



UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE ENGENHARIA E ARQUITETURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
Área de Concentração: Infra-estrutura e Meio Ambiente

LILIANE REBECHI RIBEIRO MENEGHETTI

**BIOREMEDIÇÃO NA DESCONTAMINAÇÃO DE SOLO
RESIDUAL DE BASALTO CONTAMINADO
COM ÓLEO DÍESEL E BIODÍESEL.**

Passo Fundo

2007

LILIANE REBECHI RIBEIRO MENEGHETTI

**BIOREMEDIÇÃO NA DESCONTAMINAÇÃO DE
SOLO RESIDUAL DE BASALTO CONTAMINADO
COM ÓLEO DÍESEL E BIODÍESEL.**

Orientador: Professor **Antônio Thomé, Dr.**

Co-orientadora: Professora **Norimar D'Ávila Denardin, Dra.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia para obtenção do grau de Mestre em Engenharia na Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo na Área de concentração Infra-estrutura e Meio Ambiente

Passo Fundo

2007

LILIANE REBECHI RIBEIRO MENEGHETTI

**BIOREMEDIÇÃO NA DESCONTAMINAÇÃO DE
SOLO RESIDUAL DE BASALTO CONTAMINADO
COM ÓLEO DÍESEL E BIODÍESEL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Engenharia para obtenção do grau
de Mestre em Engenharia na Faculdade de
Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo
Fundo na Área de concentração Infra-estrutura e
Meio Ambiente

Data de aprovação: Passo Fundo, 30 de maio de 2007.

Os membros componentes da Banca Examinadora abaixo aprovam a Dissertação.

Prof. Dr. Antônio Thomé
Orientador

Prof^a. Dr^a. Norimar D'Ávila Denardin
Co-orientadora

Prof. Dr. Paulo Roberto Koetz
Universidade de Passo Fundo

Prof^a. Dr^a Vera Maria Cartana Fernandes
Universidade de Passo Fundo

Prof. Dr. Fernando Schnaid
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Passo Fundo
2007

Dedico esta dissertação à minha família,
pelo amor, confiança, amizade e dedicação...

Aos meus pais, por estarem ao meu lado,
muitas vezes escutando minhas angústias, alegrias e
decepções sempre como se fosse a primeira vez, mas
sempre apoiando as minhas escolhas e decisões...

Ao meu marido pela compreensão,
carinho e cumplicidade em todos os momentos...

Ao professor Antônio Thomé, pela sábia orientação, por ter acreditado nas minhas possibilidades e por ter tantas vezes entendido minhas limitações.

A professora Norimar D'Ávila Denardin, pela amizade, orientação e confiança na condução deste trabalho.

Ao professor Edgardo

A Bióloga, Cheila Cristina Sbalchieiro, que se tornou uma grande amiga, pela essencial participação no desenvolvimento dessa dissertação, além do carinho e amizade.

Aos bolsistas e amigos, Vinícius Girardello e Vagner Berté, pela fundamental importância, disponibilidade e compreensão em todos os momentos da pesquisa.

Ao laboratorista Leunir de Freitas, por toda a sua experiência e pelas brilhantes sugestões oferecidas.

À Universidade Passo Fundo, pela bolsa concedida.

Ao Mestrado de Engenharia, em especial à secretária Marli Tagliari, pelo companheirismo.

Aos colegas de mestrado, os quais se tornaram amigos especiais.

A todos, o meu mais sincero obrigado, vocês me ajudaram a concluir mais esta etapa da minha vida.

RESUMO

A contaminação de solos causada por vazamentos de combustíveis é um tema presente nas pesquisas da área de geotecnia ambiental. Esses solos contaminados com hidrocarbonetos derivados do petróleo geram impactos negativos ao meio ambiente contaminado o solo e posteriormente os aquíferos. Esta pesquisa tem por objetivo avaliar a descontaminação de um solo residual contaminado com óleo diesel e biodiesel, através das técnicas de bioremediação: atenuação natural, bioaugmentação e *bioventing*. A pesquisa seguiu os seguintes passos: caracterização físico-química do solo, análise microbiológica do solo (quantificação microbiológica, seleção das bactérias para bioaugmentação) evolução de CO₂, determinação do teor de contaminante residual pelo método de soxlet. A degradação do contaminante por cromatografia gasosa foi realizada no final do experimento. Para a realização dos ensaios de bioremediação, foram moldados amostras de solo indeformados retirados a uma profundidade média de 1,20m com formato cilíndrico de 10 cm de altura e 7,5 cm de diâmetro. A pesquisa tem como variáveis fixas: a dimensão geométrica dos corpos de prova (CP), a quantidade do contaminante, a quantidade de ar comprimido e o tempo de ação dos microrganismos. Como variáveis de resposta foram considerados a população dos microrganismos e o teor de óleo diesel e biodiesel residual. A quantificação microbiana foi avaliada em quatro períodos pré-determinados 30, 60, 90 e 120 dias da contaminação. Os CP foram mantidos a temperatura ambiente do laboratório, a umidade e o pH foram mantidos de acordo com a natural do campo e avaliado aos 30 e 120 dias. A degradação do poluente foi observada nas três técnicas de bioremediação, indicando que as bactérias nativas do solo em estudo apresentam um elevado potencial de biodegradação tanto dos ácidos graxos presentes no biodiesel como dos hidrocarbonetos encontrados no diesel.

Palavras Chaves: Atenuação Natural, Bioaugmentação, *Bioventing*.

ABSTRACT

The ground contamination caused by fuel leak is the one of subject in geoenvironmental researches area. These contaminated soil with petroleum hydrocarbons derived generate negative environment impacts, mainly because of the possibility of contaminating groundwater. The aim of this research was evaluate the decontamination of one residual soil from south Brazil contaminated with oil diesel and biodiesel, through the bioremediation techniques, such as: natural attenuation, bioaugmentation and bioventing. The steps followed in development of the work were the physical-chemistry characterization of the soil, the microbiological analysis of the soil (microbiological quantification, selection of the bacteria for bioaugmentation) evolution of CO₂, determination of the amount of diesel e biodiesel with the soxlet method. The contaminate degradation by gaseous chromatography was carried out at the end of the experiment. For the bioremediation tests were molded cylindrical samples of residual soil with 10 cm of height and 7,5 cm of diameter. The variables analyzed were the microorganism population and the amount of oil diesel and biodiesel residual. The microbiological quantification was evaluated in 30, 60, 90 and 120 days after contamination. The samples were kept in the temperature and the humidity of the laboratoty and the pH was kept in accordance with natural soil and evaluated at the 30 and 120 days. It was observed the degradation of the pollutant in all techniques of the bioremediation studied, indicating that the native bacteria from the residual soil presented a high biodegradation potential.

Key-words: Natural attenuation, Bioaugmentation, Bioventing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Esquema simplificado da reação de transesterificação.....	33
Figura 3.1	Fluxograma da Pesquisa.....	42
Figura 3.2	Esquema do bioreator.....	43
Figura 3.3	Mapa de situação e localização da área em estudo.....	45
Figura 3.4	Campo experimental de Geotecnia.....	46
Figura 3.5	Perfil do solo: Horizonte A e Horizonte B.....	46
Figura 3.6	Esquema do equipamento de aeração.....	49
Figura 3.7	Montagem do equipamento de aeração.....	49
Figura 3.8	Equipamento de aeração.....	50
Figura 3.9	Equipamento de purificação do ar.....	50
Figura 3.10	Esquema de filtro.....	50
Figura 3.11	Vala para coleta do solo.....	51
Figura 3.12	Coleta das amostras deformadas.....	51
Figura 3.13	Moldagem do bloco.....	52
Figura 3.14	Talude de onde foi retirado o bloco.....	52
Figura 3.15	Proteção dos blocos de solo utilizados na confecção dos corpos de prova...	52
Figura 3.16	Bloco totalmente revestido com filme de PVC	52
Figura 3.17	Moldagem da amostra indeformada do solo.....	53
Figura 3.18	Corpo de prova sendo revestido com gesso.....	53
Figura 3.19	Amostra 1 sendo contaminada.....	54
Figura 3.20	Amostra 1 após 24 horas de contaminação.....	54
Figura 3.21	Contaminação: A) diesel e B) biodiesel	54
Figura 3.22	Pesagem dos bioreatores após a contaminação.....	55
Figura 3.23	Corpos de prova após contaminação com diesel: A) diesel passando pelo bioreator, e B)percolação completa do diesel pelo solo.....	56
Figura 3.24	Solidificação do biodiesel, A) antes de passar pelo solo e, B) após percolar pelo solo.....	56
Figura 3.25	Corpos de prova após contaminação com biodiesel.....	57
Figura 3.26	Procedimento de coleta das amostras de solo para análise microbiológica: A) esterilização, B) retirada do solo superficial e, C) coleta do solo.....	59
Figura 3.27	Homogeneização da amostra de solo.....	60

Figura 3.28	Diluição seriada.....	60
Figura 3.29	Colônia de bactérias sendo repicadas em meio de cultura: A e B	61
Figura 3.30	Colônia de bactérias preservada no meio 523 em tubo inclinado.....	61
Figura 3.31	Bactérias selecionadas bioaumentadas.....	62
Figura 3.32	Solução aplicada no teste de resistência.....	63
Figura 3.33	Adição da bactéria <i>Pseudomona ssp.</i> em solução com diesel.....	63
Figura 3.34	<i>Pseudomona ssp.</i> + solução com diesel.....	64
Figura 3.35	Bactéria nº 06 + solução com diesel.....	64
Figura 3.36	Bactéria nº 07 + solução com diesel.....	64
Figura 3.37	Bactéria nº 08 + solução com diesel.....	64
Figura 3.38	Bactéria nº 11 + solução com diesel.....	64
Figura 3.39	Bactéria nº 16 + solução com diesel.....	64
Figura 3.40	Bactéria nº 19 + solução com diesel.....	65
Figura 3.41	Bactéria nº 06 + solução com biodiesel.....	65
Figura 3.42	Bactéria nº 06 + solução com biodiesel.....	65
Figura 3.43	Bactéria nº 07 + solução com biodiesel.....	65
Figura 3.44	Bactéria nº 08 + solução com biodiesel.....	65
Figura 3.45	Bactéria nº 11 + solução com biodiesel.....	66
Figura 3.46	Bactéria nº 16 + solução com biodiesel.....	66
Figura 3.47	Bactéria nº 19 + solução com biodiesel.....	66
Figura 3.48	Mix das bactérias em solução A) com diesel e, B) com biodiesel.....	66
Figura 3.49	Aplicação das bactérias bioaumentadas no solo.....	68
Figura 3.50	Experimento de evolução de CO ₂	69
Figura 3.51	Amostra sendo feito a titulação com HCl.....	70
Figura 3.52	Experimento e amostra antes e depois da titulação.....	70
Figura 3.53	Aparelho de Soxlet.....	71
Figura 3.54	Balão com resíduos no dessecador.....	72
Figura 4.1	Resultados do teste de absorção do contaminante.....	74
Figura 4.2	Análise granulométrica.....	78
Figura 4.3	<i>Penicillium ssp.</i>	81
Figura 4.4	<i>Rizoctonia ssp.</i>	83
Figura 4.5	Fungo não identificado.....	83
Figura 4.6	Quantificação microbiológica da atenuação natural.....	84

Figura 4.7	Quantificação microbiológica da bioaumentação.....	85
Figura 4.8	Quantificação microbiológica do bioventing.....	86
Figura 4.9	Bactéria nº 06.....	87
Figura 4.10	Bactéria nº 07.....	87
Figura 4.11	Bactéria nº 08.....	87
Figura 4.12	Bactéria nº 11.....	87
Figura 4.13	Bactéria nº 19.....	88
Figura 4.14	Bactéria nº 16.....	88
Figura 4.15	Bactéria nº 16.....	89
Figura 4.16	<i>Pseudomona</i> ssp.....	89
Figura 4.17	Bactéria nº 06.....	89
Figura 4.18	Bactéria nº 07.....	89
Figura 4.19	Bactéria nº 08.....	89
Figura 4.20	Bactéria nº 11.....	89
Figura 4.21	Bactéria nº 19.....	90
Figura 4.22	Mix de bactérias	90
Figura 4.23	Bactéria nº 16.....	90
Figura 4.24	<i>Pseudomona</i> ssp.....	90
Figura 4.25	Bactéria nº 06.....	91
Figura 4.26	Bactéria nº 07.....	91
Figura 4.27	Bactéria nº 08.....	91
Figura 4.28	Bactéria nº 11.....	91
Figura 4.29	Bactéria nº 19.....	91
Figura 4.30	Mix de bactérias	91
Figura 4.31	Evolução de CO ₂ da técnica de atenuação natural.....	92
Figura 4.32	Evolução de CO ₂ da técnica de bioaumentação.....	93
Figura 4.33	Avaliação dos resultados obtidos pela evolução de CO ₂	94

Figura 4.34	Extração dos contaminantes no período de 30 dias.....	98
Figura 4.35	Extração dos contaminantes no período de 60 dias.....	99
Figura 4.36	Extração dos contaminantes no período de 90 dias.....	100
Figura 4.37	Extração dos contaminantes no período de 120 dias.....	101
Figura 4.38	Temperatura interna do laboratório durante os 120 dias do experimento.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Tipos e estratégias para biorremediação do solo.....	21
Tabela 2.2	Espécies de microrganismos utilizados na bioremediação.....	26
Tabela 2.3	Distribuição de microrganismos em vários horizontes do perfil.....	29
Tabela 2.4	Propriedades complementares atribuídas ao biodiesel em comparação com o óleo comercial.....	34
Tabela 2.5	Concentração de oxigênio e dióxido de carbono na atmosfera de um solo tropical nas condições úmido e seco.....	40
Tabela 3.1	Número de amostras coletadas, tipos e o número de parâmetros e análises.....	43
Tabela 3.2	Características físico-químicas do diesel convencional solo.....	47
Tabela 3.3	Composição do biodiesel de sebo de boi.....	48
Tabela 3.4	Teste de absorção realizado em três níveis de contaminação.....	54
Tabela 3.5	Tratamentos utilizados no experimento.....	67
Tabela 4.1	Contaminação dos corpos de prova.....	75
Tabela 4.2	Características físicas do solo natural.....	77
Tabela 4.3	Índices físicos do solo.....	78
Tabela 4.4	Análise básica e micronutrientes do solo.....	81
Tabela 4.5	Microrganismos encontrados no solo natural a 120 cm de profundidade.....	83
Tabela 4.6	Comparação estatística entre os tratamentos.....	95
Tabela 4.7	Diferença de áreas obtidas nos perfis cromatográficos dos tratamentos de bioremediação com biodiesel.....	95
Tabela 4.8	Diferença de áreas obtidas nos perfis cromatográficos dos tratamentos de bioremediação com diesel.....	96
Tabela 4.9	Diferença de áreas obtidas nos perfis cromatográficos das amostras do teste de resistência das bactérias ao contaminante biodiesel.....	97
Tabela 4.10	Diferença de áreas obtidas nos perfis cromatográficos das amostras do teste de resistência das bactérias ao contaminante diesel.....	97
Tabela 4.11	Umidade avaliada aos 30 e 120 dias.....	103

Tabela 4.12 pH avaliado aos 30 e 120 dias.....

