênio (bioestímulo), buscando potencializar a atividade dos microrganismos degradadores dos poluentes em questão (LUKIĆ et al., 2017). Em alguns casos, foi possível recuperar solos contaminados artificialmente com total mineralização do poluente orgânico sem geração de resíduos secundários (ANASTASI et al., 2008; FARHADIAN et al., 2007), entretanto, ainda não foram encontrados dados indicando a biorremediação total de áreas reais.

O *Landfarming* é uma técnica de biorremediação muito utilizada para resíduos gerados pela indústria do petróleo, se destacando pela relativa eficiência na remoção de óleos e graxas presentes no solo, simplicidade e baixo custo operacional (LUKIĆ et al., 2017). Nesta tecnologia o resíduo oleoso é incorporado ao solo, sob condições controladas, para promover a degradação e imobilização dos contaminantes perigosos nele presentes, pelas bactérias autóctones. Tipicamente, o resíduo oleoso é aplicado à superfície de uma área e misturado com o solo por meio de equipamentos convencionais como tratores e/ ou grades. Entretanto, a eficácia é relativa, já que não possibilita a remoção total dos compostos, especialmente os mais recalcitrantese tóxicos (CERQUEIRA et al., 2014). Logo, é importante estabelecer medidas que possam auxiliar na biodegradação de hidrocarbonetos nestes sistemas de biorremediação.

Uma das estratégias que podem ser utilizadas é a incorporação de materiais vegetais no solo (CHEN et al., 2015). O aumento da matéria orgânica no solo visa tornar mais eficiente a ciclagem e mobilização dos nutrientes, melhorar as propriedades físicas do solo, e ainda contribuir para a drenagem de água e difusão de oxigênio, entre outros benefícios (ITOPF, 2012; SHAHSAVARI et al., 2013; HAMZAH et al., 2014). Os resíduos vegetais podem estimular a atividade dos microrganismos degradadores de óleo e consequentemente a remoção de hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP). A susceptibilidade dos vegetais à

decomposição está associada à sua composição química quanto aos teores de celulose, hemicelulose, lignina e polifenóis e às relações entre constituintes, tais como C/N, C/P, lignina/N, polifenóis/N (NDAW et al., 2009).

O bagaço de cana-de-açúcar, resíduo oriundo da moagem da cana, é abundante no Brasil (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2014), e tem sido apontado na literatura por favorecer a biodegração de HTP em solos artificialmente contaminados (MOLINA-BARAHONA et al., 2004; TREJO-HERNÁNDEZ et al., 2007; GARCÍA-TORRES et al., 2011; CUEVA-DÍAS et al., 2017). Entretanto, é preciso que seja dado uma ênfase maior na utilização deste material orgânico quando incorporado a solos de áreas industriais saturadas com hidrocarbonetos extremamente recalcitrantes como o *Landfarming*. Uma estratégia pode ser utilizar a ação conjunta de diferentes tipos de resíduos vegetais. A serapilheira de leguminosas florestais como a *Mimosa caesalpiniifolia* (sabiá) pode ser uma boa alternativa. As leguminosas apresentam teores elevados de nutrientes em sua composição (principalmente N), por realizarem associação com bactérias fixadoras de N_2 e fungos micorrízicos em suas raízes (NUNES et al., 2016). Assim, a adição combinada de bagaço de cana-de-açúcar e da serapilheira da leguminosa sabiá, pode ser uma alternativa eficaz a baixo custo, quando comparada a outros tratamentos de biorremediação para recuperar solos contaminados por petróleo e seus derivados (NIKOLOPOULOU et al., 2013; SHAHSAVARI et al., 2013).

Capítulo 2

Justificativa

Alguns trabalhos já avaliaram o efeito da adição do bagaço de cana-de-açúcar (BC) em solos contaminados, demonstrando que seu emprego pode favorecer a biodegração de hidrocarbonetos do petróleo (HTP). Entretanto, cabe salientar que estas pesquisas foram desenvolvidas na maioria das vezes com solos artificialmente contaminados, e que ainda não foi possível obter 100% de degradação nas poucas pesquisas realizadas com solo de áreas reais. Além disso, não existe, na literatura científica, informação referente à utilização da serapilheira do sabiá (SS), ou da mesma associada à adição do BC ao solo. Tanto o BC como a SS podem atuar como fonte de C, na difusão de oxigênio, na retenção de umidade no solo, e na melhoria da textura do solo. A relevância do emprego da SS reside especialmente na capacidade de adicionar nutrientes no solo, especialmente N. Por serem leguminosas, estas plantas são reconhecidas por realizarem associação biológica com bactérias fixadoras de N_2 e fungos micorrízicos em suas raízes, o que promove a melhoria na absorção de nutrientes. Sendo assim, juntos, o BC e a SS podem ser uma alternativa eficaz, e de relativo baixo custo, capaz de diminuir gastos com fertilização e aeração do solo, práticas freqüentemente adotadas em tratamentos biológicos como o *landfarming*.

Capítulo 3

Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da adição do bagaço de cana-de-açúcar (BC) e da serapilheira da leguminosa florestal *Mimosa caesalpiniifolia* - sabiá (SS) na biorremediação de um solo contaminado por borra oleosa do petróleo proveniente de um sistema *landfarming* de refinaria.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar se o BC e a SS atuam como fonte de C e N para os microrganismos presentes no solo, e avaliar a evolução de CO_2 acumulada no solo durante 91 dias de incubação, quando o BC e a SS foram adicionados separadamente ou de forma combinada em diferentes quantidades;

- Avaliar a remoção de hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP) e o crescimento das populações de bactérias heterotróficas totais (BHT), fungos filamentosos (FF), e de microrganismos degradadores de óleo (MDO) em solos com diferentes concentrações de BC e SS adicionados no solo separadamente ou combinados ao longo de 90 dias, e realizar análise taxonômica do solo com base em sequências do gene 16S rRNA utilizando sequenciamento em larga escala;

- Utilizar a proporção de resíduo vegetal indicada como mais eficiente no experimento anterior para avaliar o efeito da incorporação dos resíduos vegetais ao solo, e da adição dos resíduos vegetais somente em superfície, sobre a remoção de HTP e crescimento das populações de BHT, FF, MDO.

Capítulo 4

Revisão Bibliográfica

4.1 Solo: definição, formação e influência sobre a biodegradação de contaminantes

A compreensão humana sobre o solo e a sua importância vem de muito mais tempo do que tem sido escrito até hoje na literatura (COLEMAN et al., 2018). Existem várias definições para solo (OLIVEIRA, 2008; SPOSITO, 2008; KER et al., 2012). De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2013), que concentra um grande número de especialistas em solo e agricultura, tem-se como definição:

> *"Solo é uma coleção de corpos naturais constituído por partes sólidas, líquidas e gasosas, formado por materiais minerais e orgânicos que ocupam a maior parte do manto superficial das extensões continentais do nosso planeta. Ele contém matéria viva, pode ser vegetado na natureza onde ocorre e, eventualmente, pode ter sido modificado por interferências antrópicas"*.

O solo apresenta camadas organizadas de forma aproximadamente paralelas, denominadas horizontes. Essas camadas distinguem-se do material de origem, as rochas, por ação do intemperismo e da pedogênese. O intemperismo é um processo de desagregação e desintegração, enquanto a pedogênese compreende etapas de adição e/ou perda de materiais orgânicos e inorgânicos no solo, transporte/ translocação de materiais de origem biótica ou abiótica, solidificação de matéria orgânica e transformação, por exemplo, de minerais primários e secundários (OLIVEIRA, 2008; CLEMENTE et al., 2015). Estes processos ocorrem ao longo do tempo, sob a influência dos fatores de formação bióticos (organismos) e abióticos (clima e relevo), o que faz com que os horizontes apresentem pouca ou grande diferenciação pedológica em relação à rocha originária em função dos processos pedogenéticos (EMBRAPA, 2013).

O tipo e a intensidade do intemperismo dependem diretamente da temperatura, pluviosidade e vegetação onde o solo se encontra. Em regiões de temperatura e pluviosidade baixas o intemperismo físico predomina. Já nos trópicos,

que é o caso do Brasil, onde as temperaturas são mais elevadas e as chuvas são mais frequentes, a ação biológica é mais intensa, e o intemperismo químico é preponderante (ALMEIDA, 2013).

Uma vez que o solo está sujeito à ação dos fatores de formação, em um processo evolutivo ininterrupto, o número de horizontes que o solo apresenta varia com o tipo e o estágio de evolução do solo. Um solo maduro é um solo totalmente formado, apresentando cinco diferentes horizontes (O, A, B, C e R) que se separam um do outro de maneira gradativa, sendo possível observar regiões intermediárias que apresentam características mistas, tanto na camada superior quanto na inferior (EMBRAPA, 1983), como pode ser visto na Figura 4.1.

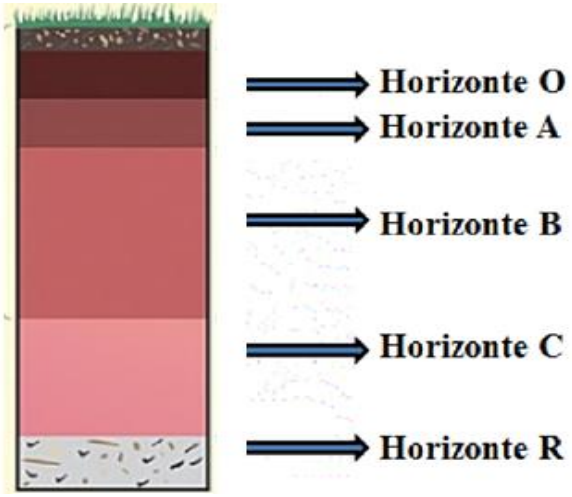


Figura 4.1 Cinco horizontes de um solo maduro. Fonte: Adaptado de LEPSCH (2016).

O horizonte superficial (horizonte O) é a camada mais superficial do solo. Nele, a matéria orgânica apresenta pouca ou nenhuma decomposição. O horizonte A é considerado como camada mineral que apresenta atividade biológica intensa, e muita matéria orgânica decomposta. O horizonte B apresenta uma camada muito influenciada pelos fatores pedogenéticos, rica em óxidos iônicos e com pouca ou nenhuma estrutura da rocha original, que se diferencia do C, por esse horizonte ser uma camada mineral pouco afetada pelos processos pedogenéticos, e que pode ainda conter a rocha matriz, que é caracterizadopelo Horizonte R (EMBRAPA, 1983; IBGE, 2007; OLIVEIRA, 2008).

O solo é constituído por cerca de 25 de ar, 25 de água, 45% de minerais e 5% de matéria orgânica, conforme ilustrado na Figura 4.2.

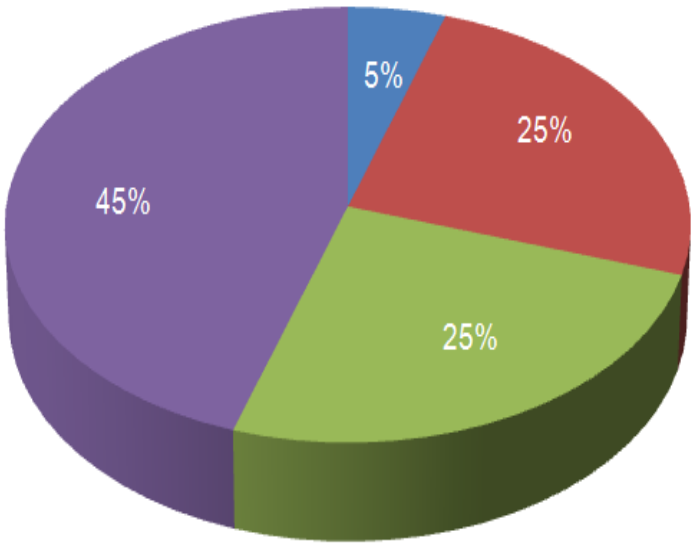


Figura 4.2 Representação da composição do solo. Fonte: Adaptado de RESENDE et al. (1996).

De acordo com LUCHESE et al. (2001), a parte sólida do solo é formada por minerais provenientes da decomposição da rocha mãe, matéria orgânica, e organismos vivos. A parte líquida do solo encontra-se nos espaços vazios da fase sólida, denominados poros do solo. Ela também pode ser chamada de solução do solo, sendo constituída por água e íons dissolvidos, tais como $H_2PO_4^-$, SO_4^{2-}, NO_3^-, Na^+, K^+, Cl^-, Ca^{2+}, H^+, NH_4^+, entre outros, podendo preencher totalmente os poros do solo, levando à sua saturação, ou parcialmente. A parte gasosa, ou ar do solo, apresenta volume inversamente proporcional ao da parte líquida, de modo que quando um solo apresenta a capacidade máxima de retenção de água, o teor de ar desse solo tende a zero. Gases como CO_2, O_2, NH_3 e vapor de água são os constituintes normais da fase gasosa. Em condições normais, o conteúdo de CO_2 no solo é maior que o de O_2, como resultado do metabolismo microbiano e da lenta velocidade de difusão de ambos os gases.

A organização das partículas do solo e o espaço poroso formado entre elas resultam em unidades básicas da estrutura do solo que recebem o nome de agregados. Esses agregados podem apresentar tamanhos diferentes, de modo que se acredita que, para uma boa estrutura, o solo deva apresentar agregados com diâmetro entre 1 a 10 mm. Estes devem ser estáveis quando molhados e conter grande quantidade de poros com mais de 75 µm de diâmetro para permanecerem

aeróbios, embora devam apresentar, também, poros com diâmetro de até 30 µm para reter água suficiente para os microrganismos (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006).

A parte sólida do solo compreende a fração mineral. Os minerais são divididos de acordo com o diâmetro. São chamados de areia, silte e argila, conforme apresentado no Quadro 4.1.

Quadro 4.1 Composição textural do solo. Fonte: IBGE (2007).

Fração	**Diâmetro (mm)**
Argila	< 0,002
Silte	0,002 - < 0,05
Areia fina	0,05 - < 0,2
Areia grossa	0,2 - < 2

A fração argila apresenta grande capacidade para retenção de compostos poluentes, especialmente os compostos polares, ou seja, aqueles que apresentam grupos funcionais reativos (carboxilas, hidroxilas, fenilas, aminas ou amidas), sobretudo em decorrência da elevada superfície específica desses minerais. As partículas de silte também apresentam forte interação entre si, o que confere a elas menor permeabilidade e maior capacidade de retenção de água (CRA) do que a fração areia. As partículas de areia, por apresentarem maior tamanho, têm superfície específica reduzida, realizando fracas interações de coesão e adesão, o que confere aos solos arenosos uma alta permeabilidade, alta porosidade, e uma menor capacidade de retenção de água e, inclusive, compostos poluentes (OLIVEIRA E REGITANO, 2009). Dependendo do teor de areia, silte e argila (Quadro 4.1), Os solos podem ser classificados como: arenosos, siltosos, argilosos, areia-francos, francos, francoargiloarenosos, francoargilosos, francoarenosos, argiloarenosos, muito argilosos, argilossiltosos, francoargilossiltosos e francosiltosos (Figura 4.3) (IBGE, 2007).

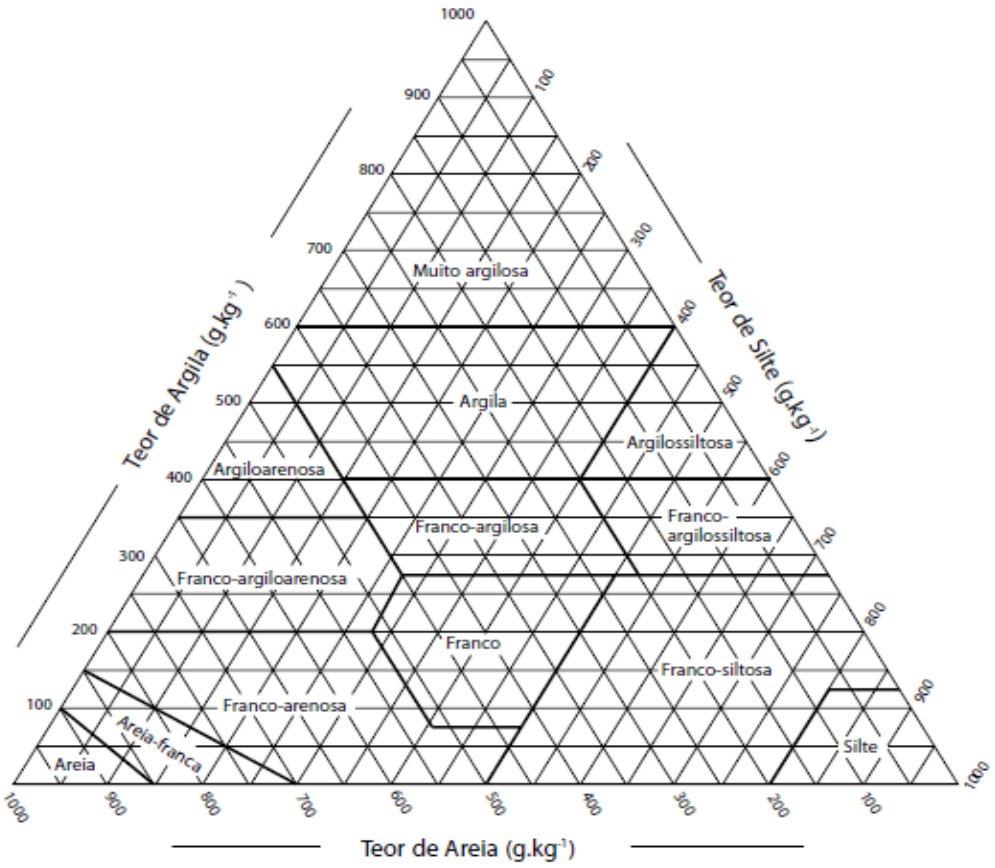


Figura 4.3 Triangulo textural com as classes da fração terra fina. Fonte: IBGE (2007).

Os termos granulometria ou composição granulométrica somente devem ser empregados quando se refere ao conjunto de todas as frações ou partículas do solo, desde as mais finas de natureza coloidal (argilas), até as mais grosseiras (calhaus e cascalhos). Quando a caracterização física do solo analisa somente a composição granulométrica da terra fina do solo (fração menor que 2 mm de diâmetro), o termo empregado deve se textura (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006).

No Brasil, o teor de silte nos solos geralmente não é elevado, exceto para a maioria dos Cambissolos. Os teores de areia fina, quando são muito maiores do que os de areia grossa, contribuem para o aumento da disponibilidade de água. A maioria dos solos no território nacional, denominados de Latossolos, apresentam elevados teores de argila, são ricos em óxidos de Fe e Al e reconhecidamente fixadores de fósforo (EMBRAPA, 2013).

A fração sólida que corresponde à fração orgânica do solo é chamada de matéria orgânica do solo (MOS). Ela é constituída basicamente por C, H, O, N, S e

P, sendo que o C compreende cerca de 58% da MOS, e por isso o teor de C orgânico (Co) do solo está diretamente relacionado ao teor de MOS, ou seja, quanto maior o teor de C, maior o conteúdo de MOS, e o H representa 6%, O 33%, e N, S e P contribuem com cerca de 3% cada (SILVA E MENDONÇA, 2007).

O solo como recurso natural básico é um componente fundamental para os ecossistemas e ciclos naturais, tendo como funções o armazenamento de água, fornecimento de suporte à atividade agrícola e espaço para as atividades humanas. No entanto, a integridade deste recurso algumas vezes é comprometida pelas atividades humanas inerentes ao desenvolvimento socioeconômico (COLEMAN et al., 2018). Por exemplo, as atividades industriais, particularmente as relacionadas à exploração, processamento e transporte de petróleo, são frequentemente apontadas como potencialmente nocivas aos seres humanos e ao meio ambiente por acarretarem a contaminação do solo e muitas vezes atingirem lençóis freáticos tornando a água imprópria para o consumo (ATLAS E HAZEN, 2011).

A contaminação do solo pode ser definida como a presença de produtos químicos tóxicos em concentrações altas o suficiente para trazerem risco a saúde humana e o ecossistema circundante. Além disso, mesmo quando as concentrações de contaminantes nos solos não são muito altas em relação ao que é recomendado pela legislação local vigente, leva-se em conta o aumento nas concentrações de contaminantes (LUKIĆ et al., 2017).

Quando o solo sofre uma contaminação, o destino da substância contaminante é função das características do solo, tais como mineralogia da fração argila, matéria orgânica, agregação, e biodiversidade, aliadas a parâmetros ambientais, tais como, temperatura, umidade, e aeração (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006).

As propriedades físicas (ex.: textura, permeabilidade, capacidade de absorver água, densidade) e químicas (ex.: presença e conteúdo de matéria orgânica, de macronutrientes e de micronutrientes, carga iônica e salinidade) de um solo afetam diretamente a diversidade e atividade dos microrganismos nele presentes, ditos autóctones (COLEMAN et al., 2018). A composição granulométrica do solo interfere diretamente na capacidade de retenção dos contaminantes presentes no solo e, portanto, na degradação dos mesmos pelos microrganismos, pois dificulta ou até mesmo pode impedir o acesso dos microrganismos aos contaminantes. Em estudos

de biorremediação a caracterização física do solo é fundamental e frequentemente realizada (OLIVEIRA E REGITANO, 2009).

Entre os componentes do solo capazes de influenciar os processos de retenção e transformação de moléculas orgânicas contaminantes, a fração orgânica do solo ocupa o papel mais importante. Esta fração serve como fonte de energia e nutrientes, favorecendo a atividade de microrganismos capazes de realizar a biodegradação, atua como fonte de sítios ativos para o processo de retenção dessas substâncias, e serve como estabilizadora de agregados, que ajudam a diminuir a porosidade do solo e, portanto, a reter os contaminantes. Estes benefícios podem ser especialmente observados quando a fração orgânica é maior que 20 g kg^{-1} e os solos apresentam uma boa disponibilidade de água (OLIVEIRA E REGITANO, 2009).

A fração orgânica do solo, apesar de ser continuamente alterada, contribui muito para a degradação de compostos poluentes como os hidrocarbonetos do petróleo (HTP) pelos microrganismos e pode desempenhar um papel importante na sorção de contaminantes do solo (OLIVEIRA, 2008).

A contaminação do solo é um dos principais problemas ambientais. Apesar disso, por muito tempo, não foi dada a devida atenção ao descarte de lixo, produtos químicos e resíduos industriais. Como resultado tem-se diversas e extensas áreas inviáveis à prática da agricultura ou construção de moradias. Por isso, atualmente, busca-se formas de recuperar estas áreas, visando principalmente à implementação de técnicas eficazes e de custo acessível de acordo com o que se deseja.

4.2 Petróleo: definição, utilização e atividades potencialmente poluidoras e resíduos gerados pela indústria do petróleo

O petróleo é um recurso natural de origem biogênica, constituído por uma mistura complexa de vários compostos. Ele apresenta como fração majoritária os hidrocarbonetos, que são compostos formados por átomos de carbono (C) e hidrogênio (H), e podem ser classificados como alifáticos e aromáticos (ROBERTS, 1998; THOMAS, 2004). Até hoje o petróleo é considerado uma matéria prima essencial à vida moderna, servindo como componente básico para muitos produtos, dentre os quais: gasolina, combustível de aviação, gás de cozinha, lubrificantes, borrachas, plásticos, tecidos sintéticos, tintas e até mesmo energia elétrica,

destacando-se na matriz energética mundial e brasileira, conforme pode ser visto na Figura 4.4.

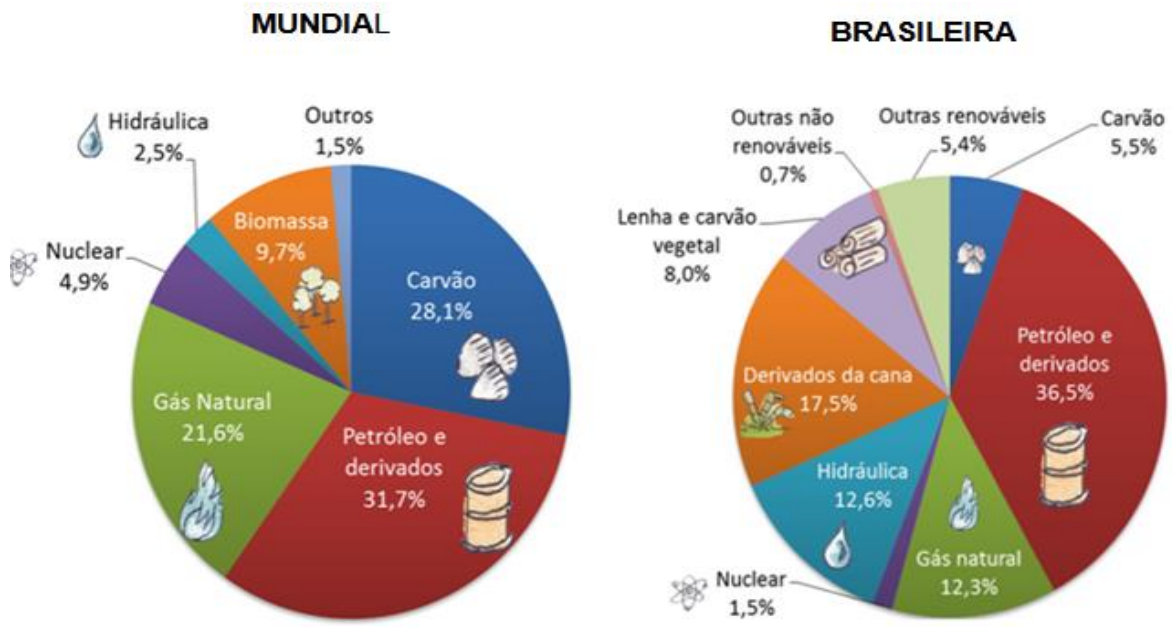


Figura 4.4 Petróleo na matriz energética mundial e brasileira. Fonte: Adaptado da EPE (2016).

Apesar da grande importância do petróleo para a população mundial, desde a sua exploração até a comercialização de seus derivados, ocorrem alguns impactos ambientais (LIM et al., 2016). Estes impactos negativos, aliados à disposição inadequada de resíduos, fez com que o crescimento das atividades industriais no Brasil e no mundo fosse acompanhado pelo aumento dos problemas ambientais, já que a natureza hidrofóbica dos hidrocarbonetos de petróleo os torna recalcitrantes e persistentes no ecossistema, e isso, ao longo do tempo, resulta no surgimento de áreas contaminadas e degradadas (ROY et al., 2014).

Com os frequentes desastres ambientais gerados pela disposição inadequada de resíduos, especialmente os provenientes da indústria do petróleo, e em virtude do desconhecimento acerca dos males causados por eles à saúde humana e ao meio ambiente, atualmente vem sendo dado um grande enfoque na luta pela proteção a um meio ambiente ecologicamente equilibrado, conforme inclusive preleciona a constituição, de maneira que o tratamento desses resíduos acarrete no menor custo possível.

De acordo com o Ministério do Meio Ambiente (2014), a geração de resíduos provenientes das indústrias é um assunto que vem sendo discutido há algumas décadas nas esferas nacionais e internacionais. Assim, a complexidade das atuais demandas ambientais, sociais e econômicas induz a um novo posicionamento da sociedade civil e da iniciativa privada, de modo que a aprovação da Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS), após vinte e um anos de discussões no Congresso Nacional, tenha marcado o início de uma forte articulação institucional envolvendo União, Estados e Municípios, o setor produtivo e a sociedade em geral, na busca de soluções para os problemas na gestão dos resíduos sólidos que comprometem a qualidade de vida dos brasileiros.

Os resíduos gerados pelas indústrias do petróleo merecem destaque entre os resíduos industriais perigosos. O petróleo cru é a principal matéria prima das refinarias. Por ser uma mistura complexa de compostos orgânicos, com predominância de hidrocarbonetos e frações menos representativas de enxofre, nitrogênio, oxigênio, cálcio e elementos como vanádio, níquel, sódio, cobre e urânio, o petróleo permite inúmeras sínteses. O máximo aproveitamento do potencial energético do petróleo é obtido quando os hidrocarbonetos que o compõem são separados mediante um processo de beneficiamento conhecido como refino (GURGEL et al., 2009).

As refinarias de petróleo utilizam e geram uma grande quantidade de compostos químicos, muitos dos quais deixam as unidades de processamento sob a forma de emissões atmosféricas, efluentes líquidos ou resíduos sólidos. Elas respondem pela maior parte dos resíduos gerados, entre os quais merecem destaque os produtos acumulados no fundo dos tanques de óleo cru, lodos oleosos, lodos das torres de resfriamento, catalisadores gastos, resíduos das torres de troca de calor, finos de coque e águas residuárias (RIZZO et al., 2006).

Tanto as operações realizadas a montante e a jusante do processo de produção do petróleo podem gerar uma grande quantidade de resíduos oleosos. O petróleo bruto, antes de ser refinado, fica temporariamente alojado em tanques de armazenamento. Os sedimentos que ficam no fundo dos tanques de armazenamentos representam a borra oleosa do petróleo. Esse resíduo oleoso é composto basicamente de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos, água e sólidos,

em proporções variadas, e uma pequena quantidade de metais pesados (FRANCISCO E FRANÇA, 2007).

A quantidade de borra gerada pelo processo de refino do petróleo depende de vários fatores, por exemplo: propriedades do óleo bruto (densidade e viscosidade, entre outros parâmetros), esquema de processamento da refinaria, armazenamento de óleo, e mais importante, a capacidade de refino (HU et al., 2013). Partindo do princípio de que o petróleo apresenta cerca de três percentuais de geração de borras oleosas geradas com base nas cargas de petróleo processadas: 0,1% (baixa geração de borras oleosas-petróleos leves), 0,5% (geração intermediária) e 1,5% (alta geração - petróleos pesados) (SILVA, 2013), e considerando a capacidade de refino apresentada pela Agência Nacional de Petróleo e Gás (ANP), em 2017, foi possível estimar a geração de borras oleosas para as refinarias brasileiras (Quadro 4.2), embora ainda se espere que a quantidade total de lodo oleoso aumente, uma vez que a demanda por produtos petrolíferos refinados em todo o mundo é crescente.

Quadro 4.2 Geração de borra oleosa nas refinarias brasileiras. Fonte: Anuário estatístico da ANP (2017).

Refinarias	**Carga processada (barril/ dia)**	**Borras oleosas em relação ao percentual de carga processada (m^3/ dia)**		
		0,1%	**0,5%**	**1,5%**
Manguinhos (RJ)	1.028	1,0	5,1	15,4
Lubnor (CE)	8.823	8,8	44,1	132,3
Recap (SP)	52.605	52,6	263,0	789,1
Reduc (RJ)	114.548	114,5	572, 7	1.718,2
Refap (RS)	127.609	127,6	638,0	1.914,1
Regap (MG)	148.396	188,4	741,9	2.225,9
Reman (AM)	30.690	30,7	153,5	460,4
Repar (PR)	152.314	152,3	761,6	2.284,7
Replan (SP)	306.742	306,7	1.533,7	4.601,1
Revap (SP)	197.845	197,8	989,2	2.967,7
Rlam (BA)	217.207	217,2	1.086,0	3.258,1
RPBC (SP)	135.915	135,9	679,6	2.038,7
RPCC (RN)	33.384	33,4	166,9	500,8
Rnest (PE)	73.056	73,0	365,3	1.095,8
Dax Oil (BA)	655	0,655	3,3	9,8
TOTAL	**1.601**	**1.578**	**8.004**	**24. 012**

4.3 Meio ambiente, solo, e a legislação

Entende-se por áreas contaminadas, locais que contenham quantidades ou concentrações de quaisquer substâncias ou resíduos em condições que causem ou possam causar danos à saúde humana, ao meio ambiente ou a outro bem a proteger, que nelas tenham sido depositados, acumulados, armazenados, enterrados ou infiltrados de forma planejada, acidental ou até mesmo natural (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2014). No solo, os contaminantes podem concentrar-se em diferentes compartimentos, como por exemplo, nos sedimentos, nas rochas, nos materiais utilizados para aterrar os terrenos, nas águas subterrâneas, ou, de uma forma geral, nas zonas saturada e insaturada do solo (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2014).

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA), 16 HPAs são considerados prioritários para monitoramento ambiental em função de sua carcinogenicidade e ocorrência (Quadro 4.3).

Quadro 4.3 Lista de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) que representam risco a saúde humana e ambiental. Fonte: EPA (2008).

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
Antraceno
Benzo[a]antraceno
Benzo[a]pireno
Benzo[b]fluoranteno
Benzo[e]pireno
Benzo[g,h,i]perileno
Benzo[k]fluoranteno
Coroneno
Criseno
Dibenzo[a,h]antraceno
Fenatreno
Fluoranteno
Fluoreno
Indeno[1,2,3-c,d] pireno
Metilfenantrenos + Metilantracenos
Pireno

A contaminação de solos por hidrocarbonetos não é uma novidade. Há registros desse tipo de poluição desde 1754 (SANTOS et al., 2002). A alta variabilidade no total de locais potencialmente contaminados depende dos critérios

adotados por cada país para definir a contaminação do local. Por exemplo, em alguns países, áreas potencialmente contaminadas incluem aquelas onde nenhuma evidência de contaminação foi encontrada, mas atividades potencialmente poluidoras são conduzidas. Alguns países consideram locais contaminados quando a contaminação é determinada através de análises, enquanto outros países só consideram áreas contaminadas de grande impacto nacional (LUKIĆ et al., 2017).

No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2014) dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas na resolução n° 420, de 28 de dezembro de 2009 e, atualmente, esses valores são adotados pelo Ministério do Meio Ambiente para todos os Estados da federação. A resolução dispõe sobre os valores de referência de qualidade (VRQ) para substâncias químicas no solo e em águas subterrâneas que representam risco à saúde humana e ao meio ambiente (Quadros 4.4). No Quadro 4.5 estão apresentados os valores de orientação de qualidade do solo considerando-se um teor de argila de 25% e de matéria orgânica de 10% de acordo com a Lista Holandesa apresentada pela CETESB (2014). O valor de prevenção é referente à concentração de determinada substância, acima da qual podem ocorrer alterações prejudiciais à qualidade do solo e da água subterrânea, e o valor de Intervenção é a concentração de determinada substância acima da qual existem riscos potenciais, diretos ou indiretos, à saúde humana.

Quadro 4.4 Valores de referência orientadores de qualidade para alguns contaminantes de solos e águas subterrâneas. Fonte: CONAMA (2009).

Substâncias	CAS n°	Solo (mg.kg^{-1} de peso seco)					Água subterrânea (µg.L^{-1})
		Ref. de qualidade	Pre-venção	Investigação			Investigação
				Agrícola APMax	Resi-dencial	Indus-trial	
Inorgânicos							
Alumínio	7429-90-5	E*	-	-	-	-	3.500
Antimônio	7440-36-0	E	2	5	10	25	5
Arsênio	7440-38-2	E	15	35	55	150	10
Bário	7440-39-3	E	150	300	500	750	700
Boro	7440-42-8	E	-	-	-	-	500
Cádmio	7440-48-4	E	1,3	3	8	20	5
Chumbo	7440-43-9	E	72	180	300	900	10
Cobalto	7439-92-1	E	25	35	65	90	70
Cobre	7440-50-8	E	60	200	400	600	2.000
Cromo	7440-47-3	E	75	150	300	400	50
Ferro	7439-89-6	E	-	-	-	-	2.450
Manganês	7439-96-5	E	-	-	-	-	400
Mercúrio	7439-97-6	E	0,5	12	36	70	1
Molibdênio	7439-98-7	E	30	50	100	120	70
Níquel	7440-02-0	E	30	70	100	130	20
Nitrato (como N)	797-55-08	E	-	-	-	-	10.000
Prata	7440-62-2	E	2	25	50	100	50
Selênio	7782-49-2	E	5	-	-	-	-
Vanádio	7440-62-2	E	-	-	-	1.000	-
Zinco	7440-66-6	E	300	450	1.000	2.000	1.050
Hidrocarbonetos aromáticos voláteis							
Benzeno	71-43-2	na**	0,03	0,06	0,08	0,15	5
Estireno	100-42-5	na	0,2	15	35	80	20
Etilbenzeno	100-41-4	na	6,2	35	40	95	300
Tolueno	108-88-3	na	0,14	30	30	75	700
Xilenos	1330-20-7	na	0,13	25	30	70	500

Continuação.