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Bioremediação.....	20
2.1.1 Atenuação Natural.....	22
2.1.2 Bioaumentação.....	23
2.1.3 <i>Bioventing</i>	24
2.2 Microrganismos do solo.....	25
2.3 Contaminantes.....	32
2.3.1 Diesel.....	32
2.3.2 Biodiesel.....	33
2.4 Fatores determinantes da bioremediação.....	35
2.4.1 Temperatura e radiação solar.....	36
2.4.2 pH.....	37
2.4.3 Nutrientes.....	38
2.4.4 Umidade e aeração.....	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1 Programa experimental.....	42
3.2 Materiais utilizados.....	44
3.2.1 Local do estudo.....	44
3.2.2 Solo.....	46
3.2.3 Contaminantes.....	47
3.2.3.1 Diesel.....	47
3.2.3.2 Biodiesel.....	48
3.2.4 Equipamento de aeração.....	49
3.3 Métodos e técnicas.....	51
3.3.1 Coleta e preparo das amostras.....	51
3.3.2 Contaminação do solo.....	53
3.3.3 Análise física do solo.....	57
3.3.4 Análise química do solo.....	58
3.3.5 Análise microbiológica do solo.....	58

3.3.5.1 Diluição seriada.....	59
3.3.5.2 Meio semi-seletivo.....	60
3.3.5.3 Isolamento e purificação das colônias.....	61
3.3.5.4 Seleção de bactérias para bioaumentação.....	61
3.3.5.5 Preparo do inóculo (bioaumentação).....	62
3.3.5.6 Teste de resistencia das bactérias aos contaminantes.....	62
3.3.5.7 Microcultura para fungos.....	67
3.3.6 Ensaio de Bioremediação.....	67
3.3.7 Evolução de CO ₂	68
3.3.8 Determinação do teor de contaminante.....	70
3.3.8.1 Cromatografia Gasosa (CG).....	70
3.3.8.2 Óleos e graxos.....	71
3.3.9 Temperatura, umidade e pH.....	72
3.3.10 Análise estatística.....	73
4 APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	74
4.1 Contaminação do solo.....	74
4.2 Caracterização físicas do solo.....	77
4.3 Caracterização química do solo.....	80
4.4 Análises microbiológicas.....	82
4.4.1 Quantificação microbiológica.....	82
4.4.2 Seleção das bactérias para bioaumentação.....	87
4.4.3 Teste de resistencia das bactérias aos contaminantes.....	88
4.5 Evolução de CO ₂	92
4.6 Determinação do teor de contaminantes.....	95
4.6.1 Cromatografia Gasosa.....	95
4.6.2 Óleos e graxos.....	95
4.7 Temperatura, umidade e pH.....	97
5 CONCLUSÃO.....	105
5.1 Recomendações para trabalhos futuros.....	106
REFERÊNCIAS.....	107

1 INTRODUÇÃO

A crescente contaminação de solos e água subterrânea por hidrocarbonetos derivados de petróleo (óleo diesel), tem sido destaque nas últimas décadas, principalmente em função da frequência com que os episódios de contaminação são verificados e da gravidade com que o meio ambiente é afetado. Embora os grandes vazamentos acidentais de petróleo sejam preocupantes e ocupem grande espaço na mídia, estima-se que a principal fonte de contaminação por óleo diesel seja devida a pequenos vazamentos de combustível ocorridos em reservatórios, falhas mecânicas ou humanas ocorridas nas operações de descarga e até mesmo por acidentes ocorridos no transporte deste produto químico.

Deste modo, quando ocorre um vazamento, uma das principais preocupações é a contaminação do solo e posteriormente a contaminação dos aquíferos.

A origem das áreas contaminadas está relacionada ao desconhecimento, em épocas passadas, de procedimentos seguros para o manejo de substâncias perigosas, ao desrespeito a esses procedimentos seguros e à ocorrência de acidentes ou vazamentos durante o desenvolvimento dos processos produtivos, de transporte ou de armazenamento de matérias primas e produtos. A existência de uma área contaminada pode gerar problemas como danos à saúde humana, comprometimento da qualidade dos recursos hídricos, restrições ao uso do solo e danos ao patrimônio público e privado, com a desvalorização das propriedades, além de danos ao meio ambiente.

Em virtude de grande parte da frota mundial de veículos automotores utilizarem o óleo diesel como combustível, é necessário a existência de muitos postos de serviço, terminais de distribuição e refinarias. No Brasil, existem cerca de 27 mil postos de combustíveis (PETROBRÁS, 1995), muitos operando em condições de risco, o que torna o potencial poluente ainda mais elevado. Esses estabelecimentos possuem reservatórios ou tanques, que armazenam grandes quantidades deste produto, com vida útil de 25 anos.

Os postos de combustível estão entre os principais contaminantes do solo apresentando um percentual de 73 % do total das áreas contaminadas no estado de São Paulo, com 1.221 registros. As fontes de contaminação industrial (259 registros), comercial (100 registros), de tratamento e disposição de resíduos (65 registros) e acidentais (17 registros), representam um percentual de 27% das outras áreas contaminadas. Os principais grupos de contaminantes, encontrados nas áreas contaminadas foram: solventes aromáticos, combustíveis líquidos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), metais e solventes halogenados. Entre os combustíveis líquidos, destacam-se os derivados de petróleo: óleo diesel e gasolina (CETESB, 2006).

Nas últimas décadas, em virtude da escassez do petróleo e o excesso de monóxido de carbono no ar atmosférico nos grandes centros urbanos, alguns países, entre eles o Brasil, passaram a buscar fontes de combustíveis alternativas. A utilização de álcool como aditivo da gasolina teve início nos anos 30. A medida foi regulamentada pelo decreto 19.717, de 20 de fevereiro de 1931, que estabeleceu a aquisição obrigatória de álcool anidro de procedência nacional, na proporção de 5% da gasolina importada. A adição de álcool anidro a gasolina permanece indicada por lei, tendo sido elevada a proporção a 25%. Essa medida diferencia a gasolina brasileira da gasolina comercializada em outros países.

Outra fonte de energia alternativa foi decretada pela lei nº 11.097, dia 13 de janeiro de 2005, que dispõe sobre a introdução do biodiesel na Matriz energética brasileira, sendo fixado em 5% (cinco por cento), em volume, o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, em qualquer parte do território nacional. O prazo para aplicação é de 8 (oito) anos após a publicação da Lei, sendo de 3 (três) anos o período, após essa publicação, para se utilizar um percentual mínimo obrigatório intermediário de 2% (dois por cento), em volume. Essas medidas adotadas diminuem os impactos ambientais negativos decorrentes de um vazamento, considerando os aditivos provenientes de origem vegetal ou animal, os contaminantes tornam-se mais biodegradáveis.

Os hidrocarbonetos que constituem os combustíveis como óleo diesel e gasolina são compostos de baixa densidade e a maioria dos seus componentes consiste em uma fase não solúvel em água, ou pelo menos possuem dificuldade em solubilizar seus componentes no aquífero quando em seu estado original. Desta forma, um vazamento de combustível promove diferentes fases de contaminação. A forma como interagem com o fluxo freático, com os argilo-minerais e com a matéria orgânica (MO) presente no solo é complexa do ponto de vista físico e químico, no entanto, sendo considerados produtos orgânicos, as ações biológicas são consideradas significativas e alteram o comportamento do contaminante ao longo do tempo.

Atualmente uma grande variedade de processos físico-químicos e biológicos tem sido utilizado na remoção de hidrocarbonetos de petróleo puro e dissolvido na água subterrânea. Processos como extração de vapores do solo (SVE), recuperação de produto livre, bioventilação, extração com solventes, incineração, torres de aeração, adsorção em carvão ativado, biorreatores, bioremediação “ex situ” (remoção do solo para posterior tratamento), entre outros, tem sido usados para remover contaminantes orgânicos de águas subterrâneas e sistemas de solo. Esses processos podem ser implementados para controlar o movimento das plumas de contaminantes, tratar águas subterrâneas e ou descontaminar solos. No entanto longos períodos de tempo, espaço físico, tratamento do material contaminado e altos custos estão normalmente associados com a grande maioria dos processos utilizados para remediação de áreas contaminadas. Mesmo que todos os problemas operacionais dos processos de remediação sejam resolvidos, vários anos serão necessários para que os padrões de qualidade da água e do solo sejam atingidos.

Por outro lado, a bioremediação “in situ”, é um dos processos de remediação mais viável economicamente, apesar de muitas vezes estar limitada por dificuldades no transporte de nutrientes ou receptores de elétrons e no controle das condições de aclimatação e degradação dos contaminantes nos sistemas subterrâneos, continua sendo a arma mais usada e pesquisada para o controle e descontaminação de aquíferos e solos contendo compostos orgânicos.

A bioremediação “in-situ” permite a descontaminação no próprio local, evitando os inoportáveis custos de remoção e posterior tratamento do solo contaminado; não há contato de pessoas com o contaminante; nenhum ou quase nenhum resíduo é formado; requer poucos equipamentos e mão de obra; não interfere nas operações que já estão sendo realizadas; podem ser utilizadas em locais de difícil acesso e é a técnica mais viável economicamente para a descontaminação do solo.

Pelo processo de bioremediação, a biodegradação do poluente se dá pela ação dos microrganismos presentes (atenuação natural) ou inoculados no solo contaminado (bioaugmentação), podendo ocorrer naturalmente ou sendo estimulada por nutrientes como matéria orgânica, oxigênio (bioventing), nitrogênio entre outros, contribuindo para o desenvolvimento sustentável do meio ambiente. Este processo de biodegradação é baseado na capacidade de populações microbianas de modificar ou decompor determinados poluentes, utilizando os hidrocarbonetos de petróleo como fonte de carbono (C) e energia ao seu crescimento nos solos. A degradação completa destes hidrocarbonetos resulta em produtos finais atóxicos como dióxido de carbono (CO₂), água (H₂O) e biomassa celular.

As preocupações relacionadas ao potencial de contaminação dos solos e águas subterrâneas, por derramamento de combustível vêm crescendo em diversas cidades brasileiras. São Paulo e Curitiba possuem legislação sobre o tema, e em Joinville a prefeitura realizou um estudo em todos os postos de combustível da cidade, no qual foi constatado que somente um posto não possuía qualquer tipo de vazamento. O Rio Grande do Sul não possui nenhuma legislação específica para a contaminação de combustíveis, e os processos de remediação empregados baseiam-se principalmente no tratamento “ex situ”.

Sabe-se que, inúmeros são os registros dos acidentes ambientais em nosso estado ocasionados pelo derramamento de combustíveis, e que estes possuem natureza eminentemente multidisciplinar, contudo, existe a necessidade de obtenção de um maior número de dados técnicos sobre tal problema para que se possa promover a recuperação do solo contaminado (principalmente em Latossolos), sem comprometer a biodiversidade local. Portanto pesquisar e entender a dinâmica dos processos de bioremediação torna-se fundamental para desenvolver atividades de descontaminação do meio contaminado, bem como para desenvolver uma técnica de biodegradação econômica e ambientalmente viável.

O objetivo desse trabalho é avaliar a capacidade de bioremediação de solos residuais de basalto contaminados com óleo diesel comum e biodiesel puro, através das técnicas de atenuação natural, bioaugmentação e bioventing.

Os objetivos específicos são:

- Caracterizar o solo do campo experimental de geotecnia da UPF.
- Quantificar os microrganismos nativos do solo natural.
- Avaliar a atividade microbiológica presente no solo em estudo.
- Verificar a resistência dos microrganismos na presença dos contaminantes.
- Determinar o teor de contaminante residual.
- Projetar e montar um equipamento de aeração para desenvolver a técnica *Bioventing*.
- Verificar o potencial de descontaminação do solo através de estudos de biorremediação utilizando a técnica Atenuação Natural, Bioaugmentação e *Bioventing*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Com o desenvolvimento dos processos industriais, surgiram novos compostos químicos sintéticos que por sua vez foram lançados no meio ambiente indiscriminadamente. Muitos desses compostos chamados xenobióticos, como exemplo os hidrocarbonetos de petróleo, estão sujeitos ao metabolismo microbiano. A degradação dos xenobióticos no solo pode ser abiótica, sem a participação dos microrganismos ou enzimas, ou biótica, através de processos bioquímicos mediados pelos microrganismos, sendo a contribuição relativa de cada processo dependente do composto e das condições químicas e físicas do solo. Na maioria dos casos, a biodegradação é o mecanismo principal da degradação de xenobióticos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

Os poluentes xenobióticos podem ser removidos do ambiente por uma variedade de vias biológicas, químicas e físicas. Atualmente as técnicas de bioremediação, oferecem novas possibilidades para acelerar a degradação destes poluentes, quer adicionando-se os nutrientes necessários à população microbiana natural, quer adicionando culturas bacterianas mistas ou puras, que apresentem as vias metabólicas que permitam a rápida metabolização do contaminante (WHITE et al. 1996).

Zhou e Crawford (1995) observam que a contaminação de solos com gasolina, diesel, óleos em geral e outros produtos de petróleo através de vazamentos, derrames e outras fontes tem se tornado importante foco de pesquisa. Os vazamentos não apenas contaminam os ecossistemas dos solos, mas são também uma potencial fonte de contaminação para os aquíferos a longo prazo.

Desta forma, os frequentes derramamentos de petróleo nos solos brasileiros vêm motivando o desenvolvimento de novas técnicas para o tratamento de descontaminação destes. Entre elas, a bioremediação destaca-se como uma das mais promissoras, sendo a

mesma baseada na degradação bioquímica dos contaminantes através da atividade de microrganismos presentes no solo contaminado (BERNOTH et al. 2000).

2.1 BIOREMEDIÇÃO

A bioremediação é um processo de tratamento ativo que usa microrganismos para degradar e transformar em químicos orgânicos os contaminantes do solo, sedimentos e resíduos.

Conforme Moreira e Siqueira (2002), a bioremediação é fundamentada nos processos de degradação microbiana e reações químicas combinadas com processos de engenharia, criando condições para maximizar as transformações dos contaminantes orgânicos do solo. Essas transformações no solo sob influência dos microrganismos vão da simples remoção de um único átomo da molécula à mineralização completa da substância orgânica

O objetivo da bioremediação é mineralizar os poluentes, libertando apenas substâncias inertes, como dióxido de carbono e a água. A bioremediação baseia-se em três aspectos principais: a existência de microrganismos com capacidade catabólica para degradar o contaminante; a disponibilidade do contaminante ao ataque microbiano ou enzimático e condições ambientais adequadas para o crescimento e atividade do agente bioremediador. (PEREIRA e LEMOS, 2005).

A bioremediação também pode ser considerada como fonte de controle e prevenção de poluição, reduzindo a toxicidade dos orgânicos e o potencial de migração de perigosos constituintes do solo. Baseia-se no processo de degradação microbiana e reações químicas combinadas com processos de engenharia, a fim de que os contaminantes sejam transformados, não oferecendo riscos ao ambiente.

Apesar de fundamentada em um único processo básico (biodegradação), as técnicas de bioremediação envolvem variações de tratamentos “in situ” (no local) e “ex situ” (fora do local) que podem envolver inúmeros procedimentos listados na tabela 2.1 e comentados a seguir. A maioria dessas estratégias se aplica aos tratamentos de superfície, enquanto algumas são específicas para a bioremediação em solos e água subterrânea como é o caso da bioventilação.

Tabela 2.1. Tipos e estratégias para bioremediação do solo (Moreira e Siqueira, 2002).

BIOREMEDIÇÃO	FUNDAMENTOS E DEFINIÇÕES
PASSIVA	Consiste na degradação intrínseca ou natural pelos microrganismos indígenas do solo.
BIOESTIMULAÇÃO	Consiste na adição de nutrientes, como N e P, para estimular os microrganismos indígenas.
BIOVENTILAÇÃO	É uma forma de bioestimulação por adição de gases estimulantes como O ₂ e CH ₄ , para aumentar a atividade microbiana decompositora.
BIOAUMENTAÇÃO	É a inoculação do local contaminado com microrganismos selecionados para degradação do contaminante.
“LANDFARMING”	É a aplicação e incorporação de contaminantes ou rejeitos contaminados na superfície de solo não contaminado para degradação.
COMPOSTAGEM	É o uso de microrganismos termófilicos aeróbios em pilhas construídas para degradar o contaminante.

As tecnologias de bioremediação “in situ” (“passiva”, “bioestimulação”, “bioventilação”, “bioaumentação”) possuem baixo custo relativo quando comparadas as tecnologia “ex situ” (landfarming e compostagem como biopilhas e bioreatores). Entretanto, há uma grande dificuldade de aplicá-las na recuperação de solos impactados por petróleo e/ou derivados quando estes apresentam características argilosas, bastante comuns no Brasil. Dentre as tecnologias “ex situ”, a utilização de bioreatores apresenta maior aplicabilidade no tratamento de solos contaminados de natureza argilosa, permitindo o monitoramento efetivo do processo, maior controle das variáveis (valor de pH, temperatura, umidade, etc.) e melhor incorporação de aditivos. Além disso, os bioreatores são sistemas completamente fechados que permitem o

controle de emissões e possibilita, na maioria dos casos, a redução do tempo de processo (RAIMUNDO e RIZZO, 2002).