Substâncias	CAS nº	Solo (mg. Kg^{-1} de peso seco)					Água subterrânea (µg.L^{-1})
		Ref. de qualidade	Preven -ção	Investigação			Investigação
				Agrícola APMax	Resi- dencial	Indus- trial	
Hidrocarbonetos aromáticos voláteis							
Benzeno	71-43-2	na**	0,03	0,06	0,08	0,15	5
Estireno	100-42-5	na	0,2	15	35	80	20
Etilbenzeno	100-41-4	na	6,2	35	40	95	300
Tolueno	108-88-3	na	0,14	30	30	75	700
Xilenos	1330-20-7	na	0,13	25	30	70	500
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos							
Antraceno	07/12/20	na	0,039	-	-	-	-
Benzo(a)antraceno	56-55-3	na	0,025	9	20	65	1,75
Benzo(k)fluoranteno	207-06-9	na	0,38	-	-	-	-
Benzo(g,h,i)perileno	191-24-2	na	0,57	-	-	-	-
Benzo(a)pireno	50-32-8	na	0,052	0,4	1,5	3,5	0,7
Criseno	218-01-9	na	8,1	-	-	-	-
Dibenzo(a,h) antraceno	53-70-3	na	0,08	0,15	0,6	1,3	0,18
Fenantreno	85-01-8	na	3,3	15	40	95	140
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	193-39-5	na	0,031	2	25	130	0,17
Naftaleno	91-20-3	na	0,12	30	60	90	140

* E - a ser definido pelo Estado; ** na - não se aplica para substâncias orgânicas.

Quadro 4.5 Lista holandesa (2000) com valores de referência orientadores de qualidade para alguns contaminantes em solos. Fonte: CETESB (2014).

Parâmetro	Concentração em peso seco ($mg.kg^{-1}$)		
	S	T	I
Inorgânicos			
Arsênio	29,0	42,0	55,0
Bário	200,0	413,0	625,0
Cádmio	0,8	6,4	12,0
Cromo	100	240	380
Cobalto	20	130	240
Cobre	36	113	190
Mercúrio	0,3	5,2	10,0
Chumbo	85	308	530
Molibidênio	10	105	200
Níquel	35	123	210
Zinco	140	430	720
Compostos inorgânicos			
Cianetos (livre)	1	11	20
Cianetos-complexados (pH<5)	5	328	650
Cianetos-complexados (pH= ou >5)	5	28	50
Tiocianetos (soma)	-	10	20
Compostos aromáticos			
Benzeno	0,05	0,53	1,00
Tolueno	0,05	65,0	130,0
Etilbenzeno	0,05	25,0	50,0
Xileno (soma)	0,05	12,5	25,0
Fenol	0,05	20,0	40,0
Creosol	-	2,5	5,0
Catenol	-	10,0	20,0
Resorcinol	-	5,0	10,0
Hidroquinona	-	5,0	10,0
Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos			
Naftaleno	-	-	-
Fenantreno	-	-	-
Antraceno	-	-	-
Fluoranteno	-	-	-
Benzo(a)antraceno	-	-	-
Criseno	-	-	-
Benzo(k)fluoranteno	-	-	-
Benzo(a)pireno	-	-	-
Benzo(ghi)perilene	-	-	-
Indenol(1,2,3cd)pireno	-	-	-
PAH (soma 10) [3]	1,0	20,5	40,0

Valores Considerando-se um teor de argila de 25,0% e de matéria orgânica de 10,0%. S- Valores de referência, T- Valores de alerta, I- Valores de intervenção.

Solos contaminados por petróleo e seus derivados apresentam compostos de grande interesse ambiental e toxicológico. Dentre os compostos de maior risco ambiental estão os hidrocarbonetos aromáticos, substâncias lipofílicas que

apresentam uma grande persistência no ambiente, distribuindo-se nos ambientes em diferentes proporções, dependendo das propriedades físico-químicas dos constituintes e do ambiente (VIANA et al., 2007). Além disso, por serem substâncias lipofílicas, são extremamente danosos aos seres humanos, sendo rapidamente dissolvidos e transportados por lipoproteínas da membrana celular (FRANCO et al., 2008). Estudos realizados em 2011 na Inglaterra, estimaram que cerca de 54.000 toneladas destas substâncias contaminaram até aquela data o território do Reino Unido (FONSECA et al., 2011).

Os hidrocarbonetos monoaromáticos, conhecidos como BTEX, constituem um grande problema, por serem tóxicos ao meio ambiente e ao ser humano, atuando como depressores do sistema nervoso central. Estes compostos apresentam elevada toxicidade crônica, mesmo em concentrações da ordem de µg L^{-1} (ANDRADE et al., 2010).

Além dos BTEX, também merecem grande atenção os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs), que são compostos químicos constituídos por dois ou mais anéis aromáticos (JACQUES et al., 2007). São poluentes orgânicos persistentes e recalcitrantes no solo que apresentam propriedades pré-carcinogênicas e/ ou mutagênicas para humanos e animais (ANASTASI et al., 2008; FRANCO et al., 2008).

4.4 Biorremediação de solos contaminados por resíduos do petróleo

O reconhecimento dos riscos que os resíduos de petróleo podem trazer para o meio ambiente e à saúde dos seres humanos levou ao desenvolvimento de várias tecnologias para a remediação de solos contaminados com hidrocarbonetos (ROBERTS, 1998). Em função da complexidade da mistura de compostos que compõe o petróleo, o tratamento de áreas contaminadas por HC é bastante difícil e problemático. Nas refinarias têm sido adotados diversos sistemas de tratamento com base em processos físicos (lavagem, extração a vapor), químicos (extração por solvente, processos oxidativos avançados - POAs, desalogenação química, correções superficiais), térmicos (dessorção térmica, incineração) e biológicos (*landfarming*, biopilhas e biorreatores), entre outros (SEMPLE et al., 2001). O Quadro 4.6 apresenta alguns tratamentos de remediação de solo contaminado com petróleo e seus derivados dividindo-os em sete categorias.

Devido aos custos proibitivos de algumas tecnologias utilizadas para a remediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados, as atenções foram desviadas para o desenvolvimento de tecnologias alternativas/ complementares tal como a biorremediação, que utiliza plantas e/ ou microrganismos para remediação de solos e águas poluídas, e é uma tecnologia ambientalmente aceitável (EAPEN et al., 2005). A biorremediação é uma técnica que apresenta grande eficiência na destruição de poluentes orgânicos no solo, podendo inclusive promover a eliminação completa destes, sem gerar nenhum fluxo de resíduos secundários no solo (KOMIYAMA et al., 2003).

Quadro 4.6 Tecnologias de remediação para descontaminação de solos. Fonte: Adaptado de LUKIĆ et al. (2017).

Tratamento de remediação do solo	**Principais características**
Biorremediação	A atividade microbiana mineraliza completamente ou transforma os contaminantes em compostos menos tóxicos, de forma ambientalmente aceitável.
Fitorremediação	Plantas são utilizadas para extrair e desintoxicar contaminantes ambientais.
Químico	Reações químicas destroem, convertem ou neutralizam contaminantes. Contaminantes orgânicos mais recalcitrantes podem ser mais facilmente destruídos ou convertidos em substâncias menos prejudiciais.
Térmico	O calor é empregado para destruir contaminantes através da incineração, gaseificação e pirólise.
Físico	O solo contaminado é removido para um aterro ou contido no local contaminado.
Solidificação/ vitrificação	A solidificação está relacionada ao encapsulamento dos contaminantes dentro de um sólido monolítico de alta integridade estrutural, com ou sem fixação química associada. Isso é chamado 'estabilização'. A vitrificação é baseada no uso de altas temperaturas para fundir o material contaminado.
Integração de técnicas	Múltiplos métodos podem ser aplicados visando à degradação de contaminantes caso um único método seja ineficaz.

Mesmo que os custos com monitoramento e práticas agrícolas sejam necessários à implantação de um projeto de biorremediação, e que às vezes haja a necessidade da adoção de estratégias de manejo que possam auxiliar o processo, comparada a outras tecnologias de remediação de solos utilizadas, a biorremediação é capaz de promover grandes benefícios para o tratamento de áreas contaminadas por petróleo e seus derivados, apresentando geralmente um custo menor (Quadro 4.7), embora estes custos apresentem uma ampla faixa de valores em função dos custos com transporte conforme apresentado no Quadro 4.7.

Quadro 4.7 Custos de alguns tratamentos utilizados para remediação de solos contaminados. Fonte: Adaptado de LUKIĆ et al. (2017).

Tratamento	Custo (£/ ton solo)
Biológico	5 - 170
Quimico	12 - 600
Térmico	30 - 750
Físico	20 - 170
Solidificação / vitrificação	17 - 170

Antes de iniciar um projeto de biorremediação, a natureza e a extensão das substâncias químicas no solo devem ser avaliadas considerando os valores de referência de qualidade para os contaminantes no país onde será realizado o tratamento, a necessidade de remediação da área contaminada, e as opções de tratamento disponíveis (EPA, 2005). Outro fator importante é o reconhecimento de que solos afetados por produtos químicos podem conter substâncias para o qual o tratamento de biorremediação pode não ser adequado. Esse importante fator deve ser avaliado em conjunto com os custos demandados pelas diversas tecnologias de tratamento disponíveis atualmente, para a determinação da viabilidade do processo de biorremediação, atentando sempre para a proteção da saúde humana e do meio ambiente, e adotando-se medidas de controle, minimização e monitoração das emissões ou descargas do processo de biorremediação (EPA, 2005).

4.4.1 Biorremediação assistida por microrganismos

Os microrganismos apresentam grande potencial para serem utilizados em estudos para melhorar a qualidade do solo. Eles apresentam características

preciosas, tais como: alta sensibilidade a perturbações antropogênicas; correlações com diversas funções benéficas do solo, incluindo armazenamento e disponibilidade de água; decomposição de resíduos orgânicos; transformação e ciclagem de nutrientes; controle de fitopatógenos; papel direto em muitos processos do ecossistema, incluindo conversão de nutrientes em formas disponíveis às plantas, supressão de organismos nocivos, formação da estrutura do solo, infiltração de água, e apresentam uma relativa facilidade em relação ao monitoramento do processo, e refletem em um menor custo ao tratamento de biorremediação quando comparado a outras tecnologias de tratamento não biológicos (SILVEIRA E FREITAS, 2007).

O uso de parâmetros microbiológicos como indicadores da poluição do solo vem sendo recomendado em virtude deles apresentarem maior sensibilidade em detectar alterações de origem natural e antropogênica do solo (MARTINES et al., 2006). Quando os microrganismos são utilizados para promover e/ ou avaliar a biorremediação de solos contaminados por petróleo e/ ou seus derivados, esses organismos utilizam a habilidade de biotranformação que possuem para remover, degradar ou tornar inócuos os contaminantes orgânicos (DAMS et al., 2007). Esses microrganismos degradadores de óleo são chamados de microrganismos hidrocarbonoclásticos, e são caracterizados assim por utilizarem hidrocarbonetos como fontes de carbono e energia.

A atividade metabólica dos microrganismos degradadores de hidrocarbonetos pode fazer com que reações de biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo resultem na mineralização e destoxificação dessas substâncias. A mineralização é a completa conversão dos hidrocarbonetos em compostos inorgânicos inertes, como dióxido de carbono e água, enquanto a destoxificação é a transformação dos hidrocarbonetos em produtos intermediários, menos tóxicos ou não tóxicos (SUTHERSAN, 1996).

Para que um microrganismo utilize estes compostos como fonte de C e energia para o seu crescimento, é necessário que possuam enzimas que transformem as complexas moléculas de HAPs em intermediários comuns das suas rotas catabólicas. Várias vias metabólicas de degradação dos HAPs já foram identificadas em diferentes microrganismos, porém as mais estudadas são as do

metabolismo aeróbico realizado pelas bactérias, fungos ligninolíticos e fungos não-ligninolíticos (JACQUES et al., 2007).

Dentre os microrganismos com habilidade para degradar hidrocarbonetos, as bactérias constituem os mais frequentemente pesquisados, dentre as quais se destacam as pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* (ZHANG et al., 2011), embora outros gêneros de bactérias sejam importantes para o processo de biorremediação, como por exemplo, os gêneros *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Flavobacterium* e *Nocardia* (LEAHY E COLWELL, 1990).

A atuação dos fungos na biodegradação de compostos poluentes também tem sido bastante avaliada, principalmente devido à notável eficiência dos mesmos em degradar frações de hidrocarbonetos saturados e aromáticos (CLEMENTE et al., 2015). Apesar dos fungos da podridão-branca serem os mais conhecidos pela capacidade que possuem de transformar compostos orgânicos, diversos gêneros de fungos possuem a capacidade de degradar hidrocarbonetos, como os dos gêneros *Arpergillus* e *Penicillium* (LIMA et al., 2011).

Dentre os fungos filamentosos, alguns são degradadores de lignina, como *Phanaerochaete chrysosporium*, e outros não, como *Cunninghamella elegans* (BOUCHEZ et al., 1995). Ambos são muito eficientes na biodegradação de hidrocarbonetos por possuírem crescimento micelial, o que possibilita a alguns deles uma boa colonização de substratos, digerindo-os através das enzimas extracelulares, e facilitando, conseqüentemente, a degradação posterior por bactérias.

Em certos casos, mesmo que a população de fungos não aumente, eles podem iniciar o processo de degradação, quebrando, ou modificando hidrocarbonetos complexos e, nesse caso, algum grau de conversão parcial pode estar ocorrendo na presença de um substrato alternativo atuando como uma fonte de carbono e energia (LIMA et al., 2011).

A abundância dos microrganismos em conjunto com a grande capacidade de transferência de genes e as altas taxas de crescimento que eles apresentam, permite-lhes evoluir de forma rápida e adaptarem-se a mudanças nas condições ambientais, com melhoria do habitat, processo chamado de atenuação natural (GAN et al., 2009). Apesar disso, a degradação dos HPAs no solo, em alguns casos, pode ser limitada pela incapacidade dos microrganismos autóctones em metabolizar

eficientemente esses compostos, pela falta de nutrientes disponíveis no solo ou pela baixa população microbiana (JACQUES et al., 2007).

O processo de biorremediação de solos contaminados pode ser acelerado pelas técnicas de bioaumento e/ ou de bioestímulo. No bioaumento, são adicionados ao solo microrganismos alóctones e/ ou autóctones, capazes de degradar rapidamente os contaminantes específicos, sendo particularmente importante quando o solo recebe um composto xenobiótico e não há populações microbianas capazes de degradar eficientemente este composto (LUKIĆ et al., 2017). Já o bioestímulo refere-se à técnicas de aeração, umidificação, controle do pH e adição de nutrientes ao solo, e à otimização das condições ambientais, visando o desenvolvimento de populações nativas de microrganismos (LIMA et al., 2011).

4.4.2 Fatores que influenciam a atuação dos microrganismos no processo de biorremediação

As condições ambientais atuam de forma muito importante no processo de biorremediação. Isso porque a atividade da população microbiana é diretamente influenciada pelos fatores ambientais, que são de difícil controle. Portanto, para que essa técnica possa ser eficaz, antes da implantação da mesma, é importante levar isso em consideração, principalmente durante as etapas de elaboração do projeto. Entre os fatores ambientais importantes para o sucesso da biorremediação estão o teor de umidade, temperatura, pH, substrato, nutrientes e oxigênio (LEAHY E COLWELL, 1990; MOREIRA E SIQUEIRA, 2006; RIZZO et al., 2006; JACQUES et al., 2007; JACQUES et al., 2010; SHAHSAVARI et al., 2013; LUKIĆ et al., 2017).

- Teor de umidade

Todos os microrganismos do solo podem ser considerados aquáticos, pois necessitam de água para a absorção de nutrientes e integridade da superfície celular. A água também é importante para o movimento dos microrganismos unicelulares, uma vez que são restritos aos filmes de água, enquanto os fungos filamentosos e actinobacterias podem atravessar os vazios insaturados através do crescimento de filamentos. Substratos e produtos tóxicos podem ficar mais disponíveis aos microrganismos ao se movimentarem junto com a água. Ciclos secos e úmidos, congelamento e aquecimento de solo, também ajudam a liberar

substratos das superfícies das argilas ou de células mortas, estimulando a atividade metabólica dos microrganismos do solos. Além disso, devido ao alto calor específico da água, solos úmidos estão menos sujeitos a grandes variações diurnas de temperatura, que os solos secos. O ideal é que durante o processo de biorremediação de solos contaminados, o teor de umidade seja mantido acima de 20% para que taxas ótimas de degradação sejam obtidas.

- Temperatura

O desejável é que se trabalhe em uma faixa de temperatura de 10 a 45°C, embora a cada aumento de 10°C, dentro dessa faixa de temperatura, a atividade microbiana tenda a dobrar. As taxas de reações microbianas no solo são maiores à temperatura em torno de 28°C, e sofrem decréscimos acentuados em temperaturas menores que 25°C e maiores que 35°C, embora existam microrganismos adaptados para viverem em ambientes muito frios ou muito quentes, como os psicrófilos e termófilos, respectivamente. A temperatura não só afeta as características fisiológicas das células, como também as características físico-químicas do ambiente, como volume do solo, potencial de oxirredução, pressão, difusão, movimentos, viscosidade, tensão superficial, estrutura da água, que por sua vez influenciam o ambiente microbiano. Dessa forma, a temperatura também apresenta profundo efeito sobre as características físicas, como solubilidade, sorção, viscosidade e volatilização dos contaminantes presentes no solo. Em temperaturas baixas, hidrocarbonetos líquidos se transformam em parafinas sólidas, hidrocarbonetos solúveis precipitam e ocorre uma queda considerável na suas solubilidades. As alterações que ocorrem nas características físicas do solo em função da temperatura podem interferir significativamente na disponibilização destes contaminantes para os microrganismos responsáveis pela biodegradação, afetando assim as taxas de degradação dos mesmos.

- pH

A maioria dos solos têm pH entre 4,0 e 8,5, embora o pH possa variar de duas ou mais unidades em distâncias menores que o diâmetro de uma célula. As argilas, por serem carregadas negativamente, de modo geral, têm camadas de íons carregados positivamente atraídos a elas, o que ocorre também para os coloides

orgânicos, e torna o pH das superfícies muito menor que o da solução do solo. A atividade microbiana é fortemente dependente do pH do meio. Geralmente, fungos são mais adaptados a valores de pH menores que 5,0, e bactérias a valores de pH entre 6 e 8. A flutuação do pH do solo pode ocorrer em função da atividade metabólica dos microrganismos, dependendo do tipo de substrato metabolizado, sendo alcançados boas taxas de biodegradação com pH entre 6 e 8 . Adições de carboidratos ao solo, por exemplo, geralmente diminuem o pH do solo pela produção de metabólitos ácidos e de CO_2. A solubilidade e a sorção de algumas substâncias no solo também podem variar em função do pH. A disponibilidade e toxicidade de nutrientes minerais como Fe, Mn e Zn são menores em valores de pH acima de 7,0, e de Fe, Al e Mn atingem níveis tóxicos em valores de pH menores que 5,0.

- Substrato

Diversos tipos de substratos orgânicos estão presentes no solo. Contudo, a taxa de degradação dos mesmos pelos microrganismos dependerá do tipo, se estão acessíveis espacialmente para as células ou enzimas, e das condições físico-químicas do micro-habitat. Uma informação importante, é que nem toda substância orgânica é passível de degradação pela microbiota do solo. As substâncias não degradáveis ou que demoram a ser degradadas, como alguns hidrocarbonetos presentes em solos contaminados por resíduos provenientes da indústria do petróleo, são denominado recalcitrantes.

Em solos onde existe plantio, a maior atividade biológica situa-se, de modo geral, na camada de 0 a 20 cm de profundidade, pois é onde ocorre a maior acumulação da matéria orgânica do solo pela deposição de material vegetal da parte aérea da planta e situa-se grande parte das raízes. Solos sem coberturas vegetais são de modo geral, um deserto nutricional. Por isso, para esses solos, a incorporação de matéria orgânica e nutrientes favorece o aumento dos microrganismos heterotróficos, entre os quais alguns degradadores de óleo, apesar de à medida que o substrato é consumido ocorre declínio da população.

- Nutrientes

Para sobreviver, os microrganismos, de uma forma geral, necessitam de fontes de nutrientes e de um aceptor final de elétrons. C, O, N e H são os

constituintes principais das moléculas orgânicas. Outros nutrientes, como P, K, Ca, Mg, S, Fe, Zn, Mn, Cu, Mo, Co, Na, Cr, Ni, Se, e V são constituintes de diversas moléculas e/ ou são importantes nas diferentes reações metabólicas. Os processos celulares também podem ficar limitados pela indisponibilidade dos nutrientes inorgânicos. A mineralização, por exemplo, é dependente das relações C/N, C/P, e C/K. Desse modo, assim como ocorre com a adição de materiais orgânicos, a aplicação de nutrientes minerais resulta em uma resposta pronunciada da população de microrganismos envolvidos na biodegradação de contaminantes presentes no solo.

- Oxigênio

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. Condições aeróbias são necessárias para que ocorra a biodegradação relativamente rápida de hidrocarbonetos do petróleo, uma vez que a degradação anaeróbia destes compostos é bem mais lenta. A aeração do sistema solo/ contaminante é essencial ao processo de biodegradação aeróbia. Frequentemente, a agitação mecânica, é utilizada em algumas técnicas de biorremediação para melhorar a aeração do solo, o que também ajuda na dispersão dos microrganismos para que tenham acesso aos contaminantes e nutrientes do solo. Mudanças de metabolismo aeróbio para anaeróbio ocorrem em concentrações de O_2 abaixo de 1%, em solos não inundados. Apesar de o metabolismo aeróbio ser mais eficiente que o anaeróbio, a fermentação resulta na produção de uma variedade de produtos finais que servem como fonte de substrato e energia para diversos microrganismos, contribuindo para o aumento da diversidade de espécies.

4.4.3 Biologia molecular

A microbiologia do solo é comumente avaliada a partir de dados de crescimento microbiano. Porém, essa determinação fornece um conhecimento bastante limitado, uma vez que é feita a partir do cultivo em meios apropriados para o crescimento. Além disso, métodos tradicionais que utilizam microrganismos crescidos em meios de cultura seletivos não reproduzem as condições ambientais.

Estudos demonstram que técnicas dependentes de cultivo atingem somente uma pequena fração dos microrganismos existentes no ambiente e, por este motivo, para que se tenha uma avaliação mais completa da diversidade da comunidade microbiana, é importante o uso de técnicas moleculares (ROSADO E DUARTE, 2002).

As técnicas de biologia molecular, independentes de cultivo, trouxeram novas oportunidades para a análise de estruturas e composição de comunidades microbianas complexas. Algumas metodologias permitem estabelecer relações filogenéticas entre os microrganismos, determinar a diversidade genética das comunidades microbianas e identificar diversos microrganismos não cultiváveis (QUINTAES et al., 2014).

O sequenciamento de DNA foi iniciado entre as décadas de 70 e 80 com os métodos de degradação química (Maxam e Gilbert) e terminação de cadeia com dideoxinucleotídeos (Sanger). Outro método que foi desenvolvido é o de Sanger, porém sem escalabilidade, bastante trabalhoso e demorado. Estudos de identificação microbiana e caracterização da diversidade utilizam o gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal (16S rRNA), para procariotos. Essa região do RNA apresenta elevado grau de conservação e está presente em todos os grupos bacterianos, permitindo o desenvolvimento de sistemas de amplificação com alvos em diferentes grupos taxonômicos, porém com variabilidade para prover comparações filogenéticas das comunidades microbianas (MALIK et al., 2008). Para eucariotos (inclusive fungos), utiliza-se o gene que codifica a subunidade 18S do RNA ribossômico (18S rRNA) e as regiões intergênicas ITS (*Internal Transcribed Spacer*), também por apresentarem grau elevado de conservação (KIRK et al., 2004; HIRSCH et al., 2010).

Algumas técnicas são utilizadas para manipulação de ácidos nucléicos, tais como, extração, amplificação, tratamento com enzimas de restrição, clonagem e seqüenciamento (DELONG, 2002; KIRK et al., 2004; MALIK et al., 2008; VAN ELSAS E BOERSMA, 2011)**.**

No ano 2005 surgiram as primeiras tecnologias de sequenciamento de DNA conhecida como tecnologia de sequenciamento de nova geração, em inglês, *Next Generation Sequencing* (NGS), permitindo uma nova abordagem de sequenciamento em larga escala (HGS - High throughput sequencing). Nos anos

subsequentes, diversas plataformas de NGS foram desenvolvidas baseadas principalmente nas metodologias de: Pirosequenciamento com detecção de pirofosfato; Sequenciamento por ligação; Metodologia de semicondutores; Sequenciamento por síntese; Sequenciamento de moléculas únicas (SCHUSTER, 2008). Grande parte destas tecnologias ainda esta sendo desenvolvida e em constante aprimoramento.

As metodologias NGS possuem o grande diferencial de proporcionarem o sequenciamento direto e paralelo de milhões e bilhões de moléculas de DNA, aumentando consideravelmente a escala, a resolução das análises, e a redução da quantidade de amostra necessária (ex.: sequenciamento de células únicas), além da diminuição significativa no custo por nucleotídeo sequenciado que também é um grande avanço obtido com esta tecnologia (GOODWIN et al., 2016). A NGS pode ser diretamente aplicada para sequenciamento de genomas completos, metagenomas, RNA-seq, exomas, RNAs não codificantes, pequenos RNAs, amplicons, regiões marcadas, bibliotecas enriquecidas com fragmentos-alvo, entre diversas outras aplicações (GOODWIN et al., 2016).

O sequenciamento NGS está cada dia mais presente em nosso cotidiano, revolucionando a pesquisa biológica em áreas como a genética, genômica, biotecnologia e medicina. A crescente utilização destas metodologias vem se tornando uma ferramenta importante na compreensão da diversidade biológica que nos cerca, podendo ser diretamente aplicada no meio ambiente, em questões de saúde pública e de qualidade de vida.

4.4.4 Técnicas de biorremediação do solo

Em relação ao local onde o tratamento pode ser realizado, as técnicas de biorremediação são denominadas *in situ* e *ex situ*. Na biorremediação *in situ*, o processo de biodegradação ocorre no local contaminado, enquanto na biorremediação *ex situ* o solo é retirado e transferido para uma unidade de tratamento (LEMOS et al., 2009).

A biorremediação *in situ* apresenta relativa simplicidade, baixo custo e notável eficiência na remoção de poluentes de solos, apesar de ser reconhecidamente uma tecnologia de longo prazo para atuar de forma uniforme sobre o solo (SEO et al., 2007).

Na biorremediação *ex situ*, geralmente é despendido um custo maior em função dos gastos com retirada e transporte do solo para o local de tratamento, embora possa ser necessário quando há possibilidade dos poluentes contaminarem pessoas e ambientes próximos ao local da biorremediação, ou quando os resíduos apresentam altas concentrações de contaminantes, como no caso dos resíduos provenientes da indústria do petróleo (JACQUES et al., 2007).

De acordo com a literatura, as principais técnicas empregadas na biorremediação *in situ* e *ex situ* dos solos são (EPA, 2005; RIZZO et al., 2006; JACQUES et al., 2007; LEMOS et al., 2009; GAN et al., 2009; LUKIĆ et al., 2017):

<u>*Biorremediação in-situ*</u>

- *Atenuação Natural:* neste tratamento é realizado somente o monitoramento regular da concentração do contaminante;
- *Fitorremediação:* técnica que faz uso de plantas para a remoção ou degradação de poluentes, que podem atuar em associação ou não com microrganismos que colonizam ou estão próximos às suas raízes;
- *Bioventing:* introdução de ar na zona insaturada do solo, suprindo assim a necessidade de oxigênio requerida pelo processo de biodegradação aeróbia;
- *Biosparging:* o ar é introduzido na zona saturada do solo (lençol freático), objetivando suprir as necessidades de oxigênio e transferir poluentes voláteis para a zona insaturada, onde se encontram os microrganismos capazes de degradá-los.

<u>*Biorremediação ex-situ*</u>

- Biorreatores: o biorreator de “lama” é o mais comum. Neste, após escavação e peneiramento, o solo contaminado é misturado a uma fase aquosa (contendo microrganismos, nutrientes e/ ou surfactantes) e posteriormente a lama tratada é normalmente desidratada ou submetida à biorremediação em fase sólida, quando os teores de umidade no solo são reduzidos;
- Biopilhas: sistema mais complexo, que permite o controle da perda de compostos voláteis durante a fase operacional e a introdução de água, nutrientes e oxigênio, embora não permita a frequente mistura do solo para

suprir limitações referentes à heterogeneidade e à disponibilização de nutrientes e contaminantes;

- *Landfarming:* Nesse sistema de tratamento, os resíduos industriais perigosos são dispostos em células de tratamento de grandes dimensões e misturados à camada superficial do solo, na qual se encontra uma maior atividade microbiana. O solo sofre frequente revolvimento e correções periódicas de pH, umidade e nutrientes para a manutenção da atividade microbiana.

4.4.5 Biorremediação de solo com resíduos do petróleo pela técnica de *landfarming*

O *Landfarming* é um dos tratamentos biológicos mais antigos, eficientes, e frequentemente escolhido para o tratamento de resíduos provenientes da indústria do petróleo, como por exemplo, a borra oleosa do petróleo. Nos EUA, a indústria do petróleo começou a usar este sistema de tratamento no início dos anos 70 (HARMSEN et al., 2007).

No *Landfarming* grande parte dos hidrocarbonetos mais leves, e, portanto mais voláteis, como por exemplo, o diesel e a gasolina, tendem a ser removidos por evaporação durante o processo de revolvimento, enquanto os hidrocarbonetos mais pesados, e menos voláteis, como por exemplo, óleos lubrificantes e borras do petróleo são menos voláteis e mais sujeitos a biodegradação (EPA, 2014). Assim, por se tratarem de áreas saturadas com contaminantes recalcitrantes, geralmente é necessário que esse sistema de tratamento receba nutrientes, e que se faça a realização de práticas de aeração para estimular a atividade dos microrganismos envolvidos no processo de biorremediação (RIZZO et al., 2006). O processo de biorremediação no *lanfarming* sofre influência direta da taxa de atividade dos microrganismos responsáveis pela biodegradação dos hidrocarbonetos do petróleo. Como o solo possui, naturalmente, diversos microrganismos com atividades metabólicas bastante variadas, uma das maneiras mais simples de se proceder no tratamento de um resíduo no *landfarming* consiste em deixar que a microbiota nativa atue, embora possa ser utilizada a técnica de bioaumento (JERÔNIMO e KITZINGER, 2014).

No *Landfarming,* os resíduos são colocados sobre a superfície do solo com o objetivo de reduzir as concentrações dos constituintes perigosos através da ação de

microrganismos com habilidade de degradar ou transformar os compostos poluentes em substâncias que não sejam nocivas à saúde humana e ambiental. Este método, muitas vezes é considerado um processo de disposição final, em que os produtos degradados podem ser incorporados ao solo (HENDGES, 2013).

O solo utilizado no *Landfarming*, antes de receber os contaminantes, poderá ser submetido a processos de pré-tratamento, como britagem, trituração, peneiração, mistura, entre outros processos, a fim de melhorar a porosidade do solo. Posteriormente, o material oleoso é espalhado sobre o solo preparado, e é feita a incorporação do óleo na camada arável. O solo então passa a ter o controle de umidade, temperatura e pH periodicamente, de forma que estejam na faixa ideal para os microrganismos degradadores dos compostos contaminantes (LUKIĆ et al., 2017). Além disso, existe uma norma que preconiza a necessidade de monitoramento dos fatores ambientais para avaliar o desempenho do bioprocesso e, caso necessário, aplicação de ações corretivas, como por exemplo, de aeração, calagem e adição de fertilizantes (ABNT, 1997).

A Figura 4.5 apresenta um sistema de *Landfarming.* A parte inferior do solo de *landfarming* é geralmente coberta com um forro sintético de polietileno de alta densidade impermeável, ou com argila como forro natural, a fim de evitar fugas do lixiviado e consequente contaminação de águas subterrâneas, após a manta de polietileno, é colocada uma camada de areia grossa, ou de cascalho para drenagem do lixiviado, que vai para um tanque de tratamento ou armazenamento (LUKIĆ et al., 2017). Na superfície do *Landfarming* também são feitas calhas em torno dele para controle do escoamento de água, evitando assim, uma contaminação cruzada. Quando é necessário, o fornecimento de água, nutrientes e por vezes bactérias, faz-se o uso de sistema de irrigação, e a aeração, quando realizada, é feita por revolvimentos periódicos que podem ser realizados manualmente ou com equipamento de aeração (LUKIĆ et al., 2017).

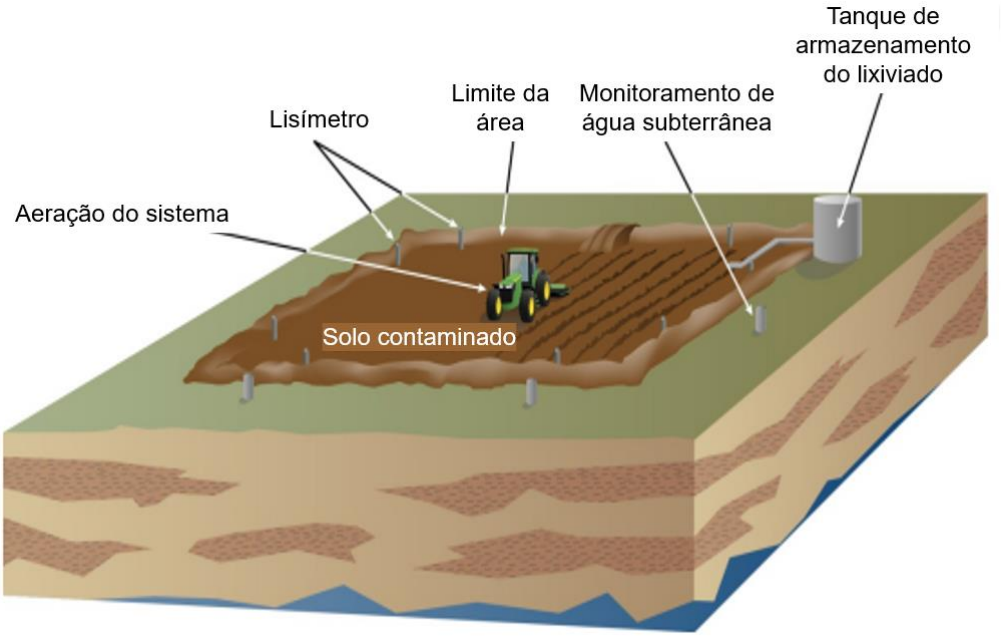


Figura 4.5 Funcionamento de um sistema *Landfarming*. Fonte: Adaptado de EPA (2014).

Dentre os tratamentos de resíduos gerados pela indústria petroquímica o *landfarming* se destaca pela relativa eficiência na remoção de óleos e graxas presentes no solo (PAULA et al., 2005). Este sistema tem sido utilizado pela indústria de petróleo nacional devido ao relativo baixo custo operacional e eficácia perante as condições naturais tropicais na redução das concentrações de contaminantes como HTPs (NAVARRETE et al., 2009).

Muitos processos bioquímicos acontecem no *landfarming* como, por exemplo, a conversão de carbono a dióxido de carbono e incorporação do carbono remanescente, que é importante por proporcionar a fixação de matéria orgânica no solo, melhorando assim a sua estrutura e fertilização. Entretanto, com o tempo, este tratamento pode se tornar ineficiente na remoção de compostos mais recalcitrantes e tóxicos presentes nos resíduos petrolíferos (HUANG et al., 2004). Após determinados períodos de tempo, esse sistema pode passar a agir apenas como acumulador de substâncias não biodegradáveis, como hidrocarbonetos recalcitrantes, metais pesados, sais e areia, ao invés de atuar na remoção de contaminantes, perdendo a eficácia (EPA, 2005), o que torna necessário, em longo prazo, a adoção de outras técnicas que possam auxiliar no tratamento de contaminantes recalcitrantes e persistentes presentes no *landfarming*.

4.5 Adição de resíduos vegetais como ferramenta auxiliar na biorremediação de solos contaminados

O Brasil é um dos países com maior participação na oferta de energia de fontes renováveis. Atualmente, o desenvolvimento e o aprimoramento de tecnologias mais limpas, acompanhadas de legislações incentivadoras, fazem com que as fontes renováveis sejam uma opção vantajosa do ponto de vista social, econômico e ambiental. Nesse contexto, o Brasil é favorecido por um clima favorável, rica biodiversidade e vasta extensão territorial, o que faz com que a sua produção agropecuária seja ampla e diversificada e resulte, inclusive, em uma grande geração de resíduos que podem ter uma série de aplicações (SEBRAE, 2016).

A adição de resíduos vegetais no solo atua como um fator chave nas práticas modernas de manejo sustentável e ecologicamente viável do solo. Nos solos altamente degradados, a adição de resíduos orgânicos constitui a maior fonte de matéria orgânica (MO), desempenhando importante papel na formação e manutenção da fertilidade do solo, atuando de forma benéfica praticamente sobre todos os fatores que influenciam no processo de biorremediação (SANTOS et al., 2008).

A matéria orgânica do solo (MOS) é composta por resíduos de plantas, animais e seus produtos em vários estágios de decomposição, podendo variar de menos que 1%, até mais de 90% (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006). Ela atua como um grande reservatório de nutrientes, exercendo efeitos benéficos na estrutura, resistência a danos físicos e mecânicos, e na capacidade de retenção de água (SANTOS et al., 2008). Disso resulta a melhoria da qualidade do solo e o bioestímulo de microrganismos presentes no solo, havendo aumento da densidade e diversidade populacional desses (EMBRAPA, 2008) que utilizam os nutrientes liberados pela decomposição da matéria orgânica para a sua manutenção e crescimento (BALOTA et al., 1998).

Os materiais vegetais são componentes importantes nos ecossistemas, apresentando natureza variada e complexa, sendo constituídos por celulose, que representa geralmente de 20 a 50% da matéria seca, hemicelulose de 10% a 30%, lignina de 5 a 30%, proteínas de 2 a 15% e substâncias solúveis até 10%, além de outros constituintes como: ceras, graxas, pigmentos, e outros compostos com

menores quantidades, contendo quantidades variadas de nutrientes (em kg ha^{-1}) como: 74 a 156 de N; 1,4 a 4,1 de P; 2,0 a 4,2 de Ca e 1 a 27 de Mg, e constituindo um *habitat* onde ocorre abundante fauna e comunidade microbiana heterotrófica, em florestas tropicais (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006).

Na presença de ambientes expostos a contaminação por petróleo e seus derivados, alguns microrganismos adquirem a capacidade de utilizar os hidrocarbonetos presentes nesses produtos como fonte de energia. Essa capacidade de biodegradação de compostos poluentes, associada à utilização de materiais orgânicos vegetais adicionados ao solo, como cossubstrato, pode ser um ótimo modelo para tratamento de solos contaminados por resíduos provenientes da indústria do petróleo. De acordo com a literatura, para que a biodegradação de HTP seja efetiva, a concentração de material vegetal a ser utilizada no tratamento de solos impactados por HTP pode variar de 2 a 12% (m/m) (MEYSAMI E BAHERI, 2003; MOLINA-BARAHONA et al., 2004; TREJO-HERNÁNDEZ et al., 2007; SHAHSAVARI et al., 2013).

Em solos contaminados por hidrocarbonetos do petróleo, a celulose, hemicelulose e lignina presentes na parede dos vegetais podem ser utilizadas como cossubstrato pela microflora do solo. Esses componentes dos materiais vegetais aumentam as populações microbianas, tornando-os mais ativos no processo de biodegradação dos contaminantes. Faz-se necessário, portanto, o conhecimento da quantidade de celulose, hemicelulose e lignina na estrutura dos materiais vegetais, pois diferentes proporções destes componentes podem conferir diferentes graus de labilidade ou recalcitrância ao material vegetal, influenciando diretamente na degradação dos mesmos pelos microrganismos envolvidos na degradação dessas moléculas. Conforme pode ser visualizado na Figura 4.6, a fração celulósica encontra-se envolvida pela lignina, cuja função é aumentar a resistência da estrutura dos vegetais a ataques químicos e enzimáticos. Estes componentes resultam em um material flexível, porém altamente resistente a algumas espécies de microrganismos que não apresentam enzimas ligninolíticas para degradar a lignina (MURPHY E MCCARTHY, 2005). Essa difícil degradabilidade da lignina tem estimulado, inclusive, pesquisas voltadas para aplicar a capacidade que alguns fungos degradadores de lignina possuem na remoção de HTP (PICKARD et al, 1999; MEYSAMI E BAHERI, 2003; LIMA et al., 2011).

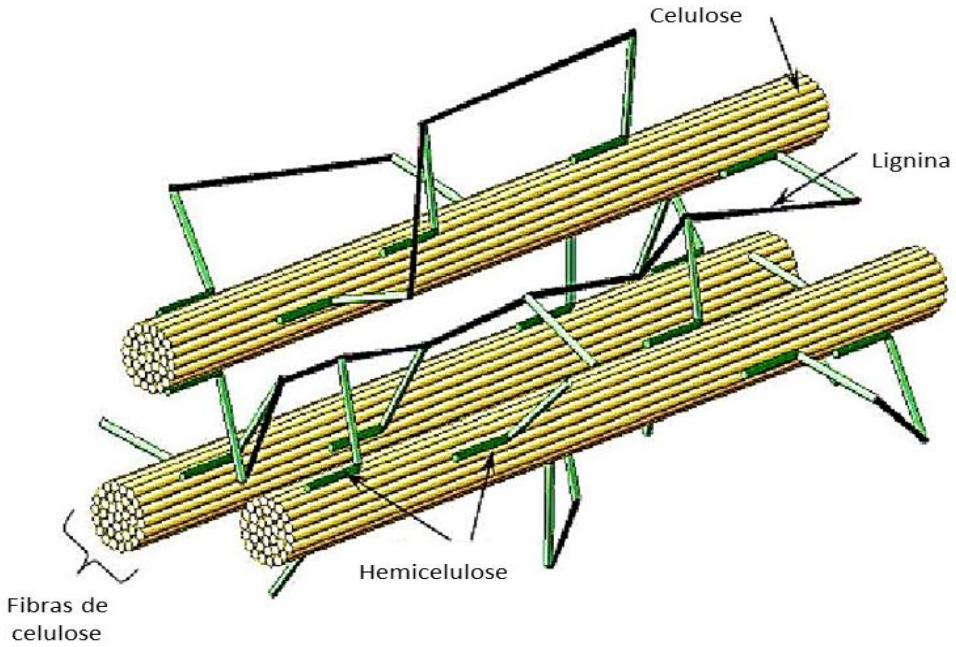


Figura 4.6 Ilustração da parede celular vegetal mostrando como a lignina, celulose e hemicelulose encontram-se interligadas. Fonte: Adaptado de MURPHY E MCCARTHY (2005).

Apesar de a lignina ser mais difícil de ser degradada pelos microrganismos em relação a celulose e hemicelulose, ela pode ser utilizada como fonte de carbono por algumas espécies que apresentam enzimas ligninolíticas, capazes dedegradar a lignina, embora a mesma possa algumas vezes atuar na sorção de poluentes orgânicos no solo (ITOPF, 2012; SHAHSAVARI et al., 2013).

Os materiais vegetais também podem atuar no bioestímulo do processo de biorremediação, uma vez que fornecem nutrientes e também disponibilizam oxigênio ao atuarem como agentes de volume (materiais estruturantes) no solo. Eles também podem melhorar as propriedades físicas do solo. Quanto maior a quantidade de material orgânico adicionado ao solo, menor a compactação do mesmo. Isso ocorre devido a alguns efeitos da MOS, como amortecimento, retenção de água, aumento da coesão entre as partículas do solo, baixa densidade, susceptibilidade à deformação e elasticidade, que aumentam a capacidade do solo em atenuar as cargas aplicadas sobre ele (HASAN et al., 2016).

A contribuição da MOS para os atributos do solo não se restringe apenas a sua quantidade, mas também à qualidade. Inicialmente, ocorre rápida decomposição de material lábil e, posteriormente, num processo mais lento, de materiais mais

resistentes (GAMA-RODRIGUES et al., 2008). A adição de resíduos com baixa taxa de decomposição é mais indicada para a manutenção dos teores de matéria orgânica dos solos, enquanto resíduos com elevada taxa de degradação estimulam a decomposição da matéria orgânica nativa dos solos (MANTOVANI et al., 2006).

A decomposição dos materiais vegetais também é influenciada pelo manejo do solo utilizado, de modo que a incorporação de resíduo vegetal no solo proporciona uma decomposição mais rápida do que os resíduos aplicados em cobertura, que por sua vez estão associados à maior retenção de água e proteção contra a erosão (ESPINDOLA et al., 2006).

Outro possível efeito da adição de material orgânico no solo pode ser verificado sobre os metais presentes em solos contaminados. Os resíduos de plantas contêm ácidos orgânicos, que formam grupos funcionais, principalmente dos tipos carboxílicos e fenólicos, participando de reações químicas no solo como: complexação ácido orgânico-metal, redução da toxidez por Al, adsorção de íons, constituição química da rizosfera de plantas e lixiviação de elementos no solo (PAVINATO E ROSOLEM, 2008). Reações de complexação e quelação de metais com a MOS são importantes em vários processos no solo, como no intemperismo, na disponibilidade de nutrientes e de outros metais, e nos aspectos ambientais do solo (SILVA E MENDONÇA, 2007).

De acordo com SEO et al. (2007), resíduos orgânicos podem ser usados como adubo para melhorar a remediação de águas e inclusive de solos porque, além de proporcionarem aumento da MOS, são abundantes e baratos. Esses autores avaliaram em uma coluna de vidro de 30 cm o desempenho de três tipos de cobertura morta (casca de cipreste, casca de madeira e casca de nozes) na remediação de águas subterrâneas contaminadas com naftaleno, observando eficiência de remoção deste HPA de 77 a 99%, onde a maior parte da remoção ocorreu nos 6 primeiros centímetros de coluna.

As atividades de exploração, conservação e melhoria realizadas com solos, devem ser cuidadosamente planejadas e aplicadas, de modo que sejam reduzidos os danos causados ao solo pelas tecnologias existentes. Portanto, embora a utilização de materiais vegetais para a estimulação da microflora autóctone de solos contaminados com petróleo e seus derivados se mostre como uma estratégia eficiente e que requer um menor custo, em relação a muitas tecnologias adotadas,

as discrepâncias relatadas na literatura a respeito dos efeitos benéficos que essa técnica pode promover, indica que é necessário a realização de mais estudos relacionados à adição de materiais vegetais em solos contaminados, acompanhados pela caracterização do solo e dos resíduos vegetais utilizados (MOLINA-BARAHONA et al., 2004; MOREIRA E SIQUEIRA, 2006; SILVA E MENDONÇA, 2007; SEO et al., 2007; SANTOS et al., 2008; SHAHSAVARI et al., 2013).

4.5.1 Bagaço de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) foi introduzida no Brasil durante o período colonial, e hoje é uma das principais culturas da economia brasileira. O agronegócio sucro-alcooleiro, responsável por grande parte do PIB nacional, é o setor que mais emprega no país, com a geração de empregos diretos e indiretos (ALBINO et al., 2006).

De acordo com o Ministério da Agricultura (2014), além do Brasil ser o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, é também o primeiro em produção de açúcar, etanol, e ainda vem conquistando cada vez mais espaço no mercado externo com o uso do biocombustível como alternativa energética, já que este material vegetal apresenta alta concentração de carboidratos, baixo conteúdo relativo de lignina, fácil utilização, baixo custo de colheita, transporte e armazenagem (GOUVEIA et al., 2009).

A cana-de-açúcar é produzida em quase todo o país, destacando-se o estado de São Paulo (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2014). No Rio de Janeiro, a produção da cana-de-açúcar localiza-se principalmente na região Norte Fluminense, em Campos dos Goytacazes, apesar do estado, no entanto, fazer um mau uso do solo, em função das tecnologias adotadas, resultando em baixa produção (FRANCO et al., 2014).

A composição química da cana-de-açúcar varia muito em função das condições climáticas, propriedades físicas, microbiológicas e químicas do solo, do tipo de cultivo, da sua variedade, do estágio de maturação e idade, entre outros fatores, sendo 99% composta pelos elementos hidrogênio, oxigênio e carbono (PARANHOS, 2014).

O caldo da cana-de-açúcar é constituído de 80% de água e sólidos solúveis. Os últimos são agrupados em açúcares, não açúcares orgânicos, e inorgânicos. Os

açúcares são representados pela sacarose, glicose e frutose, os não açúcares orgânicos contêm substâncias nitrogenadas (aminoácidos e proteínas), gorduras, pectinas, ceras, ácidos e matérias corantes, e os inorgânicos, representados pelas cinzas, constituem-se principalmente de sílica, potássio, fósforo, cálcio, magnésio, enxofre, sódio, cloro e alumínio. De acordo com os diferentes tipos de variedades comerciais de cana-de-açúcar, a composição e teor de sólidos solúveis do caldo de cana variam, dentro de certos limites (HAMERSKI, 2009) (Quadro 4.8).

Quadro 4.8 Composição da cana-de-açúcar e sólidos solúveis no caldo. Fonte: HAMERSKI (2009).

Componentes da cana de açúcar	**Fração mássica (%)**
Água	73-76
Sólidos	24-27
Sólidos solúveis	10-16
Fibra (seca)	11-16
Constituintes do caldo de cana	**Fração em sólidos solúveis (%)**
Açúcares	75-92
Sacarose	70-88
Glicose	2-4
Frutose	2-4
Sais	3,0-4,5
Ácidos orgânicos	1,5-5,5
Ácidos carboxílicos	1,1-3,0
Aminoácidos	0,5-2,5
Outros não-açúcares orgânicos	
Proteínas	0,5-0,6
Amido	0,001-0,100
Gomas	0,30-0,60
Ceras, gorduras, fosfolipídeos	0,05-0,15

O bagaço de cana-de-açúcar é resultante da extração do caldo da cana-de-açúcar, e é caracterizado como um material com altos teores de parede celular, baixa densidade energética, pobre em proteína e minerais, constituindo um material que normalmente apresenta um baixo valor nutritivo. Essas características podem ser visualizadas no Quadro 4.9 e podem indicar que o resíduo não é eficiente se for utilizado como fonte de nitrogênio para estimular a biodegradação de óleo em tratamentos de solos contaminados.

Quadro 4.9 Composição química do bagaço de cana de açúcar, em porcentagem de matéria seca. Fonte: CARVALHO et al. (2006).

Componente	Composição (%)
Matéria seca	40,11
Proteína bruta	2,32
Fibra em detergente neutro	59,02
Fibra em detergente ácido	38,34
Hemicelulose	20,68
Celulose	30,30
Lignina	7,34
Extrato etéreo	0,07
Cinzas	1,22
Nitrogênio insolúvel em detergente neutro	0,07
Nitrogênio insolúvel em detergente ácido	0,08
Cinza insolúvel em detergente neutro	0,65
Cinza insolúvel em detergente ácido	1,45

O material fibroso da cana é constituído, principalmente, de celulose, hemicelulose e lignina e, assim como a maioria dos materiais lignocelulósicos provenientes da biomassa de plantas, são abundantes complexos orgânicos de carbono (GOUVEIA et al., 2009).

Alguns trabalhos avaliaram a adição do bagaço de cana-de-açúcar em solos contaminados e verificaram remoção de HTP entre 24% e 60% (MOLINA-BARAHONA et al., 2004; TREJO-HERNÁNDEZ et al., 2007; GARCIA-TORRES et al., 2011; HAMZAH et al., 2014; CUEVAS-DÍAZ et al., 2017), embora a maior parte desses trabalhos tenham sido conduzidos com solos contaminados artificialmente. A remoção de HTP verificada nestes trabalhos provavelmente se deve à atuação do bagaço de cana-de-açúcar como agente estruturante e como substrato de grande valor energético, que pode ter estimulado o crescimento dos microrganismos atuantes no processo de biorremediação (SHAHSAVARI et al., 2013).

Apesar da degradação de HTP ser estimulada em solos contaminados onde foi realizada a adição de BC, existe a possibilidade de alguns resíduos vegetais atuarem adsorvendo ou absorvendo contaminantes no solo, reduzindo ou impedindo a degradação de HTP no solo (ITOPF, 2012). Outro fator que deve ser levado em consideração quando se utiliza materiais vegetais para auxiliar no tratamento de solos contaminados, é que os resultados de remoção de HTP podem não estar atrelados somente à quantidade de hidrocarbonetos provenientes do solo, mas também aos hidrocarbonetos presentes na composição dos materiais vegetais, o que resultaria em um resultado incorreto de remoção de HTP (VECCHIATO et al., 2017). Portanto, é necessário estar atento para a escolha de metodologias adequadas para determinação da quantidade de HTP removida no solo, e aos resultados encontrados durante processo de biorremediação para elucidação da resposta do tratamento realizado.

4.5.2 Leguminosas florestais

As florestas desempenham um importante papel para a melhoria e manutenção da qualidade dos solos, ao promoverem o aumento do teor de matéria orgânica, da disponibilidade de nutrientes, melhoria das propriedades físicas e otimização da atividade biológica, resultados do aporte de material vegetal da copa das árvores (GAMA-RODRIGUES et al., 2008). O plantio de árvores contribui para diminuir o impacto ambiental gerado pela exploração das florestas naturais, além de ser uma boa alternativa socioeconômica para o desenvolvimento regional quando se trata de espécies que podem ser utilizadas com fins econômicos, como no caso do aproveitamento da madeira (TERROR et al., 2011). Neste ultimo caso, os resíduos da planta, ao serem retiradas as madeiras, podem ser utilizados para a recuperação de solos degradados ou contaminados.

A recuperação de solos degradados, seja pelo uso intensivo e inadequado do solo, ou pela contaminação do mesmo, é de grande importância para a racionalização do uso da terra e melhoria da qualidade ambiental. Para estes fins, algumas características são desejáveis de serem encontradas em espécies para plantios de reabilitação, destacando-se a boa capacidade de facilitar a sucessão natural em locais onde uma série de barreiras impede o desenvolvimento do processo, a boa capacidade de estabelecimento em condições limitantes, a atração

da fauna, o crescimento rápido e a grande deposição de serapilheira (CHADA et al., 2004).

Fatores como tipo de vegetação, deciduidade, estágio sucessional, altitude, latitude, precipitação, disponibilidade hídrica, temperatura, luminosidade, relevo e características do solo fazem com que as espécies vegetais apresentem diferenças na produção e consequentemente no acúmulo da serapilheira depositada. Essas características, somadas à qualidade da serapilheira, modificam a velocidade de decomposição e a liberação de nutrientes para o solo. A fração lábil ou ativa da matéria orgânica do solo, embora pequena, é importante pela rápida taxa de ciclagem de poucas semanas ou meses, ao contrário da fração passiva, em que a ciclagem ocorre lentamente (NUNES et al, 2016).

A influência do plantio das espécies florestais ou da utilização do material vegetal dessas plantas também está relacionada com o potencial produtivo de biomassa vegetal e com o caráter lábil ou recalcitrante das mesmas, o que resulta em diferentes taxas de transformações dos nutrientes (NDAW et al., 2009), uma vez que tanto a quantidade quanto a qualidade do resíduo da planta adicionado ao solo determinam a taxa de decomposição da matéria orgânica e, assim, a dinâmica dos nutrientes no solo (GAMA-RODRIGUES et al., 2007).

As leguminosas arbóreas são espécies muito promissoras para a restauração de solos degradados. Essas plantas não só protegem o solo e promovem melhoria do mesmo pela adição de matéria orgânica, como participam vantajosamente da ciclagem de nutrientes por apresentarem uma associação biológica com bactérias fixadoras de N_2 atmosférico e fungos micorrízicos, conhecidos por aumentar a área explorada pelas raízes promovendo, e assim, uma melhoria na disponibilização dos nutrientes do solo (AL-ANSARI E ABDULKAREEM, 2014). Essas são características muito importantes, uma vez que alguns nutrientes, a exemplo do fósforo, mesmo que estejam em grande quantidade no solo, podem encontrar-se adsorvidos na superfície dos minerais do solo (NOVAIS et al., 2007), enquanto o N pode ser facilmente perdido no solo por processos como volatilização e lixiviação (AL-ANSARI E ABDULKAREEM, 2014).

Na literatura não foram encontrados trabalhos que avaliassem a adição da leguminosa florestal *Mimosa caesalpiniifolia,* conhecida como sabiá (SS) na remoção de HTP em solos contaminados por petróleo e seus derivados. No entanto, a

relevância do emprego da SS reside especialmente na capacidade de adicionar nutrientes ao solo, especialmente N, podendo ser uma alternativa eficaz, e de relativo baixo custo, principalmente se associada a um resíduo vegetal com capacidade de remoção de HTP já conhecida, como o BC, podendo diminuir os gastos com fertilização e aeração do solo, práticas frequentemente adotadas em tratamentos biológicos como o *landfarming* (LUKIĆ et al., 2017).

Capítulo 5

Materiais e Métodos

5.1 Solo: descrição, coleta e preparo

O estudo foi conduzido com solo de um sistema *landfarming* de uma refinaria de petróleo brasileira (Figura 5.1). A refinaria é localizada na região sudeste do Brasil, e apresenta um clima subtropical úmido segundo a classificação de Köppen-Geiger (PEEL et al., 2007). A refinaria possui uma área de 3,7 km^2, com uma capacidade para produção de 53 barris/ dia. Os principais produtos gerados são: propeno, gasolina, óleo diesel com baixo teor de enxofre e solventes especiais.

O sistema de *landfarming* utilizado neste trabalho apresenta três células de 5.000 m^2 cada uma (Figura 5.1).

Figura 5.1 Sistema *landfarming* da refinaria de petróleo com três células (A, B e C). Demarcação da célula onde foram coletadas as amostras de solo (célula C). Fonte: Adaptado de MARTINS (2015).

O solo foi coletado uma única vez, em vários pontos, na profundidade de 20 cm, em uma quantidade total de 200 kg. O mesmo foi posteriormente encaminhado para o Laboratório de Biossíntese, Biocorrosão e Biodegradação da Escola de Química (E-107) do Centro de Tecnologia da UFRJ, onde foi destorroado, homogeneizado e quarteado. O processo de peneiramentonão não foi realizado para evitar o menor contato possível entre o manuseador do solo e os contaminantes presentes no mesmo, e para manter as características intrínsecas do solo. Inicialmente o solo apresentou um teor de umidade de 40%, e pH 6,5.

5.2 Materiais vegetais: descrição, coleta e preparo

Foram utilizados dois tipos de materiais vegetais. O bagaço de cana-de-açúcar (BC), e a serapilheira da leguminosa florestal *Mimosa caesalpiniifolia,* conhecida vulgarmente como sabiá (SS)*,* ambos apresentados nas Figuras 5.2 e 5.3, respectivamente. A saber, a serapilheira consiste de todo material vegetal que cai das árvores sobre a superfície do solo (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006).

- Bagaço de cana-de-açúcar (BC)

O BC foi coletado após o descarte da produção de caldo de cana-de-açúcar, no comércio local de Duque de Caxias, RJ (Figura 5.2).

Figura 5.2 Bagaço de cana-de-açúcar

- Serapilheira do Sabiá (SS)

O sabiá utilizado neste trabalho, na ocasião do plantio (em 1998) foi inoculado com estirpes selecionadas de bactérias fixadoras de N_2 atmosférico (BR 3407 e

3446) e fungos micorrízicos (um combinado de *Gigaspora margarita* e *Glomus clarum*) (Figura 5.3). O local de coleta da serapilheira do sabiá foi em um plantio localizado na fazenda Carrapeta, Conceição de Macabu, RJ.

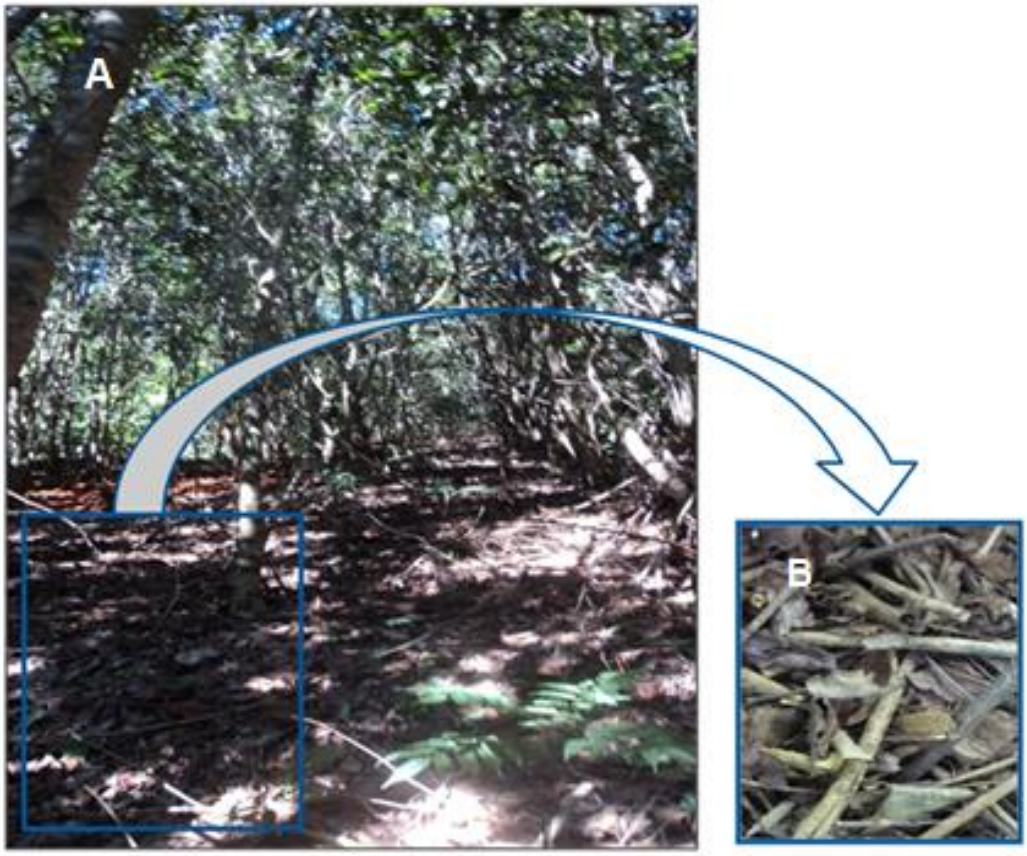


Figura 5.3 Foto da área da leguminosa florestal *Mimosa caesalpiniifolia*, conhecida como sabiá (A), onde foram coletadas as amostras de serapilheira (B).

A ferramenta utilizada para a coleta da SS foi o gabarito metálico com área de 25 cm x 25 cm (Figura 5.4). O gabarito foi colocado sobre a superfície do solo, e a serapilheira presente na área ocupada pelo gabarito foi coletada.

Figura 5.4 Foto da ferramenta (gabarito) utilizada para coletar a serapilheira.

O bagaço de cana-de-açúcar e a serapilheira do sabiá foram secos em estufa de circulação forçada de ar, à temperatura de 65°C de acordo com o manual para análise vegetal da EMBRAPA (2000). Posteriormente, esses materiais vegetais foram grosseiramente quebrados com auxilio de um liquidificador industrial de alta rotação (fak 800 w).

5.3 Ensaios preliminares

5.3.1 Teste para avaliação dos resíduos vegetais como fonte de C e N para os microrganismos do solo.

Como o C e N são essenciais para a atividade microbiana, e foram adicionados materiais vegetais ao solo com esses elementos na composição, este teste foi realizado para verificar se o BC e a SS atuam como fonte de C e N para os microrganismos presentes no solo avaliado. Inicialmente, foi feito um inóculo de cultura mista do solo. Para tal, 20 g do solo foram introduzidas em frasco Erlenmeyer de 500 mL de capacidade contendo 180 mL de solução fisiológica a 0,85% de NaCl. A mistura foi colocada sob agitação a 120 rpm e temperatura de 30°C por 30 minutos em incubadora agitada para a dispersão das células do solo, e logo a seguir, filtrada em filtro whatman estéril. Para verificar se o BC e a SS atuaram como fonte de C para os microrganismos, 20 mL do inóculo (I) foram colocados em Erlenmeyers de 500 mL de capacidade contendo 80 mL de meio de cultivo mineral de Bushnell Haas (Tabela 5.1). Quando o objetivo foi verificar se o BC ou a SS atuaram como fonte de C, 5 g de BC ou SS foram adicionados aos Erlenmeyers

(Tabela 5.1). Para verificar se a SS também atuou como fonte de N para os microrganismos, foi retirada a fonte de N habitual (0,1 g de NH_4NO_3) de alguns Erlenmeyers com meio de cultivo Bushnell Haas (BH) e foi adicionado 0,5 g de glicose como fonte de C junto aos 5 g de SS (Tabela 5.1). Para fins comparativos foram feitos dois tipos de controle. O controle biótico, que recebeu material vegetal, mas não recebeu inóculo do solo, e o controle abiótico, que foi igual ao controle biótico, acrescentando 15 g do biocida $AgNO_3$ (Tabela 5.1). A quantidade de material vegetal utilizada (5 g) apresenta 2% de C em sua composição, levando-se em consideração que normalmente um meio de cultivo contém de 1-2% de C. Os Erlenmeyers do ensaio foram colocados sob agitação a 120 rpm e temperatura de 30°C por 15 dias. No final do ensaio foi realizada a quantificação de BH, FF e BDO. O ensaio é apresentado visualmente na Figura 5.5.

Tabela 5.1 Avaliação do crescimento microbiano na presença do bagaço de cana-de-açúcar (BC) ou da serapilheira do sabiá (SS) como fonte de C e N. Bactérias heterotróficas totais (BHT), Fungos filamentosos (FF) e microrganismos degradadores de óleo (MDO).

Ensaio	Tempo	Condição
1	0 dias	BH + I
1	15 dias	BH + I
2	15 dias	BH + I + Ag NO_3
3	15 dias	BH + I + BC
4	15 dias	BH + BC
5	15 dias	BH + I + SS
6	15 dias	BH + SS
7	15 dias	BH (-N) + I + SS
8	15 dias	BH (-N) + $AgNO_3$ + SS

BH- meio de cultivo Bushnell Haas, I- Inóculo, $AgNO_3$ – nitrato de prata (biocida), BC- bagaço de cana-de-açúcar, SS- serapilheira do sabiá, (-N)- BH sem fonte de N mineral.

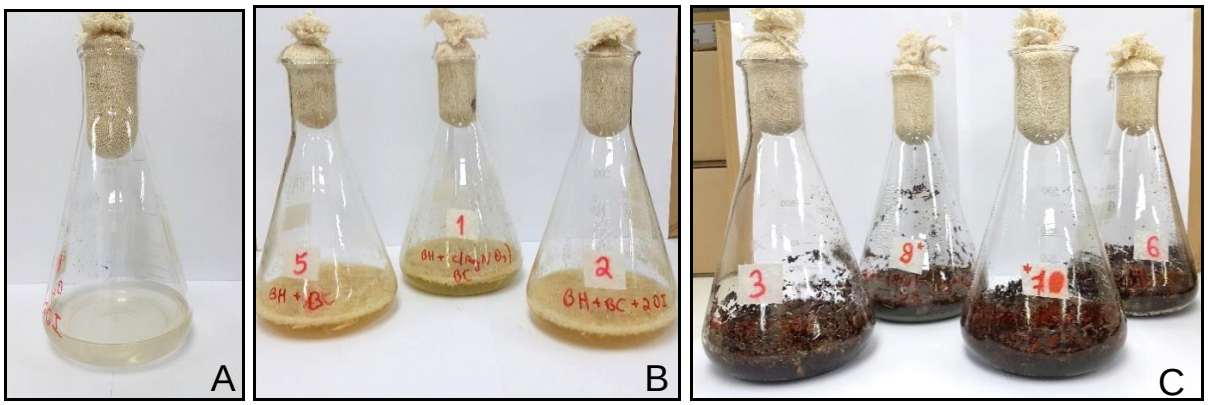


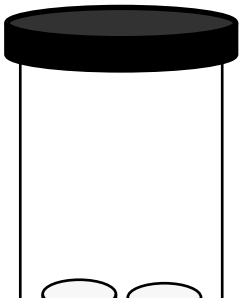
Figura 5.5 Teste para avaliar o efeito da adição do bagabaço de cana-de-açucar (BC) e da serrapilheira do sabiá (SS) como fontes de C e N. A- Meio BH + inóculo do solo (I); B- Meio BH + I + BC como fonte de C; C- Meio BH + I +SS como fonte de C e N.

5.3.2 Evolução de CO_2 acumulado

Para verificar a respiração acumulada do solo (evolução de CO_2) foi utilizada a técnica descrita por BARRETO et al. (2010) com modificações. O experimento foi realizado em condições aeróbicas, dentro de recipientes plásticos (em triplicata) (Figura 5.6), onde foram colocados dois frascos de vidro *snap caps* sem tampa (Figura 5.6). Em um dos frascos de vidro foram colocados 50 g de solo, e no outro 10 mL de NaOH 1 mol L^{-1} para absorção do CO_2 liberado durante a incubação (Figura 5.6). A SS foi utilizada na quantidade de 0,5 e 1 g/50 g de solo (correspondendo a 10 e 20 g kg^{-1} de solo), e o BC na quantidade de 1 e 2 g/50g de solo (correspondendo a 20 e 40 g kg^{-1} de solo).

Os potes contendo os *snap caps* foram tampados e envolvidos com filme de PVC imediatamente após a montagem para evitar a influência do CO_2 presente no meio externo. Três recipientes plásticos que não continham o frasco com solo foram montados apenas com o frasco com NaOH (10 mL), servindo como branco (Figura 5.6).

As amostras de solos foram incubadas por 91 dias (13 semanas), em laboratório, a temperatura média de 26°C ± 2°C, e as determinações de evolução de CO_2 foram realizadas com 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 63, 91 dias de incubação. As soluções de NaOH 1 mol L^{-1} dos recipientes foram trocadas e devidamente fechadas após cada amostragem, inclusive no branco (Figura 5.6).



A

B C

Figura 5.6 Recipiente plástico vedado (A) contendo dois frascos snap caps (B e C). Frasco com NaOH (B) e frasco com solo (C).

5.4 Avaliação do efeito dos resíduos vegetais na biorremediação do solo

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação na Escola de Química - UFRJ, Estado do Rio de Janeiro. As coordenadas geográficas do local são 22° 51’ S de latitude Sul e 43° 13’ W de longitude, Oeste (Figura 5.7).

Figura 5.7 Casa de vegetação onde os experimentos foram conduzidos.