Algumas técnicas de bioremediação podem ser utilizadas em todas as tecnologias, visando à otimização do processo de degradação dos poluentes pelos microrganismos. Dentre estas se destacam: a adição de nutrientes (bioestimulação) que aumenta a atividade microbiana nativa; adição de linhagens microbianas exógenas degradadoras (bioaugmentação); adição de surfactantes, que auxilia a metabolização dos compostos poluentes, facilitando o transporte destes substratos orgânicos para o interior das células microbianas ou diminuindo as interações superficiais contaminante/solo; ou ainda a adição de enzimas comerciais, que favorecem a oxidação de moléculas de difícil degradação em moléculas de fácil assimilação pelos microrganismos (RAIMUNDO e RIZZO, 2003).

A superfície do solo contém grande número de microrganismos que incluem bactérias aeróbicas ou anaeróbicas, fungos, actinomicetos e protozoários. As tecnologias de bioremediação aumentam o crescimento da população microbiana e criam condições ótimas para o máximo de degradação possível.

A técnica de bioremediação mais apropriada depende das características do local contaminado, do tipo de contaminante, da natureza e propriedade do poluente e do uso final do meio. A proporção e disponibilidade de contaminantes, substratos e nutrientes, as condições de umidade, a aeração e temperatura e a presença de compostos inibitórios são fatores que geralmente limitam a bioremediação.

Segundo Moreira e Siqueira (2002), vários contaminantes podem ser tratados biologicamente com sucesso. Estes incluem petróleo bruto, hidrocarboneto do petróleo como gasolina, óleo diesel e combustível de avião, preservativos de madeira, solventes diversos, lodo de esgoto urbano ou industrial, ou outros compostos xenobióticos, existindo mais de 300 compostos individuais passíveis de destoxificação por bioremediação.

2.1.1 ATENUAÇÃO NATURAL

O processo de atenuação natural (bioremediação intrínseca) de um poluente orgânico do solo, sem acréscimo de nutrientes ou adequação de qualquer condição ambiental, pode ocorrer de maneira contínua devido ao processo de adaptação natural da microbiota nativa do solo impactado. Esses microrganismos passam, então, a utilizar o composto orgânico poluente como fonte de carbono, ocasionando assim uma redução da sua concentração ao longo do

tempo. Além disso, o solo contaminado é sujeito ao processo de intemperização natural, onde, não só os processos biológicos estão envolvidos, mas também, processos físicos e químicos são responsáveis pela redução da concentração de poluente no solo (lixiviação, volatilização, etc.). No entanto, o tempo envolvido no processo de atenuação natural costuma ser bastante longo (meses ou anos) o que torna necessária, muitas das vezes a remoção do solo impactado e encaminhamento do mesmo para tratamento ex-situ (BAPTISTA e RIZZO, 2004).

Bento et al. (2003), avaliaram a degradação de hidrocarboneto de petróleo em solos contaminados com óleo diesel através da atenuação natural, bioaugmentação e bioestimulação. Após 12 semanas de incubação, os melhores resultados foram obtidos na bioaugmentação, e a atenuação natural foi mais efetiva que a bioestimulação.

Baptista e Rizzo (2004) realizaram estudos acompanhando o processo de atenuação natural de solo contaminado por petróleo. Os resultados obtidos nos dois primeiros meses de acompanhamento do processo de atenuação natural de duas amostras de solo contaminado com 5 e 10% de óleo cru indicaram uma redução de 5 e 12%, respectivamente, no teor do contaminante. No entanto, deve se destacar que o trabalho encontra-se em fase inicial, tendo em vista o longo tempo normalmente associado ao processo de atenuação natural de poluentes orgânicos em solos.

2.1.2 BIOAUMENTAÇÃO

A bioaugmentação envolve a inoculação do solo com culturas puras ou consórcio microbiano contendo microrganismos selecionados para degradação de contaminantes específicos. Esse processo tem sido estudado para vários herbicidas, hidrocarbonetos clorados e carbamatos através do emprego de populações indígenas aclimatadas, isolados selecionados. Em geral, a bioaugmentação é mais apropriada para tratamentos de contaminantes muito recalcitrantes, em contaminações recentes e onde se pretende aplicar a degradação acelerada (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

Segundo Sarkar et al. (2005), as culturas podem ser derivadas de um solo contaminado ou obtidas de uma cultura estoque que têm demonstrado, previamente, capacidade para degradar hidrocarbonetos.

De acordo com Siqueira et al. (1994), a bioaugmentação pode ocorrer de três maneiras: a) estimulação da população existente através de alterações no ambiente ou aplicação de nutrientes; b) isolamento e seleção de organismos competentes e posterior aplicação ao solo;

c) uso de microrganismos clonados pela engenharia genética denominados MEG. No processo de bioaugmentação, os microrganismos nativos ou introduzidos degradam contaminantes presentes no solo. Porém, o uso desta tecnologia é ainda restrito a situações mais específicas. A composição biológica destas formulações é mantida em segredo, mas a maioria inclui estirpes selecionadas de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium* e outras bactérias, do fungo *Phanerochaete chrysosporium* e vários MEG.

Bento et al. (2003), utilizando a bioaugmentação, obteve a degradação de 75 % do poluente após duas semanas de incubação da bactéria no solo contaminado. O melhor desempenho a bioremediação do solo contaminado com diesel foi obtido quando foram adicionados microrganismos pré-selecionados do ambiente contaminado. Comprovando a teoria de Pellizari e Luz (2000), que diz que em geral, os microrganismos capazes de degradar um xenobiótico específico são encontrados com maior frequência nos locais contaminados previamente com o poluente.

Siqueira et al. (1994), também afirma que, para conseguir uma efetiva biodegradação são necessários à presença de microrganismos ou de consórcios pré-selecionados apropriados.

Na bioaugmentação, os microrganismos podem ou não, inicialmente, ter como alvo os hidrocarbonetos como fonte de alimento. Contudo, os hidrocarbonetos são, supostamente, degradados mais rapidamente do que no processo de degradação natural, devido à elevação do número de microrganismos causado pelo aumento dos níveis de nutrientes (SARKAR et al. 2005).

2.1.3 BIOVENTING

A técnica de bioventing ou bioaeração como é conhecida, caracteriza-se pela adição de oxigênio através do solo para estimular o crescimento dos organismos naturais e/ou introduzidos pela bioaugmentação.

É uma tecnologia promissora que aumenta a biodegradação natural de hidrocarbonetos de petróleo mediante fornecimento de oxigênio aos microrganismos existentes no solo. Este processo utiliza baixas vazões de ar, suficientes apenas para manter a atividade microbiana. Na maioria dos casos, o oxigênio é fornecido pela injeção direta de ar na massa de solo

contaminado, onde ocorre também a biodegradação de compostos orgânicos voláteis, que se movem lentamente através do solo biologicamente ativado.

De acordo com Borden et al. (1995), quase todos os hidrocarbonetos de petróleo são biodegradáveis sob condições aeróbicas. O oxigênio é um co-substrato que pode iniciar o mecanismo de biodegradação e, depois de iniciado o metabolismo, pode também funcionar como acceptor de elétrons para a geração de energia. Em altas concentrações de hidrocarboneto, a biodegradação aeróbia pode não ser suficiente para degradá-los completamente. Quando o oxigênio é esgotado e o nitrato está presente, os microrganismos anaeróbios facultativos utilizarão o nitrato como acceptor final de elétrons em substituição ao oxigênio.

Segundo Daniel (1993), condições aeróbicas e concentrações adequadas de oxigênio nos sistemas de bioremediação são importantes para evitar os odores produzidos pela degradação aeróbia e para maior produção de oxidação como produto final.

A tecnologia de *Bioventing* é um importante meio de remoção, através de volatilização, da massa do contaminante e sua destruição “in situ”. A aplicação de ar e/ou oxigênio puro, a camada de subsuperfície, estimula o crescimento da população existente, resultando na redução, via potencial oxidativo da microbiota, os contaminantes do sítio (FERNANDES e ALCÂNTARA, 2003).

Raimundo e Rizzo (2003), visando avaliar a eficiência de remoção de petróleo do solo contaminado, proveniente de Guararema, utilizaram aditivos (nutrientes, microrganismos, surfactantes, enzimas comerciais, dentre outros), em um protótipo de biorreator. O biorreator proporcionou melhor incorporação dos aditivos ao meio, tendo como processo a biodegradação aeróbia. A aeração do biorreator foi realizada diariamente durante uma hora com vazão de 20L/min, com o objetivo de suprir a demanda de oxigênio requerida pelos microrganismos. De uma forma geral, a condução do processo no biorreator teve como consequência uma elevação nas eficiências de biodegradação dos poluentes.

2.2 MICRORGANISMOS DO SOLO

Tanto o solo como as águas subterrâneas contêm elevado número de microorganismos que, gradualmente, se vão adaptando às fontes de energia e carbono disponíveis, quer sejam

açúcares facilmente metabolizáveis, quer sejam compostos orgânicos complexos como os BTEX. Esses microrganismos desenvolvem naturalmente a atenuação natural, ou podem ser estimulados para uma biodegradação controlada do contaminante. Em situações onde se detecta a presença de poluentes persistentes, faz-se necessário a utilização de microrganismos específicos ou microrganismos geneticamente modificados, de modo a conseguir uma otimização da biodegradação.

Entender como a biodiversidade é desenvolvida e mantida nas comunidades microbianas naturais irá auxiliar nos processos de bioremediação, de maneira que se possa manipular e controlar essa diversidade, com intuito de melhorar e estimular as taxas de degradação de compostos, como hidrocarbonetos, em ambientes contaminados (PRITCHARD et al. 1996).

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA), as principais categorias de contaminantes do solo são em ordem decrescente: os cloroalifáticos > pesticidas > hidrocarbonetos aromáticos > cloroaromáticos > aromáticos simples e outros. Estes originam-se da industrialização do petróleo bruto, indústrias químicas diversas e atividades agrícolas, sendo muito desses produtos de difícil decomposição e por isso causam sérios impactos ambientais.

Para cada tipo de contaminante, indicam-se espécies diferentes de microrganismos utilizados nos processos de biorremediação, como apresentado na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Espécies de microrganismos utilizados na bioremediação.

Contaminante	Espécie utilizada
Anéis aromáticos	<i>Pseudomonas, Achromobacter, Bacillus, Arthrobacter, Penicillium, Aspergillus, Fusarium, Phanerocheate</i>
Cádmio	<i>Staphylococcus, Bacillus, Pseudomonas, Citrobacter, Klebsiella, Rhodococcus</i>
Cobre	<i>Escherichia, Pseudomonas</i>
Cromo	<i>Alcaligenes, Pseudomonas</i>
Enxofre	<i>Thiobacillus</i>
Petróleo	<i>Pseudomonas, Proteus, Bacillus, Penicillium, Cunninghamella</i>

Fonte: www.ambientebrasil.com.br

Estudos realizados por Bento et al. (2003), apontam as espécies: *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus pumillus*, *Acinetobacter junni* e *Pseudomonas sp.* como bactérias degradadoras de hidrocarbonetos. Os microrganismos foram pré-selecionados de solos contaminados com óleo diesel da Califórnia (USA) e Hong Kong (China), e posteriormente aplicados nos tratamentos: bioaugmentação e bioestimulação. A capacidade de atenuação natural do solo também foi analisada neste experimento.

Segundo Ururahy et al. (1998), ao pesquisarem os efeitos da aeração sobre a biodegradação de resíduos de petróleo, identificaram a predominância de bactérias do gênero *Pseudomonas* e de leveduras dos gêneros *Candida* e *Rhodotorula*.

Microrganismos com as mais diversas capacidades metabólicas são empregados na bioremediação. Alguns destes são pertencentes a gêneros de bactérias e fungos como: *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Mucor*, *Fusarium*, *Chaetomium*, *Phanerochaete* e *Trametes*. A rota metabólica da degradação dependerá do microrganismo envolvido e do ambiente (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

Margesin e Schinner (1997) realizaram um estudo comparativo da eficiência dos microrganismos indígenas e inoculados na biodegradação de diesel em solos alpinos e sua relação com um fertilizante mineral (C:N:P = 100:10:2). A atividade dos microrganismos indígenas na biodegradação do diesel melhorou significativamente com o fertilizante e mostrou que a bioestimulação parece apresentar melhores resultados quando comparada a bioaugmentação. Um fator interessante no estudo é o fato de nenhum tratamento com inoculo e fertilizantes ter sido mais eficiente do que os microrganismos nativos bioestimulados.

Olson et al. (1999) estudaram as taxas de biodegradação de algumas classes de hidrocarbonetos (alcanos e aromáticos) separados de um óleo diesel comum. Foi utilizado um inoculo de microrganismos degradadores específicos selecionados de um solo contaminado, acompanhando seu desenvolvimento em placas de Petri e as frações de hidrocarbonetos por cromatografia gasosa. Os hidrocarbonetos foram avaliados separadamente e em combinações. Os autores observaram uma correlação entre o crescimento microbiano e as perdas de biodegradação. Após 35 dias do experimento, o consórcio microbiano não conseguiu degradar de maneira eficaz os compostos aromáticos, os controles sem inoculo tiveram poucas perdas e nos tratamentos contendo microrganismos apresentaram uma contagem de mais de 50 vezes o número de células encontradas inicialmente. Ao final do experimento, observaram que as

taxas de eliminação dos hidrocarbonetos seguem uma ordem de degradação, sendo primeiramente degradados os n-alcenos, seguidos do isoalcenos e aromáticos.

Cunha e Leite (2000) avaliaram a biodegradação de gasolina em diversos tratamentos contendo solo inoculado ou não com diferentes consórcios de culturas bacterianas. Os microrganismos capazes de crescer na presença de gasolina foram isolados do solo e vários sistemas de tratamento foram testados usando tanto as espécies isoladas quanto *Pseudomonas putida* obtida de coleção de cultura. O sistema de tratamento constituído somente da microflora autóctone apresentou valores médios de degradação de 50% enquanto o sistema com a microflora autóctone com a associação de *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas alcaligenes* e *Burkholderia cepacia* mostrou um percentual significativo na remoção do hidrocarboneto. Neste trabalho o solo não foi esterilizado de forma a se avaliar as condições ambientais. Cunha e Leite (2000) observaram também, que o crescimento de uma população específica causa um desequilíbrio na comunidade por competição por espaços físicos, nutrientes e água, reduzindo para pequenas quantidades os microrganismos que tem a melhor desempenho na biodegradação.

Richard e Vogel (1999) estudaram um consórcio de bactérias capazes de degradar óleo diesel, composto por diversos tipos de *Pseudomonas* sp. e por *Achromobacter* sp. Após 50 dias de incubação o consórcio conseguiu biodegradar 90% do diesel inicial, não sendo encontrado nenhum composto aromático ao final do experimento.

Capelli et al. (2001) analisaram a biorremediação de hidrocarbonetos obtidos de óleo cru utilizando microrganismos indígenas. Foram realizados ensaios de laboratório com microrganismos inoculados com bactérias indígenas por 45 dias. Ao final do procedimento, o conteúdo de hidrocarbonetos totais foi reduzido em 70%, os hidrocarbonetos saturados e aromáticos foram os mais rápidos a serem degradados. A microflora indígena da pesquisa foi exposta a altos níveis de contaminação continuamente, sendo observado que cada espécie é capaz de degradar apenas um número limitado de moléculas da fração dos hidrocarbonetos, desta forma um aumento da curva de crescimento pode ser um indicativo do aumento no número de espécies.

Trindade et al. (2002), relatam que derrames de óleos em solos argilosos tem estimulado diversos estudos na área de biorremediação. Isto porque há grande dificuldade de remediar estes solos devido às fortes interações entre o solo e os contaminantes, além da baixa permeabilidade. Contudo, avaliaram a eficiência da remoção de poluentes através da adição de microrganismos nativos de solos (*Nocardia nova*, *Pandoraea* sp., *Rhodotorula glutinis*)

definindo o melhor “pool” a ser utilizado no tratamento. Foi avaliada também a eficiência da das taxas de nutrientes (C:N:P) ao longo do processo.

Diversos autores apresentaram a importância da utilização das bactérias autóctones na bioremediação. Muitas vezes, utilizando um bioestimulante podemos otimizar a remoção dos contaminantes sem que seja necessário a inoculação de consórcios microbianos. A microbiota previamente exposta a contaminações possui uma “memória biológica” sendo mais eficaz na remoção de contaminantes no caso de derrames contínuos. Entretanto, diversos autores consideram a introdução de consórcios de microrganismos como fator decisivo nos processos de biorremediação. Existem métodos que determinam as frações de microrganismos totais e degradadores específicos, assim como uma relação ótima de C:N:P, onde nenhum desses elementos devem estar na forma recalcitante, podendo se obter facilmente essa relação em ensaios de laboratório (SPINELLI, 2005).