5.4.1 Experimentode biorremediação em microcosmo

Para a realização do ensaio de biorremediação em microcosmo. O solo foi acondicionado em recipientes plásticos (13,5 cm de profundidade, 12 cm de largura e 20,5 cm de comprimento), na quantidade de 1kg (Figura 5.8). Durante o experimento o solo apresentou temperatura de 30 ± 2°C em média. Os recipientes

foram cobertos por plástico insufilme e alguns orifícios foram feitos manualmente com auxílio de uma pinça com o objetivo de reduzir a perda excessiva de umidade (Figura 5.8).

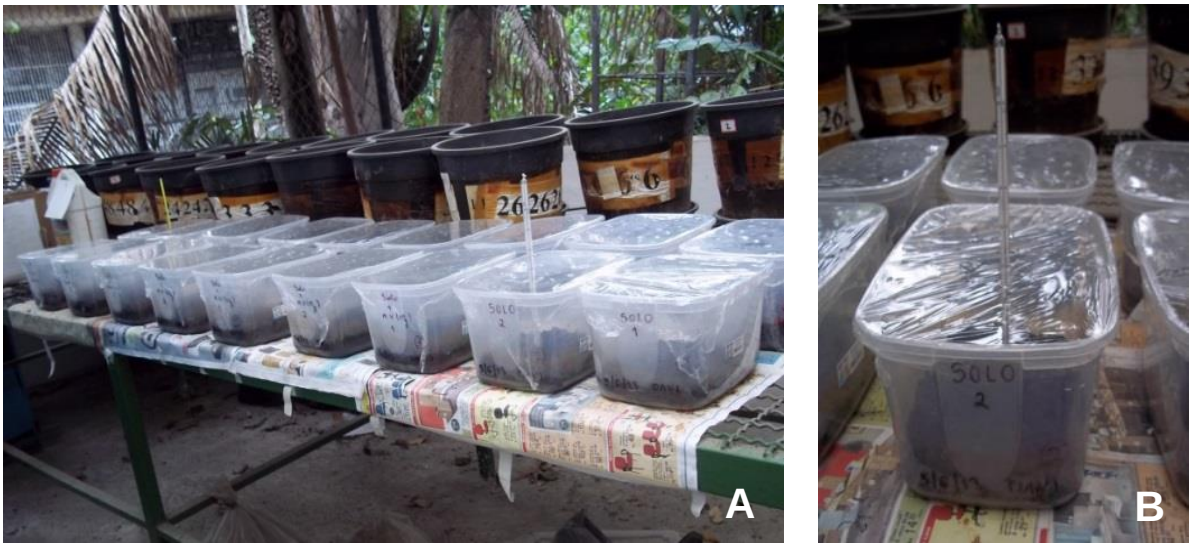


Figura 5.8 Experimento de biorremediação em microcosmo (A). Detalhe do recipiente (B).

O experimento foi conduzido com solo sem adição de resíduos vegetais (controle), solo com adição do bagaço de cana-de-açúcar, solo com serapilheira da leguminosa florestal *Mimosa caesalpiniifolia* (sabiá), e solo com a mistura do bagaço de cana-de-açúcar e serapilheira do sabiá em diferentes proporções (Figura 5.9).

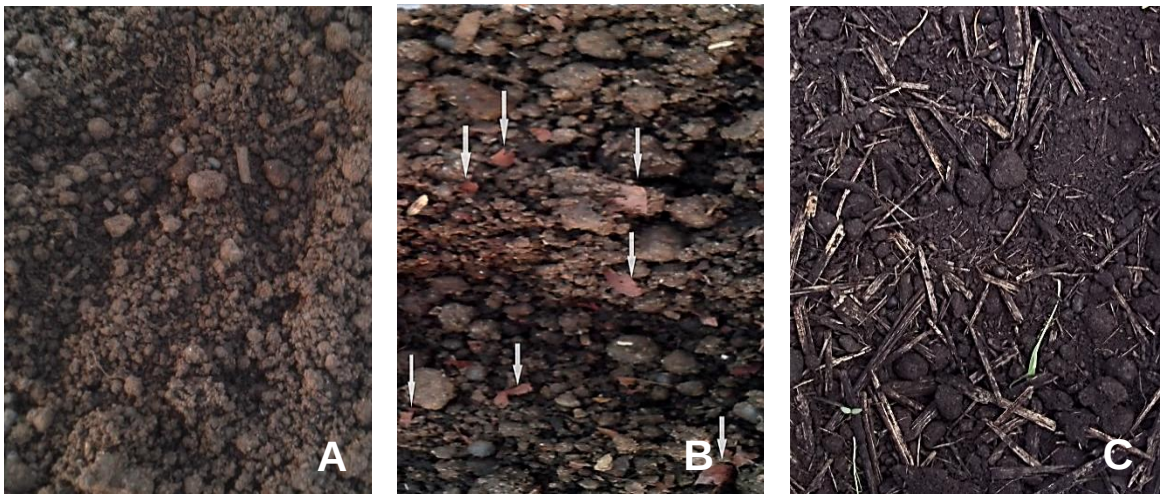


Figura 5.9 A- Solo sem adição de material vegetal, B- solo com adição de 20 g kg^{-1} solo da serapilheira do sabiá, com algumas setas para ajudar na visualização, e C- solo com 20 g kg^{-1} solo de bagaço de cana-de-açúcar.

Quando os solos receberam apenas um dos resíduos vegetais, a quantidade de BC utilizada foi de 20 g ou 40 g kg^{-1} solo, enquanto a quantidade de SS adicionada foi de 10 g ou 20 g kg^{-1} solo. Nos solos onde foram adicionados os dois materiais vegetais, as combinações foram: 20 g do BC mais 10 g da SS; 20 g de BC mais 20 g da SS; 40 g de BC mais 10 g da SS; 40 g de BC mais 20 g da SS. Os ensaios foram realizados em duplicata e estão descritos na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 Descrição do experimento de biorremediação em microcosmo.

Solo	**Materiais vegetais utilizados nos tratamentos**			
Experimento*	**Bagaço de cana-de-açúcar**		**Serapilheira do sabiá**	
	20 g kg^{-1} solo	40 g kg^{-1} solo	10 g kg^{-1} solo	20 g kg^{-1} solo
1				
2	**X**			
3	**X**		**X**	
4	**X**			**X**
5		**X**		
6		**X**	**X**	
7		**X**		**X**
8			**X**	
9				**X**

* Todos os experimentos foram realizados em duplicata

Durante o experimento foram realizadas amostragens do solo para avaliar a influência das diferentes quantidades de resíduos vegetais sobre o processo de biorremediação. Semanalmente foi realizado o monitoramento da umidade, pH, e da

temperatura do solo e do ambiente (Tabela 5.3). Sempre que necessário a umidade foi ajustada ao teor inicial.

Tabela 5.3 Parâmetros avaliados durante os experimentos de biorremediação

Parâmetro	Análise	Tempo (dias)
Microrganismos cultiváveis	BHT, FF e MDO	0, 30, 60, 90
Biologia molecular	Técnica de sequenciamento em larga escala	0,30, 60
Concentração de contaminantes	HTP	0, 30, 60, 90
Análises físico-químicas	Umidade, pH e temperatura	A cada 7 dias

As amostras de solo nas diferentes condições experimentais foram retiradas em períodos de 0 dia, 30 dias, 60 dias, e 90 dias de ensaio para a quantificação de microrganismos cultiváveis (bactérias heterotróficas totais - BHT), (fungos filamentosos - FF) e (microrganismos degradadores de óleo - MDO), realização da análise de biologia molecular (Sequenciamento em larga escala do gene rrs utilizando a plataforma iontorrent) e análise de contaminantes (HTP), conforme descrito na Tabela 5.3.

Após a realização do experimento em microcosmo, e da obtenção dos resultados, a remoção de HTP foi utilizada como variável resposta para realização de um planejamento estatístico com o intuito de verificar a melhor condição testada.

5.4.2 Experimento de biorremediação em escala maior

Para a realização do ensaio de biorremediação em escala maior, o solo foi acondicionado em recipientes plásticos de (20 cm de profundidade, 12 cm de largura e 40 cm de comprimento), na quantidade de 5 kg (5 vezes maior que o primeiro ensaio em microcosmo) (Figura 5.10). Durante o experimento o solo apresentou temperatura de 26 ± 2°C em média. Os solos foram cobertos por plástico insufilme e alguns orifícios foram feitos manualmente com auxílio de uma pinça com o objetivo de reduzir a perda excessiva de umidade (Figura 5.10).

Figura 5.10 Experimento de biorremediação em escala maior que o experimento em microcosmo.

A adição da serapilheira do sabiá e do bagaço de cana-de-açúcar foi feita na quantidade de 100 g cada (20 g kg^{-1} solo de BC e SS). Duas condições foram avaliadas: materiais vegetais misturados ao solo; e materiais vegetais adicionados na superfície no solo.

No início do experimento (0 dias), com 30 dias, 60 dias e 90 dias, foi feita a quantificação de microrganismos (BHT, FF, MDO), e a determinação de HTP. A umidade foi ajustada sempre que necessário a 40% durante todo o experimento. Periodicamente, foi realizado o revolvimento do solo, monitoramento do pH e da temperatura do solo.

5.5 Procedimentos analíticos realizados com o solo e os resíduos vegetais

Para a caracterização do solo as análises físico-químicas e químicas foram realizadas na EMBRAPA Solos, localizada no Jardim botânico, RJ. A análise de HTP e de biologia molecular do solo foram realizadas no CETEM, localizado na UFRJ, RJ. As análises de caracterização químicas dos materiais vegetais foram realizadas pelo Laboratório de solos da UENF, localizada em campos dos Goytacazes, RJ.

5.5.1 Elementos químicos

Para a determinação dos elementos químicos do solo e dos resíduos vegetais as amostras destes materiais foram anteriormente tratadas com diferentes extratores. No solo o Fe, Al, Cd, Cr, Cu, Pb, Ni, V e Zn foram extraídos com solução de água régia invertida por digestão em micro-ondas de acordo com a metodologia

descrita pela USEPA (2007). O P e o K foram extraídos por Mehlich-1, e o Ca, Na, Mn e Mg extraídos por KCl mol L^{-1} (EMBRAPA, 1997). Para as plantas, a extração dos elementos químicos foi realizada por digestão nítrico-perclórica (ANDERSON E INGRAM, 1996).

A quantificação dos elementos químicos foi realizada utilizando os métodos descritos no manual da EMBRAPA (1997). As quantidades de Fe, Al, Cd, Cr, Cu, Pb, Ni, V, Zn, Ca, Mn e Mg foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica com chama. O P foi analisado por espectrofotometria na região visível (725 nm), e o K e Na por fotometria de emissão em chama. O N foi analisado pelo método Kjeldahl, e o teor de carbono orgânico foi determinado por oxidação com $K_2Cr_2O_7$ 0,21 mol L^{-1} em meio ácido conforme descrito por ANDERSON E INGRAM, 1996.

Os polifenóis totais dos resíduos vegetais foram determinados utilizando o método de Folin-Denis com 50% de metanol (ANDERSON E INGRAM, 1996). A curva padrão foi preparada utilizando ácido tânico. As cinzas, lignina e os teores de celulose nos materiais vegetais foram determinados pelo método de fibra em detergente ácido (FDA) de VAN SOEST E WINE (1968), que é baseado na separação dos diferentes constituintes.

5.5.2 Textura

Foram verificadas as proporções de areia, silte e argila presentes no solo. Para tal, foi utilizado o principio de que a matéria em suspensão (silte e argila) confere determinada densidade ao liquido. Portanto, com a ajuda de um densímetro, relacionaram-se as densidades com o tempo de leitura e com a temperatura, calculando com esses dados a porcentagem das partículas (EMBRAPA, 1997).

A determinação foi feita colocando-se 25 g de TFSA em dois beckers de 250 mL. Em um deles, foram adicionados 12,5 mL de NaOH 1 mol/L e 50 mL de água destilada. No outro, colocou-somente água destilada. Ambos ficaram em repouso por 15 minutos. Após esse tempo, as suspensões dos beckeres foram transferidas para dois copos metálicos do agitador Hamilton Beach, e os volumes foram completados com água destilada até 2/3 da capacidade do copo do agitador, agitando-se por 10 minutos a 12.000 rpm. Após essa etapa, o conteúdo foi individualmente transferido para uma proveta de 500 mL, que teve o volume completado com água destilada, estando o densímetro dentro da suspensão. O densímetro foi então retirado e o conteúdo foi homogeneizado com um agitador

manual durante um minuto. Após o repouso, foi anotado o tempo de início da sedimentação. Após quatro minutos do inicio da sedimentação, o densímetro foi colocado novamente para fazer a leitura do silte + argila, verificando-se a temperatura da suspensão, para correção posterior da leitura. Posteriormente, duas horas a partir do início da sedimentação, foi feita a leitura da argila. Para a amostra que foi dispersa em água destilada, foi feita uma única leitura. A temperatura da suspensão foi então verificada novamente para posterior correção da leitura.

O densímetro mede a densidade da suspensão, sendo necessário verificar sua correspondência com o densímetro de Bouyoucos, calibrado em g de solo/ L de suspensão. Além disso, sempre que a análise é realizada, o densímetro deve ser colocado com cuidado para evitar perturbação na suspensão.

Para o conhecimento das frações do solo em porcentagem (%) foram realizados os cálculos a seguir (Equações 5.1, 5.2 e 5.3):

$$Silte\ (\%) = \frac{(1°\ leituta\ corrigida - 2°\ leitura\ corrigida) * 50}{massa\ de\ TFSA}$$ **Equação 5.1**

$$Argila\ (\%) = \frac{(2°\ leitura\ corrigida) * 50}{massa\ de\ TFSA}$$ **Equação 5.2**

$$Areia\ (\%) = 100 - \%\ silte - \%\ argila$$ **Equação 5.3**

Sendo:

TFSA = Terra fina seca ao ar

5.5.3 Capacidade de retenção de água

A metodologia adotada para a determinação da capacidade de retenção de água (CRA) foi adaptada de ALEF E NANNIPIERE (1995). Para tal, o solo foi seco, e 20 g desse solo foram pesados e transferidas para papel de filtro em funil, que teve como suporte uma proveta de 100 mL de capacidade previamente pesada. Cerca de 100 mL de água destilada foram adicionadas ao solo e, fechada a parte superior do

funil para que não houvesse evaporação, durante 24 h, ou tempo suficiente para que houvesse percolação total da água para a proveta. A proveta com a água percolada foi pesada, e os valores determinados foram usados no cálculo da capacidade de retenção de água (Equação 5.4).

$$CRA = \left(\frac{P_i - P_f}{ms}\right) * 100$$ **Equação 5.4**

Sendo:

CRA = capacidade de retenção de água [%]

P_i = Peso inicial da proveta com 100 mL de água [g]

P_f = Peso final da proveta com água percolada [g]

ms = Massa do solo seco [g]

5.5.4 Umidade

O teor de umidade dos solos foi verificado pelo método gravimétrico em balança analítica digital IV200 GEHAKA, com secagem por infravermelho, que fornece o valor da quantidade de água da amostra automaticamente.

5.5.5 pH

A determinação do pH do solo foi feita pela metodologia realizada em água, de acordo com BAPTISTA (2007). Para tal, foram utilizados 10 g de solo acrescidos de 25 ml de água destilada. A mistura foi agitada por 15 minutos em placa magnética para homogeneização e em seguida a medição foi feita em um potenciômetro digital da marca QUIMIS, modelo Q400AS.

5.5.6 Determinação de hidrocarbonetos totais do petróleo

Buscando avaliar a degradação dos hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP) presentes no solo impactado por borra oleosa de petróleo nos diferentes tratamentos de solos avaliados, a determinação dos HTP foi realizada de acordo com a

metodologia descrita por TAKETANI et al. (2015). As amostras de solo foram submetidas à secagem em estufa de circulação forçada de ar em temperatura de 60°C durante 16 horas. Posteriormente, o solo foi macerado, e 1 g de solo foi pesado e misturado a 2 g de sulfato de sódio anidrido, com o objetivo de secar totalmente a amostra de solo. Para a extração de HTP foram adicionados 25 ml de n-hexano (padrão HPLC, Tedia) nas amostras de solo secas, que foram colocadas por 60 minutos em ultrassom. O extrato permaneceu em repouso por cerca de 10 minutos, e a leitura do sobrenadante foi feita por espectrometria de infravermelho utilizando o equipamento Infracal (modelo HART-T da Wilks Enterprise). A curva padrão foi feita utilizando óleo extraído do mesmo solo de *landfarming* avaliado neste trabalho.

5.5.7 Bactérias heterotróficas totais

A concentração de bactérias heterotróficas totais (BHT) das amostras de solo foi avaliada pelo método em profundidade (*pour plate method)*. Para tal, tomando cuidado para a realização do trabalho em conformidade com as técnicas assépticas, 10g do solo foram inseridas em frasco Erlenmeyer de 500 mL de capacidade contendo 90 mL de solução fisiológica a 0,85% de NaCl. A mistura foi colocada sob agitação por 30 minutos em incubadora agitada para a dispersão das células do solo e, logo a seguir, a partir do sobrenadante (suspensão celular), foram preparadas diluições, em tubos de ensaios, também com solução fisiológica a 0,85% de NaCl, variando de 10^{-1} a 10^{-11}. De cada diluição, foi retirada uma alíquota de 1 mL, e adicionada em placas de Petri estéril, sobre as quais, verteu-se 18 mL do meio de cultivo Ágar Nutriente (Tabela 5.4), fundido na temperatura de 45°C. Posteriormente, foi realizada a homogeneização das placas (feitas em duplicatas). Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30° ± 2°C durante 48h e, posteriormente, foi realizada a contagem das colônias presentes. Os resultados foram calculados com base no volume de alíquota e diluição, e expressos em UFC (unidade formadora de colônia) por grama de solo seco.

Tabela 5.4 Composição do meio de cultivo Agar Nutriente

Componentes	Concentração (g/L)

Peptona decarne	5
Extrato de carne	3
Glicose	5
Agar-agar	15
pH do meio = 7,0 ± 0,2	

5.5.8 Fungos filamentosos

A determinação da concentração de fungos filamentosos (FF) nas amostras de solo foi realizada de acordo com o mesmo procedimento descrito acima para as bactérias heterotróficas totais, embora a contagem dos fungos tenha sido realizada após 72h. O meio de cultivo utilizado foi o Agar Sabouraud (Tabela 5.5), que é apropriado para o crescimento desses microrganismos, sendo adicionados 50 ppm de amoxicilina, com o intuito de inibir o crescimento de bactérias.

Tabela 5.5 Composição do meio de cultivo Agar Sabouraud

Componentes	**Concentração (g/L)**
Peptona	10
Dextrose	40
NaCl	6,5
Agar - agar	20
pH do meio = 5,5 ± 0,2	

5.5.9 Microrganismos degradadores de óleo

A contagem dos microrganismos degradadores de óleo (MDO), capazes de degradar os hidrocarbonetos presentes na borra oleosa do petróleo foi realizada de acordo com a metodologia adotada por WRENN E VENOSA (1996). Assim como na metodologia adotada para quantificação das BHT, tomou-se o cuidado de realizar o trabalho em conformidade com as técnicas assépticas, e foram preparadas diluições

de alíquotas do solo, de 10^{-1} até 10^{-8}, em solução fisiológica de NaCl a 0,85%, de onde foram retiradas alíquotas de 0,1 mL, que foram transferidas para três poços de uma microplaca de 24 poços (Figurura 5.11), que anteriormente receberam 1,7 mL do meio de cultivo mineral Bushnell Haas (BH), cuja composição está descrita na Tabela 5.6. Posteriormente, em cada poço inoculado foram adicionados 5µL de óleo árabe leve estéril. As placas foram colocadas em estufa bacteriológica, e incubadas a 30°C durante 7 dias. Após esse tempo, a degradação do óleo e, portanto, o crescimento dos microrganismos degradadores de óleo, foi avaliado visualmente, comparando-se os poços que receberam óleo e que tiveram a adição de 0,1 mL de água destilada estéril ao invés da alíquota de solo diluída (teste em branco). Os resultados foram expressos através da técnica do número mais provável (NMP), em NMP por grama de solo seco.

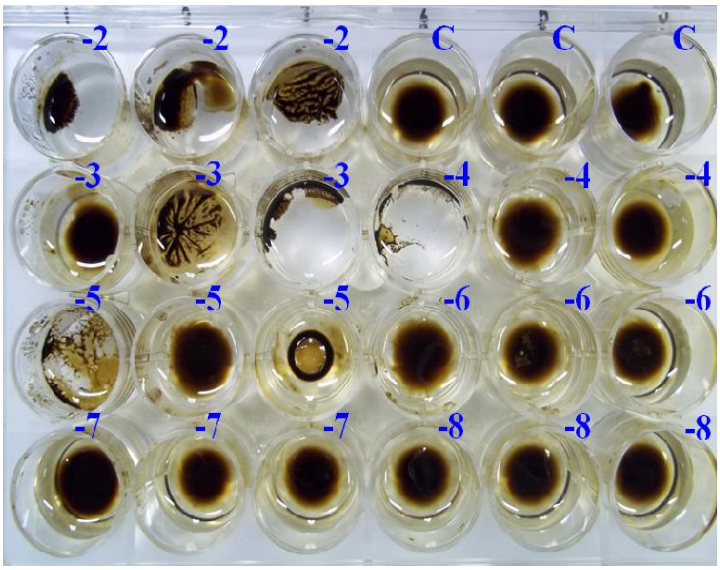


Figura 5.11 Placa de cultura de células de 24 poços. O controle (C) consiste no teste em branco realizado em triplicata. Nos demais poços estão presentes as diluições do solo (de 10^{-2} até 10^{-8}) também em triplicata, indicando onde houve degradação pelos microrganismos.

Tabela 5.6 Composição do meio de cultivo Bushnell Haas.

Componentes	Concentração (g/L)
Sulfato de magnésio	0,20
Cloreto de cálcio	0,02
Fosfato de potássio monobásico	1,0
Fosfato de potássio dibásico	1,0
Nitrato de amônio	1,0

Cloreto férrico	0,05
pH do meio = 7,0 ± 0,2	

5.5.10 Biologia molecular do solo pela tecnologia de sequenciamento de nova geração

Foi realizado um sequenciamento em larga escala do gene que codifica o rRNA ribossomal do Domínio Bacteria. Para isso, foi feita a extração de DNA com o kit de extração de DNA comercial Fast DNA spin kit for soil (MPBio), seguindo as instruções do fabricante. Foram utilizados os *primers* 967f e 1193r para a amplificação dos genes que codificam o rRNA 16S de Bacteria (SOGIN et al., 2006; WANG E QIAN, 2009). Nas reações de PCR visando o sequenciamento por Ion Torrent, foram acrescentados sequências de*barcode* (AMARAL-ZETTLER et al., 2009), a extremidade 5' dos iniciadores "forward". Da mesma maneira, foram adicionadas às extremidades 5' dos *iniciadores* sequências de adaptadores específicos para a amplificação por PCR em emulsão (em PCR) necessária para o sequenciamento por Ion Torrent. Bibliotecas para sequenciamento em larga escala foram preparadas usando o kit Ion PGM Template OT2 200pb segundo o protocolo do fabricante (Life Technologies). O sequenciamento foi realizado usando o instrumento Ion Torrent PGM system usando o kit Ion PGM sequencing kit 200pb e chip 316v2. As sequências obtidas foram analisadas utilizando a plataforma Qiime (CAPORASO et al., 2010), e todas as análises estatísticas também foram realizadas utilizando esse mesmo software, com o comando core_diversity_analysis.py (KAVAMURA et al., 2013).

5.5.11 Avaliação da evolução de CO_2 acumulado do solo

O CO_2 da solução de NaOH foi determinado potenciometricamente por titulação com HCl 0,5 mol L^{-1} no intervalo de pH de 8,3 a 3,7, segundo método descrito por SALCEDO E SAMPAIO (1982), após ter sido adicionado à solução, 2 mL de $BaCl_2$ a 10% e 1 gota de fenoftaleína.

5.5.12 Planejamento fatorial 3^2 do experimento em microcosmo

A análise estatística foi realizada com os dados de remoção de HTP do ensaio em microcosmo. O objetivo da análise foi verificar a melhor condição de tratamento, ou seja, a melhor combinação de BC/SS para promover a maior remoção de HTP. Para tal, foi executado o planejamento experimental fatorial 3^2 no programa Statistica™ (v. 12.0), trabalhando com um intervalo de confiança de 90% (Tabela 5.7). Os experimentos foram realizados em duplicata, totalizando 18 ensaios. As variáveis estudadas foram os materiais vegetais (BC e SS), e os níveis foram as quantidades desses vegetais (Tabela 5.7).

Tabela 5.7 Descrição do experimento analisado estatisticamente pelo planejamento fatorial 3^2

Experimento	SS (X_1)	BC (X_2)
1	-1*	-1 *
2	0 **	-1 **
3	+1 ***	-1 ***
4	-1	0
5	0	0
6	+1	0
7	-1	+1
8	0	+1
9	+1	+1

Para a SS os níveis foram: *-1= 0 g kg^{-1} de solo, ** 0= 10 g kg^{-1} de solo e *** +1= 20 g kg^{-1} de solo.
Para o BC, os níveis foram: *-1= 0 g kg^{-1} de solo, ** 0= 20 g kg^{-1} de solo e *** +1= 40 g kg^{-1} de solo.

A análise do planejamento experimental do tipo 3^2 gera uma análise de variância (ANOVA), e o modelo utilizado apresenta valores de coeficientes b, que são calculados para cada termo da equação, em que b0 é o termo independente que corresponde ao intercepto da reta no eixo y. A variável resposta é a incógnita Z, que corresponde a remoção de HTP, e as incógnitas X_1 e X_2 são as variáveis SS e BC correspondentes aos níveis (quantidade de material vegetal), respectivamente.

Foi com a análise estatística que foi possível definir melhores resultados de remoção de HTP para ampliar a escala do experimento.

Capítulo 6

Resultados e Discussão

O presente capítulo trata da apresentação, análise e discussão dos resultados obtidos após o tratamento de biorremediação de um solo de *Landfarming* que recebe borra oleosa do petróleo periodicamente, após a adição de resíduos vegetais. O tratamento realizado consistiu na adição do bagaço de cana-de-açúcar (BC) e da serapilheira do sabiá (SS) no solo, de forma separada e/ ou combinada. Os resultados foram abordados seguindo uma sequência. Primeiramente será mostrada a caracterização do solo e dos resíduos vegetais. Posteriormente, os resultados foram divididos em duas etapas: Ensaios preliminares, para avaliar a atuação dos resíduos vegetais como fonte de C e N; e análise da evolução de CO_2 acumulado do solo. Após a apresentação dos resultados preliminares foram abordados os resultados do experimento em microcosmo, que foram os seguintes: monitoramento do crescimento de microrganismos cultiváveis (BHT, FF, MDO); avaliação dos grupos de microrganismos predominantes e da diversidade de microrganismo pela técnica de sequenciamento em larga escala; determinação da quantidade de HTP removida; e realização do planejamento experimental fatorial 3^2

para a escolha da melhor condição de tratamento. Por ultimo, serão mostrados os resultados do ensaio em escala maior, que foi montado utilizando a proporção de BC e SS indicada na estatística como mais eficiente. Neste experimento foi avaliado o efeito da combinação do BC e da SS incorporados no solo, ou na superfície do mesmo sobre o crescimento da população de BHT, FF, MDO, e na remoção de HTP.

6.1 Caracterização do solo

A caracterização do solo foi feita com o objetivo de conhecer as principais propriedades do solo para que o tratamento de biorremediação fosse implementado. Os resultados da nálise da textura do solo estão apresentados na Figura 6.1, que mostra que a areia foi a fração predominante. A distribuição percentual das partículas do solo permitiu a classificação do solo como franco, através da utilização do triangulo textural utilizado para classificação do solo (Figura 6.1).

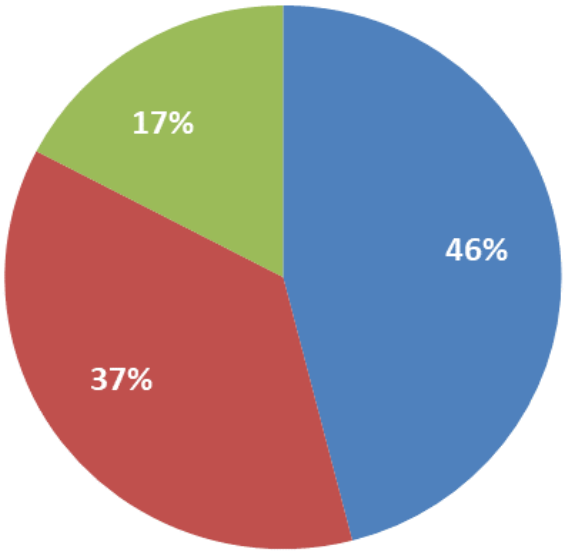


Figura 6.1 Composição textural do solo: argila (■),areia (■) e silte (■).

De maneira geral, quando a maior fração do solo é a areia, os solos são mais permeáveis que os solos argilosos e siltosos. Essa característica pode ser importante quando o tratamento de contaminantes é realizado *ex-situ,* porque a maior quantidade de areia facilita a infiltração de água no solo, difusão de gases, e o processo de biodegradação aeróbia. Essa característica também propicia um bom contato entre os microrganismos e os contaminantes presentes no solo (JACQUES et al., 2007), enquanto os solos com alto teor de argila apresentam maior capacidade de retenção de contaminantes, tornando-os menos disponíveis para a degradação microbiana (OLIVEIRA E REGITANO, 2009).

O tratamento deste solo foi relizado *ex-situ* e, portanto, uma grande quantidade de areia na composição do solo não constitui um problema, mas caso o tratamento seja realizado em área real, de forma *in-situ*, uma grande quantidade de areia pode ser uma desvantagem, devido à alta permeabilidade dos solos arenosos, os contaminantes podem atingir águas subterrâneas. No entanto, esse problema poderia ser contornado com a adição de materiais orgânicos vegetais ao solo. A matéria orgânica pode promover uma melhoria na adsorção de poluentes, como os HPAs (GAN et al., 2009) e uma melhoria na capacidade de retenção de água do solo dificultando, com isso, a contaminação dos lençóis freáticos.

O teor de umidade encontrado no solo estudado neste trabalho foi de 40% (Tabela 6.1), ou seja, o solo apresenta 0,4 ml de água por grama de solo. A quantidade adequada de água no solo é necessária para o metabolismo dos microrganismos, pois melhora a difusão dos nutrientes e substratos para que os microrganismos tenham acesso a eles. O teor de umidade deste solo está de acordo com o valor recomendado para estudos de biodegradação. Segundo JACQUES et al. (2010), somente quando o teor de água é inferior a 20% ocorre redução significativa da atividade dos microrganismos degradadores de óleo (MDO) no solo.

Além da umidade do solo, outro parâmetro que indica se o solo apresenta uma boa disponibilidade de água é a capacidade de retenção de água (CRA). Neste trabalho, a CRA foi de 30% (Tabela 6.1), e está na faixa de valores em que o solo é capaz de fornecer água em quantidade necessária para que os microrganismos

possam promover a biodegradação de hidrocarbonetos (de 25% a 85%) (LEMOS et al., 2013). Portanto, o solo apresenta uma baixa demanda por irrigação, reduzindo assim os custos no processo de biorremediação.

A CRA está diretamente relacionada com a agregação do solo. Normalmente, solos muito arenosos, que apresentam uma maior quantidade de cargas na superfície de suas partículas e não apresentam uma boa agregação, apresentam menor CRA, o que pode refletir em uma maiordemanda por irrigação (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006). Uma das maneirasde se obter um aumento da CRA desse solo arenoso é fornecendo materiais orgânicos vegetais ao solo. Os resíduos vegetais podem formar agregados complexos e persistentes no solo, e ainda estimularem o crescimento de alguns fungos, que através de suas hifas cobertas por polissacarídeos extracelulares ocupam os poros formados entre os microagregados (agregados com diâmetro < 50 µm), estabilizando assim os macroagregados (agregados com diâmetro ≥ 50 µm) (EMBRAPA, 2013).

Tabela 6.1 Caracterização físico-química, química e microbiológica das amostras de solo coletadas do sistema landfarming de refinaria.

CARACTERIZAÇÃO		RESULTADOS
FÍSICO-QUÍMICA	Umidade (%)	40,0 ± 1,5
	CRA (%)	30,0 ± 3,5
	pH	6,5 ± 0,1
QUÍMICA	Ca ($Cmol_c kg^{-1}$)	22,6 ± 0,2
	Mg ($Cmol_c kg^{-1}$)	1,4 ± 0,2
	K ($Cmol_c kg^{-1}$)	0,2 ± 0,0
	N (mg kg^{-1})	4200,0 ± 0,2
	P (mg kg^{-1})	270,3 ± 5,5
	Fe (mg kg^{-1})	108,2 ± 7,5
	Mn (mg kg^{-1})	10,6 ± 1,2
	V (mg kg^{-1})	84,0 ± 5,8
	Ni (mg kg^{-1})	59,0 ± 1,5
	Cd (mg kg^{-1})	1,8 ± 0,3
	Cu (mg kg^{-1})	296,7 ± 10,2

	Pb (mg kg^{-1})	78,9 ± 5,8
	Cr (mg kg^{-1})	75,3 ± 3,9
	Al (mg kg^{-1})	17926,7 ± 1153,4
	Zn (mg kg^{-1})	1121,7 ± 22,3
	HTP (mg kg^{-1})	32.251,0 ± 0.2
MICROBIOLÓGICA	Bactérias heterotróficas totais (BHT)	$1,12x10^8 \pm 1,63x10^7$
	Fungos filamentosos (FF)	$4,35x10^4 \pm 9,19x10^3$
	Microrganismos degradadores de Óleo (MDO)	$2,50x10^5 \pm 0,00$

O pH verificado no solo inicialmente foi de 6,5 (Tabela 6.1). Este valor está dentro da faixa de pH em que normalmente são encontradas bactérias e actinobacterias (6 - 8) (MADIGAN et al., 2010). Neste valor de pH os fungos também estão presentes. O valor do pH próximo à neutralidade é vantajoso porque pode propiciar a atividade de microrganismos sem que se faça necessária a realização de técnicas para correção do pH, conhecida como calagem, o que demandaria um custo maior para o tratamento do solo.

Foram determinados alguns elementos no solo (Tabela 6.1). Esta avaliação é importante porque os microrganismos precisam destes elementos para suas atividades metabólicas, e para apresentarem uma boa capacidade para degradar os contaminantes presentes no solo.

O solo apresentou um teor bastante elevado de N (4200 mg kg^{-1} solo) (Tabela 6.1). A avaliação do N no solo é essencial, visto que é um dos elementos mais abundante no material celular dos microrganismos, chegando a compor 12% de uma célula microbiana na formação de proteínas, ácidos nucleicos e outros componentes celulares (MADIGAN et al., 2010). Já o P, que também é bastante importante por estar presente nos ácidos nucleicos e fosfolipídeos, deve encontrar-se no solo entre 200 e 3000 mg Kg^{-1} de P (NOVAIS et al., 2007), e também está em uma quantidade dentro do recomendável (270,3 mg kg^{-1}) (Tabela 6.1). Além disso, o N e o P também se encontram na proporção recomendada de C/N/P, de 100/15/1 (FILLER et al., 2006), o que dispensa a fertilização do solo, e portanto coopera para reduzir os custos com o tratamento do solo, prática frequentemente adotada para promover o

bioestímulo dos microrganismos envolvidos na biodegradação dos contaminantes presentes no solo.

Além do N e do P, os elementos K, Ca e Mg também são importantes para o metabolismo microbiano. O K, por exemplo, é necessário para todos os organismos na síntese de proteínas. Recomenda-se uma relação entre ele e o P de 1/1 (FILLER et al., 2006). O Mg funciona como estabilizador de ribossomos da parede celular e dos ácidos nucleicos e ainda é utilizado para a atividade de muitas enzimas como um cofator. O Ca, apesar de não ser essencial para todos os microrganismos, ajuda a estabilizar a parede celular bacteriana e tem a importante função de fornecer termoresistência a endósporos (MADIGAN et al., 2010).