A biodiversidade da população microbiana é determinada em parte, pela distribuição, concentração, estrutura e disponibilidade da matéria orgânica a qual se encontra exposta. Assim, os microrganismos devem desenvolver vias metabólicas complexas com enzimas especializadas e outras características celulares para degradar estes compostos. Muitos estudos têm demonstrado a existência de uma grande diversidade de microrganismos biodegradadores presentes em amostras de solo, sedimento, água doce ou ambiente marinho que ocorrem naturalmente nestes ambientes (PELLIZARI e LUZ, 2000).

A maior concentração microbiológica do solo situa-se, de modo geral, na camada de 0-20 cm de profundidade, como observado na tabela 2.3, pois aí ocorre maior acúmulo de matéria orgânica do solo por deposição do material vegetal da parte superficial (superior). Solos sem cobertura vegetal tendem a ter menos matéria orgânica, pois esta não é repostada pelo material vegetal. Portanto, estes solos têm uma comunidade biológica menor e menos diversificada.

Tabela 2.3. Distribuição de microrganismos em vários horizontes do perfil (Alexandre 1977 apud Moreira e Siqueira, 2002).

PROFUNDIDADE (cm)	Organismos/g de solo x 10 ³				
	Bact. aeróbicas	Bact. Anaeróbias	Actinomicetos	Fungos	Algas
3-8	7800	1950	2080	119	25
20-25	1800	379	245	50	5
35-40	472	98	49	14	0,5
65-75	10	1	5	6	0,1
135-145	1	0,4	0	3	0

As condições químicas e a matéria orgânica do solo são importantes para a população microbiana co-metabolizante, que também atua na biodegradação de certos componentes do petróleo e de outros resíduos (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006).

Na grande maioria dos solos, o teor de matéria orgânica do solo (MOS) varia de 0,5% a 5% nos horizontes minerais superficiais, podendo apresentar valores mais elevados em solos orgânicos. Apesar de encontrar-se em pequenas quantidades em comparação com a fração mineral, a MOS é importante para os sistemas de biorremediação devido a diversos efeitos que produz nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (MEURER, 2000). Ainda segundo Meurer (2000), os compostos de carbono da MOS servem como fonte de energia para os organismos do solo. Portanto, a atividade desses microrganismos está diretamente relacionada à disponibilidade de carbono.

Desta forma, a atividade biológica do solo é decorrente da presença de organismos que habitam esse ambiente, das interações entre eles e as plantas e as interações bioquímicas que realizam. Os microrganismos participam de diversas reações e processos que ocorrem no solo, sendo sua existência de fundamental importância no solo (MEURER, 2000).

A proliferação dos microrganismos é limitada pelo pH, riqueza mineral do solo, espécie de matéria orgânica, temperatura e umidade (PRIMAVESI, 1981).

As bactérias do solo formam o grupo de microrganismos que apresenta maior abundância e diversidade entre as espécies. A comunidade bacteriana é estimada em cerca de 10^8 e 10^9 organismos por grama de solo, variando de acordo com o método de contagem utilizado e com o tipo de manejo do solo. Esse grupo apresenta uma elevada taxa de crescimento e alta capacidade de decomposição dos diferentes substratos contidos no solo, exercendo um importante papel na decomposição de matéria orgânica e na ciclagem dos elementos (CARDOSO et al. 1992).

O número de bactérias presentes no solo é variável, uma vez que diversos fatores exercem profunda influência no seu crescimento. Em geral as maiores concentrações encontram-se nos horizontes de superfície, por serem aí mais favoráveis as condições de temperatura, aeração, umidade e nutrição. O número de bactérias no solo é muito elevado, varia de alguns bilhões a 3 trilhões em cada quilograma de solo. As bactérias são encontradas no solo, sob a forma de mantas, moitas e filamentos, denominados colônias, superpostas às partículas de solo, ou ao seu redor, onde houver alimentação (BRADY, 1994). Ainda, segundo Brady (1994), bactérias são organismos monocelulares, uma das menores e mais simples formas conhecidas de vida.

Esta capacidade quase ilimitada de multiplicação é extremamente importante para os solos. Permite que ajustem rapidamente suas atividades, em atendimento às mudanças ambientais. Muitas bactérias do solo têm capacidade de produzir esporos ou corpos semelhantes resistentes, havendo assim um estágio vegetativo e um outro de descanso. É importante essa última característica, por possibilitar, com relativa facilidade, a sobrevivência de microrganismos sob condições desfavoráveis.

Os fungos são encontrados no solo com comunidades variando de 10^4 e 10^6 organismos por grama de solo. Ao contrário das bactérias e actinomicetos que se desenvolvem melhor em valores de pH na região alcalina e neutra, os fungos são predominantes em solos ácidos, onde sofrem menor competição. Os fungos podem ser encontrados em solos com pH de 3,0 a 9,0, porém o valor ótimo é variável com a espécie. Os fungos são classificados como protistas superiores, pois são constituídos por células eucarióticas. Podem ser unicelulares ou pluricelulares. Possuem formações denominadas hifas, que são filamentos tubulares ramificados com cerca de 3-10 μm de diâmetro. O conjunto de hifas ramificadas é denominado micélio. Todos os fungos são aclorofilados e, portanto, quimiorganotróficos, obtendo o carbono para a síntese celular de matéria orgânica pré-formada. (CARDOSO et al., 1992).

Os fungos, em quantidades inumeráveis, são encontrados nas camadas de superfície, quando existe ampla matéria orgânica e adequada aeração. Grande número de gêneros estão representados e os quatro mais comuns são: *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium* e *Aspergillus*. Ocorrem, na maioria dos solos, todas as espécies comuns e as condições determinarão qual delas será predominante (BRADY, 1994).

A umidade ideal para o desenvolvimento desses organismos está localizada entre 60-70% da capacidade de retenção de água de um solo. Em geral, os fungos são aeróbios, porém apresentam resistência a altas pressões de CO_2 , podendo se desenvolver em regiões mais profundas do solo. Quanto à temperatura, podem ser encontrados a uma ampla faixa, entretanto no solo predominam espécies mesófilas (CARDOSO et al. 1992).

Os fungos operam com maior eficácia que as bactérias, porque transformam em tecidos próprios uma maior fração de carbono e nitrogênio dos componentes submetidos a processamento e eliminam como subprodutos quantidades menores de dióxido de carbono e de amônio. Cerca de 50% das substâncias decompostas pelos fungos podem transformar-se em tecidos do organismo, comparando com cerca de 20% para a bactéria (BRADY, 1994).

Com exceção, das bactérias, nenhum outro organismo do solo é tão numeroso como actinomicetos, atingindo às vezes centenas de milhões, cerca de um décimo do montante de bactérias. Esses microrganismos são especialmente numerosos em solos com elevado montante de húmus, tais como pradarias e pastagens, quando a acidez não é demasiado elevada. Os actinomicetos desenvolvem-se melhor em solos úmidos e bem arejados. Em épocas de seca permanece ativa numa escala nem sempre atingida pelas bactérias ou pelos fungos. São geralmente muito sensíveis às condições de solos ácidos, seu desenvolvimento é quase impossível em solos minerais com pH 5 ou inferior, passando a ótimo pH entre os valores 6 e 7,5 (BRADY, 1994).

2.3 CONTAMINANTES

2.3.1 DIESEL

O óleo diesel é considerado um combustível derivado de petróleo constituído basicamente de hidrocarbonetos. É um composto formado principalmente por átomos de carbono, hidrogênio e em baixas concentrações por enxofre, nitrogênio e oxigênio. É um produto inflamável, medianamente tóxico, volátil, límpido, isento de material em suspensão e com odor forte e característico. (PETROBRÁS, 2006)

De acordo com a REFAP (2005), o contaminante utilizado, pode ser definido como combustível de composição complexa, constituído basicamente por hidrocarbonetos parafinemos, olefínicos e aromáticos e, em menor quantidade, por substâncias cuja fórmula química contém átomos de enxofre, nitrogênio, metais, oxigênio, etc.

Os hidrocarbonetos são uma família de moléculas, cuja constituição consiste, essencialmente, em átomos de Carbono e Hidrogênio. A sua constituição varia desde moléculas mais simples e mais facilmente biodegradáveis, como o Metano, até compostos mais complexos, como os que incluem anéis de Benzeno (MOURA e SAMARA, 2005).

Vários trabalhos tem abordado a degradação deste tipo de combustível por microrganismos isolados de várias áreas contaminadas. Estudos de biodegradação tem demonstrado que algumas populações microbianas podem degradar facões alifáticas e aromáticas de hidrocarbonetos simultaneamente, embora, a adição de determinados

compostos, assim como a composição de algumas misturas podem interferir na degradação dos componentes (OLSON, 1999).

2.3.2 BIODIESEL

A utilização do biodiesel como combustível tem apresentado um potencial promissor no mundo inteiro. Em primeiro lugar, pela sua enorme contribuição ao meio ambiente, com a redução qualitativa e quantitativa dos níveis de poluição ambiental, e em segundo lugar como fonte estratégica de energia renovável em substituição ao óleo diesel e outros derivados de petróleo. Dentre as matérias primas mais utilizadas figuram o óleo de soja, canola e mamona, alguns tipos de óleos de frituras e sebo de boi (NETO et al. 1999).

O biodiesel foi definido pela “*National Biodiesel Board*” dos Estados Unidos como o derivado monoalquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, provenientes de fontes renováveis como óleos vegetais ou gordura animal, cuja utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores de ignição por compressão (motores do ciclo diesel). Enquanto produto, pode-se dizer que o biodiesel tem as seguintes características: (a) é praticamente livre de enxofre e aromáticos; (b) tem alto número de cetano; (c) possui teor médio de oxigênio em torno de 11%; (d) possui maior viscosidade e maior ponto de fulgor que o diesel convencional; e, (e) possui nicho de mercado específico, diretamente associados a atividades agrícolas (RAMOS, 1999).

Segundo Schüller (2000) obtenção de biodiesel é realizada pela reação de transesterificação de óleos vegetais ou animais com um álcool (metanol ou etanol), na presença de um catalisador e como co-produto da reação a glicerina. O esquema simplificado da reação apresenta-se a seguir:

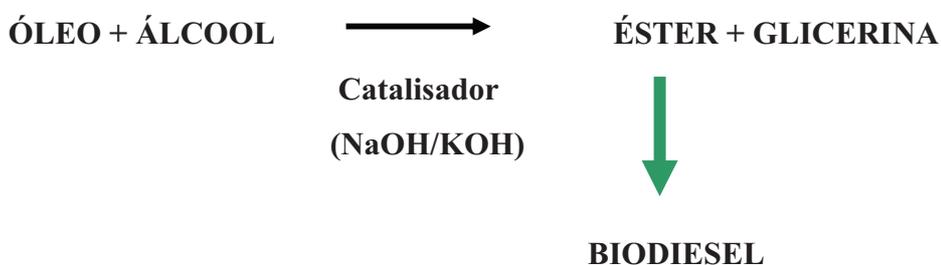


Figura 2.1 Esquema simplificado da reação de transesterificação.

Enquanto combustível, o biodiesel necessita de algumas características técnicas que podem ser consideradas imprescindíveis: a reação de transesterificação deve ser completa, acarretando a ausência total de ácidos graxos remanescentes e o biocombustível deve ser de

alta pureza, não contendo traços de glicerina, de catalisador residual ou de álcool excedente da reação (NETO et al. 1999).

O biodiesel tem sido estudado por vários pesquisadores quanto a sua eficiência na adição no óleo, no entanto para avaliar a real eficiência e viabilidade deste biocombustível alternativo, será necessária a realização de testes de longa duração para que se possam avaliar as conseqüências mecânicas que o biodiesel em efetivamente acarreta em motores lacrados previamente aferidos (NETO et al. 1999).

A tabela 2.4, apresenta algumas características complementares usualmente atribuídas ao biodiesel (obtido de óleo de fritura) em comparação com o diesel convencional.

Tabela 2.4 Propriedades complementares atribuídas ao biodiesel em comparação ao óleo diesel comercial (NETO et al. 1999).

CARACTERISTICAS	PROPRIEDADES COMPLEMENTARES
Características químicas apropriadas	Livre de enxôfre e compostos aromáticos, alto número de cetanos, ponto de combustão apropriado, excelente lubricidade, não tóxico e biodegradável
Ambientalmente benéfico	Nível de toxicidade compatível ao sal ordinário, com diluição tão rápida quanto a do açúcar (<i>Departamento de Agricultura dos Estados Unidos</i>)
Menos poluente	Reduz sensivelmente as emissões de (a) partículas de carbono (fumaça), (b) monóxido de carbono, (c) óxidos sulfúricos e (d) hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
Economicamente competitivo	Complementa todas as novas tecnologias do diesel com desempenho similar e sem a exigência da instalação de uma infraestrutura ou política de treinamento
Reduz aquecimento global	O gás carbônico liberado é absorvido pelas oleaginosas durante o crescimento, o que equilibra o balanço negativo gerado pela emissão na atmosfera
Economicamente atraente	Permite a valorização de sub-produtos de atividades agro-industriais, aumento na arrecadação regional de ICMS, aumento da fixação do homem no campo e de investimentos complementares em atividades rurais
Regionalização	Pequenas e médias plantas para produção de biodiesel, podem ser implantadas em diferentes regiões do país, aproveitando a matéria prima disponível em cada local.

A adição do biodiesel ao diesel oferece grandes vantagens ao meio ambiente, principalmente em grandes centros urbanos, tendo em vista que a emissão de poluentes é menor que a do óleo diesel. Chang et al. (1996), demonstraram que as emissões de monóxido e dióxido de carbono, enxofre e material particulado foram inferiores à do diesel convencional. No entanto características como viscosidade, poder calorífico, número de cetano e ponto de névoa e limitam a eficiência do combustível.

Segundo os relatórios do Programa Nacional de Óleos Vegetais, testes desenvolvidos em território nacional com vários tipos de óleos vegetais transesterificados, puros ou misturados ao diesel convencional, apresentam bons resultados quando utilizados em caminhões, ônibus e tratores. Nesses testes, foram percorridos mais de um milhão de quilômetros e os principais problemas foram associados a um pequeno acúmulo de material nos bicos injetores e um leve decréscimo na viscosidade do óleo lubrificante.

De um modo geral, o Biodiesel é um combustível renovável derivado de óleos vegetais ou de gorduras animais, não-tóxico, praticamente livre de enxofre e aromáticos, por ser biodegradável é considerado um combustível ecológico, minimizando os impactos ambientais.

2.4 FATORES DETERMINANTES DA BIOREMEDIAÇÃO

A bioremediação é dependente de uma série de fatores ambientais que incluem a aeração, pH, umidade, temperatura e concentração de nutrientes. A presença de oxigênio é fundamental para a biodegradação efetiva dos óleos.

Segundo Moreira e Siqueira (2002), a capacidade dos microrganismos de crescerem e formar colônia ou consórcio microbiano competente depende da existência de genes apropriados e expressos na célula e de diversos fatores ambientais. Esses fatores, assim como os produtos da biodegradação, influenciam diferentemente a velocidade do processo e por isso são determinantes da degradação/ persistência do contaminante no solo.

O limite de disponibilidade de muitos poluentes para os microrganismos é um dos principais fatores que afetam a biodegradação destes, e conseqüentemente a eficácia de aplicação das técnicas de bioremediação. Assim, mesmo que existam microrganismos em quantidades suficientes e que as condições ambientais (ph, temperatura, etc.) estejam

adequadas, a biodegradação dos compostos poluentes ocorrerá apenas até o limite imposto pela disponibilização dos mesmos (RAIMUNDO E RIZZO, 2004).

A biodiversidade dos microrganismos permite a sua sobrevivência em diversos habitats. Dentre os microrganismos, as bactérias formam o grupo com maior diversidade fisiológica, o que proporciona maior adaptabilidade. Por isso é possível selecionar, dentro de certos limites, organismos tolerantes a diversos fatores estressantes (SIQUEIRA et al. 1994).

A degradação de uma substância em outra pode ser promovida por processos físicos, como o calor e a irradiação ultravioleta, por reações químicas decorrentes do pH ou da ação de certas substâncias no ambiente, e por processos biológicos, através de enzimas existentes em animais, plantas e microrganismos (LANGENBACH, 1994).