Alguns elementos são requeridos pelos microrganismos para seu metabolismo em quantidades ainda não reportadas pela literatura. Normalmente embora sejam necessários para o metabolismo celular, são requeridos em pequenas quantidades. O Fe é fundamental para a respiração celular, e também é um elemento chave para os citocromos e para as proteínas que contém ferro e enxofre envolvidos no transporte de elétrons. O Mn é ativador de muitas enzimas (MADIGAN et al., 2010).

Na literatura consultada não foi verificado valores referenciais para Ca, Mg, Fe e Mn, para o metabolismo de microrganismos biodegradadores de óleo. Apesar da maioria dos nutrientes serem importantes para os microrganismos, os elementos frequentemente investigados nos trabalhos de biorremediação são os macronutrientes N, P e K, considerados os mais importantes para o crescimento dos microrganismos (MADIGAN et al., 2010).

A Tabela 6.1 mostra que no solo deste trabalho foi encontrado um número maior de BHT ($1,12x10^8$ UFC g^{-1} solo) que em solos sem histórico de contaminação. A quantidade de FF foi de $4,4 \times 10^4$ UFC g^{-1} solo, e a de MDO de $2,5 \times 10^5$ NMP g^{-1} solo. A quantidade de microrganismos varia de acordo com o tipo e manejo do solo, mas a densidade de bactérias geralmente é maior do que a de outros grupos microbianos no solo (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006). Em geral a distribuição de BHT em solos não contaminados varia entre 3 a 7 na ordem de grandeza, FF entre 3 a 4 na ordem de grandeza, e MDO de 2 a 6 na ordem de grandeza na camada de 0 - 20 cm de solo (ALRUMMAN et al., 2015; SHAHSAVARI et al., 2013; MADIGAN et al., 2010). A grande população de bactérias no solo pode ser explicada pela presença

de HTP no solo. Os hidrocarbonetos presentes na borra oleosa do petróleo podem ter atuado como fonte de C para alguns microrganismos com capacidade para degradá-los. De fato, a quantidade de MDO verificada (2,5 x 10^5 NMP g^{-1} solo) pode ser considerada alta. Estima-se que, em solos não contaminados por petróleo, apenas 0,1% dos organismos são hidrocarbonoclásticos.

Os valores encontrados para os metais (Tabela 6.1) estão abaixo do que é preconizado pelo Ministério do Meio Ambiente do Brasil através do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2014) para intervenção em áreas industriais (VI) (Quadro 4.4). Apesar disso, todos os metais estão presentes em quantidades acima do valor adotado para o qual justifica a prevenção (VP) (Quadro 4.4). Este parâmetro, junto ao teor de HTP encontrado no solo (32.251,0 mg kg^{-1} solo) (Tabela 6.1), que é considerado alto de acordo com os valores de referência da lista holandesa de 2000 (CETESB, 2014) (Quadro 4.5), indica que a área necessita da adoção de técnicas que possam auxiliar a reduzir o nível de contaminação no solo, especialmente se for considerado um futuro descomissionamento, pois o local do *landfarming* está cercado por casas.

A adição de materiais orgânicos vegetais no solo pode contribuir para tornar os metais menos disponíveis. Alguns materiais vegetais promovem um aumento no pH do solo, o que pode tornar alguns metais como Fe, Zn, e Al menos disponíveis e menos tóxicos (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006). Além disso, os resíduos de plantas contêm ácidos orgânicos, que podem formar grupos funcionais (principalmente carboxílicos e fenólicos), participando de reações químicas no solo como complexação ácido orgânico-metal, redução da toxidez por Al, adsorção de íons, e lixiviação de elementos no solo (PAVINATO E ROSOLEM, 2008).

6.2 Caracterização dos resíduos vegetais

Assim como é importante conhecer as características do solo que será tratado, para que se faça a escolha do melhor método de biorremediação a ser realizado, também é fundamental que se faça a caracterização dos materiais vegetais, caso o tratamento escolhido contemple a utilização de resíduos vegetais com o objetivo de melhorar o processo de biorremediação no solo. A biodegradação de HTP pode estar diretamente associada à composição do material vegetal.

Os resultados encontrados na análise química do BC e SS mostram que a serapilheira do sabiá apresentou maiores teores para alguns elementos (Tabela 6.2), sugerindo que a SS pode atuar melhor do que o BC quando o efeito desejado for melhorar a composição nutricional do solo para estimular o crescimento de microrganismos.

Tabela 6.2 Caracterização dos resíduos vegetais.

Material Vegetal	Caracterização química									
	P	Ca	Mg	K	Na	N	C	Pol	Cel	Lig
	----------mg kg^{-1}----------					----------%----------				
BC	500,0	383,3	421,3	3.400,0	500,0	0,1473	39,46	0,3829	33,92	6,96
SS	525,0	12.171,5	1.939,5	1,500,0	600,0	1,3841	36,36	0,4962	24,08	51,08

Pol - Polifenóis, Cel - Celulose, Lig - lignina.

As taxas de decomposição do material vegetal e da liberação de nutrientes são reguladas pela interação das variáveis qualitativas do substrato, condições ambientais e organismos decompositores. No que diz respeito ao material vegetal, diversos índices de qualidade têm sido propostos como bons preditores da taxa de decomposição e liberação de nutrientes, destacando-se as relações C/N, C/P, polifenol/N e lignina/N (GAMA-RODRIGUES et al., 1999; FONTES, 2006; NDAW et al., 2009).

Todas as relações analisadas neste trabalho foram menores para a SS do que para o BC (Tabela 6.3). Destacaram-se as relações entre Celulose/N, C/N, e Polifenol/N, que chegaram a ser de aproximadamente 13, 10, e 7 vezes menores na SS do que no BC respectivamente.

Tabela 6.3 Relações entre alguns componentes presentes nos resíduos vegetais.

Material vegetal	C/N	C/P	Polifenol/N	Celulose/N	Lignina/N
	----------%----------				
BC	267,890	0,078	2,600	230,280	47,250
SS	26,270	0,069	0,358	17,398	36,905

Resíduos vegetais que apresentam essas relações em valores menores decompõem-se mais rápido do que os que apresentam essas relações com valores mais altos (SILVEIRA E FREITAS, 2007). Esses dados indicam que a serapilheira do sabiá atua melhor como fonte nutricional do que o BC.

A quantidade de celulose é maior no BC que na SS, enquanto a quantidade de lignina é maior na SS (Tabela 6.2). A importância de se conhecer a quantidade desses componentes na estrutura dos materiais vegetais, é que diferentes proporções deles pode conferir uma maior labilidade ou recalcitrância ao material vegetal, influenciando diretamente na degradação dos mesmos pelos microrganismos envolvidos. Os fungos, por exemplo, crescem bem na presença de materiais orgânicos vegetais que possuem em sua composição uma grande quantidade de celulose como fonte de carbono (SASHAVARI et al., 2013). Isso porque a fração celulósica encontra-se envolvida pela lignina, cuja função é aumentar a resistência da estrutura dos vegetais a ataques químicos e enzimáticos (MURPHY E MCCARTHY, 2005). Estes componentes resultam em um material flexível, porém altamente resistente a algumas espécies de microrganismos que não apresentam enzimas ligninolíticas para degradar a lignina (MURPHY E MCCARTHY, 2005).

6.3 Ensaio preliminares

6.3.1 Ensaio para avaliar os resíduos vegetais como fontes de C e N para os microrganismos do solo.

Este teste foi realizado com o intuito de verificar a participação dos resíduos vegetais como fonte de C e N, tendo em vista que foi verificado maior crescimento na população de microrganismos (BHT, FF e MDO) quando o BC e a SS foram adicionados (ensaios 3, 4, 5, 6, 7) em relação aos solos que não receberam materiais vegetais (ensaios 1 e 2), o que pode ser verificado na Tabela 6.4.

Na Tabela 6.4 foi observado um aumento no número de BHT, FF e MDO nos ensaios que receberam BC como fonte de C com e sem inóculo (ensaios 3 e 4), e SS com e sem inóculo (ensaios 5 e 6), exceto para os ensaios abióticos (ensaios 2 e 8). Isso sugere que os microrganismos presentes nos resíduos das plantas também foram importantes para incrementar a capacidade de biodegradação. De acordo com HAMZAH et al. (2014), resíduos vegetais como por exemplo o BC, contêm microrganismos degradadores de xenobióticos, incluindo bactérias, actinobacterias e fungos lignolíticos. Os microrganismos oriundos do material vegetal podem aumentar a quantidade de microrganismos capazes de promover a degradação de HTP no solo, e os materiais vegetais acabam atuando como facilitadores do bioestímulo e do bioaumento (HAMZAH et al., 2014).

Tabela 6.4 Avaliação do crescimento microbiano na presença de bagaço de cana-de-açúcar (BC) ou da serapilheira do sabiá (SS) como fonte de C e N. Bactérias heterotróficas totais (BHT), Fungos totais (FF) e microrganismos degradadores de óleo (MDO).

Ensaio	Tempo	Condição	BHT	FF	MDO
1	0 dias	BH + I	$1,1 \times 10^{4}$	>30	$4, 5 \times 10^{3}$
1	15 dias	BH + I	$1,2 \times 10^{7}$	>30	$1,1 \times 10^{10}$
2	15 dias	BH + I + Ag NO_3	>30	>30	>30
3	15 dias	BH + I + BC	$>10^{13}$	$>10^{7}$	$1,4 \times 10^{10}$
4	15 dias	BH + BC	$>10^{13}$	$>10^{7}$	$1,1 \times 10^{10}$
5	15 dias	BH + I + SS	$2,3 \times 10^{13}$	$3,5 \times 10^{4}$	$1,1 \times 10^{13}$
6	15 dias	BH + SS	$2,6 \times 10^{13}$	$3,3 \times 10^{4}$	$4,5 \times 10^{12}$
7	15 dias	BH (-N) + I + SS	$9,9 \times 10^{10}$	$8,2 \times 10^{6}$	$2,5 \times 11^{12}$
8	10 dias	BH (-N) + $AgNO_3$ + SS	>30	>30	>30

BH- meio de cultivo Bushnell Haas, I- Inóculo, $AgNO_3$ – nitrato de prata (biocida), BC- bagaço de cana-de-açúcar, SS- serapilheira do sabiá, (-N)- BH sem fonte de N mineral.

O ensaio 7 mostra que os microrganismos foram capazes de utilizar o SS como fonte de N, uma vez que o resíduo vegetal era a única fonte desse nutriente e possui alto conteúdo de N (Tabela 6.4).

Podemos observar que o BC e o SS promovem o crescimento de diferentes tipos de microorganismos (BHT, FF e MDO) (Tabela 6.4). O crescimento dos microrganismos BHT e FF foi mais significativo nos meios com BC (ensaios 3 e 4) do que com SS (ensaios 5 e 6) (Tabela 6.4). No entanto, o meio com SS foi mais eficiente na estimulação do crescimento de MDO (ensaios 5, 6 e 7) (Tabela 6.4). Esse perfil dos microrganismos presentes em um solo contaminado com petróleo enfatiza a importância do maior teor de N da SS para a estimulação dos MDO presentes no solo (LIM et al., 2016). Por outro lado, o BC foi a melhor fonte de C para os microrganismos. Isso ocorreu provavelmente devido a sacarose presente nas fibras do BC, o que estimulou fortemente o crescimento de BHT e FF. Considerando ainda que ambos os resíduos podem atuar como materiais estruturantes, o uso combinado de SS e BC indica um maior efeito na obtenção da degradação do HTP pelos microrganismos, e, consequentemente, na redução da contaminação do solo.

6.3.2 Evolução de CO_2 acumulado

A evolução acumulada de CO_2, que também é denominada de respiração do solo, se trata de uma medida indireta utilizada para acompanhar a atividade microbiana do solo. Quando realizada junto com determinações diretas da atividade microbiana, como a quantificação de microrganismos cultiváveis, e análise de biologia molecular, constitui uma ferramenta que pode incrementar as informações referentes à atuação microbiana no processo de biorremediação.

Conforme pode-se verificar na Figura 6.2, as curvas de respiração acumulada do solo (evolução de CO_2 acumulado), 57% ocorreram, em média, até 28 dias de incubação (quarta semana), e 88% até 63 dias de incubação (nona semana) (Figura 6.2).

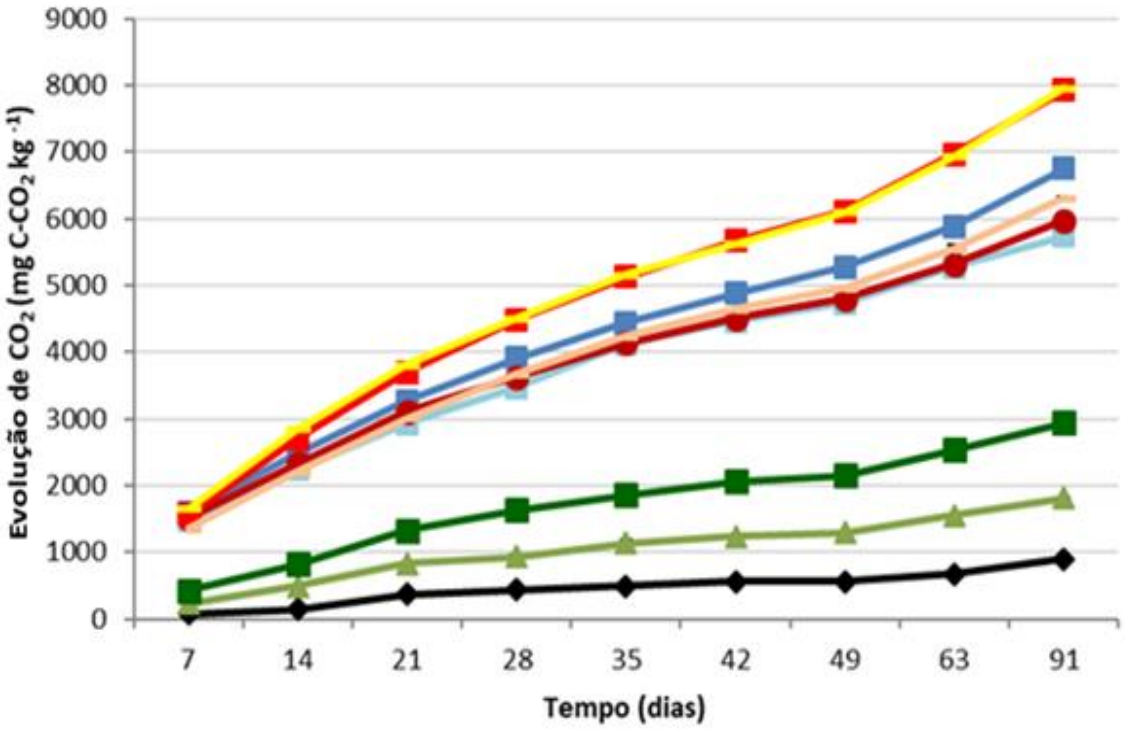


Figura 6.2 Curvas da evolução de CO_2 acumulado dos solos que receberem diferentes quantidades de bagaço de cana-de- açúcar (BC) e da serapilheira do sabiá (SS) durante 90 dias. Solo sem tratamento (controle) (◆); solo com 0,5 g de SS (10 g kg^{-1}) (▲); solo com 1 g de SS (20 g kg^{-1}) (■); solo com 1 g BC (20 g kg^{-1}) (■); solo com 2 g BC (40 g kg^{-1}) (■); solo com 0,5 g de SS (10 g kg^{-1}) e 1 g de BC (20 g kg^{-1}) (●); solo com 0,5 g de SS (10 g kg^{-1}) e 2 g de BC (40 g kg^{-1}) (■); solo com 1 g de SS (20 g kg^{-1}) e 1g de BC (20 g kg^{-1}) (▬); solo com 1 g de SS (20 g kg^{-1}) e 2 g de BC (40 g kg^{-1}) (▬). A curva de CO_2 acumulado é feita com o somatório de cada semana. Portanto, os desvios são de cada tempo de incubação, e foram abaixo de 23% para o solo do controle e abaixo de 10% para os solos tratados com BC e SS.

O perfil das curvas sugere que entre 30 e 60 dias de incubação ocorreu maior atividade microbiana. Resultados semelhantes foram observados por CAYUELA et al. (2009) e QIN et al. (2010), que relataram maior liberação acumulada de CO_2 na terceira semana de incubação e atribuíram esse resultado à decomposição das frações orgânicas lábeis presentes no solo. Para eles, a diminuição dos compostos orgânicos, representada pela liberação acumulada de CO_2 ao longo do tratamento do solo, sugere uma concentração crescente dos microrganismos presentes no solo, e no caso deste trabalho, pode indicar uma maior decomposição de compostos poluentes, como os HTP.

Os resultados da Figura 6.2 indicam que o CO_2 foi gradualmente liberado durante o período de incubação. A menor liberação de CO_2 foi verificada no solo controle (905,06 mg kg^{-1} de solo) (Figura 6.2).

Nos ensaios que receberam cada resíduo de planta separadamente observa-se que até a 13ª semana o solo que continha apenas SS apresentou a menor liberação acumulada de CO_2, independentemente da concentração aplicada (2380,71 mg CO_2 kg^{-1} de solo em média), enquanto o BC sozinho foi responsável por 2,6 vezes mais liberação de CO_2 acumulado do que a SS (6244,74 mg CO_2 k^{-1} de solo em média) (Figura 6.2). O uso das maiores quantidades de BC (2 g kg^{-1} de solo) ou SS (1 g kg^{-1} de solo) isoladamente promoveu maior liberação acumulada de CO_2 que nas menores quantidades destes resíduos (Figura 6.2).

As combinações dos resíduos vegetais foram, em geral, mais eficazes do que os tratamentos com cada resíduo sozinho (Figura 6.2). Os dois ensaios com a maior quantidade de BC (2 g de SS kg^{-1} de solo) apresentaram resultados equivalentes, ou a maior liberação de CO_2 acumulado ao longo do tratamento, independentemente do teor de SS utilizado (0,5 ou 1 g de SS kg^{-1} de solo), com média de 7942,49 mg CO_2 kg^{-1} solo (Figura 6.2). Os ensaios com a menor quantidade de BC (1 g de BC kg^{-1} de solo) com cada concentração de SS (0,5 ou 1 g SS kg^{-1} de solo) foram menos efetivos na liberação de CO_2 acumulado do que com 2 g de BC (isolado) por kg de solo, mas maior que 1 g de BC (isolado) por kg de solo.

O tratamento do solo com BC e SS teve um efeito mais significativo na liberação de CO_2 quando aplicados em conjunto. O BC e SS podem ter promovido efeitos distintos na melhoria do solo, em relação aos fatores nutricionais e físicos. Ficou evidente que o uso de resíduos vegetais é um método eficiente para estimular a respiração do solo, mas com efeitos diferenciados, de acordo com composição do material vegetal utilizado (Tabela 6.2). Os resultados de respiração do solo encontrados neste trabalho foram maiores que os verificados por BARRETO et al. (2010); CREAMER et al. (2011); NUNES et al. (2016), e em solos provenientes de plantios de cana-de-açúcar, eucalipto, e de SS (cerca de 800 mg kg^{-1} de solo). Essa diferença pode ser justificada pelo fato deste solo ter como substrato os hidrocarbonetos da borra oleosa de petróleo, e, além disso, ter recebido material vegetal como fonte adicional de C e nutrientes para a realização do experimento.

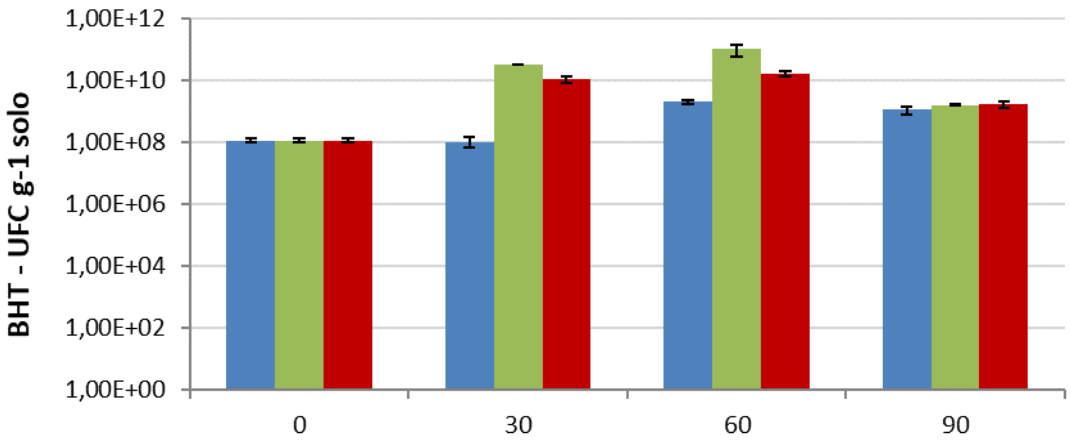
Como fonte nutricional, o BC pode ter fornecido sacarose aos microrganismos, pois as fibras provavelmente continham resíduos do processo de extração do caldo de cana e a sacarose é uma fonte de C facilmente assimilável. Além disso, o conteúdo de lignina do BC foi baixo em comparação com os valores

do SS (Tabela 6.2), o que provavelmente facilitou o acesso à fração de celulose do BC em comparação à SS (MURPHY E MCCARTHY, 2005). Entretanto, SS foi utilizada como fonte de nutrientes para os microrganismos, principalmente N. O SS possui maior conteúdo de N do que o BC (Tabela 6.2), e assim, uma relação C/ N mais adequada (26,3) (Tabela 6.3) em comparação ao BC (267,9%), considerando a presença do contaminante e estimulando, portanto, o crescimento dos microrganismos degradadores.

6.4 Experimento de biorremediação em microcosmo

6.4.1 Microbiologia do solo tratado com bagaço de cana-de-açúcar

Na Figura 6.3 é possível observar que os solos que receberam a adição do BC mostraram que durante o experimento houve um aumento do número de bactérias heterotróficas totais (BHT), fungos filamentosos (FF), e de microrganismos degradadores de óleo (MDO) em relação ao solo controle no tempo 0 (com exceção para as BHT e MDO no tempo de 90 dias). O aumento da população de microrganismos no solo, após a adição dos resíduos vegetais, provavelmente se deve a melhoria das propriedades do solo, em termos de difusão de oxigênio, umidade, nutrição e algumas propriedades físicas (BALOTA et al., 1998), estimulando a atividade dos microrganismos que utilizaram os resíduos vegetais como substrato e nutrientes para manutenção e crescimento.



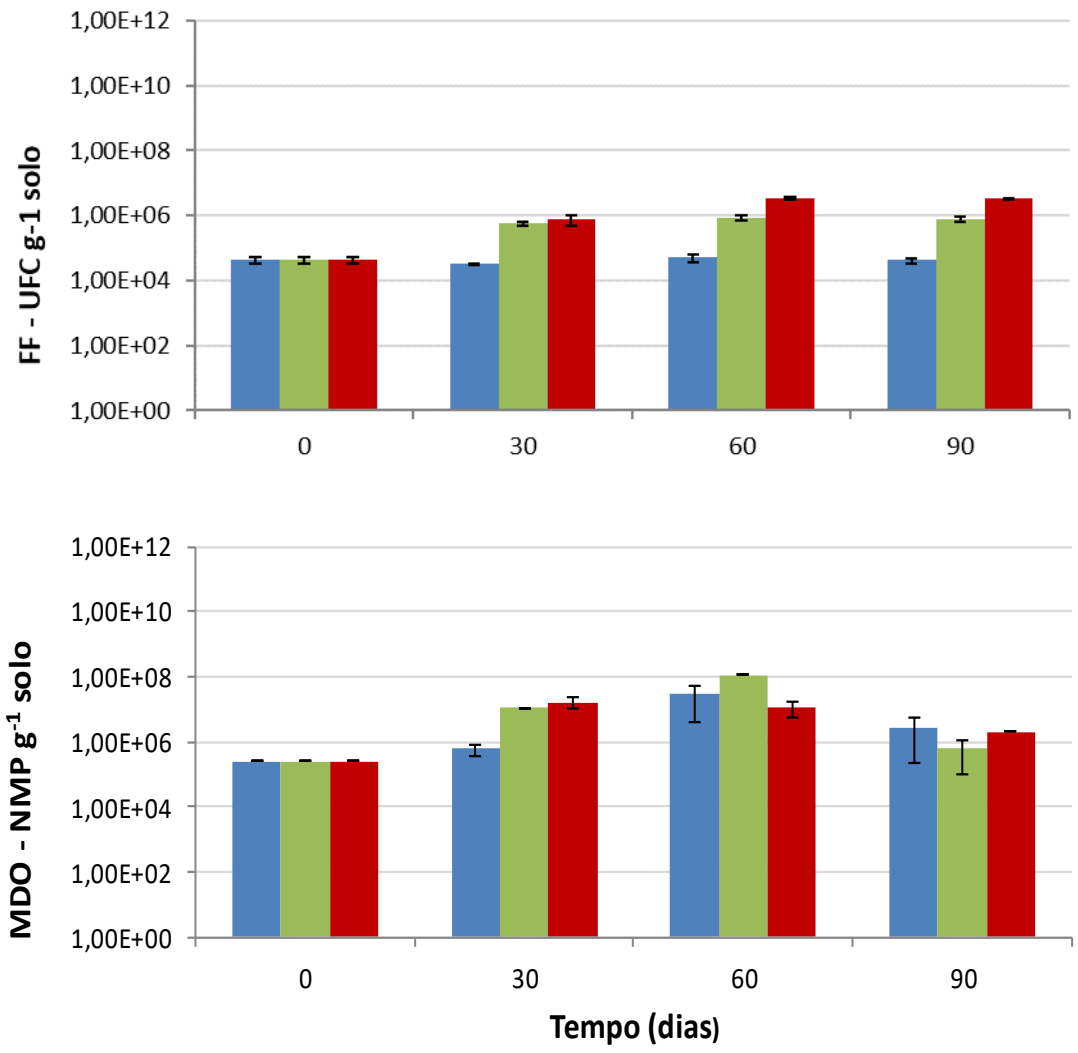


Figura 6.3 Gráfico do crescimento de bactérias heterotróficas totais (BHT), fungos filamentosos (FF), e microrganismos degradadores de óleo (MDO) dos solos com bagaço de cana-de-açúcar (BC) nos tempos de 30, 60 e 90 dias. Solo sem tratamento (controle) (■); solo com 20 g kg^{-1} solo de BC (■); solo com 40 g kg^{-1} solo de BC (■).

As populações de BHT e MDO do solo controle apresentaram um aumento no número de microrganismos em alguns dos tempos avaliados (Figura 6.3). Este aumento pode ser atribuído ao ajuste regular da umidade e/ ou do processo frequente de revolvimentodo no solo. Esses procedimentos podem ter melhorado a mobilidade dos contaminantes, a difusão de oxigênio e a distribuição da água no solo, o que aumentou a atividade microbiana (SILVEIRA E FREITAS, 2007).

A maior população de BHT foi verificada com 60 dias de experimento (9,80 x 10^{10} UFC g^{-1} solo) quando o solo recebeu a menor quantidade de BC (20 g kg^{-1} solo). Esse valor foi 2 ordens de grandeza maior que a população de BHT do solo controle. HAMZAH et al. (2014) avaliaram a biorremediação de um solo

artificialmente contaminado por óleo cru com a adição de bagaço de cana-de-açúcar, e a contagem bacteriana total após a suplementação de 5% e 15% do bagaço de cana aumentou 6% e 9%, respectivamente, alcançando1,9 x 10^{10} UFC g^{-1} de solo de BHT.

Para os FF, a maior população (10^6 de ordem de grandeza) foi verificada com 60 e 90 dias de tratamento, na maior quantidade de BC avaliada (40 g kg^{-1} solo) (Figura 6.3). Esses resultados estão de acordo com os encontrados por GABRIEL (2008), que estudou uma faixa de concentração de BC de 0 – 300 g kg^{-1} solo para o tratamento de um resíduo oleoso proveniente da separação de água e óleo realizada em laboratório, e observou que na concentração de BC de 20 g kg^{-1} solo ocorreu a maior população de BHT (2,0x10^6 UFC g^{-1} solo), enquanto que nas concentrações de BC mais altas (100 g, 200 g e 300 g kg^{-1} solo), houve aumento da quantidade dos fungos (de 10^3 UFC g^{-1} para 10^5 UFC g^{-1} solo).

As bactérias foram verificadas em maior número que os fungos e costumam, de fato, se destacar nos processos de biorremediação (ROS et al., 2010; ZHANG et al., 2011). No entanto, a participação efetiva dos fungos não pode ser negligenciada, pois seu crescimento micelial permite uma forte colonização de substratos. Os fungos também são bastante tolerantes às variações das condições ambientais, e são capazes de sintetizar e excretar diferentes enzimas. Algumas dessas enzimas podem catalisar a digestão de hidrocarbonetos e, portanto, melhorar a atividade bacteriana no meio contaminado (LIMA et al., 2011).

No final do experimento (90 dias), as populações de BHT e FF dos solos que receberam o BC apresentaram comportamentos diferentes. Enquanto as populações de BHT decresceram, as dos FF se mantiveram constantes (Figura 6.3). Situação semelhante ao que ocorreu para as BHT foi observada por SANTOS (2007), que avaliou a adição do pó da casca de coco verde como material estruturante na biorremediação de um solo contaminado por petróleo nas quantidades de 5 % (m/m) e 10% (m/m), e encontrou populações de microrganismos heterotróficos totais de 10^8 a 10^{10} UFC g^{-1}solo (2 ordens de grandeza maior que o controle), que decresceram em 60 dias de experimento. Segundo o autor, isso pode estar relacionado à redução da concentração dos nutrientes inorgânicos, resultante do consumo de grandes quantidades de carbono orgânico, que teria estimulado a população heterotrófica em geral. É possível que neste trabalho tenha ocorrido a

redução de substratos mais facilmente assimiláveis elas que a lignina, a saber: a sacarose restante do caldo da cana, e a celulose.

As populações de FF podem ter se mantido até o final do experimento porque alguns desses microrganismos possuem capacidade para degradar lignina (HAMZAH et al., 2014). No momento em que a concentração dos substratos (sacarose e celulose) preferencialmente utilizados pelos fungos no solo, reduziu, estes podem ter utilizado a lignina como fonte de carbono. Além disso, alguns fungos possuem maior eficiência em degradar frações de hidrocarbonetos aromáticos do que algumas bactérias (LIMA et al., 2011).

A população dos microrganismos degradadores de óleo (MDO) apresentou um aumento da população já no tempo de 30 dias (2 ordens de grandeza), nas duas quantidades de BC avaliadas (20 e 40 g kg^{-1} solo). Aos 90 dias de experimento, a população de MDO decresceu, refletindo o mesmo comportamento verificado para as BHT (Figura 6.3), sugerindo que embora os FF tenham participado no processo de biorremediação, as bactérias foram mais atuantes no processo (Figura 6.3). Não houve diferença significativa entre o número de BDO nas duas quantidades de BC utilizadas.

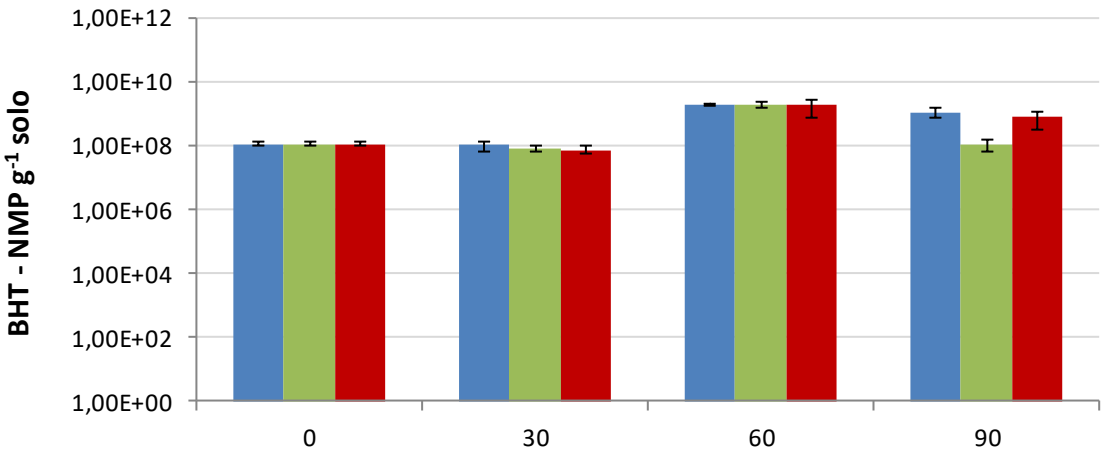
O fato de a maior quantidade de bagaço de cana adicionado ao solo (40 g kg^{-1} solo) não ter promovido um melhor aumento nas populações de MDO pode estar relacionado ao baixo teor nutricional. Esse material vegetal possui baixos teores nutricionais (Tabela 6.2), e uma alta relação C/N (267,89 %) (Tabela 6.3), o que afeta o consumo de substrato pelos microrganismos. Pode ser que a adição de materiais vegetais ao solo como fonte adicional de C favoreça o crescimento da população nativa de microrganismos apenas se o material vegetal for capaz de fornecer também os nutrientes em quantidades requeridas pelos microrganismos.

6.4.2 Microbiologia do solo tratado com a serapilheira do sabiá

Não houve diferença significativa no crescimento de BHT e FF quando a SS foi adicionada ao solo em relação ao solo controle (Figura 6.4). Apesar da SS apresentar altos teores nutricionais, principalmente de N (Tabela 6.2), as quantidades de serapilheira testadas, podem não ter sido suficientes para que ela pudesse atuar como cossubstrato, já que quando comparado ao BC, esse material vegetal não contém sacarose, tem menos celulose, e possui uma maior quantidade

de lignina (Tabela 6.2), tornando-o mais recalcitrante para os microrganismos. Assim, como foi observado quando o BC foi adicionado ao solo, a adição de SS também promoveu um número de BHT maior que o de FF.

A população de MDO foi maior que a do solo controle após 60 dias de experimento. A maior população de MDO (10^8 de ordem de grandeza) ocorreu com 60 e 90 dias, no tratamento com a maior quantidade da SS (20 g kg^{-1} solo). Esses resultados indicam que embora a serapilheira do sabiá pareça não atuar como uma fonte de carbono adicional, ela atua como fonte de nutrientes para que os microrganismos possam degradar os hidrocarbonetos presentes na borra oleosa do petróleo. De fato, a serapilheira do sabiá possui maiores teores nutricionais (P, Ca, Mg e N) e uma menor relação C/N (26,27%) que o BC (267,89%) (Tabela 6.3). Corroborando com estes dados, em um trabalho realizado na região norte do RJ, que avaliou a mineralização de N em solo de leguminosas florestais e de uma pastagem degradada, em que uma das leguminosas avaliadas foi a SS, igual a utilizada neste trabalho, verificou-se uma maior mineralização de N no solo que recebeu a SS (NUNES et al., 2016).