Conforme Frankenberger (1992), um solo ideal para ser bioremediado adequadamente deve possuir textura arenosa com alta porosidade que permita uma diluição de oxigênio. Esta alta porosidade permitiria a aeração para a oxidação dos hidrocarbonetos, necessitando ainda silte e argila na matriz de solo para manter a umidade. O pH deve ser mantido em torno do neutro e geralmente os solos necessitam de fertilizantes como nitrogênio e fósforo para promover uma adequada degradação de hidrocarbonetos de petróleo.

A seguir são abordados os principais fatores que influenciam a densidade e atividade da microbiota do solo.

2.4.1 TEMPERATURA E RADIAÇÃO SOLAR

Segundo Cardoso et al., (1992), cada espécie microbiana é caracterizada por uma faixa de temperatura ótima de crescimento que permite definir quatro tipos de microrganismos: a) **Mesófilos:** com temperaturas ótimas entre 25 °C e 40 °C, com limites mínimos e máximos de 15 °C e 42 °C, respectivamente. A esse grupo pertencem a maioria das bactérias, actinomicetos e fungos que vivem no solo; b) **Psicrófilos:** a temperatura ótima de crescimento é inferior a 20 °C, portanto com aptidão para se desenvolverem a baixas temperaturas. Pertencem a esses grupos os bastonetes gram-negativos; c) **Termófilos:** apresentando a taxa de crescimento máximo a 45 °C. Não são muito abundantes no solo, dependendo do teor de matéria orgânica. Pertencem a esse grupo microrganismos que crescem em pilhas de compostagem, e; d) **Termófilos facultativos:** desenvolvem-se bem em uma ampla faixa de temperatura, variando desde 28 °C até 56 °C.

Conforme Moreira e Siqueira (2002), o solo, por ser escuro, apresenta grande restrição à penetração de raios solares. Assim, os efeitos diretos da radiação solar são limitados a poucos milímetros superficiais do solo, onde os organismos fotossintéticos (algas e cianobactérias) ocorrem em densidade mais elevada.

A temperatura do solo é função da relação entre a quantidade de energia calorífica absorvida e perdida, sendo que o primeiro fato depende da cobertura vegetal, tipo de solo, umidade, etc. A temperatura do solo sofre variações diárias e sazonais, com marcada influência nos horizontes superficiais, portanto, na região de maior atividade microbiana (CARDOSO et al. 1992).

De acordo com Brady (1994), as reações químicas e biológicas em solos frios são lentas. As decomposições biológicas são praticamente inexistentes, limitando assim o ritmo com que certos nutrientes, como nitrogênio, fósforo, enxofre e cálcio, tornam-se assimiláveis.

A temperatura afeta não só as reações fisiológicas das células, mas também características físico-químicas do ambiente (volume do solo, potencial de oxi-redução, pressão, difusão, viscosidade, tensão superficial), que por sua vez influenciam o ambiente microbiano. O efeito direto na temperatura pode ser usado para fazer a solarização do solo. Para isso cobre-se o solo com plástico de modo a induzir aumento de temperatura ou deixa-se uma camada fina de solo exposta diretamente aos raios solares. Por outro lado, em muitas espécies fúngicas a liberação e formação de esporos e mudanças morfogênicas são induzidas por luminosidade (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

O crescimento a temperaturas baixas é facilitado pelo aumento no conteúdo de ácidos graxos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

2.4.2 pH

Uma das características fisiológicas mais notáveis da solução do solo é a sua reação, isto é ácida, alcalina ou neutra. A maioria dos solos tem pH entre 4,0 e 8,5. Conforme Cardoso et al., (1992), a ação do pH sobre os microrganismos do solo depende de sua tolerância a esse fator. Distinguem-se quatro categorias de microrganismos: a) Indiferentes: crescem numa faixa ampla de valores de pH. É o caso de numerosas bactérias que apresentam crescimento satisfatório entre valores de pH 6,0 a 9,0. para os fungos os valores variam entre pH 2,0 e 8,0; b) Neutrófilos: preferem pH próximo a neutralidade até ligeiramente alcalino. Numerosos

actinomicetos não apresentam crescimento de valores de pH inferiores a 5,5; c) Acidófilos: são os que preferem ambientes ácidos e; d) Basófilos: não suportam valores de pH inferiores a 8,0.

2.4.3 NUTRIENTES

Os nutrientes necessários aos microrganismos são subdivididos em macro e micronutrientes, conforme sejam necessários às células em grande e pequena quantidade, respectivamente. Siqueira et al. (1994) destaca entre os macronutrientes, o C como a principal fonte de nutrientes da célula microbiana, participando com 47% da sua matéria seca, sendo suas fontes as mais diversas, como aminoácidos, ácidos graxos, ácidos orgânicos, açúcares, compostos aromáticos, etc.

De acordo com Cardoso (1992), os microrganismos não dependem só da energia e do carbono. O material celular é constituído de inúmeros elementos que devem estar disponíveis no meio ambiente, de modo a permitir o desenvolvimento e a multiplicação dos microrganismos. A determinação da fonte de nitrogênio é essencial para o processo de biorremediação, pois o nitrogênio está intimamente relacionado ao metabolismo dos microrganismos. Estudos realizados mostraram que para 100 unidades de C degradada são necessárias, em média, 10 unidades de N. Das várias formas de nitrogênio encontradas na natureza, os microrganismos assimilam mais facilmente a amônia.

Pereira e Lemos (2006), utilizaram uréia, nitrato de sódio e sulfato de amônio, em duplicata, como fonte de nitrogênio, cuja relação C/N foi de 100:10, para a degradação de hidrocarbonetos de petróleo por fungos filamentosos.

Rizzo et al. (2002), utilizando diferentes técnicas de biorremediação avaliaram a eficiência da biodegradação estimulando o solo com nutrientes na relação C:N:P:K = 100:10:1:1, usando NH_4NO_3 e K_2HPO_4 .

O nitrogênio (12 a 15% da massa celular) é absorvido principalmente como amônia e nitratos, pelos microrganismos decompositores, e como nitrogênio molecular atmosférico, N_2 , pelos fixadores desse elemento (SIQUEIRA, et al. 1994, CARDOSO, 1992).

O fósforo ocorre na natureza na forma de fosfatos inorgânicos e orgânicos, sendo os primeiros (PO_4^{2-}) muito utilizados no crescimento microbiano, e os últimos utilizados sob a ação das enzimas fosfatases (SIQUEIRA, et al. 1994).

2.4.4 UMIDADE E AERAÇÃO

Os espaços do solo são ocupados por água e/ou gases, com forte influência na atividade microbiana. O volume total de poros de um solo varia de 50 a 60%, sendo 15 a 45% ocupados pela água e o restante por gases. Os gases do solo são os mesmos encontrados na atmosfera (N_2 , O_2 , CO_2 , etc.), mais aquelas decorrentes da atividade biológica como, por exemplo, o CH_4 e o H_2S (SIQUEIRA et al. 1994). Gases e água competem pelo espaço poroso do solo. Quando ele está parcialmente ou totalmente preenchido por água a disponibilidade de gases para os microrganismos é menor (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

As bactérias necessitam de uma umidade elevada do ar no solo, que deve estar por volta de 98%, e que ocorre com uma umidade entre 50 e 75% da capacidade de retenção de água do solo. Fungos, mas principalmente actinomicetos, podem crescer em solos bem mais secos, com uma saturação de umidade de ar no solo de 85 a 98%. Mas, tanto fungos como actinomicetos necessitam de um arejamento suficiente. De modo que em solos mal arejados predominam bactérias anaeróbias, desaparecendo as aeróbias (PRIMAVESI, 1981).

Segundo Cardoso (1992), a aeração e a umidade estão inversamente relacionadas, pelo movimento e substituição do ar e da água. A atmosfera do solo difere da atmosfera da superfície, sendo a concentração de CO_2 de 10 a 100 vezes maior na atmosfera do solo, acontecendo, porém o inverso na superfície com o teor de O_2 . Essas diferenças são devidas à respiração dos microrganismos e raízes, que consomem O_2 e eliminam CO_2 . Em geral, o O_2 diminui e o CO_2 aumenta com a profundidade (tabela 2.5). As alterações na constituição do ar do solo governam o crescimento e atividade da microbiota, pois o CO_2 e O_2 são necessários ao crescimento. Um solo bem arejado, do ponto de vista microbiológico, é aquele em que a atividade de oxigenação é máxima. Contudo, é pouco provável que um solo torne-se suficientemente aerado a ponto de satisfazer toda biota, devido a dificuldade de movimentação gasosa nos pequenos poros, baixa difusão de oxigênio em meio líquido e microambientes em que os microrganismos estão situados.

Tabela 2.5 Concentrações de oxigênio e dióxido de carbono na atmosfera de um solo tropical nas condições úmido e seco (Russell, 1973 apud Spinelli, 2005).

Profundidade (cm)	Oxigênio (%)		Dióxido de carbono (%)	
	Úmido	seco	Úmido	Seco
10	13,7	20,7	6,5	0,5
25	12,7	19,8	8,5	1,2
45	12,2	18,8	9,7	2,1
90	7,6	17,3	10	3,7
120	7,8	16,4	9,6	5,1

Os solos geralmente têm altas concentrações de CO₂, CO e outros gases em comparação a atmosfera, e uma correspondente diminuição da concentração de O₂. Tais mudanças são mais acentuadas em porosidades menores, onde muitas bactérias são encontradas. À medida que se distancia da superfície, menos O₂ permanece disponível especialmente em ambientes úmido, menos permeáveis (PRESCOTT et al. 1999).

A aeração do solo é crítica para a densidade de microrganismos e seus processos metabólicos, pois a maioria da microbiota do solo é aeróbia, ou seja, utiliza o O₂ como receptor final de elétrons. O volume mínimo para aeração adequada de um solo deve ser de 10% , e mudanças de metabolismo aeróbio para anaeróbio ocorrem quando a concentração de oxigênio for inferior a 1%. (SIQUEIRA et al. 1994, MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

De acordo com Brady (1989), o montante do gás O₂ num solo é determinado pela quantidade de espaços de poros cheios de ar e pela proporção e pela proporção desses espaços preenchidos por oxigênio.

Um solo bem arejado, do ponto de vista microbiológico, é aquele que a atividade de oxigenação é máxima. Contudo, é pouco provável que um solo torne-se suficientemente aerado a ponto de satisfazer toda biota, devido à dificuldade de movimentação gasosa nos pequenos poros, baixa difusão de O₂ em meio líquido e microambientes em que os microrganismos estão situados. Pouca aeração, por outro lado, é conseqüência de má drenagem e encharcamento. Tendo os poros pequenos maior capacidade de retenção de água, que os grandes, os solos pesados são mais sujeitos à má drenagem, havendo mal suprimento de O₂, redução da velocidade de muitas transformações e inibição completa de alguns processos (CARDOSO, 1992).

A ausência de oxigênio modifica completamente a natureza dos processos de decomposição, como modifica também a intensidade com que eles ocorrem. Onde há disponibilidade de O_2 sob forma de gás desenvolvem-se microrganismos aeróbios que utilizam O_2 para oxidar a matéria orgânica. Na ausência de O_2 sob a forma de gás, assumem os microrganismos anaeróbios, que utilizam o oxigênio combinado em compostos tais como nitratos, sulfatos e óxidos férricos. A decomposição anaeróbia é muito mais lenta do que com disponibilidade ampla de oxigênio sob a forma de gás. Contudo, são inteiramente diferentes os produtos de decomposição (BRADY, 1989).

Contrariamente ao que se pensa, as condições ótimas de desenvolvimento de um microrganismo nem sempre correspondem à umidade ótima detectada a partir de um solo esterilizado e inoculado com o mesmo microrganismo, indicando que vários fatores interagem para fornecer a umidade adequada, sendo que extremos de umidade podem ser prejudiciais à atividade microbiana. A umidade ótima para as diferentes atividades metabólicas varia entre os tipos de solo, teor de argila, grupos de microrganismos, vegetação, etc. (CARDOSO et al. 1992).

A água no solo também afeta outros fatores relacionados com a atividade dos microrganismos como a aeração (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). Parte da água de um solo é livre ou gravitacional e se localiza nos poros grandes, influenciando sobremaneira na aeração; parte é retida adsorvida às partículas, sendo disponível apenas parcialmente para utilização dos microrganismos (CARDOSO et al. 1992).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PROGRAMA EXPERIMENTAL

O programa experimental (fig. 3.1) contemplou a caracterização física e química do solo, caracterização microbiológica dos microrganismos presentes no solo em estudo, contaminação do solo, o projeto e montagem do equipamento de *bioventing*, a validação do equipamento, e a realização de ensaios nos tubos de PVC denominados bioreatores (fig. 3.2).

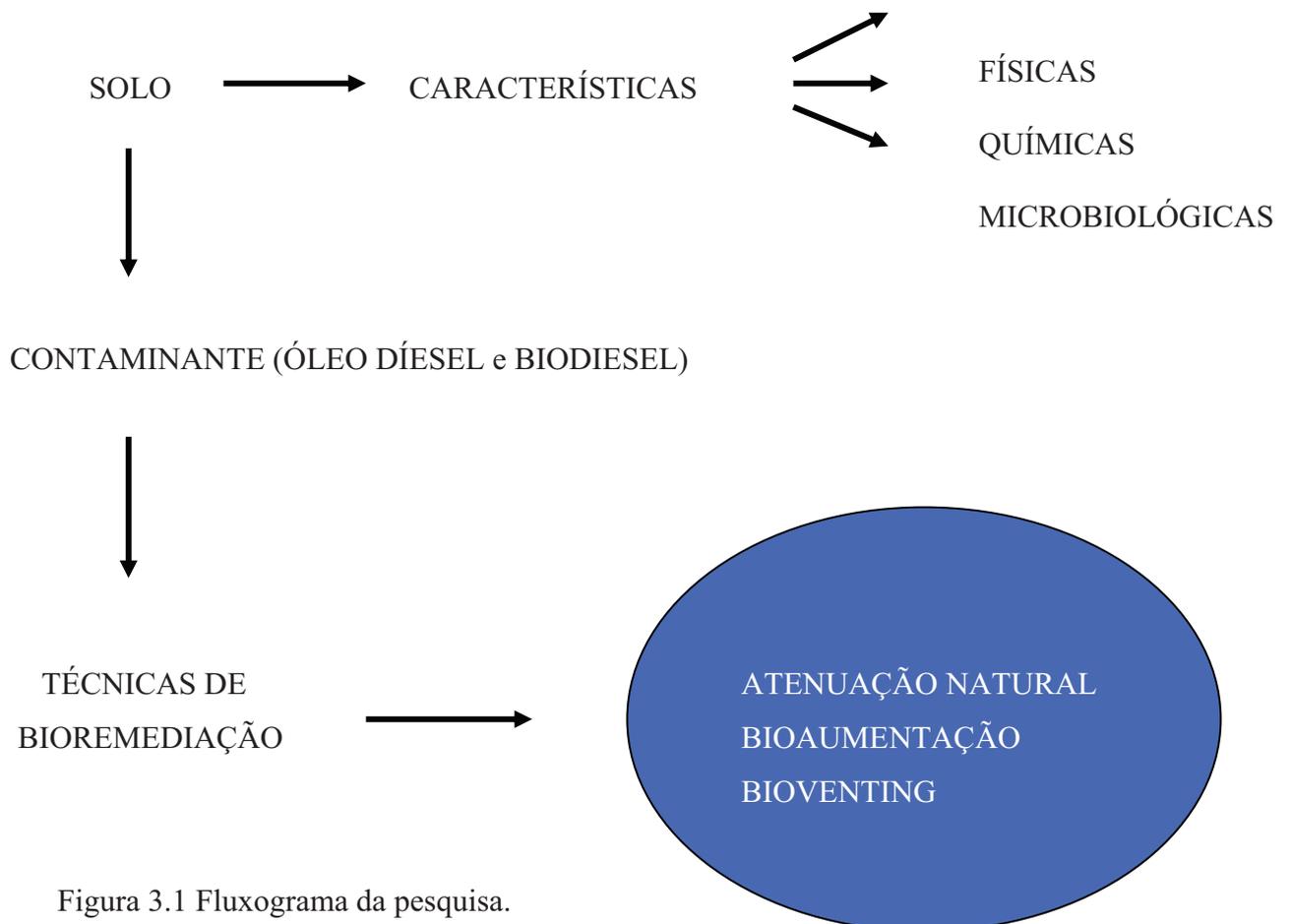


Figura 3.1 Fluxograma da pesquisa.