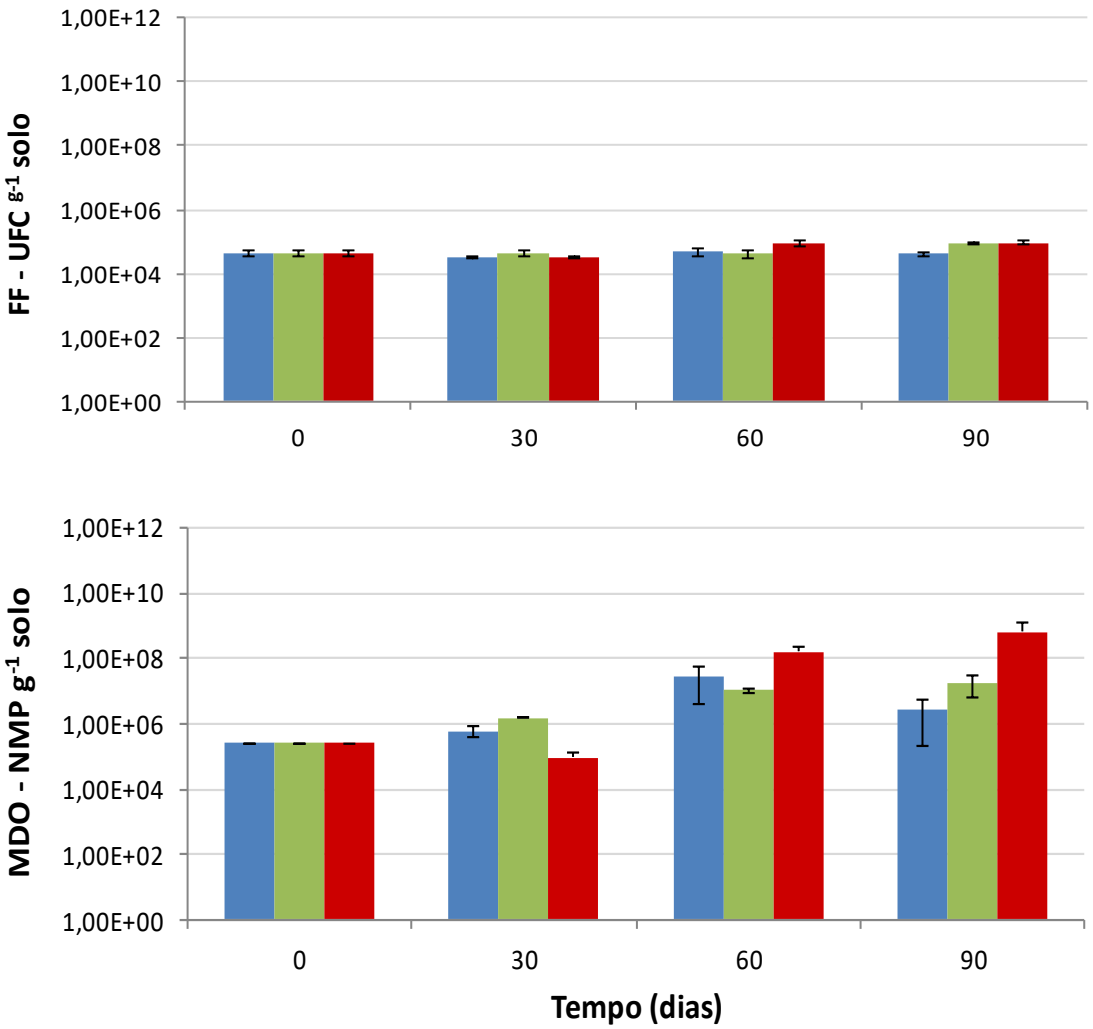


Figura 6.4 Gráfico do crescimento de bactérias heterotróficas totais (BHT), fungos filamentosos (FF), e dos microrganismos degradadores de óleo (MDO) dos solos com a serapilheira do sabiá (SS) nos tempos de 30, 60 e 90 dias. Solo sem tratamento (controle) (■); solo com 10 g kg^{-1} solo da SS (■); solo com 20 g kg^{-1} solo da SS (■).

Ao final do experimento (90 dias), as populações de BHT, FF e MDO dos solos que receberam a SS apresentaram perfis semelhantes (Figura 6.4). Ao contrário do que ocorreu para os solos tratados com BC, a população desses microrganismos se manteve igual no final do experimento (90 dias), com excessão apenas das BHT, na presença da menor quantidade de serapilheira (10 g kg^{-1} solo) (Figura 6.4). Para esta menor concentração de SS adicionada ao solo, este decréscimo pode indicar que para essa quantidade de serapilheira (que foi a menor), a redução da quantidade de nutrientes ocorreu de forma mais rápida. Outro fator que

pode ter contribuído para a diminuição da população de BHT é a redução do bioestímulo em função da redução da presença dos pedaços da serapilheira do sabiá em 60 dias de experimento, que promovia uma maior aeração ao solo. Neste tempo já não era mais possível observar visualmente a serapilheira do sabiá, quando adicionada na menor quantidade (10 g kg^{-1} solo) (Figura 6.5), embora para o solo que tinha recebido o BC na menor quantidade (20 g kg^{-1} solo) ainda era possível visualizar os resíduos vegetais (Figura 6.5).

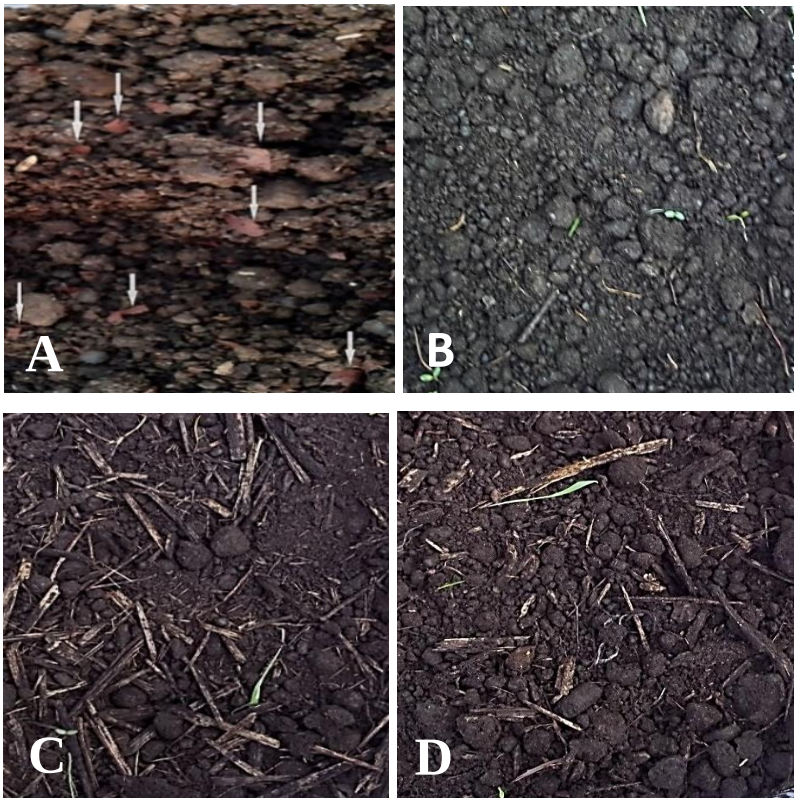


Figura 6.5 Solo com adição de 10 g kg^{-1} solo da serapilheira do sabiá no início (A) e no final do experimento (B), e com adição de 20 g kg^{-1} do bagaço de cana-de-açúcar no início (C) e no final do experimento (D).

Uma vez que o aumento da população de MDO nos solos onde foi adicionada a SS ocorreu em um tempo maior (60 dias) e se manteve aos 90 dias, e para os solos que receberam o BC o aumento na população tenha ocorrido com 30 dias, e não tenha se mantido (Figura 6.3 e 6.4), a degradação da SS parece, de fato, ocorrer de forma mais lenta, possivelmente devido a grande quantidade de lignina presente nesse material vegetal (Tabela 6.2), conforme mencionado anteriormente.

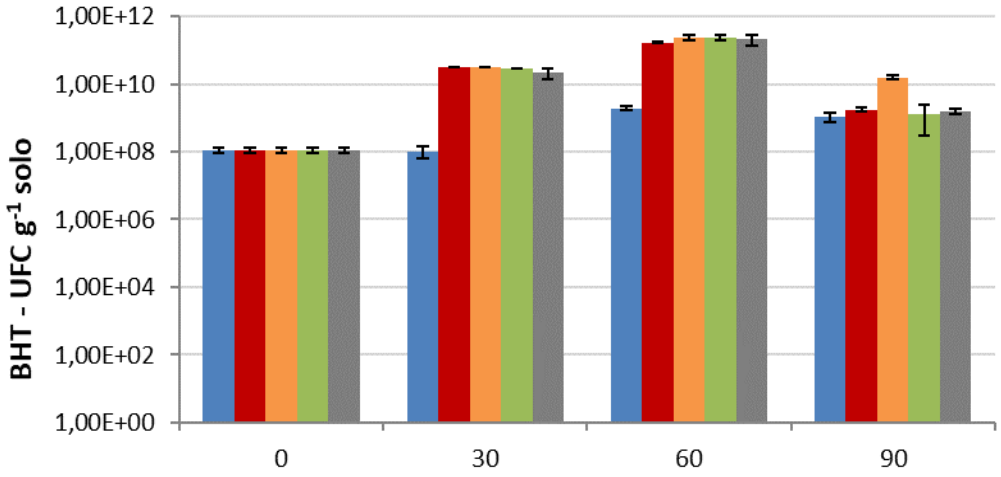
Tendo em vista que a serapilheira do sabiá possui um considerável teor nutricional, principalmente de N, a decomposição mais lenta da serapilheira do sabiá

pode ser importante. Além de manter a população de microrganismos ativa por um tempo maior ao fornecer C e outros nutrientes gradativamente ao solo, pode evitar a deficiência de alguns nutrientes, que muitas vezes é gerada pela retenção do nutriente no solo (P, por exemplo), ou perda de elementos no perfil do solo (N, por exemplo), quando é realizada a fertilização química.

Em solos mais argilosos e intemperizados, o P apresenta uma baixa disponibilidade. Nestes solos, apesar deste nutriente na maioria das vezes estar presente em quantidades adequadas, encontra-se pouco disponível na solução do solo, por estar precipitado pelas formas iônicas de Fe, Al e Ca, adsorvido pelos óxidos e hidróxidos de Fe e Al e/ ou retido no interior dos minerais de alguns solos (SALES et al., 2017). O N adicionado nestes solos por meio de fertilizações minerais é frequentemente perdido por diferentes processos (AL-ANSARI E ABDULKAREEM, 2014).

6.4.3 Microbiologia do solo tratado com bagaço de cana-de-açúcar e a serapilheira do sabiá

Quando foi avaliado o efeito da adição combinada dos dois tipos de materiais vegetais no solo foram verificadas as maiores populações de BHT, FF e MDO (Figura 6.6).



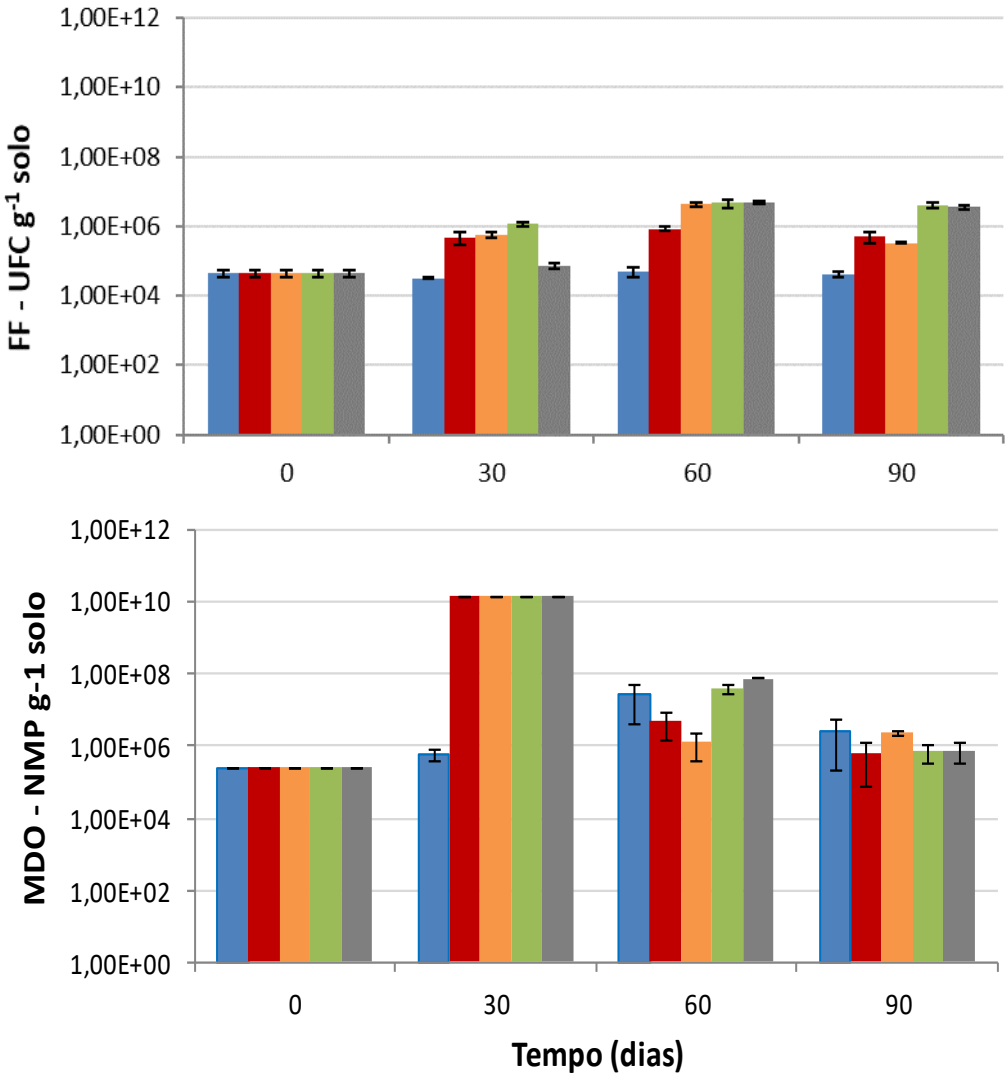


Figura 6.6 Gráfico do crescimento de bactérias heterotróficas totais (BHT), fungos filamentosos (FF), e microrganismos degradadores de óleo (MDO) dos solos com diferentes quantidades de bagaço de cana-de-açúcar (BC) e da serapilheira do sabiá (SS) nos tempos de 30, 60 e 90 dias. Solo sem tratamento (controle) (■); 20 g de BC + 10 g kg^{-1} da SS (■); 20 g de BC + 20 g kg^{-1} solo da SS (■); 40 g de BC + 10 g kg^{-1} solo da SS (■); 40 g de BC + 20 g kg^{-1} solo da SS (■).

As maiores populações de BHT ($1,69x10^{11}$ UFC g^{-1} solo) e FF ($2,93x10^{6}$ UFC g^{-1} solo) foram obtidas com 60 dias de experimento (Figura 6.6). O crescimento das BHT e dos FF foram duas ordens de grandeza maior que nos solos que receberam a SS eo BC separadamente, e assim como foi verificado quando os dois tipos de materiais orgânicos vegetais foram adicionados separadamente no solo, a população de FF foi menor que a de BHT (Figuras 6.3, 6.4 e 6.6). Estes resultados corroboram o trabalho de MEYSAMI E BAHERI (2003), que observaram maior crescimento de fungos em solo contaminado artificialmente com petróleo quando foi adicionada a mistura de materiais estruturantes (turfa e flocos de farelo) na

quantidade de 5% e 10%, respectivamente, do que quando esses materiais foram adicionados separadamente no solo. Existe também concordância com o trabalho de TREJO-HERNÁNDEZ et al. (2007) que, ao avaliar a biodegradação de petróleo misturado com resíduos do processo de produção de cogumelos comestíveis e bagaço de cana de açúcar na proporção de 3:1 em reatores tubulares e bioaumento com bactérias (*Pseudomonas, Bacillus, Klebsiella e Serratia*), verificou um aumento da população inicial de 5 ordens de grandeza (de 10^5 para 10^{10}).

Os materiais vegetais, por conterem nutrientes na composição, podem ser utilizados para estimular o crescimento da população microbiana durante o processo de biorremediação (PRICE et al., 2013). Vários tipos de materiais vegetais podem ser utilizados para tratar solos contaminados, embora seja importante avaliar a necessidade do solo e as características do material vegetal. Assim como o bagaço de cana-de-açúcar, resíduos do fruto de palma, palha de milho, casca de banana, grão de cerveja, entre outros resíduos já foram utilizados com sucesso para estimular o crescimento de bactérias degradadoras de óleo em solo artificialmente contaminado (ABIOYE et al., 2009; GARCIA-TORRES et al., 2011; ABIOYE et al., 2012; SHAHSAVARI et al., 2013; HAMZAH et al., 2014).

A maior população de MDO (>1,40 x 10^{10}) ocorreu já no primeiro tempo avaliado (30 dias) (Figura 6.6), e sugere que entre os tratamentos avaliados, a adição combinada do BC e SS favorece a atividade dos microrganismos do solo. Quando esses resíduos são adicionados juntos ao solo, o bagaço de cana propicia, inicialmente, o aumento da densidade populacional de MDO no solo porque fornece como fonte de carbono a sacarose, e apresenta maior quantidade de celulose (Tabela 6.2). Esse número maior de MDO provavelmente decompõe a serapilheira do sabiá, que apesar de ser mais recalcitrante (maior teor de lignina), atua como uma boa fonte de nutrientes, liberando-os gradativamente no solo (Tabela 6.2).

Conforme ocorreu para os solos tratados apenas com o bagaço de cana-de-açúcar, no final do experimento (90 dias), as populações de BHT, FF e MDO dos solos que receberam os dois tipos de resíduos vegetais, apresentaram perfis diferentes (Figura 6.6). Enquanto as populações de BHT e MDO decresceram, as dos FF se mantiveram constantes. Neste caso, como o crescimento das BHT e MDO foi bastante intenso nos primeiros tempos avaliados, provavelmente ocorreu uma redução dos substratos mais facilmente assimiláveis (sacarose e celulose), enquanto

para o fungo pode ter ocorrido o mesmo, mas mantiveram as populações até o final do experimento por terem utilizado a lignina como fonte de carbono.

O aumento da população de bactérias e fungos do solo, e a oscilação do número de microrganismos nos diferentes tempos avaliados quando é fornecida maior quantidade de BC, indica que os microorganismos presentes no solo são capazes de utilizar os materiais vegetais como fonte de C e/ ou de nutrientes para o seu crescimento, mas não necessariamente para degradar uma maior quantidade de hidrocarbonetos presentes no solo (SHAHSAVARI et al., 2013). Apesar disso, a quantificação de microrganismos é uma ferramenta importante quando aliada aos resultados de Biologia molecular e remoção de HTP.

6.4.4 Remoção de hidrocarbonetos totais do petróleo

A remoção de hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP) ocorreu de forma diferenciada de acordo com o tipo de tratamento. Durante o tempo de tratamento de 30, 60 e 90 dias, no solo controle, a remoção de HTP chegou a 3% (Figura 6.7). O manejo adotado, que consistiu na realização semanal do ajuste aumidade e revolvimento do solo, provavelmente permitiu uma melhor mobilidade dos contaminantes, tornando-os mais disponíveis para a degradação microbiana, além de promover uma melhoria na aeração, o que estimula o crescimento dos micro-organismos aeróbios presentes no solo (RIZZO et al., 2006).

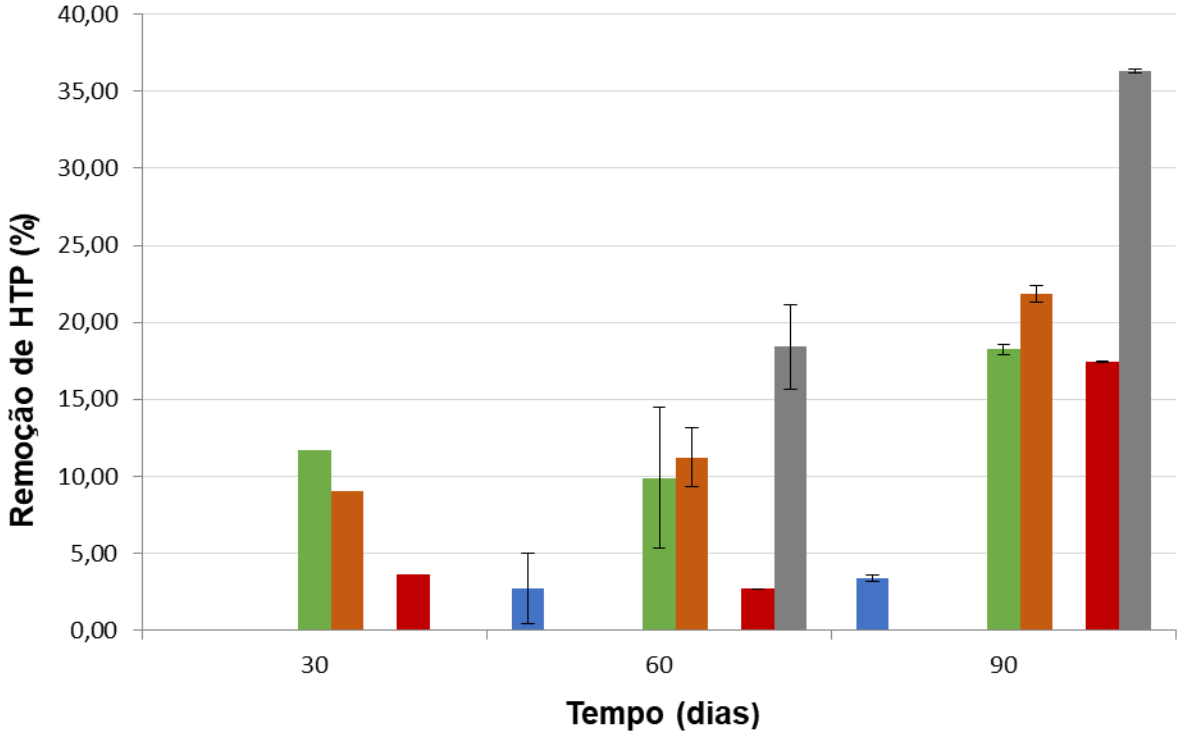


Figura 6.7 Gráfico com percentual de remoção dos hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP) do solo com diferentes quantidades de bagaço de cana-de-açúcar (BC) e da serapilheira do sabiá (SS). Solo sem tratamento (controle) (■); solo com 10 g kg^{-1} solo da SS (■); solo com 20 g kg^{-1} solo da SS (■); solo com 20 g kg^{-1} solo do BC (■); solo com 40 g kg^{-1} solo do BC (■) 20 g de BC + 10 g kg^{-1} solo da SS (■); 20 g de BC + 20 g kg^{-1} solo da SS (■); 40 g de BC + 10 g kg^{-1} solo da SS (■); 40 g de BC + 20 g kg^{-1} solo da SS (■). A concentração inicial de HTP foi de 32.251 mg kg^{-1} de solo.

ROCHA E CUNHA (2013), trabalhando com o mesmo solo, utilizaram duas condições de umidade (50% e 70% da CRA), e duas concentrações de biossurfactante (2 mg g^{-1} e 4 mg g^{-1} de solo) em um tempo de 42 dias, para avaliar a remoção de HTP. Os autores verificaram que a melhor remoção de HTP (próximo a 40% de remoção) ocorreu no solo com maior teor de umidade quando combinado tanto com a concentração alta, quanto com a concentração baixa de biossurfactante. Essa remoção foi praticamente igual ao obtido nos ensaios contendo somente correção de umidade no maior teor (39% de remoção), mostrando inclusive que a menor umidade avaliada pode gerar os mesmos benefícios. TAKETANI et al. (2015), trabalhando com solo artificialmente contaminado com 5% de óleo, ambos provenientes de um campo de exploração de petróleo da cidade de Carmópolis (PB), também verificou uma influência positiva da umidade sobre a remoção de HTP. Eles encontraram 13% e 35% de remoção de HTP em solos com 45 e 70% da CRA, respectivamente. Neste caso, houve diferença na quantidade de HTP removida com

o aumento do teor de umidade.

Quando o solo foi tratado com BC nas duas quantidades avaliadas (20 g e 40 g kg^{-1} solo), não houve remoção de HTP (Figura 6.7). Apesar disso, alguns autores verificaram degradação de HTP em alguns tipos de solos contaminados que receberam o BC, conforme pode-se verificar no Quadro 6.1. Diferente do presente estudo que foi realizado com solo de área industrial, a maior parte dos trabalhos são conduzidos com solos contaminados artificialmente, e resultam geralmente em uma remoção de HTP entre 24% e 60% (MOLINA-BARAHONA et al., 2004; TREJO-HERNÁNDEZ et al., 2007; GARCIA-TORRES et al., 2011; HAMZAH et al., 2014; CUEVAS-DÍAZ et al., 2017).

Quadro 6.1 Referências de trabalhos com dados de remoção de hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP) em solos que receberam bagaço de cana-de-açúcar (BC).

Trabalhos	**Solo**	**Relação Solo/ BC (m:m)**	**Tempo (dias)**	**Temperatura (°C)**	**Remoção (%)**
CUEVAS-DÍAZ et al. (2017)	Próximo à atividade industrial (55.954 mg HTP kg^{-1}solo)	100:2	15	28	34
HAMZAH et al. (2014)	Artificialmente contaminado com 3% (v/m) óleo de Tapis	100:5	20	29 – 30	100
GARCIA-TORRES et al. (2011)	Artificialmente contaminado com HTP (14.300 mg HTP kg^{-1}solo)	96:4	15	27	60
TREJO-HERNÁNDEZ et al. (2007)	Artificialmente contaminado com óleo crú (10 000 mg HTP kg^{-1}solo)	100:3	15	28	40
MOLINA-BARAHONA et al. (2004)	Artificialmente contaminado com diesel (40 g kg^{-1}solo)	100:3	109	20 – 25	67

Nos solos onde foi adicionado somente a SS em ambas as quantidades avaliadas (10g e 20g kg^{-1} solo) também não foi verificada degradação de HTP. Para

este material vegetal não foram encontrados trabalhos que fizessem o estudo da adição de SS misturada ao solo, seja com contaminação real ou artificial.

Considerando que o solo controle apresentou uma remoção de HTP de 3% (Figura 6.7), a ausência de remoção de HTP nos solos que receberam BC e SS separadamente, pode ter ocorrido devido a uma quantidade de material vegetal insuficiente para estimular a atividade microbiana e consequentemente a remoção destes contaminantes. Outra possibilidade seria a ocorrência de sorção de HTP presentes no solo contaminado pelos materiais vegetais estudados (ITOPF, 2012), já que no solo controle houve uma remoção de 3%. A adsorção ocorre quando a relação C/N dos resíduos vegetais, e/ ou do solo não é suficiente para estimular a degradação dos hidrocarbonetos. A lignina presente nos materiais vegetais apresenta a capacidade de adsorver poluentes orgânicos como os hidrocarbonetos do petróleo (SHAHSAVARI et al., 2013). Neste caso, quando o objetivo a ser alcançado for evitar o efeito da contaminação de solos e/ ou águas, esses materiais vegetais adicionados separadamente podem exercer um grande efeito benéfico através da retenção de poluentes, caso o objetivo seja apenas o de impedir que a contaminação atinja uma área maior (CLEMENTE et al., 2015).

Os resultados de remoção de HTP mostram que apenas os solos que receberam a adição conjunta do BC e da SS apresentaram remoção de HTP (Figura 6.7). Este resultado está de acordo com o maior crescimento da população de MDO quando o solo recebeu BC a SS juntos (Figuras 6.6 e 6.7). Nestes solos, o melhor resultado foi verificado no final do experimento (90 dias). No solo que recebeu a menor quantidade de bagaço de cana (20 g kg^{-1} solo) e a maior quantidade da serapilheira do sabiá (20 g kg^{-1} solo) avaliada, a degradação de HTP foi de 36% (33% diminuindo o valor do solo controle) (Figura 6.7). Esta quantidade foi superior à quantidade de remoção de HTP verificada nos solos que receberam BC e SS nas relações de 20:10, 40:10 e 40:20 (m/m), que foram 18%, 15% e 14% superior ao solo do controle, respectivamente.

A melhor porcentagem de remoção de HTP (33%) verificada no solo que recebeu 20 g kg^{-1} solo dos dois tipos de materiais vegetais (Figura 6.7) foi próxima aos valores verificados por LIDUÍNO et al. (2018) que trabalharam com fitorremediação utilizando plantio de girassol no mesmo solo contaminado deste estudo, e verificaram uma remoção de 18% de HTP no tempo de 45 dias, e uma

remoção de 45% em 90 dias quando foi realizada a adição de biosurfactante (BS). Neste trabalho, a análise comparativa dos teores finais de HTP nos solos (plantado sem BS aos 90 dias e plantado com BS aos 45 dias) indicou que quando o BS foi adicionado ao solo apenas houve redução do tempo de tratamento pela metade, não interferindo no grau de degradação. A técnica de fitorremediação é interessante porque além da remoção de HTP, ela também pode promover a remoção de metais pesados quando a planta é retirada após o tratamento. Caso a planta não seja retirada do solo, apesar de não se alcançar o benefício da remoção de metais, com o passar do tempo, os resíduos caídos da planta no solo podem oferecer os mesmos benefícios que os encontrados neste trabalho.

A fim de comparar os resultados de remoção de HTP verificada neste trabalho (Figura 6.7) com estudos realizados com outros solos contaminados com HTP que receberam a adição de materiais vegetais em conjunto, alguns trabalhos podem ser abordados. CUEVAS-DÍAZ et al. (2017) obtiveram melhores resultados que neste trabalho. Eles coletaram amostras de solo próximas a atividade industrial com óleo crú (55.954 mg HTP/ kg solo), e trataram com subprodutos agroindustriais durante 15 dias, em temperatura de 28°C, e verificaram remoção de HTP de 34%, 46%, e 60% em solo com bagaço de cana, torta de filtro, e mistura do bagaço de cana com torta de filtro (1:1) m/m, respectivamente, que são resíduos da indústria canavieira obtidos após extração da sacarose. TREJO-HERNÁNDEZ et al. (2007) encontrou uma biodegradação de óleo bruto de 40%, o que foi apenas 7% superior ao valor encontrado neste trabalho, ao avaliar a biodegradação de petróleo misturado com resíduos do processo de produção de cogumelos comestíveis e bagaço de cana-de-açúcar na proporção de 3:1 (m/m) em reatores tubulares, com temperatura de 28°C por 15 dias, e bioaumento com bactérias dos gêneros *Pseudomonas, Bacillus, Klebsiella* e *Serratia*. Já SHAHSAVARI et al. (2013) obtiveram uma degradação menor que a encontrada aqui. Em solo contaminado com 60% de óleo de motor e 40% de diesel (contaminação de 1% - 10.000 mg kg^{-1} de solo), com temperatura entre 27 e 30°C, eles verificaram uma degradação de HTP de 26 % em solo contendo palha de ervilha, e uma degradação de 14% em solos que receberam uma mistura de resíduos vegetais (feno de alfafa, palha de ervilha, palha de trigo) na proporção de 2,5% (m/m).

Nesse contexto, considerando que este trabalho foi realizado com solo de um

sistema *landfarming* de refinaria que ao longo do tempo apresenta-se saturado com resíduos muito recalcitrantes, é possível afirmar que a remoção máxima de HTP verificada (de 33%) (Figura 6.7), pode ser considerada um bom resultado. Além disso, o resultado foi obtido com 90 dias de experimento, e talvez esse tempo tenha sido curto para que houvesse uma maior degradação desses contaminantes, uma vez que, a biorremediação é geralmente um processo lento.

Ao observar a remoção de HTP ao longo dos tempos analisados (0, 30, 60 e 90 dias), verificou-se que nos solos onde houve remoção, a mesma foi maior em 90 dias, quando comparada a remoção verificada nos tempos anteriores (Figura 6.7). De acordo com HAMZAH et al. (2014), a biorremediação de hidrocarbonetos em solo com contaminação real é frequentemente lenta porque o processo é altamente dependente da capacidade de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, que normalmente precisam aumentar sua atividade metabólica para realizarem a degradação. PAUDYN et al. (2007), ao avaliarem a remediação de solos contaminados por hidrocarbonetos no Ártico Canadense com um sistema *landfarming,* obteve um ótimo resultado de biorremediação ao realizar um experimento durante 700 dias. Neste trabalho, os autores verificaram 90% de remoção de HTP, sob condição de baixa temperatura, pH 5,8, adição de fertilizantes (ureia, com 46% de N e fosfato diamônio com 20,1% de P e 18,0% de N) e aeração em intervalos de 4 dias.

Observando as barras do gráfico referentes aos solos que receberam o BC e a SS em combinação, é possível observar que as menores remoções de HTP foram obtidas quando foram utilizadas as menores quantidades de resíduos vegetais, isto é, de BC na quantidade de 20 g kg^{-1} de solo, e de SS na quantidade de 10 g kg^{-1} solo (Figura 6.7). Por outro lado, para a mesma quantidade de BC (20 g kg^{-1} solo), e o dobro da quantidade de SS (20 g kg^{-1} solo) foi observado um aumento na remoção de TPH em 120% (Figura 6.7). Quando o maior valor de BC (40 g kg^{-1} solo) foi utilizado, o aumento da quantidade de SS de 10 g kg^{-1} solo para 20 g kg^{-1}solo também promoveu um incremento no HTP (Figura 6.7). Apesar disso, o contrário não ocorre, ou seja, quando se aumenta a quantidade de BC de 20 g kg^{-1} solo para 40 g kg^{-1} solo, sem aumentar a quantidade de SS, quase não se observa diferença na quantidade de remoção de HTP, e quando SS é adicionada na quantidade de 20 g kg^{-1} solo, a quantidade de HTP removida é menor. O estudo dessas combinações

permite inferir que embora só seja verificada remoção de HTP quando BC e SS são utilizados juntos, o aumento na quantidade de SS é mais significativo para o aumento da remoção de HTP do que o aumento da quantidade de BC.

Cabe ainda ressaltar que os resultados de remoção de HTP de um solo contaminado como o deste trabalho, poderiam não estar atrelados somente à quantidade de hidrocarbonetos provenientes do solo, mas também aos hidrocarbonetos presentes na composição dos materiais vegetais, o que resultaria em uma falsa remoção de HTP (VECCHIATO et al., 2017). Porém, os solos que receberam apenas BC e SS não apresentaram uma diminuição na quantidade de hidrocarbonetos (Figura 6.7), o que mostra que a metodologia utilizada para a determinação de HTP conseguiu extrair apenas os hidrocarbonetos provenientes da contaminação do solo.

6.4.5 Biologia molecular pela tecnologia de sequenciamento de nova geração

A contaminação ambiental resultante da atividade humana afeta de maneira significativa os sistemas ecológicos, incluindo as populações microbianas, que muitas vezes podem ser utilizadas como indicadores da qualidade ambiental, o que torna de grande valia o acompanhamento da atividade microbiana de uma área contaminada. A análise de biologia molecular, junto com as técnicas de cultivo e análises indiretas da atividade microbiana pode ajudar a esclarecer como ocorre o processo de biorremediação, e quem são os microrganismos envolvidos nesse processo.

Neste trabalho, a realização da análise de biologia molecular pela técnica de seqüenciamento em larga escala, foi uma ferramenta que ajudou a compreender melhor a atuação dos microrganismos envolvidos através de alguns parâmetros. A análise de componentes principais gerada indicou que há uma evidente separação entre as amostras contendo apenas SS e as amostras com BC (Figura 6.8). Os dados estão de acordo com os resultados de quantificação da população microbiana do solo contendo BC e SS separadamente, onde também houve diferença de acordo com o resíduo recebido (Figuras 6.3 e 6.4), e de acordo com os resultados de evolução de CO_2 (Figura 6.2). Essa mudança torna-se bastante significativa quando nota-se que as amostras do solo controle após 60 dias de experimento (esferas vermelhas) encontram-se entre os grupos mencionados anteriormente, e bem

separadas da esfera que representa o controle no tempo 0 (esfera marrom) (Figura 6.8). A estrutura da comunidade bacteriana entre os dois grupos parece ter se diferenciado em sentidos opostos após os 60 dias de tratamento (Figura 6.8), indicando que os grupos que atuam na presença dos dois tipos de materiais vegetais se diferenciam devido a composição do BC. PADMANABHAN E SAHI (2011) ressaltaram em seu trabalho, que após a adição de carbono orgânico no solo, o número de bandas no DGGE aumentou, revelando que uma ampla oferta de nutrientes pode favorecer o aumento da diversidade microbiana.