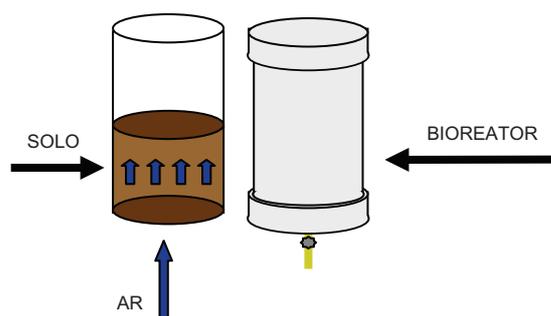


Figura 3.2 Esquema do bioreator.

Este trabalho tem como variáveis fixas: a dimensão geométrica dos corpos de prova, a quantidade do contaminante, a quantidade de ar comprimido e o tempo de ação dos microrganismos. Como variáveis de resposta será considerado a população dos microrganismos e o teor de óleo diesel e biodiesel residual. Os ensaios de contagem de população bacteriana e percentual de contaminante remanescente no corpo de prova serão medidos em quatro períodos pré-determinados, ou seja, após 30 dias da contaminação, 60 dias da contaminação, 90 dias da contaminação e 120 dias da contaminação. Os corpos de prova serão mantidos a temperatura ambiente do laboratório, e a umidade foi mantida de acordo com a natural do campo (umidade do solo do momento da retirada da amostra).

A quantidade de amostras coletadas, os parâmetros e as análises realizadas para a caracterização dos materiais utilizados na pesquisa, estão descritos na tabela 3.1.

Tabela 3.1. Número de amostras coletadas, tipos e números de parâmetros e análises.

EQUIPAMENTOS / AMOSTRAS / ENSAIOS	QUANTIDADE
Amostras do solo	04
Corpos de prova	96
Equipamento de PVC	96
Ensaio de limite de liquides	03
Ensaio de limite de plasticidade	03
Ensaio de classificação granulométrica por sedimentação	03
Análise microbiológica	96

3.2 MATERIAIS UTILIZADOS

3.2.1 LOCAL DO ESTUDO

O Município de Passo Fundo, está localizado na região norte do Estado do Rio grande do Sul, a 687m de altitude e o clima é temperado, com características subtropical úmido, apresentando chuvas bem distribuídas durante o ano e temperatura média anual de 17,5 °C.

O presente estudo foi realizado na Universidade de Passo Fundo, na Faculdade de Arquitetura e Engenharia, localizada próxima às margens da RS 285 (figura 3.3).

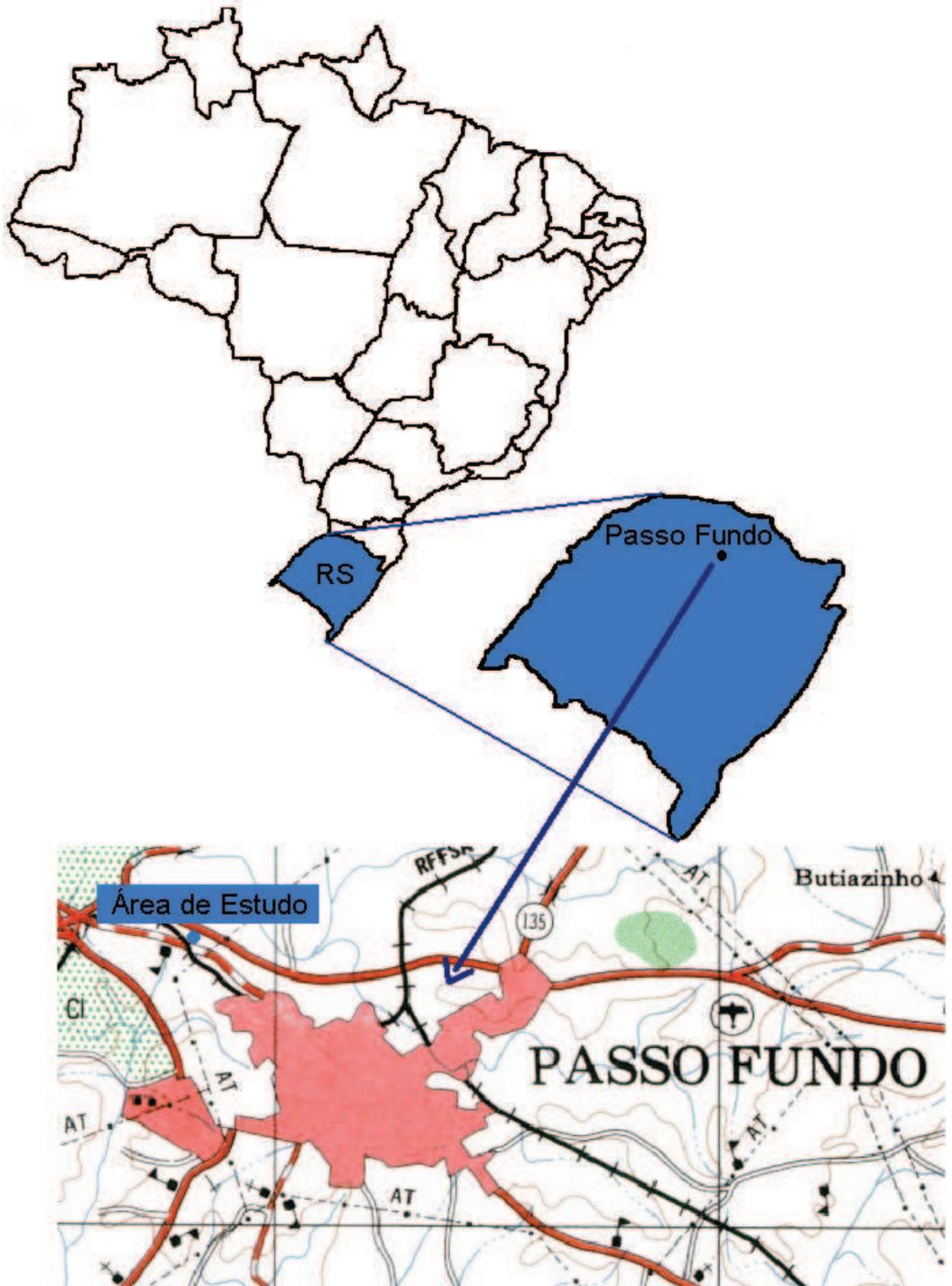


Figura 3.3 Mapa de situação e localização da Área de Estudo.

3.2.2 SOLO

O solo utilizado é proveniente do Campo Experimental de Geotecnia, localizado na UPF, (figura 3.4). Este é um solo residual proveniente de rochas basálticas. De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, 1999, o solo é classificado como LATOSSOLO distrófico vermelho.



Figura 3.4 Campo Experimental de Geotecnia.

A figura 3.5 mostra o horizonte B, de onde o solo foi retirado, definido como horizonte subsuperficial comumente encontrado abaixo de um Horizonte A ou E e que sofreu intensa transformação pedogenética e que apresenta em geral coloração mais viva devido à pouca influência da matéria orgânica e/ou a concentração de argila ou óxidos de ferro (AZEVEDO e DALMOLIN, 2004).

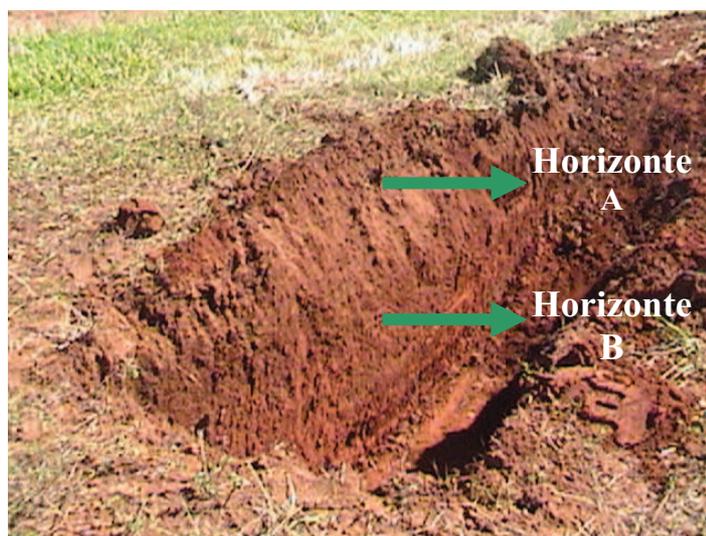


Figura 3.5 Perfil do solo: Horizonte A e Horizonte B.

3.2.3 CONTAMINANTES

Inicialmente para a realização dos ensaios as amostras de óleo diesel e biodiesel foram encaminhadas ao Laboratório de Cromatografia do Centro de Pesquisa em Alimentos da UPF. Ao final deste processo, observou-se que não haveria a disponibilidade de cromatografias destes materiais por ausência de cromatógrafos com colunas específicas para estes contaminantes. Contudo optou-se pela continuidade da pesquisa, adaptando outro método para avaliar o teor de contaminante residual.

3.2.3.1 DIESEL

O óleo diesel utilizado neste trabalho para os ensaios de bioremediação foi selecionado aleatoriamente de um posto de combustível do município de Passo Fundo, RS.

De acordo com dados da Agência Nacional de Petróleo, a tabela 3.2 apresenta as principais características físico-químicas do óleo diesel comercializado nos postos de combustíveis do Brasil.

Tabela 3.2 Características físico-químicas do diesel convencional (tipo C).

CARACTERÍSTICAS	ÓLEO DIESEL
Enxofre (%)*	0,3
Carbono (%)*	86
Hidrogênio (%)	13,4
Oxigênio (%)	0
Aromáticos (% v/v)	31,5
Viscosidade a 40 °C (cSt)*	2,5 a 5,5
Número de cetano (NC)*	42
Densidade 15 °C (Kg/m ³)	0,849
Ponto de névoa °C	1
Valor calorífico (MJ/Kg)	42,30
Umidade (ppm)	58

*Fonte: Agência Nacional do Petróleo (ANP, 2001):

Limites requeridos para a comercialização do óleo diesel.

3.2.3.2 BIODIESEL

O biodiesel utilizado na pesquisa é de origem animal, derivado de sebo bovino. De acordo com pesquisas realizadas por Schuler (2000) e Ramos (2000), os principais componentes químicos do biodiesel em estudo e a sua relativa porcentagem apresentam-se na tabela 3.3.

Tabela 3.3 Composição do biodiesel de sebo bovino.

CARACTERÍSTICAS	%
Mirístico (14:0)	5,03
Palmítico (16:0)	29,09
Palmitoléico (16:1)	3,22
Estearico (18:0)	25,33
Oléico (18:1)	35,85
Linoléico (18:2)	1,48
Saturados	59,45
Insaturados	40,55
Número de Cetanos	69
Viscosidade a 40 °C (cSt)	5,14
Ponto de névoa °C	8-10
Valor calorífico (MJ/Kg)	39,33
Umidade (ppm)	1390

* Fonte: SCHULER (2000); RAMOS (2000).

O biodiesel apresenta maior número de cetanos e valor calorífico em relação ao diesel comercial, porém o biodiesel derivado de sebo bovino solidifica em temperaturas mais elevadas, apresenta maior umidade e viscosidade. A utilização do biodiesel está associada a substituição de combustíveis fósseis em motores de ignição por compressão, no entanto, para avaliar a real eficiência e viabilidade deste biocombustível alternativo, será necessária a realização de testes de longa duração para que se possam avaliar as consequências mecânicas em motores e os possíveis efeitos de uma contaminação.

3.2.3 EQUIPAMENTO DE AERAÇÃO

O equipamento de aeração (*bioventing*) foi desenvolvido no Laboratório de Geotecnia, da Faculdade de Engenharia e Arquitetura da UPF, o esquema simplificado apresenta-se na figura 3.6.

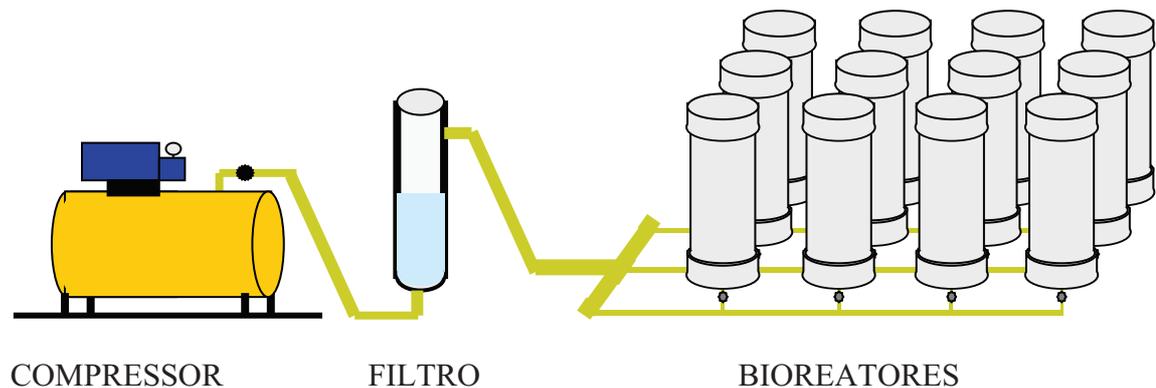


Figura 3.6 Esquema do equipamento de aeração.

É composto por tubos de PVC e tampões rosqueáveis, mangueiras de PVC Cristal 3/8, conexões metálicas 3/8, registro metálico com rosca $\frac{1}{2}$ para o lado do tampão e conexão 3/8 para o lado da mangueira e bancada de madeira com moldes em gesso para fixação do equipamento, como observado nas figuras 3.7 e 3.8.



Figura 3.7 Montagem do equipamento de aeração.

Como bioestimulador foi utilizado o ar comprimido bombeado por um compressor da marca SCHULZ Mundial (5,2 pés³/min – 100 litros – 1hp). O ar ao sair do compressor passou por um processo de filtração (figura 3.9).



Figura 3.8 Equipamento de aeração.

Para a realização deste, foi instalado um tubo de PVC transparente vedado e cheio de água. O ar bombeado entra no circuito pela parte inferior do tubo e sai pela parte superior (utilizando uma mangueira de PVC Cristal 3/8), após esse processo o ar é bombeado para o equipamento de aeração. O esquema simplificado do filtro apresenta-se na figura 3.10.



Figura 3.9 Equipamento de purificação do ar.

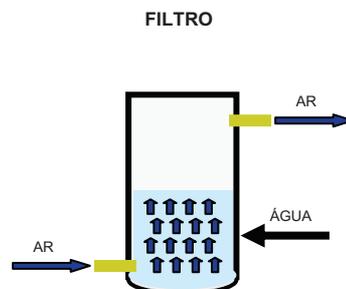


Figura 3.10 Esquema do filtro.

3.3 MÉTODOS E TÉCNICAS

3.3.1 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

No período de março a junho de 2006, foram coletadas amostras deformadas do solo para caracterização e indeformadas para o uso nas técnicas de bioremediação e no equipamento de aeração.

As amostras deformadas foram coletadas através de valas escavadas, medindo aproximadamente 1,50 metros de profundidade, como apresentado nas figuras 3.11 e 3.12, sendo acondicionadas em sacos plásticos e encaminhadas ao Laboratório de Geotecnia da Faculdade de Engenharia e Arquitetura da UPF, onde foi realizada a caracterização física do solo e aos Laboratórios de Solos e Microbiologia do Solo ambos da Faculdade de Agronomia e Veterinária da UPF, onde foram realizadas as análises química e microbiológica do solo respectivamente.



Figura 3.11 Vala para coleta do solo. Figura 3.12 Coleta das amostras deformadas.

Para as técnicas de bioremediação e para o equipamento de aeração foram coletadas amostras indeformadas, da área delimitada, através blocos moldados do talude, conforme as figuras 3.13 e 3.14.



Figura 3.13 Moldagem do bloco.



Figura 3.14 Talude de onde foi retirado o bloco

Para evitar a perda de umidade excessiva, logo após a sua retirada o bloco foi envolvido em filme de PVC transparente (figura 3.15 e 3.16), e encaminhadas ao Laboratório de Geotecnia da Faculdade de Engenharia e Arquitetura da UPF, para posterior confecção dos corpos de prova.