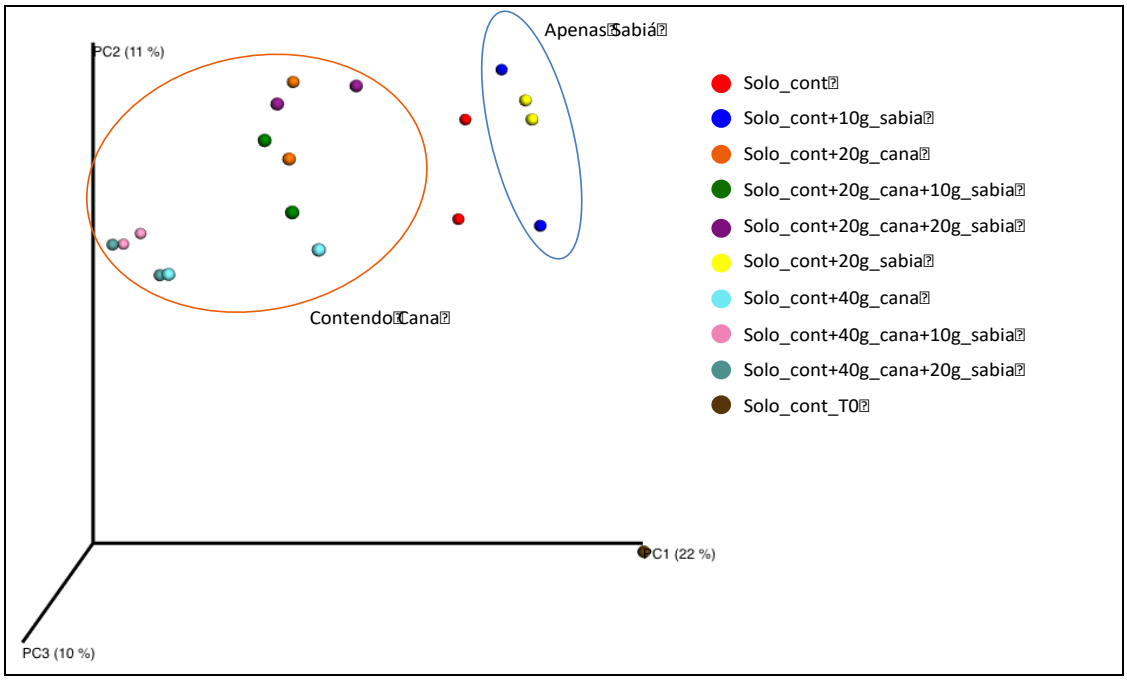


Figura 6.8 Análise de Componentes Principais baseada na matriz de similaridade de Bray-Curtis das amostras de solo no início do experimento controle (T0) e após 60 dias, do controle, e dos solos tratados com bagaço de cana-de-acúcar (BC) e serapilheira do sabiá (SS).

A classificação taxonômica das seqüência obtidas indicou que todas as amostras apresentaram alterações após 60 dias de tratamento (Figura 6.9). As principais diferenças podem ser observadas na diminuição do número de incidência dos grupos Clostridia, Bacilli, Deltaproteobacteria, e no aumento do número de incidência do grupo das Alphaproteobacterias, que foi ainda mais evidente nos solos que receberam a SS. O grupo das Alphaproteobacteria é geralmente associado a ambientes impactados por hidrocarbonetos (VILÀ et al., 2010), assim, o aumento do

número destas bactérias nos solos tratados com resíduos vegetais (principalmente a SS) parece estar correlacionado com o aumento da população de microrganismos degradadores no solo.

Conforme foi discutido anteriormente nos tópicos referentes à quantificação microbiana do solo, na análise de biologia molecular também foi possível observar uma mudança na estrutura da comunidade microbiana dos solos tratados em relação ao experimento controle (Figura 6.9). Essa mudança mostra que algumas das alterações estão relacionadas ao manejo do solo. No entanto, como houve uma grande variação entre as comunidades presentes nos solos tratados, podemos afirmar que o manejo do solo e a presença de matéria orgânica (resíduos vegetais) em diferentes concentrações foram responsáveis pela diversidade microbiana observada (MUKHERJEE et al., 2015).

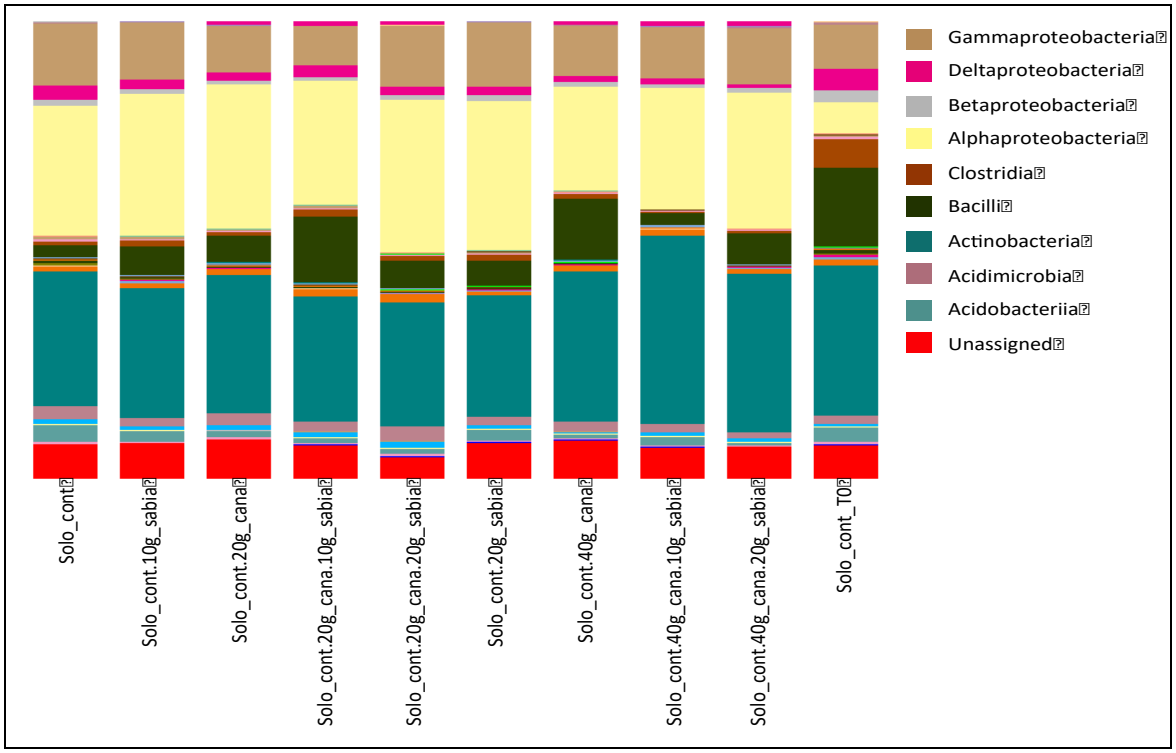


Figura 6.9 Classificação taxonômica das sequencias do gene rrs obtidas das amostras dos tratamentos. As classificações estão representadas ao nível de classe. As barras representam as médias das repetições.

Os números de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) observados nas amostras variou amplamente (Figura 6.10). A maioria dos tratamentos contendo

somente BC apresentou valores semelhantes ao controle (sem alteração) no início do experimento (T0). No entanto, tratamentos contendo apenas SS assemelharam-se ao solo controle após 60 dias. O tratamento contendo 20 g kg^{-1} de BC e 20 g kg^{-1} de SS teve a menor média de todos os tratamentos, apesar de ter apresentado o melhor resultado de remoção de TPH. Este fato indica que os valores de diversidade total não estão necessariamente relacionados com a remoção de hidrocarbonetos, embora possa ser previsto pela diversidade inicial.

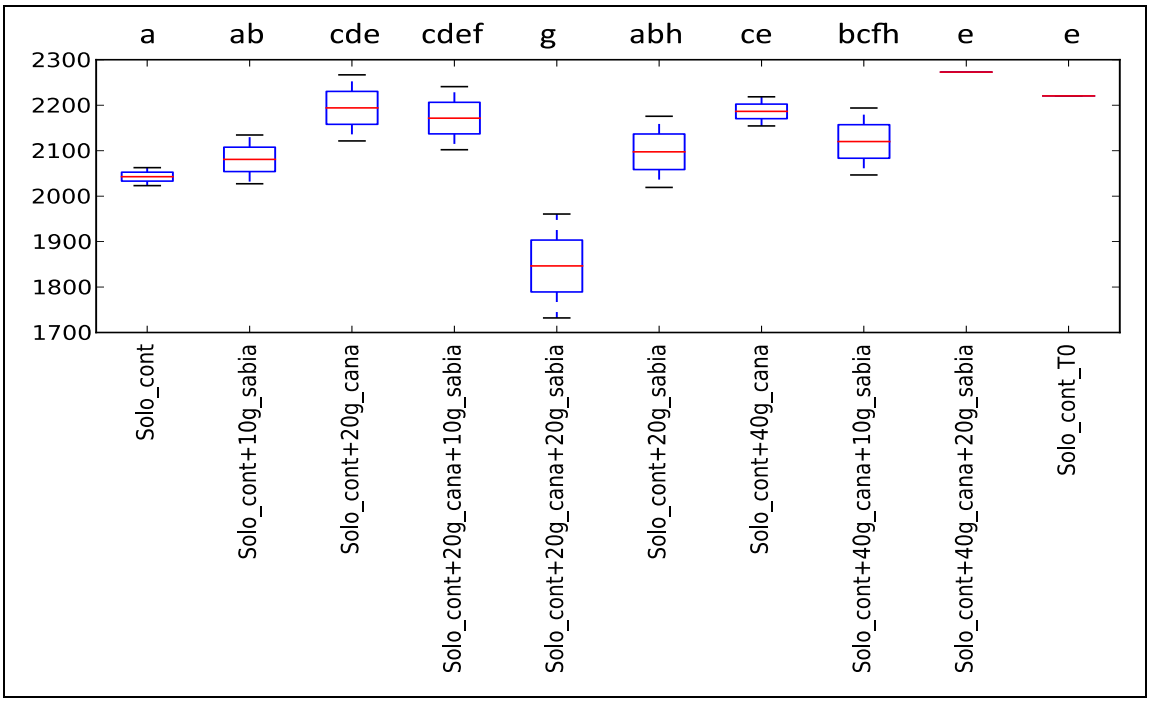


Figura 6.10 Número de UTOs observadas nas amostras. O número foi normalizado para uma amostragem de 4900 sequencias por biblioteca. As letras sobre as barras representamo resultado da análise de variância seguido de teste de Tukey com $p < 0.05$. Bagaço de cana-de-açúcar (BC) e Serapilheira do sabiá (SS).

6.4.6 Planejamento fatorial 3^2 do experimento em microcosmo

O planejamento experimental dos dados de remoção do experimento em microcosmo foi realizado para avaliar a melhor proporção de quantidade de BC combinado com a SS capaz de resultar na maiordegradação de HTP no solo. A análise estatística foi realizada pelo programa Statistica™ (v. 12.0) seguindo o planejamento fatorial 3^2, conforme mostrado na Equação 6.1.

$$Z = 18{,}96\,(b_0) + 18{,}15\,(\mathrm{b})\,X_1 - 1{,}60\,(\mathrm{b})\,X_1^{\,2} + 9{,}13\,(\mathrm{b})\,X_2 - 10{,}62\,(\mathrm{b})\,X_2^{\,2} + 6{,}25\,(\mathrm{b})\,X_1 X_2 - 13{,}50(\mathrm{b})\,X_1 X_2^{\,2} - 4{,}517(\mathrm{b})\,X_1^{\,2} X_2$$

Equação 6.1

Por meio da realização da análise de variância (ANOVA) dos dados foi possível verificar que os resultados apresentaram distribuição normal com diferença significativa conforme pode-se ver na Tabela 6.5 e no diagrama de pareto (Figura 6.11). A estatística foi realizada com $p < 0{,}1$, tendo em vista que trabalhos com organismos vivos estão sujeitos a um número maior de fatores, e a apresentar uma margem de erro maior.

Tabela 6.5 ANOVA do delineamento experimental fatorial 3^2.

Fatores	90 dias (R^2: 0,996)*	
	F	*P*
SS (X_1)**	91,12	0,0664****
SS (X_1^2)***	0,92	0,5121
BC (X_2)**	40,18	0,0996****
BC (X_2^2)***	40,93	0,0987****
SS (X_1) BC (X_2)	28,36	0,1182
SS (X_1) BC (X_2^2)	44,05	0,0952****
SS (X_1^2) BC (X_2)	5,05	0,2624

*Valor entre parêntese indica o R^2 do modelo. **Fator linear para a variável SS ou BC. ***fator quadrático para a variável SS ou BC. ****Valores significativos ($p < 0{,}1$).

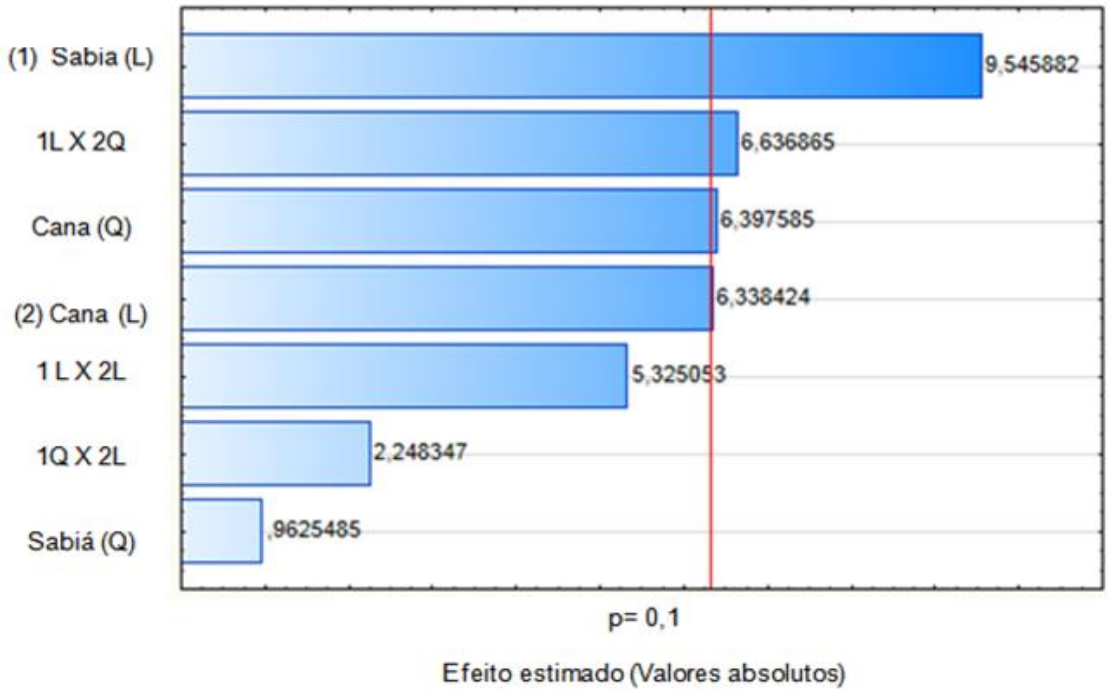


Figura 6.11 Diagrama de Pareto obtido no planejamento fatorial 3^2. Variável resposta: remoção de hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP). L- fator linear e Q- fator quadrático.

Por meio da realização do planejamento estatístico foi possível obter o gráfico de superfície de resposta. Ele indica a combinação ideal para a utilização dos materiais vegetais. A melhor condição encontra-se no nível 0 para o BC (20 g kg^{-1}), e no nível 1 para a SS (20 g kg^{-1}) (Figura 6.12).

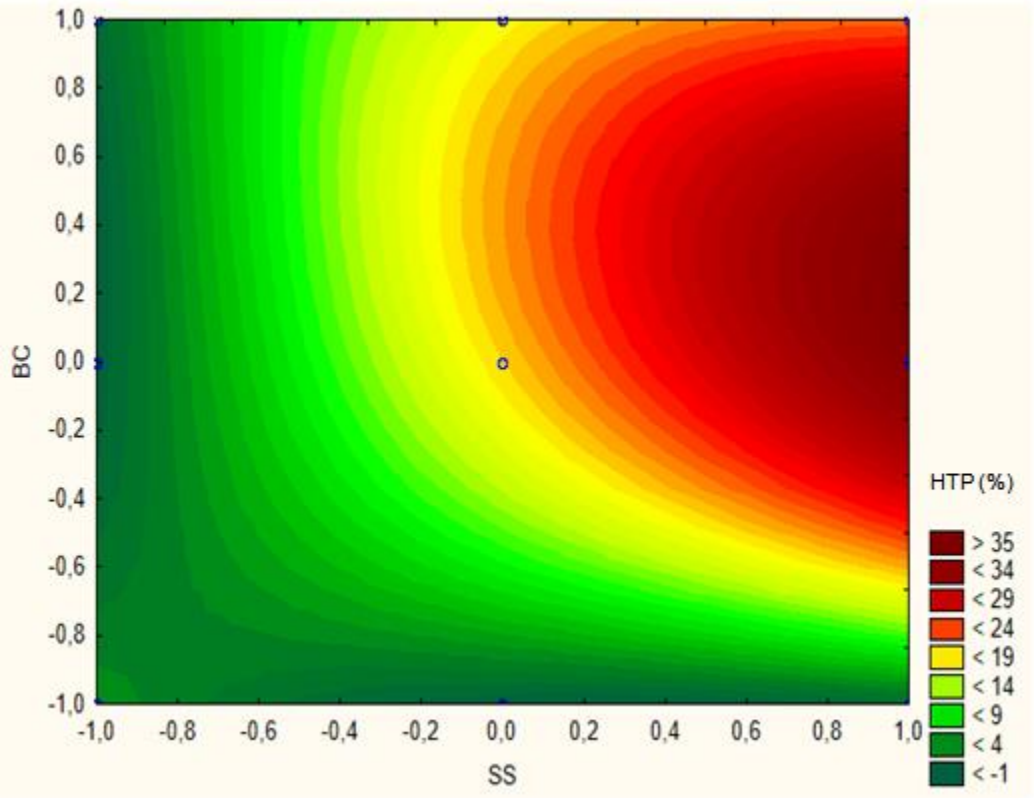


Figura 6.12 Gráfico da superfície de resposta. Para a SS o nível -1 é igual a 0 g kg^{-1} de solo, o nível 0 é igual a 10g kg^{-1} de solo, e o nível 1 é igual a 20 g kg^{-1} de solo. Para o BC o nível -1 é igual a 0 g kg^{-1} de solo, o nível 0 é igual a 20 g kg^{-1} de solo, e o nível 1 é igual a 40 g kg^{-1} de solo. Bagaço de cana-de-açúcar (BC) e Serapilheira do sabiá (SS).

Estes resultados da análise estatística forneceram embasamento para que fosse realizado um novo experimento, em escala maior, para constatação dos resultados e para verificar se com o escalonamento do processo haveria o mesmo comportamento do solo.

6.5 Experimento em escala maior

6.5.1 Microbiologia do solo tratado com bagaço de cana-de-açúcar e a serapilheira do sabiá

O experimento de biorremediação realizado em escala maior que o primeiro experimento, foi realizado com a relação BC/ SS apontada pelo planejamento estatístico por promover a maior remoção de HTP no solo do experimento em microcosmo (20 g de BC mais 20 g de SS kg^{-1} solo). Neste experimento também houve uma oscilação no numero de microrganismos ao longo do tempo (Figura 6.13). No início do experimento (0 dias) o solo controle apresentou o mesmo valor de BHT, FF, e MDO em ordem de grandeza que o experimento em microcosmo (10^8, 10^4 e 10^5, respectivamente), mostrando que o tempo de aproximadamente 2 anos entre os dois experimentos não foi capaz de alterar a população microbiana do solo (Figuras 6.6 e 6.13). Conforme mencionado anteriormente, por se tratar de um solo de sistema *Landfarming* de refinaria, o mesmo apresenta grande quantidade de resíduos oleosos recalcitrantes (SHAHSAVARI et al., 2013), e portanto é preciso que técnicas complementares de bioestímulo e/ ou bioaumento sejam adotadas com a finalidade de promover uma melhora na atividade microbiana e consequentemente na remoção de HTP do solo.

O melhor resultado de crescimento de MDO deste experimento foi muito próximo ao do ensaio em escala menor (aproximadamente 10^{10} e 10^{11}, respectivamente) (Figura 6.6 e 6.13). Porém, estes melhores resultados aconteceram em tempos diferentes. Ocorreu no tempo de 30 dias para o ensaio em escala menor, e com 60 dias no ensaio em escala maior (Figura 6.13). No ensaio em escala maior foi preciso um tempo maior para que aumentasse a população dos MDO. Como a quantidade de resíduo vegetal é a mesma (20 g kg^{-1} solo), este fato deve estar associado às menores temperaturas registradas durante o experimento (26 ± 2ºC), em relação ao experimento realizado em escala menor (30 ± 2Cº), a um revolvimento do solo menos uniforme, ou a erro de amostragem já que a quantidade de solo utilizada foi maior, e o revolvimento realizado de forma manual.

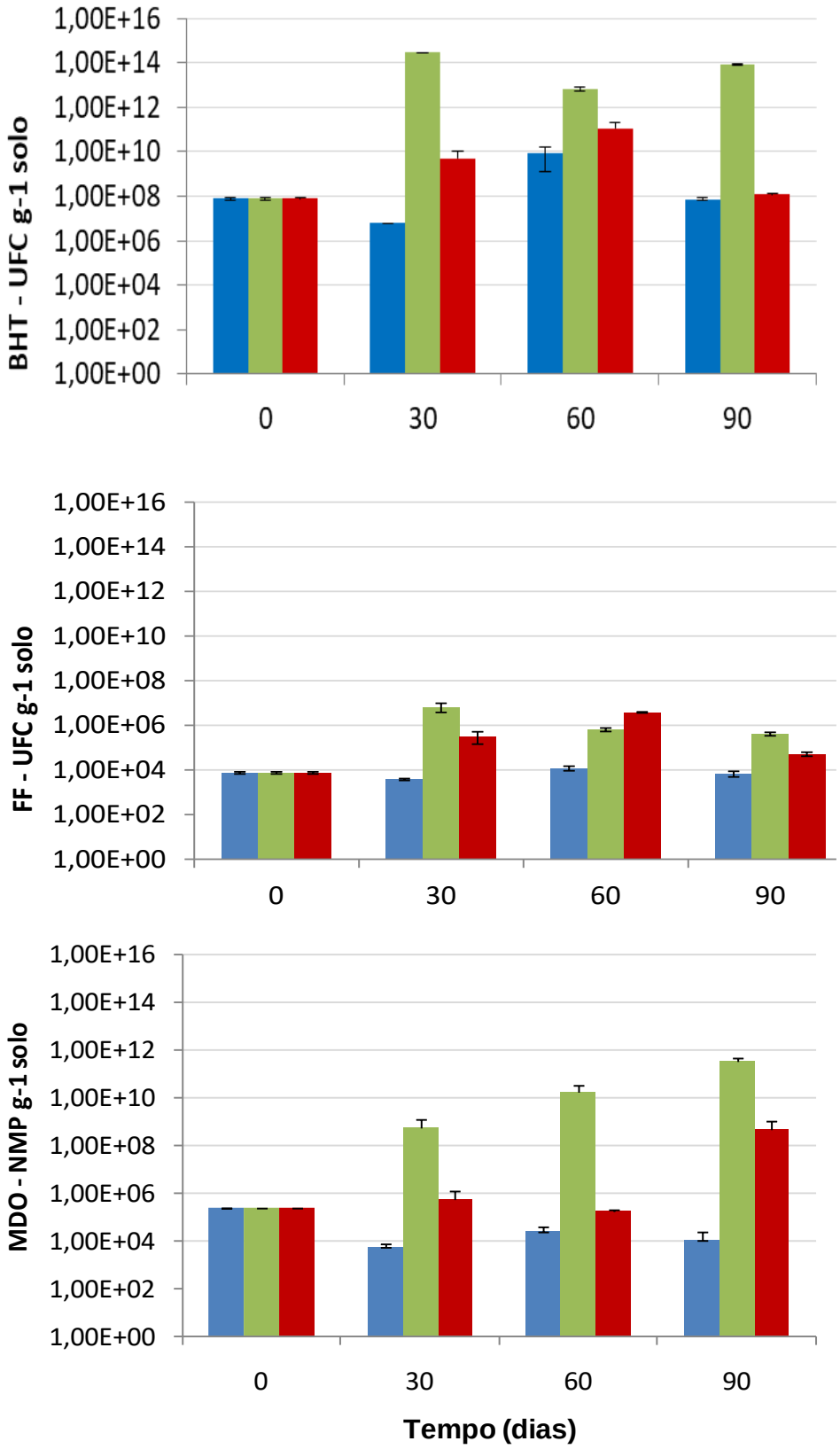


Figura 6.13 Gráfico do crescimento de bactérias heterotróficas totais (BHT), fungos filamentosos (FF), e dos microrganismos degradadores de óleo (MDO) do solo, ao receberem diferentes quantidades de bagaço de cana-de-açúcar (BC) e de (SS) nos tempos de 30, 60 e 90 dias. Solo sem

tratamento (controle) (■); solo com 20 g de BC + 20 g kg^{-1} solo da SS incorporada ao solo (■); solo com 20 g de BC + 20 g kg^{-1} solo da SS adicionados na superfície do solo (■).

LIU et al. (2017), trabalhando com diferentes fatores para avaliar a biorremediação verificou a grande importância da temperatura sobre o processo. Eles observaram que a temperatura é o parâmetro que mais influencia a atividade microbiana. Com relação ao revolvimento do solo, de acordo com RHODEN et al. (2006), há um aumento da atividade microbiana, porque a matéria orgânica do solo pode ser mais facilmente degradada, pois promove a destruição, inclusive dos agregados, havendo maior e mais rápida liberação de C e nutrientes para os microrganismos, além de uma melhor difusão de oxigênio no solo.

Para todas as populações microbianas e em todos os tempos estudados, houve maior crescimento microbiano nos solos que receberam material vegetal incorporado ao solo do que em superfície (Figura 6.13). A única exceção ocorreu para a população de fungos no tempo de 60 dias, onde o crescimento de microrganismos no solo foi maior do que no solo que recebeu material vegetal em mistura (Figura 6.13). Em superfície ou em mistura, os benefícios da aplicação de resíduos vegetais no solo estão relacionados com o aumento da fertilidade do solo (COLEMAN et al., 2018), mas a utilização do BC e SS misturados certamente favoreceu um melhor contato do material vegetal com o solo, promovendo uma melhor aeração, e aumentando assim a população de microrganismos no solo. Entretanto, a adição de resíduos vegetais em superfície no solo também pode trazer benefícios, como por exemplo, a redução da perda de umidade. Em superfície, os materiais vegetais são mais lentamente degradados, podendo formar uma cobertura estável capaz de proteger o solo contra erosão, além de fornecer os nutrientes lentamente ao solo, reduzindo perdas (NDAW et al., 2009). HAMZAH et al. (2014) avaliaram a utilização de BC e da casca do fruto de óleo de palma (OPEFB) em superfície no solo contaminado artificialmente com petróleo bruto, e verificou que o solo que não recebeu os resíduos vegetais em superfície apresentaram uma redução da umidade de 40% para 32% em 20 dias, enquanto os solos que receberam BC e OPEFB em superfície mantiveram a umidade do solo em 38 e 39%, respectivamente.

6.5.2 Remoção de hidrocarbonetos totais do petróleo

A adição do BC e da SS juntos resultou em uma maior remoção de HTP quando comparada à remoção no solo controle (Figura 6.14). Porém, apresentou uma menor remoção de HTP comparativamente ao experimento realizado em escala menor (Figura 6.7 e 6.14).

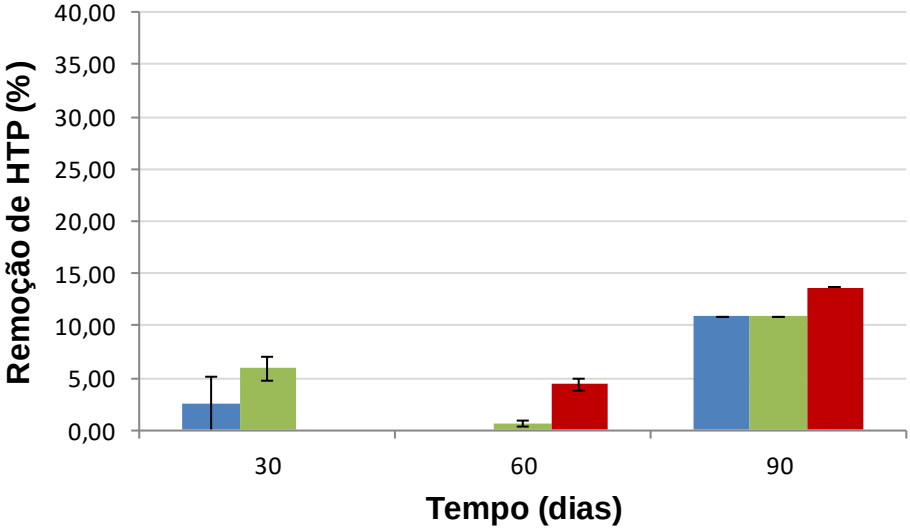


Figura 6.14 Gráfico com percentual de remoção dos hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP) no solo dos experimentos em maior escala ao receberem diferentes quantidades de bagaço de cana-de-açúcar (BC) e de (SS) nos tempos de 30, 60 e 90 dias. Solo sem tratamento (controle) (■); solo com 20 g de BC + 20 g kg^{-1} solo da SS (■) incorporada ao solo; solo com 20 g de BC + 20 g kg^{-1} solo da SS adicionados na superfície do solo (■). A concentração inicial de HTP foi de 32.251 mg kg^{-1} de solo.

Quando os materiais vegetais foram incorporados ao solo, a remoção ocorreu com maior rapidez (30 dias) (Figura 6.14). Essa remoção foi menor com 60 dias de experimento, e não aumentou com 90 dias (Figura 6.14). Nos solos que receberam os materiais vegetais em superfície, a remoção ocorreu inicialmente em um tempo maior (60 dias), e se manteve ao final do experimento (90 dias) (Figura 6.14), corroborando o aumento observado da população de MDO do solo que recebeu os resíduos vegetais em superfície somente com 90 dias de experimento.

Os materiais vegetais incorporados ao solo tiveram um maior contato com o solo e os microrganismos, favorecendo a degradação mais rápida dos materiais vegetais e dos hidrocarbonetos no solo. Apesar disso, quando os materiais vegetais

foram colocados na superfície do solo, o contato certamente foi menor fazendo com que a degradação se tornasse mais lenta. No entanto, a remoção de HTP em 90 dias foi 4% maior que no solo que recebeu os resíduos vegetais incorporados ao solo (Figura 6.14), provavelmente devido a uma liberação mais lenta dos substratos e nutrientes, evitando perdas, e a melhor manutenção da umidade do solo fornecida pela proteção do material vegetal em superfície, conforme mencionado no tópico anterior (NDAW et al., 2009).

Os resultados do experimento em maior escala não foram ideais, mas foram satisfatórios. Os valores de remoção foram todos abaixo de 14% (Figura 6.14), enquanto no experimento em escala menor chegaram a alcançar uma remoção de 33% (Figura 6.7). MARTINS et al. (2014) também realizou um trabalho de fitorremediação com girassol com o mesmo solo deste trabalho, e verificou uma remoção de HTP de apenas 10 ± 2% após 45 dias de tratamento.

A menor remoção encontrada no experimento realizado em escala maior, em relação ao ensaio de escala menor, provavelmente ocorreu em função das dificuldades inerentes ao aumento de escala ou a erros de amostragem. A maior quantidade de solo pode ter dificultado sua homogeneização (RHODEN et al., 2006). Outro fator que pode ter resultado em uma menor degradação de HTP no experimento em maior escala é fato de ter sido realizado no período de inverno, quando as temperaturas estão mais baixas, desfavorecendo a degradação de HTP pelos microrganismos degradadores de hidrocarbonetos conforme foi mencionado no tópico anterior. O fato do experimento em escala maior ter sido realizado cerca de 2 anos após o ensaio em menor escala também pode ter resultado na presença de hidrocarbonetos mais recalcitrantes no solo, resultantes da degradação ou modificação de outros contaminantes (SHAHSAVARI et al., 2013).

Capítulo 7

Considerações finais

O desenvolvimento tecnológico e o bem-estar humano ainda são fortemente dependentes do petróleo e seus derivados, e os derrames, aliados a disposição inadequada dos resíduos gerados pela indústria do petróleo são umas das causas mais apontadas pelo aumento da contaminação ambiental. O *Landfarming* é um tratamento biológico antigo utilizado para tratar resíduos provenientes da indústria do petróleo. Apesar disso, com o passar do tempo ele pode ficar saturado e passar a atuar como acumulador de substâncias perigosas e recalcitrantes. Portanto, a busca por estratégias que pudessem dar continuidade aos benefícios do *landfarming* tornou-se um incentivo para o desenvolvimento deste trabalho. Foi realizada a adição de materiais vegetais ao solo, que é considerado um tratamento eficaz e de baixo custo quando comparado a outros tipos de tratamentos realizados. Além disso, não existe na literatura trabalhos que avaliem a adição da SS para incrementar a remoção de HTP no solo, e são poucas as pesquisas realizadas com BC em solo de área real. Com a realização dos experimentos foi verificado que o BC é uma melhor fonte de C para os microrganismos do solo e que a SS, que atua principalmente como fonte de N. Também foi observado que a adição separada destes resíduos não promove remoção de HTP no solo, enquanto a adição combinada dos mesmos, além de ter resultado em uma maior evolução de CO_2 no solo, promoveu um maior crescimento microbiano, e foi capaz de remover 33% de HTP quando o BC e a SS foram adicionados ao solo na concentração de 20 g kg^{-1}. Portanto, mesmo que no experimento em escala maior tenha sido verificada uma pequena remoção de HTP (4%) em face da dificuldade experimental de manter a uniformidade no processo de revolvimento, e pelo fato de ter sido realizado em uma época do ano com temperatura mais baixa, o resultado de remoção do experimento em escala menor (33%) pode ser considerado promissor, sobretudo porque a incorporação de resíduos vegetais, devido aos benefícios promovidos ao solo, a saber: adição de nutrientes, melhoria da difusão de oxigênio e da drenagem de água, entre outros, pode reduzir gastos com fertilização e aeração no solo, práticas frequentemente adotadas em tratamentos biológicos como o sistema *landfarming*.

Capítulo 8

Conclusões

- O BC é melhor fonte de C para os microrganismos do solo que a SS, embora a SS atue principalmente como fonte de N para os microrganismos do solo.

- A maior evolução de CO_2 acumulado foi verificada quando o BC e a SS foram adicionados de forma combinada no solo (7942,49 mg CO_2 kg^{-1} solo, em média).

- A utilização do BC e da SS de forma combinada, no ensaio em microcosmo, foi capaz de promover o crescimento dos microrganismos cultiváveis (BHT, FF, e MDO) em 3, 2 e 5 ordens de grandeza, respectivamente, maior que no experimento controle.