Figura 3.15 Proteção do bloco de solo utilizado na confecção dos corpos de prova.



Figura 3.16 Bloco totalmente revestido com filme de PVC transparente.

A partir do bloco foram moldados corpos de prova com 7,5 cm de diâmetro e 10 cm de altura com peso variado (figura 3.17), e após foram acondicionados em filme de PVC transparente, fechados e armazenados em geladeira a uma temperatura de 20°C, para não alterar as características naturais.



Fig. 3.17 Moldagem da amostra indeformada do solo.

3.3.2 CONTAMINAÇÃO DO SOLO

Os ensaios de bioremediação foram desenvolvidos no Laboratório de Geotecnia da UPF, onde os corpos de prova foram inseridos em tubos de PVC de 100 mm (para atenuação natural e bioaumentação) e 100mm rosqueáveis (para bioaeração), tendo ambos a lateral preenchida por gesso líquido (evitando o fluxo preferencial do óleo diesel e do biodiesel). Como observado na figura 3.18.



Figura 3.18 Corpo de prova sendo revestido com gesso.

Inicialmente foi realizado o teste de absorção das amostras indeformadas de solo nos três níveis de contaminação determinadas no projeto de pesquisa. Os corpos de prova foram contaminados com óleo diesel com proporções em cm^3 , referentes ao volume de vazios existente em cada amostra (tabela 3.4).

Tabela 3.4 Teste de absorção realizado em três níveis de contaminação.

Amostras	%	Volume de vazios	Volume de contaminante
1	25	199,45 cm ³	49,86 cm ³
2	50	206,16 cm ³	103,08 cm ³
3	75	200,94 cm ³	150,70 cm ³

As amostras 1, 2 e 3 apresentaram o volume de vazios = 199,45 cm³, 206,16 cm³ e 200,94 cm³, desta forma o volume de óleo diesel aplicado foi 49,86 cm³, 103,08 cm³ e 150,70 cm³, o equivalente a 25%, 50% e 75% do volume de vazios dessas amostras respectivamente

Na figura 3.19, apresenta-se a metodologia adotada para a contaminação de solo com diesel. O diesel foi derramado com o auxílio de uma proveta sobre o corpo de prova. As amostras ficaram em observação até que ocorresse a completa absorção do óleo diesel pelo solo. Após 24 horas, as amostras absorveram totalmente o óleo diesel aplicado (figura 3.20), porem, uma parte do óleo diesel passou pelo corpo de prova, ficando retido na bandeja.



Figura 3.19 Amostra 1 sendo contaminada com 25% de óleo diesel.



Figura 3.20 Amostra 1 após 24 horas de observação.

Definido o grau de contaminação, as amostras de solo naturais deformadas foram colocadas nos bioreatores e contaminados com diesel e biodiesel (figura 3.21 A e B) e expostos aos diferentes tipos de tratamentos.



Fig. 3.21 Contaminação: A) com óleo diesel) e B) com biodiesel.

Todos os corpos de prova foram contaminados no mesmo dia com proporções referentes ao volume de vazios existente em cada amostra. As amostras foram expostas a um período de contaminação de 24 horas. Após esse período, o excesso dos contaminantes foi retirado, sendo observado que tanto o diesel como o biodiesel percolaram pelo solo, atingindo o objetivo esperado da contaminação. A quantidade de contaminante absorvida foi determinado pela diferença de massa, do bioreator antes e depois da contaminação (figura 3.22).



Figura 3.22 Pesagem dos bioreatores após a contaminação.

Na figuras 3.23 (A e B), observa-se a contaminação do solo com diesel após 24 horas de contaminação.

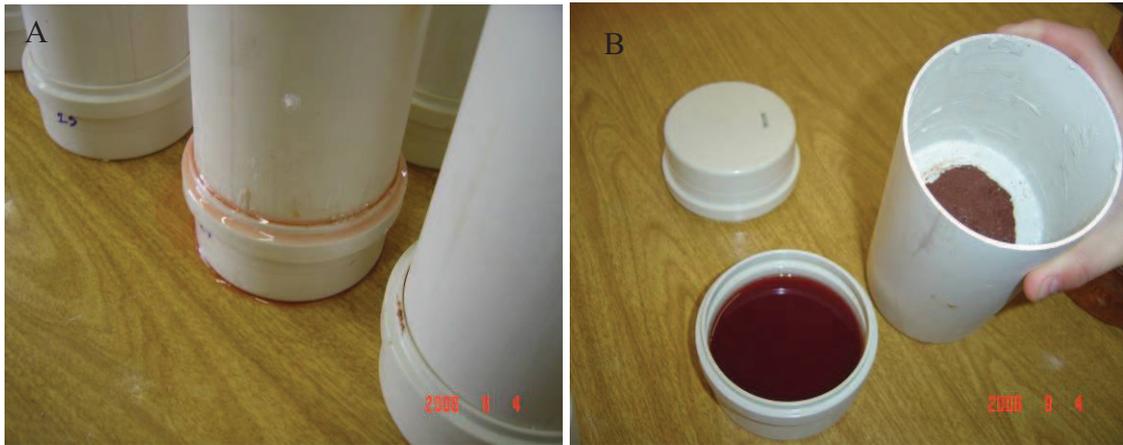


Fig. 3.23 Corpos de prova após contaminação com diesel, A) diesel passando pelo bioreator e B) percolação completa do diesel pelo solo.

Nas figuras 3.24 (A e B), e 3.25, observa-se a contaminação do solo com biodiesel após 24 horas de contaminação. Neste caso, o biodiesel, durante o processo de contaminação se solidificou no período da noite (devido a baixas temperaturas), dificultando a percolação do contaminante no solo.

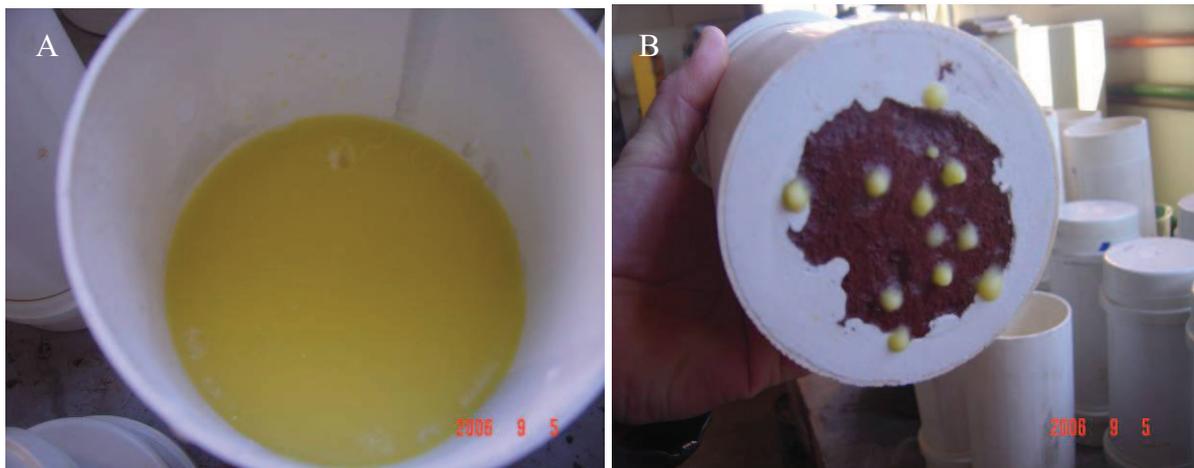


Fig. 3.24 Solidificação do biodiesel: A) antes de passar de solo e B) após percolar pelo solo.



Figura 3.25 Corpo de prova após contaminação com biodiesel.

Tanto para a contaminação do solo com diesel como para o biodiesel foram estabelecidos e adotados os mesmos parâmetros, no entanto o comportamento e as características dos contaminantes apresentaram-se diferenciadas ao longo do processo, devido as características químicas de cada combustível.

3.3.3 ANÁLISE FÍSICA DO SOLO

A caracterização física foi realizada no Laboratório de Geotecnia da Faculdade de Engenharia e Arquitetura da UPF, no período de março a junho de 2006.

Foram realizados ensaios de caracterização do solo para determinar sua classificação pelo Sistema Unificado de Classificação do Solo (SUCS) e *Highway Research Board* (HRB).

Foram analisados os seguintes parâmetros:

- Granulometria, realizadas por peneiramento e por sedimentação segundo o método da NBR 7181/84 (ABNT, 1984,a);
- Massa Específica (γ_g), realizada seguindo a NBR 6508 (ABNT 1984,b);
- Limites de consistência (LL, LP e IP) do solo de acordo com os métodos da NBR 6459 (ABNT, 1984c) e NBR 7180 (ABNT, 1984,d);
- Umidade (w), obtido através da relação entre os pesos úmidos e secos das amostras;
- Índices físicos (porosidade, índice de vazios, grau de saturação, massa específica).

3.3.4 ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO

Para realização da análise química, foram retiradas amostras do solo natural. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Solos da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, Passo Fundo, RS. A análise química consiste na análise básica e micronutrientes do solo:

- pH;
- Nitrogênio (N);
- Fósforo (P);
- Potássio (K);
- Alumínio (Al);
- Cálcio (Ca);
- Magnésio (Mg);
- Hidrogênio + Alumínio (H+Al);
- Capacidade de Troca de Cátions (CTC);
- Porcentagem de matéria orgânica (MO),
- Enxofre (S),
- Saturação de Bases, Al e K,
- Boro,
- Manganês,
- Zinco e,
- Cobre.

3.3.5 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO SOLO

Para quantificação e identificação da microbiota indígena presente no solo em estudo, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do Solo da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, no período de maio a junho de 2006. As amostras foram realizadas em épocas diferentes, resultando em três análises para a quantificação e identificação dos microrganismos.

As amostras de solo foram retiradas a aproximadamente 1,20 m de profundidade, com o uso de material previamente esterilizado em laboratório. A seqüência do procedimento para coleta de amostras do solo, utilizado na segunda análise, apresenta-se na figura 3.26. Para evitar contaminações externas, utilizou-se material esterilizado, flambou-se a parede da vala (figura 3.26 A), descartou-se 20 cm do solo da parede da vala (figura 3.26 B) e coletou-se o solo (figura 3.26 C).

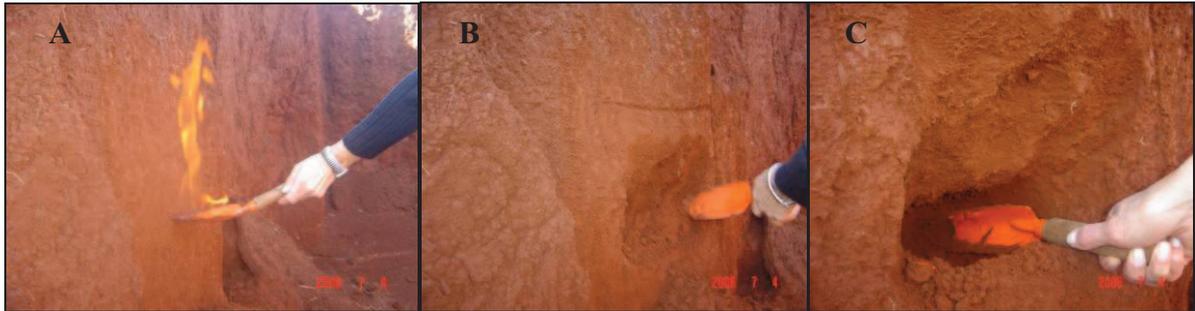


Figura 3.26 Procedimento de coleta das amostras de solo para análise microbiológica. A) esterilização, B) retirada do solo superficial e C) coleta do solo.

Após a coleta, o solo foi armazenado em um recipiente de vidro fechado e previamente esterilizado, sendo encaminhado ao laboratório de microbiologia para o desenvolvimento dos seguintes procedimentos:

3.3.5.1 Diluição seriada

Para quantificação da microbiota nativa retirou-se um Kg de solo, procedeu-se a homogeneização, retirando duas amostras de 10 g de solo cada, adicionando 90 mL de solução fisiológica 0,8% (figura 3.27). A mistura foi agitada por 15 minutos a 80 rpm sob agitação orbital e após procedeu-se a leitura do pH de cada amostra. Para quantificação da microbiota tomou-se 1 mL de cada amostra realizando-se diluições seriadas (10^{-1} e 10^{-2}), (figura 3.28), com semeadura de 200 μ L nos meios de cultura, com três repetições para cada amostra e para cada meio de cultura.



Figura 3.27 Homogeneização da amostra.



Figura 3.28 Diluição seriada.

3.3.5.2 Meios semi-seletivo

Inicialmente para identificar e quantificar os microrganismos nativos presentes no solo residual de basalto em estudo foi utilizado os seguintes meios de cultura: Thornton (THORNTON, 1922), BDA (SMITH & ONIONS, 1983), Martin (WOLLUM, 1982), CDA – Caseino - Dextrose - Agar (BOUCHER et al.,1992), Extrato de Solo (PRAMER & SCHMIDT, 1964) e meio de cultura 523 (KADO & HESKETT, 1970). O meio Thornton é utilizado para quantificar bactérias, o meio BDA é um meio mais geral, usado para quantificar todos os fungos presentes no solo, no meio Martin usa-se um corante (Rosa bengala) e estreptomicina (antibiótico usado para inibir o crescimento de bactérias), crescendo apenas fungos, o meio CDA foi utilizado na quantificação de actinomicetos, o meio Solo, por conter solo na sua composição torna-se propício ao crescimento da microbiota característica do local em estudo e o meio de cultura 523 para bactérias. Os meios para crescimento de bactérias e actinomicetos foram colocados em estufa bacteriológica a 28 °C e os meios para crescimento de fungos foram colocados em lampadário com 12 horas/luz a 25 °C. A contagem da UFCs de bactérias e actinomicetos realizou-se após 48 da semeadura e a identificação de fungos sete dias após a semeadura.

O número de UFC/g foi calculado pela fórmula: $\text{UFC/g de solo} = C \times D \times 0,5$

Onde:

C = n° de colônias observadas

D = denominador da diluição correspondente

0,5 = (volume de semeadura).

3.3.5.3 Isolamento e purificação de colônias

Após o crescimento e contagem das UFC, as diferentes colônias que cresceram isoladas foram repicadas para seus respectivos meios de cultura para purificação e crescimento isolado (figura 3.29 A e B) Cada colônia com aspecto morfológico diferenciado foi preservado em meio de cultura 523 em tubo inclinado (figura 3.30) e mantido a 4 °C para testes posteriores.

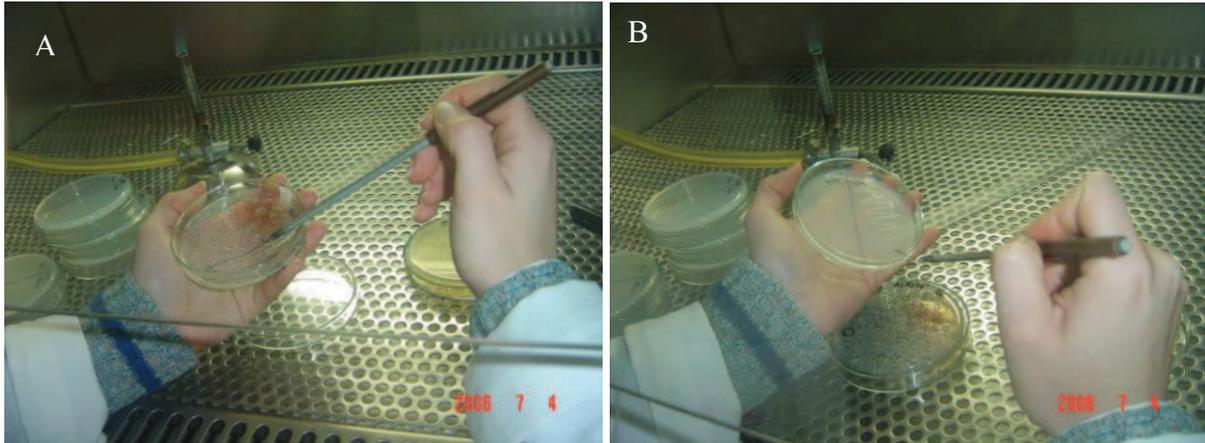


Figura 3.29 A e B) Colônia de bactérias sendo repicadas em meio de cultura.