- Não foi detectada biodegradação de hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP) nos ensaios com BC e SS adicionados separadamente no solo. Entretanto, a combinação destes resíduos vegetais na concentração de 20 g kg^{-1} solo, para ambos, resultou em uma remoção de 33% de HTP após 90 dias de tratamento.

- Foi observada uma mudança na estrutura da comunidade microbiana relacionada aos tratamentos realizados no solo. Houve uma maior abundância na classe de Alphaproteobacteria nos solos tratados com SS, grupo geralmente associado a ambientes impactados por HTP.

- A aplicação do BC e SS de forma combinada na quantidade de 20 g kg^{-1} solo no ensaio em maior escala resultou no aumento da população de BHT, FF e MDO de 5, 2 e 6 ordens de grandeza, respectivamente, maiores que no experimento controle.

- A adição combinada do BC e SS de forma incorporada no solo do

experimento realizado em maior escala, permitiu o aumento das populações de BHT e MDO em 3 ordens de grandeza em relação ao solo que recebeu os resíduos em superfície. Entretanto, só foi verificada remoção de HTP (4%) no solo cuja adição dos resíduos vegetais ocorreu de forma superficial.

Capítulo 9

Sugestões para trabalhos futuros

- Realizar análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) no solo para completar as informações deste trabalho;

- Avaliar o efeito da adição de BC e SS em solos contaminados artificialmente;

- Realizar experimento com adições periódicas do BC e da SS, e não somente no início do experimento como foi realizado neste trabalho;

- Estender o tempo do tratamento de biorremediação além dos 90 dias estudados neste trabalho;

- Realizar experimento em escala maior no mesmo período do ano que foi realizado o experimento em microcosmo para evitar diferenças na temperatura de trabalho e conseqüentemente no efeito esperado;

- Montar experimento em área real.

Referências bibliográficas

ABIOYE, O. P.; ABDUL AZIZ, A.; AGAMUTHU, P. Stimulated biodegradation of used lubricating oil in soil using organic wastes. Malays J. Sci. v. 28, p.127 - 133, 2009.

ABIOYE, O. P.; AGAMUTHU, P.; ABDUL AZIZ, A. R. Biodegradation of used motor oil in soil using organic waste amendments.Biotechnol. Res. Int. 2012.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Tratamento no Solo - Landfarming. ABNT NBR ISO 13.894, 1997.

ACSELRAD, H; MELLO. C. C. D. A. Conflito social e risco ambiental - o caso do vazamento de óleo na Baía 22 de Guanabara. In: Alimonda H. (Org.), 2002.

AL-ANSARI, A. S.; ABDULKAREEM, M. A. Some plant extracts retarde nitrification in soil. Acta agriculturae Slovenica, 103 p., p. 5 - 13, 2014.

ALBINO, J. C.; CRESTE, S.; FIGUEIRA A. Mapeamento genético da cana de açúcar. Biotenologia, ciência e desenvolvimento, n° 36, 2006.

ALEF, K.; NANNIPIERI, P. Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, 576 p., 1995.

ALMEIDA, R. C. Caracterização de propriedades de cambissolos derivados de arenito submetidos a diferentes condições de manejo. Dissertação (Mestrado). Escola de Química, Universidade Federal do Paraná, 2013.

ALRUMMAN, S. A.; STANDING, D. B.; PATON, G. I. Effect of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. Journal of King Saud University-Science, v. 27, p. 31 - 41, 2015.

AMARAL-ZETTLER, L. A.; MCCLIMENT, E. A.; DUCKLOW, H. W.; HUSE, S. M. A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA genes. PLOS ONE, v. 4, 6372 p., 2009.

ANASTASI, A.; VARESE, G. C.; BOSCO, F.; CHIMIRRI, F.; MARCHISIO, V. F. Bioremediation potential of basidiomycetes isolated from compost.Bioresource Technology, v. 99, p. 6626 - 6630, 2008.

ANDERSON, J. D.; INGRAM, J. S. I. Tropical soil biology and fertility. In: A handbook of methods. 2. ed. Wallingford, UK CAB International, 171 p., 1996.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. Eclet. Quím, SP, v. 35, n° 3, p. 17 - 43, 2010.

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Anuário estatístico. Disponível em: http://www.anp.gov.br/publicacoes/anuario-estatistico/3819-anuario-estatistico-2017. Acessado em 18/ 07/ 2018, 2017.

ATLAS, R. M.; HAZEN, T. C. “Oil biodegradation and bioremediation: A tale of the two worst spills in U.S. history,” Environ. Sci. Technol, v. 45, n° 16, p. 6709 - 6715, 2011.

BALOTA, E. L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D. S.; Hungria, M. Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. R. Bras. Ci. Solo, v. 22, p. 641 - 649, 1998.

BAPTISTA, S. J. Avaliação do emprego de biossurfactante na biorremediação de solos contaminados com óleo diesel. Tese (Doutorado). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 146 p., 2007.

BARRETO, P. A. B.; GAMA-RODRIGUES, E. F.; GAMA-RODRIGUES, A. C. Mineralização de nitrogênio e carbono em solos sob plantações de eucalipto em uma sequência de idades. Rev Bras Cienc Solo, v. 34, p. 735 - 745, 2010.

BOUCHEZ, J. R. Practical handbook of soil, vadose zone, and ground-water contamination. Assessment, prevention, and remediation. Boca Raton: Lewis, 948 p., 1995.

CAPORASO, J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D; COSTELLO, E. K.; FIERER, N.; PEÑA, A. G,; GOODRICH, J. K.; GORDON, J. I.; HUTTLEY, G. A.; KELLEY, S. T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J. E.; LEY, R. E.; LOZUPONE, C. A.; MCDONALD, D. A.; MUEGGE, B. D.; PIRRUNG, M. REEDER, J.; SEVINSKY, J. R.; TURNBAUGH, P. J.; WALTERS, W. A.; WIDMANN, J.;YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nat Methods, v. 7, p. 335 - 336, 2010.

CARVALHO, G. G. P.; PIRES, A. J. V.; VELOSO, C. M.; MAGALHÃES, A. F. M.; FREIRE, A. L. F. F. S.; SILVA, R. R.; CARVALHO, B. M. A. Valor nutritivo do bagaço de cana-de-açúcar amonizado com quatro doses de uréia. Pesq. agropec. bras., Brasília, v. 41, n° 1, p.125 - 132, 2006.

CAYUELA, M. L.; SINICCO, T.; MONDINI C. Mineralization dynamics and biochemical properties during initial decomposition of plant and animal residues in soil. Appl Soil Ecol, v. 41, p.118 - 27, 2009.

CERQUEIRA, V. S.; PERALBA, M. C. R.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M. Comparison of bioremediation strategies for soil impacted with petrochemical oily sludge. Int Biodeterior Biodegrad, v. 95, p.338 - 345, 2014.

CETESB - COMPANHIA ESTADUAL DE TRATAMENTO DE ESGOTO E SANEAMENTO BÁSICO. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/areascontaminadas/relacoes-de areas-contaminadas/15 publicacoes. Acessado em 02/09/2014, lista holandesa (2000), 2014.

CHADA, S. S.; CAMPELLO, E. F. C.; FARIA, S. M. Sucessão vegetal em uma encosta reflorestada com leguminosas arbóreas em Angra dos Reis, RJ. Viçosa. Rev. Árvore, v. 28, n°6, 2004.

CHEN, M.; XUA, P.; ZENG, G.; YANG, C.; HUANG, D.; ZHANG, J. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. Biotechnol Adv, v. 33, p. 745 - 755, 2015.

CLEMENTE, R.; PARDO,T.; MADEJÓN, P.; MADEJÓN, E.; BERNAL, M. P. Food byproducts as amendments in trace elements contaminated soils. Food Research International, v. 73, p. 176 - 189, 2015.

COLEMAN, D. C.; CALLAHAM, M. A.; CROSSLEY, J. D. A. Fundamentals of Soil Ecology. Elsevier, 3.ed. India, 376 p., 2018.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução Conama n° 420 de 28 de dezembro de 2009. Disponível em: http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620. Acessado em: 22/08/2014.

CUEVAS-DÍAZ, M. C.; MARTÍNEZ-TOLEDO, A.; GUZMÁN-LÓPEZ, O.; TORRES-LÓPEZ, C. P.; ORTEGA-MARTÍNEZ, A. C.; HERMIDA-MENDOZA, L. J.; Catalase and Phosphatase Activities During Hydrocarbon Removal from Oil-Contaminated Soil Amended with Agro-Industrial By-products and Macronutrients. Water Air Soil Pollut, v. 228, 159 p., 2017.

CREMER, C. A.; FILLEY, T.R; BOUTTON, T. W.; OLEYNIK, S.; KANTOLA, I. B. “Controls on soil carbon accumulation during woody plant encroachment: Evidence from physical fractionation, soil respiration, and 13C of respired CO2,” Soil Biol. Biochem., v. 43, nº 8, p. 1678 - 1687, 2011.

DAMS, R. I. Rizoremediação de pentaclorofenol em um solo argiloso por Sphingomonas chlorophenolica ATCC 39723. Eng. Sanit. Ambient. v. 12, n° 4, p. 426 - 432, 2007.

DELONG, E. F. Microbial population genomics and ecology. Curr Opin Biotechnol., v. 5, n° 5, p. 520 - 524, 2002.

EAPEN, S.; SOUZA, S. F. D. Prospects of genetic engineering of plants for ph-EMBRAPA ytoremediation of toxic metals. Biotechnology Advances, v. 23, p. 97 - 114, 2005.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Manual de métodos de análise de solo. 2.ed. Rio de Janeiro, 212 p., 1997.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Definição e Notação de Horizontes e Camadas do solo, nº 3, 1983.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Instruções práticas para produção de composto orgânico em pequenas propriedades. Comunicado técnico, Brasília, DF, n° 53, 2008.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Manual de calagem e adubação do estado do Rio de Janeiro. Editora Universidade Rural. 430 p, 2013.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Métodos de análise de tecidos vegetais utilizados na EMBRAPA Solos. Circular Técnica n° 6, 2000.

EPA - Environmental Protection Agency. Best Practice Note: Landfarming, DC 0323, 2014.

EPA - Environmental Protection Agency. How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers, EPA 510-R-04-002, 2005.

EPA - Environmental Protection Agency. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Office of Solid Waste, Washington, DC 20460, 2008.

EPE - Empresa de Pesquisa Energética. Matriz Energética e Elétrica. Disponível em: http://www.epe.gov.br/pt/abcdenergia/matriz-energetica-e-eletrica. Acessado em 16/ 07/ 2018.

ESPINDOLA, J. A. A.; GUERRA, J. G. M.; ALMEIDA, D. L.; TEIXEIRA, M. G.; URQUIAGA, S. Decomposição e liberação de nutrientes acumulados em leguminosas herbáceas perenes consorciadas com bananeira. R. Bras. Ci. Solo, v. 30, p. 321 - 328, 2006.

FARHADIAN, M.; VACHELARD, C.; DUCHEZ, D. E.; LARROCHE, C. In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: A review. Bioresour technology, 2007.

FILLER, D. M.; REYNOLDS, C. M.; SNAPE, I.; DAUGULIS, A. J.; BARNES, D. L.; WILLIAMS, P. J. Advances in engineered remediation for use in the Arctic and Antarctica. Polar Rec. v. 42, p.111 - 120, 2006.

FONSECA, R. D. V.; TEIXEIRA, K. N. Estudo da atividade catalítica de enzimas de Pseudomonas aeruginosa pertencentes à via de degradação do benzeno. PERQUIRERE - Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão, 1806-6399, Patos de Minas: UNIPAM, v. 1, n° 8, p. 58 - 69, 2011.

FONTES, A. G. Ciclagem de nutrientes em sistemas agroflorestais De cacau no sul da bahia. Tese (Doutorado), Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do norte Fluminense – UENF, 78p, 2006.

FRANCISCO, J. L.; FRANÇA, K. C. Dossiê técnico de métodos de Tratamento de Resíduos de Petróleo. Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro – REDETEC, 2007.

FRANCO, S. S.; NARDOCCI, A. C.; GÜNTHER, W. M. R. PAH biomarkers for human health risk assessment: a review of the state-of-the-art. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, v.4, nº24, p. S569 - S580, 2008.

FRANCO. L. Rio de janeiro aposta na cana-de-açúcar. Revista on-line, Globo Rural Disponível em: http://revistagloborural.globo.com/GloboRural/0,6993,EEC1582442-5809,00.html, acessado em 17/06/2014.

GABRIEL, S. Biorremediação do lodo de caixas separadoras de água e óleo utilizando bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 65p., 2008.

GAMA-RODRIGUES, A. C.; BARROS, N. F. & MENDONÇA, E. S. Alterações edáficas sob plantios puros e misto de espécies florestais nativas do sudeste da Bahia, Brasil. R. bras.Ci. Solo, v. 23, p. 581 - 592, 1999.

GAMA-RODRIGUES, A. C.; GAMA-RODRIGUES, E. F.; BRITO, E. C. Decomposição e liberação de nutrientes de resíduos culturais de plantas de cobertura em argissolo vermelho-amarelo na região noroeste fluminense (RJ). Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, v.31, p.1421 - 1428, 2007.

GAMA-RODRIGUES, E. F.; BARROS, N. F.; VIANA, A. P.; SANTOS, G. A. Alterações na biomassa e na atividade microbiana da serapilheira e do solo, em decorrência da substituição de cobertura florestal nativa por plantações de eucalipto, em diferentes sítios da região Sudeste do Brasil. R. Bras. Ci. Solo, v. 32, p. 1489 - 1499, 2008.

GAN, S.; LAUA, E. V.; NG, H. K. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Journal of Hazardous Materials, v.172, p. 532 - 549, 2009.

GARCÍA-TORRES, R.; RIOS-LEAL, E.; MARTÍNEZ-TOLEDO, A.; RAMOS-MORALES, F. R.; CRUZ-SANCHEZ, J. S.; CUEVAS - DÍAZ, M. D. C. Uso de cachaza y bagazo de caña de azúcar en la remoción de hidrocarburos en suelo contaminado. Rev Int Contam Ambient [online] v. 27, p. 31 - 39, 2011.

GOODWIN, S.; PHERSON, J. D. M.; COMBIE, W. R. M. Coming of age: ten years of nextgeneration sequencing technologies. Nature reviews, Genetics, v.17, p. 333-351, 2016.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, E A. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. Quim. Nova, v. 32, N° 6, p. 1500 - 1503, 2009.

GURGEL, A. M.; MEDEIROS, A. C. L. V.; ALVES, P. C.; SILVA, J. M.; GURGEL, I. G. D.; AUGUSTO, L. G. S. Framework dos cenários de risco no contexto da implantação de uma refinaria de petróleo em Pernambuco. Ciência & Saúde Coletiva, v.6, nº14, p. 2027 - 2038, 2009.

HAMERSKI, F. Estudo de variáveis no processo de carbonatação do caldo de cana-de-açúcar Processo de Landfarming para Tratamento de Resíduos Oleosos. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, 2009.

HAMZAH, A.; PHAN, C. W.; YONG, P. H.; RIDZUAN, N. H. M. Oil Palm Empty Fruit Bunch and Sugarcane Bagasse Enhance the Bioremediation of Soil Artificially Polluted by Crude Oil. Soil and Sediment Contamination, v.23, p. 751 - 762, 2014.

HARMSEN, J.; RULKENS, W. H.; SIMS, R. C.; RIJTEMA, P. E.; ZWEERS, A. J. Theory and application of landfarming to remediate polycyclic aromatichydrocarbons and mineral oil-contaminated sediments: beneficial reuse. J Environ Qual. v. 36, n° 4, p.1112 - 1122, 2007.

HASAN, H.; DANG, L.; KHABBAZ, H.; FATAHI, B.; TERZAGHI, S. Remediation of Expansive Soils Using Agricultural Waste Bagasse Ash. Procedia Engineering, v. 143, p.1368 - 1375, 2016.

HENDGES, A. S. Anexo II da Instrução Normativa 01 do Ibama: Operações Finais Dos Resíduos Sólidos, 2013.

HIRSCH,P. R.; MAUCHLINE, T. H.; CLARK, I. M. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology.Soil Biology and Biochemistry, v. 42, n° 6, p. 878 - 887, 2010.

HU, G.; LI, J.; ZENG, G. Recent development in the treatment of oily sludge from petroleum industry: A Review. J Hazard Mater, v. 261, p. 470 - 490, 2013.

HUANG, X. D.; EL-ALAWI, Y.; PENROSE, D. M.; GLICK, B. R.; GREENBERG, B. M. Responses of three grass species to creosote during phytoremediation. Environmental Pollution, Oxford, v. 130, n° 3, p. 453 - 464, 2004.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Manual técnico de Pedagogia. 2. Ed, n° 4, 2007.

ITOPF. Technical information paper. Use of sorbent materials in oil spill response. ITOPF Ltd. Produced by impact PR & Design, Canterbury, UK, 2012.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Ciência Rural, v. 37, n° 4, p. 1192 - 1201, 2007.

JACQUES, R. J. S.; SILVA, K. J.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. Ciência Rural, v. 40, n° 2, p. 310 - 317, 2010.

JERÔNIMO, C. E. M.; KITZINGER, W. G. C. M. Dimensionamento de um landfarming para tratamento de borras oleosas utilizando critérios de um reator batelada. REGET, v. 18 p.1273 - 1285, 2014.

KAVAMURA, V. N.; TAKETANI, R. G.; LANÇONI, M. D.; ANDREOTE, F. D.; MENDES, R.; DE MELO, I. S. Water regime influences bulk soil and rhizosphere of Cereus jamacaru bacterial communities in the Brazilian, Caatinga biome. PLOS ONE, v. 8, e 73606, 2013.

KER, J. C.; CURI, N.; SCHAEFER, C. E. G. R.; VIDAL-TORRADO, P. Pedologia – Fundamentos. Editora Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 1. Ed, 343p., 2012.

KIRK, J. L.et al. Methods of studying soil microbial diversity. J Microbiol Methods, v. 58, n° 2, p. 169 - 188, 2004.

KOMIYAMA, K.; OKAUE, M.; MIKI, Y.; OHKUBO, M.; MORO, I.; COOPER, E. L. Non-specific cellular function of Eisenia fetida regulated by polycyclic aromatic hydrocarbons. Pedobiologia, The 7th international symposium on earthworm ecology, Cardiff, Wales, v. 47, p. 717 - 723, 2003.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiological Reviews, v. 54, n° 3, p. 305 - 315, 1990.

LEMOS, D. A.; CARDOSO, S. L.; VIEIRA, P. A.; CARDOSO, V. L. Bioremediation of Soil contaminated with Biodiesel and Glycerin - Results of Soil Microbial Adaptation Through Evidence Contaminants Removal.Chemical Engineering Transactions, v. 32, p. 463 - 468, 2013.

LEMOS, L. L. S.; OLIVEIRA, S. D.; SCHLITTLER, L. A. F. S.; JÚNIOR, N. P. Técnicas de biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. Diálogos & Ciência – Revista da rede de ensino FTC, 2009.

LEPSCH, I. F. Horizontes do solo. In: Formação e conservação dos solos. Oficina de textos, 2. Ed., 334 p., 2016.

LIDUINO, V. S.; SERVULO, E. C. S.; OLIVEIRA, F. J. S.; Biosurfactant-assisted phytoremediation of multicontaminated industrial soil using sunflower (Helianthus annuus L. Journal of environmental science and health, PART A, n° 0, p. 1 - 8, 2018.

LIM, M. W.; LAU, E. V.; POH, P. E. A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil - Present works and future directions. Marine Pollution Bulletin, v. 109, p.14 - 45, 2016.

LIMA, D. F.; OLIVEIRA O. M. C.; CRUZ, M. J. M. Utilização dos fungos na biorremediação de substratos contaminados por petróleo: estado da arte. Cadernos de Geociências, v. 8, n° 2, 2011.

LIU, J.; BACOSA, H. P.; LIU, L. Potential Environmental Factors Affecting Oil-Degrading Bacterial Populations in Deep and Surface Waters of the Northern Gulf of Mexico. Frontiers in Microbiology. v. 7, nº 2131, 2017.

LUCHESE, E. B., FAVERO, L. O. B. e LENZI, E. Fundamentos da química do solo. Rio de Janeiro: 1. Ed. Freitas Bastos, 2001.

LUKIĆ, B.; PANICO, A.; HUGUENOT, D.; FABBRICINO, M.; HULLEBUSCH, E. D. V.; ESPOSITO. G. A. Review on the efficiency of landfarming integrated with composting as a soil remediation treatment. Environmental technology reviews. (Online), v. 6, n° 1, p. 94 - 116, 2017.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARK, J. Brock Biología de Los Microorganismos, editora Artmed, 12. ed. 2010.

MALIK, S.; BEER, M.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soiland water. Environ Int., v. 34, n° 2, p. 265 - 276, 2008.

MANTOVANI, E. C.; BERNARDO, S.; PALARETTI, L. F. Irrigação: princípios e práticas. Viçosa: UFV, 318 p., 2006.

MARTINES, A. M.; ANDRADE, C. A. E.; CARDOSO, E. J. B. N. Mineralização do carbono orgânico em solos tratados com lodo de curtume Pesq. agropec. bras., Brasília, v. 41, n°7, p.1149 - 1155, 2006.

MARTINS, C. D. C. Fitorremediação de solo oriundo de área industrial multicontaminado com metais pesados e hidrocarbonetos do petróleo por girassol (*Helianthus annuus*). Tese (Doutorado). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 187 p., 2015.

MARTINS, C. D. C.; LIDUINO, V. S.; OLIVEIRA, F. J. S.; SÉRVULO, E. F. C. Phytoremediation of Soil Multi-Contaminated with Hydrocarbons and Heavy Metals Using Sunflowers. International Journal of Engineering & Technology, v. 14 Nº 05, 2014.

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.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Cana de açúcar. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar/, acessado em 17/06/2014.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Resíduos Sólidos. Disponível em: http://www.mma.gov.br/cidades-sustentaveis/residuos-solidos/, acessado em 18/05/ 2014.

MOLINA-BARAHONA, L.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; HERNÁNDEZ-VELASCO, M.; VEGA-JARQUÍN, C.; ZAPATA-PÉREZ, O.; MENDOZA-CANTÚ; A.; ALBORES, A. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. Applied Soil Ecology, Amsterdam, v. 27, n° 2, p. 165 - 175, 2004.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do solo. 2. ed. Universidade Federal de Lavras, MG, 729p, 2006.

MUKHERJEE, B.; MAJUMDAR, M.; GANGOPADHYAY, A.; CHAKRABORTY, S.; CHATERJEE, D. Phytoremediation of parboiled rice mill wastewater using water lettuce (*Pistia stratiotes*). Int J Phytoremediation v.17, 2015.

MURPHY J. D.; MCCARTHY, K. Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland. Applied Energy, v. 82, n° 2, p. 148 -166, 2005.

NAVARRETE, A. A.; PIZANO, M. A.; JÚNIOR, O. N.; PIÃO, A. C. S.; ANGELIS, D. F. Toxicidade de solo de “landfarming” de refinaria de petróleo tratado com algas para minhoca Eiseniab fétida. Holos Environment, v. 9, n° 1, 2009.

NDAW, S. M.; GAMA-RODRIGUES, A. C.; GAMA-RODRIGUES, E. F.; SALES, K. R. N.; ROSADO, A. S. Relationships between bacterial diversity, microbial biomass and litter quality in soils under different plant covers in northern - Rio de Janeiro State, Brazil, Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, v. 55, p.1089 - 1095, 2009.

NIKOLOPOULOU, M.; PASADAKIS, B. N.; KALOGERAKIS, N. Evaluation of autochthonous bioaugmentation and biostimulation during microcosm-simulated oil spills. Mar Pollut Bull, v. 72, p.165 - 173, 2013.

NOVAIS, R. F.; SMITH, T. J.; NUNES, F. N. Fósforo. In: NOVAIS, R. F; ALVARES, V. H.; BARROS. N. F.; FONTES, R. B. C.; NEVES, J. C. L. Fertilidade do solo 2007. Sociedade Brasileira de Ciência do solo, Viçosa, M G, 1. Ed. p. 471 - 550, 2007.

NUNES, D. A. D.; GAMA-RODRIGUES, E. F.; BARRETO, P. A. B.; GAMA-RODRIGUES, A. C.; MONROE; P. H. M. Carbon and nitrogen mineralization in soil of leguminous trees in a degraded pasture in northern Rio de Janeiro, Brazil. J Forestry R [online] v. 27, p 91 - 99, 2016.

OLIVEIRA JR, R. S.; REGITANO, J. B. Dinâmica de pesticidas no solo. Química e Mineralogia do Solo, Viçosa, 1. Ed, p. 188 - 248, 2009.

OLIVEIRA, J. B. Pedologia Aplicada. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, São Paulo, 3. Ed, 592 p., 2008.

PADMANABHAN, P.; SAHI, S. Suppresion subtractive hybridization reveals differential gene expression in sunflower grown in high P. Plant physiology and Biochemistry, v. 49, p. 584 - 591, 2011.

PARANHOS, S. B. Cana-de-açúcar. Cultivo e utilização. Disponível em: http://www.agrobyte.com.br/cana.htm, acessado em 17/06/2014.

PAUDYN, K.; RUTTER, A.; ROWE, R. K.; POLAND, J. S. Remediation of hydrocarbon contaminated soils in the Canadian Arctic by landfarming. Science and technology, v. 53, p. 102 - 104, 2008.

PAULA, A. M.; SOARES, C. R. F. S.; SIQUEIRA, J. O. Biomassa, atividade microbiana e fungos micorrízicos em solo de “landfarming” de resíduos petroquímicos. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, Campina Grande, PB, v. 10, n° 2, p. 448 - 455, 2006.

PAVINATO, P. S.; ROSOLEM, C. A. Disponibilidade de nutrientes no Solo - decomposição e liberação de compostos orgânicos de Resíduos vegetais. R. Bras. Ci. Solo, v. 32, p. 911 - 920, 2008.

PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. Updated world map of the köppen-Geiger climate classification. Hydrology and Earth System Sciences, v. 11, p. 1633 - 1644, 2007.

PICKARD, M. A.; VANDERTOL, R.; ROMAN, R.; VAZQUEZ-DUHALT, R. High production of ligninolytic enzymes from white rot fungi in cereal bran liquid medium. Can. J. Microbiol. v. 45, p. 627 - 631, 1999.

PRICE, G. W.; ZENG, J.; ARNOLD, P. Influence of agricultural wastes and a finished compost on the decomposition of slaughterhouse waste composts. J. Environ. Manage. v. 130, p. 248 - 254, 2013.

QIN, S. P.; HU, C. S,; HE, X. H.; DONG, W. X.; CUI, J. F.; WANG, Y. Soil organic carbon, nutrients and relevant enzyme activities in particle-size fractions under conservational versus traditional agricultural management.Appl Soil Ecol, v. 45, p. 152 - 159, 2010.

QUINTAES, B. R.; CAMPOS, J. C.; MIGUEL, M. A. L.; HINOJOSA, M. A. G. Uso de Ferramentas Moleculares para Estudos de Comunidades Microbianas em Lixiviado de Aterro de Resíduos Sólidos Urbanos. Revista Brasileira de Ciências Ambientais, n° 31, 2014.

RESENDE, M.; CURI, N., REZENDE; S. B. CORRÊA, G. F. PEDOLOGIA – Base para distinção de ambientes. Viçosa, UFLA, 6. Ed, 378p., 1996.

RHODEN, A. C.; SILVA L. S.; CAMARGO, F. A. O.; BRITZKE, D.; BENEDETTI, E. L. Mineralização anaeróbia do nitrogênio em solos de várzea do Rio Grande do Sul. Ciência Rural v.36, p. 1780 - 1787, 2006.

RIZZO, A. C. L.; LEITE, S. G. F.; SORIANO, A. U.; SANTOS, R. L. C.; SOBRAL, L. G. S. Biorremediação de solos contaminados por petróleos: ênfase no uso de biorreatores. CETEM - Centro de Tecnologia Mineral. Série Tecnologia Ambiental, n° 37, 2006.

ROBERTS, E. R. Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical, and chemical. Library of congresso Card, United States, 2. Ed. 576 p, 1998.

ROCHA, D. L.; CUNHA, C. D. Biorremediação de solos multicontaminados com petróleo e metais. II Jornada do Programa de Capacitação Interna, CETEM, 2013.

ROS, M.; RODRÍGUEZ, I.; GARCÍA, C.; HERNÁNDEZ, T. Microbial communities involved in the bioremediation of an aged recalcitrant hydrocarbon polluted soil by using organic amendments. Bioresour Technolv. v. 101, p. 6916 - 6923, 2010.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F. Utilização de eletroforese em gel com gradientes de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura para estudar a diversidade microbiana. In: Genética e melhoramento de microrganismos. Mello, I.S. EDUSP: São Paulo, 1 Ed, 2002.

ROY, A. S.; BARUAH, R.; BORAH, M.; SINGH, A. K.; BORUAH, H. P. D.; SAIKIA, N.; DEKA, M.; DUTTA, N.; BORA, T. C. Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study. Int. Biodeterior. Biodegrad, v. 94, p. 79 - 89, 2014.

SALCEDO, I. H; SAMPAIO, E. V. S. B; ALVES, G. D. Mineralização do C e do N em soloultivado com cana-de-açúcar. Rev Bras Cienc Solo, v. 9, p. 33 - 38, 1985.

SALES, M. V. S.; ALEIXO, S.; GAMA-RODRIGUES, A. C.; GAMA-RODRIGUES, F. E. Structural equation modeling for the estimation of interconnections between the P cycle and soil properties. Nutrient Cycling in Agroecosystems, v. 109, p. 193 - 207, 2017.

SANTOS, D. R.; CASSOL, P. C.; KAMINSKI, J.; ANGHINONI, I. Fósforo orgânico do solo. In: SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. Fundamentos da matéria orgânica do solo - ecossistemas tropicais e subtropicais. Metropole, Porto Alegre, 2 Ed. 636 p, 2008.

SANTOS, R. M. Avaliação da adição do pó da casca de coco verde, como material estruturante, na biorremediação de solo contaminado por petróleo. Dissertação (mestrado). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 143 p., 2007.

SANTOS, R. S.; SOUZA, G. P.; HOLANDA, J. N. F. Caracterização de massas argilosas contendo resíduo proveniente do setor petrolífero e sua utilização em cerâmica estrutural. Cerâmica, v. 48, n° 307, 2002.

SCHUSTER, S. C. Next-generation sequencing transforms today’s biology. Nature methods, v. 5, n° 1, 2008.

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Uso de resíduos e dejetos como fonte de energia renovável. Ed. Supernova desing. Rio de Janeiro, p. 1 - 89, 2016.

SEMPLE, K. T.; REID, B. J.; FERMOR, T. R. Review: Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. Environ. Pollution, v. 112, p. 269 - 283, 2001.

SEO, Y.; JANG, A. J.; BISHOP, P. L. Organic mulch biowall for PAH contaminated groundwater remediation. European Journal of Soil Biology. v. 43, p. 304 - 309, 2007.

SHAHSAVARI, E.; ADETUTU, E. M.; ANDERSON, P. A. BALL, A. S. Plant residues - A low cost, effective bioremediation treatment for petrogenic hydrocarbon-contaminated soil. Science of the Total Environment, v. 443, p. 766 - 774, 2013.

SILVA, I. R.; MENDONÇA, E. S. Matéria orgânica do solo. In: NOVAIS, R. F; ALVARES, V. H.; BARROS. N. F.; FONTES, R. B. C.; NEVES, J. C. L. Fertilidade do solo. Sociedade Brasileira de Ciência do solo, Viçosa, MG, 1. Ed, p. 275 - 374, 2007.

SILVA, L. J. Gerenciamento de borras oleosas provenientes de refinaria de petróleo. Tese (Doutorado). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 576 p., 2013.

SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. Microbiota do solo e qualidade ambiental. Intituto agronômico, Campinas, SP, 2007.

SINGH, C.; LIN, J. Isolation and characterization of diesel oil degrading indigenous microrganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. Afr. J. Biotechnol., v.7, p.1927 - 1932, 2008.

SOGIN, M. L.; MORRISON, H. G.; HUBER, J. A.; WELCH, D. M.; HUSE, S. M.; NEAL, P. R.; ARRIETA, J. M. E.; HERNDL, G. J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. Proc Natl Acad Sci USA 43, v. 103, p.12115 - 12120, 2006.

SPOSITO, A.; The chemistry of soil. Publicado por oxford University, New York, 2. Ed, 329 p., 2008.

SUTHERSAN, S. S. Remediation Engineering: Design Concepts. Disponível em: http://books.google.com.br/books/about/Remediation_Engineering.html?id=Rd2QIcNKl1UC&redir_esc=y, acessado em 24/06/2014. 384p., 1996.

TAKETANI, N. F.; TAKETANI, R. G.; LEITE S. G.; RIZZO, A. C.; TSAI, S. M.; DA CUNHA, C. D. The influence of nickel on the bioremediation of multi-component contaminated tropical soil: microcosm and batch bioreactor studies. World J Microbiol Biotechnol, v. 31, p. 1127 - 1135, 2015.

TERROR, V. L.; SOUSA, H. C.; KOZOVITS, A. R. Produção, decomposição e qualidade nutricional da serapilheira foliar em uma floresta paludosa de altitude. Acta Botanica Brasilica v. 25, n° 1, p.113 - 121, 2011.

THOMAS, J. E. Fundamentos de engenharia de petróleo. Interciência, PETROBRAS, Rio de Janeiro, 2. Ed. 977 p., 2004.

TREJO-HERNÁNDEZ, M.R.; ORTIZ, A.; OKOH, A. L.; Morales, D. Quintero, R. Biodegradation of heavy crude oil Maya using spent compost and sugar cane bagasse wastes. Chemosphere, v. 68, p. 848 - 855, 2007.

USEPA - U. S Environmental Protection Agency, Washington, Office of Solid Waste and Emergency Response: 24; Test methods for evaluating solid waste, SW-846, Revision 6; Method 3051a, 2007.

VAN ELSAS, J. D.; BOERSMA, F. G. H. A. review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. Eur J Soil Biol., v. 47, p. 77 - 87, 2011.

VAN SOEST, P. J.; WINE, R. H. The determination of lignin and cellulose in acid-detergent fibre with 32 permanganate. J Assoc Off Anal Chem, v. 51, p. 780 - 785, 1968.

VECCHIATO, M.; BONATO, T.; BERTIN, A.; ARGIRIADIS, E.; BARBANTE, C.; PIAZZA, R. Plant residues as direct and indirect sources of hydrocarbons in soils: current issues and legal implications. Environ. Sci. Technol. Lett., v. 4, p. 512 - 517, 2017.

VIANA, F.; CORREIA, T. M. B.; MACHADO, M. I.; COSTA, C. B.; BAISCH, P. A utilização da fitorremediação em áreas contaminadas por petróleo e seus resíduos. 4° PDPETRO, Campinas, SP, 2007.

VILÀ, M.; BASNOU, C.; PYŠEK, P.; JOSEFSSON, M.; GENOVESI, P.; GOLLASCH, S.; NENTWIG, W.; OLENIN, S.; ROQUES, A.; ROY, D.; HULME, P. E.; DAISIE, P. How well do we understand the impacts of alien species on ecosystem services? A pan-European cross-taxa assessment'. Frontiers of Ecology and Environment, v, 8, p. 135 - 144, 2010.

WANG, Y.; QIAN, P. Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. PLOS ONE v. 4: e7401, 2009.

WRENN, B. A.; VENOSA, A. D. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. Canadian Journal of Microbiology, v. 42, p. 252 - 258, 1996.

ZHANG, Z.; HOU, Z.; YANG, C.; MA, C.; TAO, F.; XU, P. Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated Pseudomonas aeruginosa DQ8. Bioresource Technology, v. 102, p. 4111 - 4116, 2011.