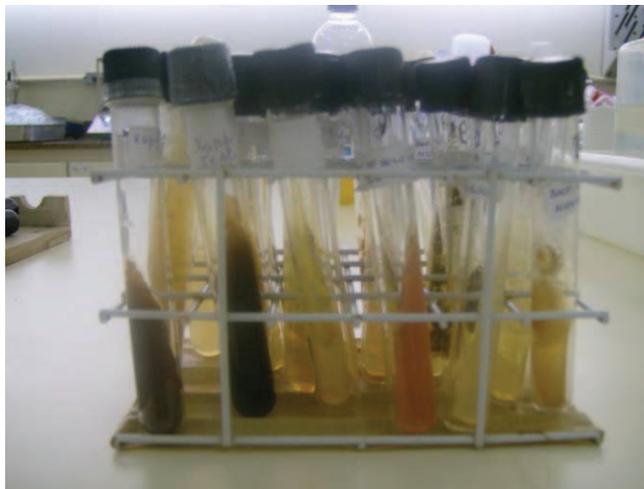


Figura 3.30 Colônias de bactérias sendo preservado em meio 523 em tubo inclinado.

3.3.5.4 Seleção das bactérias para bioaumentação

Após o isolamento e purificação das colônias, as bactérias foram testadas quanto à resistência e suscetibilidade aos contaminantes, sendo repicadas para o crescimento em meio de cultura 523, este com óleo diesel em sua composição. Neste caso a sacarose foi substituída

pelo diesel na mesma proporção, servindo de fonte de nutrientes para o crescimento das bactérias. Os resultados foram obtidos após 48 h da incubação na estufa bacteriológica.

3.3.5.5 Preparo do inoculo (bioaugmentação)

O preparo do inoculo foi realizado a partir de colônias puras de bactérias selecionadas, cultivados em meio de cultura 523, por 24 h e ressuspendidas em 3mL de solução fisiológica 0,8%. A suspensão será acrescentada em 50mL de meio de cultura líquido 523, sob agitação orbital constante a 28 °C, na incubadora refrigerada com agitação do fabricante TECNAL modelo TE-421. Após 24 h de incubação, deve-se proceder diluições sucessivas em meio de cultura 523, para determinação da concentração de células (figura 3.31).



Figura 3.31 Bactérias selecionadas bioaugmentadas.

3.3.5.6 Teste de resistência das bactérias aos contaminantes

Após a bioaugmentação das bactérias selecionadas, realizou-se um teste paralelamente aos ensaios de bioremediação, para determinar a resistência das bactérias quanto à presença do óleo diesel e do biodiesel. Para a realização deste teste, utilizou-se 18 erlenmeyer de vidro de 250 mL, meio de cultura 523, contaminantes (diesel ou biodiesel) e bactérias. Para cada 50 mL de meio de cultura aplicou-se 50 mL de contaminante (figura 3.32) e 1000 µL de bactéria.

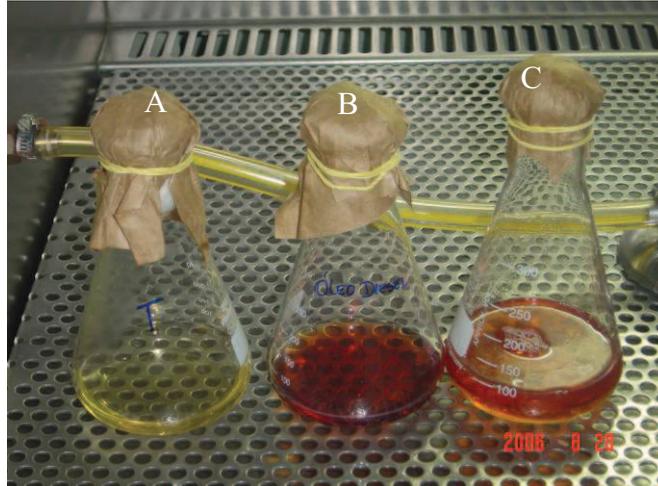


Figura 3.32 Solução aplicada no teste de resistência.

A figura 3.33, mostra a aplicação de 1000 μL da bactéria *Pseudomona ssp.*, em 100 mL de solução contendo meio de cultura + diesel.



Figura 3.33 Adição da bactéria *Pseudomona ssp.*, em solução com diesel.

Neste teste, a composição do meio de cultura 523 não foi alterada, sendo a sacarose a fonte inicial de nutrientes.

Nas figuras seguintes apresenta-se a bactéria *Pseudomonas ssp.* (figura 3.34) e as bactérias identificadas com os número 06 (figura 3.35), 07 (figura 3.36), 08 (figura 3.37), 11 (figura 3.38), 16 (figura 3.39), 19 (figura 3.40), aplicadas em solução com o meio de cultura 523 + diesel, para testar individualmente a resistência das bactérias bioaumentada.

Fig. 3.35 *Pseudomonas ssp.* + solução com diesel.

Fig. 3.36 Bact. nº 06 + solução com diesel.



Fig. 3.37 Bact. nº 07 + solução com diesel.



Fig. 3.38 Bact. nº 08 + solução com diesel.



Fig. 3.39 Bact. nº 11 + solução com diesel.



Fig. 3.40 Bact. nº 16 + solução com diesel.



Fig. 3.40 Bact. nº 19 + solução com diesel.

Nas figuras seguintes apresenta-se a bactéria *Pseudomonas ssp.* (figura 3.41) e as bactérias identificadas com os número 06 (figura 3.42), 07 (figura 3.43), 08 (figura 3.44), 11 (figura 3.45), 16 (figura 3.46), 19 (figura 3.47), aplicadas em solução com o meio de cultura 523 + biodiesel, para testar individualmente a resistência das bactérias bioaumentada.



Fig. 3.41 *Pseudomonas sp.* + solução com biodiesel. Fig. 3.42 Bact. nº 06 + solução com biodiesel.



Fig. 3.43 Bact. nº 07 + solução com biodiesel. Fig. 3.44 Bact. nº 08 + solução com biodiesel.



Fig. 3.45 Bact. nº 11 + solução com biodiesel.



Fig. 3.46 Bact. nº 16 + solução com biodiesel.



Fig. 3.47 Bact. nº 19 + solução com biodiesel.

A figura 3.48, mostra o teste de resistência realizado com um pool (mix) de bactérias, onde foi adicionado 1000 μ L de cada bactéria bioaumentada. O pool foi colocado na solução de meio de cultura + diesel ou biodiesel nas mesmas concentrações dos testes anteriores.



Figura 3.48 Mix de bactérias em solução: A) com diesel B) com biodiesel.

Após quinze dias do início do ensaio, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Cromatografia Gasosa do CEPA (Centro de Pesquisa em Alimentos) e para o Laboratório de Química do ICEG (Instituto de Ciências Exatas e Geológicas) ambos da UPF, onde foram realizadas as análises de Cromatografia Gasosa (CG), *Differential Scanning Calorimetry* (DSC). O ensaio continuou em observação até o final do experimento.

3.3.5.7 Microcultura para fungos

A técnica de cultura em lâminas é útil para se determinar o modo pelo qual os esporos são produzidos, bem como para observar as características do micélio, dos esporos e dos esporóforos.

Para a identificação de fungos, foram colocados dois discos de papel filtro umedecidos em uma placa de Petri, sobre os quais foram dispostos uma vareta de vidro em forma de V, uma lâmina de microscópio e uma lamínula. Usando-se um perfurador esterilizado cortou-se discos de BDA colocando-se sobre a lâmina na placa de Petri. Com o auxílio de uma agulha histológica retira-se pequena parte do micélio e coloca-se nos discos em pontos equidistantes, cobrindo com uma lamínula. Estes foram colocados em lampadário com 12 horas/luz a 25 °C por sete dias para permitir o crescimento do fungo em direção à lamínula de forma que possam ser analisadas tanto em lâmina quanto em lamínula para montagem de novas lâminas para posterior análise em microscópio.

3.3.6 ENSAIOS DE BIOREMEDIÇÃO

Para melhor análise os ensaios de bioremediação foram divididos em tratamentos com triplicata para cada tempo pré-determinado, como apresentado na tabela 3.5.

Tabela 3.5 Tratamentos utilizados no experimento.

TRATAMENTOS	CONTAMINANTES	ADIÇÕES	TÉCNICAS DE BIOREMEDIÇÃO
T1	Sem Contaminante	----	Atenuação Natural
T2	Diesel	----	Atenuação Natural
T3	Biodiesel	----	Atenuação Natural
T4	Sem Contaminante	Bactérias $2,93 \times 10^6$ UFC	Bioaumentação
T5	Diesel	Bactérias $2,93 \times 10^6$ UFC	Bioaumentação
T6	Biodiesel	Bactérias $2,93 \times 10^6$ UFC	Bioaumentação
T7	Sem Contaminante	Adição de ar	Bioventing
T8	Diesel	Adição de ar	Bioventing
T9	Biodiesel	Adição de ar	Bioventing

A técnica Atenuação Natural foi aplicada nos tratamentos T1, T2 e T3. O T1 não foi contaminado, sendo considerado controle para os demais, o T2 foi contaminado com diesel e o T3 com biodiesel, nestes ensaios avaliou-se a capacidade de atenuação natural do solo em relação ao contaminante.

A técnica Bioaugmentação foi aplicada nos tratamentos T4, T5 e T6. Nesta técnica, após a identificação e quantificação dos microrganismos (realizado pelas análises microbiológicas), os microrganismos encontrados no solo em questão foram multiplicados até atingirem aproximadamente a concentração de $2,6 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL e inoculados no solo em estudo (figura 3.49). Desta forma, os microrganismos responsáveis pela biodegradação do óleo diesel são microrganismos nativos presentes no solo residual de basalto em estudo. Nos tratamentos T5 e T6, o solo virgem bioaugmentado foi contaminado com óleo diesel e biodiesel, respectivamente.



Figura 3.49 Aplicação das bactérias bioaugmentados no solo.

Para a execução da bioaeração foi projetado e construído um equipamento (descrito no item 3.2.3), através do qual foi possível a adição do ar comprimido por um período de 4 horas diárias. O ar comprimido foi utilizado como fonte de nutriente estimulando a biodegradação do contaminante. Desta forma, no tratamento T7, foi aplicada a técnica de bioventing no solo virgem, nos tratamentos T8 e T9, o solo virgem bioestimulado pela aeração, foi contaminado com óleo diesel e biodiesel, respectivamente.

3.3.7 EVOLUÇÃO DE CO₂

O método de evolução de CO₂, teste de respirometria ou C mineralizável foi realizado para determinar quanto de C é respirado pela microbiota do solo nos tratamentos de Atenuação Natural (controle), Atenuação Natural + Diesel, Atenuação Natural + Biodiesel,

Bioaumentação, Bioaumentação + Diesel e Bioaumentação + Biodiesel. Pela determinação das taxas de respiração durante um período de incubação, pode-se determinar a taxa máxima de respiração, relacionado com a biomassa existente nesse solo.

Este método consiste na captura de C-CO₂, emitido de uma amostra de solo, em solução de NaOH e sua dosagem por titulação em HCL.



Figura 3.50 Experimento de Evolução do CO₂.

Para o desenvolvimento do método utilizou-se 19 vidros herméticos de 1000 mL cada (figura 3.50). Sendo 18 usados em triplicata para cada tratamento, e um usado como branco (controle). Em cada recipiente, adicionou-se um frasco com aproximadamente 50 g de solo (proveniente dos tratamentos em estudo), um frasco com 30 mL de solução de NaOH 0,5 mol/L⁻¹ (para captura de C-CO₂), e outro contendo 30 mL de H₂O (para manter a umidade).

A umidade do solo foi ajustada a 60-70% da capacidade de campo.

Os recipientes contendo o conjunto de solo + solução de NaOH + H₂O e o recipiente contendo apenas NaOH (branco), foram fechados e mantidos a temperatura ambiente.

Após 48 horas de incubação, os recipientes foram abertos e os frascos de NaOH retirados, tomando o cuidado para deixar cada recipiente contendo solo aberto por 15 minutos, para que ocorra a troca de ar (esse tempo foi uniforme para todas as amostras). Pipetou-se 10 mL da solução de NaOH (previamente incubada com o solo) para um erlenmeyer de 125 mL, adicionou-se 10 mL da solução de BaCl₂ 0,05 mol/L⁻¹ e 3 gotas de fenolfetaleína 1%, em seguida titulou-se com solução de HCL 0,25 mol/L⁻¹ (figura 3.51). O ponto de viragem é nítido passando de violeta para incolor (figura 3.52). Decorrido o tempo necessário para a troca de ar do solo, outro frasco com 30 mL de solução de NaOH 0,5 mol/L⁻¹ foi adicionado

a cada sistema e este fechado e incubado novamente. O procedimento foi repetido em 2, 6, 15, 25, 31, 38 e 45 dias após a incubação.



Figura 3.51 Amostra sendo feita a titulação com HCl.



Figura 3.52 Experimento + amostras antes e depois da titulação.

3.3.8 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CONTAMINANTE

3.3.8.1 Cromatografia Gasosa (CG)

O projeto inicial prevê a determinação do teor de contaminante residual pelo método Cromatografia Gasosa (CG). Através do método CG, é possível analisar as cadeias carbônicas do diesel e do biodiesel. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Cromatografia Gasosa do Centro de Pesquisa em Alimentos (CEPA) da UPF. O equipamento utilizado para as análises foi um cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama, fabricante VARIAN e modelo STAR 3400 CX.

Devido ao alto custo desse método e tendo em vista que os processos de bioremediação necessitam de tempo para a biodegradação dos contaminantes, apenas as amostras de solo retiradas aos 120 dias foram encaminhadas para a análise de CG.

No teste de resistência das bactérias aos contaminantes apenas as amostras que apresentam-se morfologicamente diferentes, foram avaliadas pelo método de CG, aos 30 e 120 dias.

3.3.8.2 Óleos e graxos

A determinação do contaminante residual também foi avaliada pela extração de óleos e graxos (lipídios), através do Método de Soxlet. Este método baseia-se na solubilidade dos lipídios (óleos e graxos) em solventes orgânicos (hexano), possibilitando sua extração da amostra quando em contato com o mesmo. Para a realização deste procedimento, adotou-se um método de extração contínua em aparelho de soxlet (figura 3.53), baseado na quantificação gravimétrica do material extraído com solvente. O método foi adaptado do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA,1998), e utilizou-se o mesmo procedimento para todos os tratamentos.



Figura 3.53 Aparelho de Soxlet.

Inicialmente pesou-se 5g de solo de cada tratamento em cartucho de papel filtro. Os cartuchos, já com a amostra do solo, foram inseridos no aparelho de soxlet para fazer a extração com hexano, utilizando balão de fundo chato (250 mL) previamente dessecado e tarado. Após 4 horas, os cartuchos com as amostras de solo foram retirados e inicia-se o processo de recuperação do hexano por 30 min, desta forma, o hexano vai sendo retirado do extrator de soxlet antes de recomeçar nova sifonação e os resíduos ficam depositados no fundo do balão. O balão com lipídios fica na à estufa a 105°C por 1hora e em seguida, vai para o dessecador (figura 3.54), onde permanece até esfriar a temperatura ambiente.



Figura 3.54 Balão com resíduos no dessecador.

O balão é pesado e o cálculo da determinação de lipídios é feito através da equação que segue:

$$\text{Lipídios, g/100g} = \frac{\text{P2} - \text{P1}}{\text{Po}} \times 100$$

Onde:

Po = quantidade de amostra (g)

P1 = peso do balão (g)

P2 = peso do balão com lipídios (g)

O resultado obtido foi obtido em base úmida, já que foi utilizada a amostra de solo com umidade característica para cada tratamento.

3.3.9 TEMPERATURA, UMIDADE e pH

Os ensaios de bioremediação foram realizados na temperatura ambiente do Laboratório de Geotecnia do CETEC (Centro Tecnológico) da UPF. A umidade do solo foi mantida a umidade natural da coleta das amostras 34% (w/w), sendo avaliada em dois períodos (30 dias e 120 dias após o início do experimento). O pH utilizado foi o natural do solo (5,4), sendo avaliada em dois períodos (30 dias e 120 dias). Apesar de ser considerado ácido para o desenvolvimento microbiológico o pH não foi corrigido.

3.3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises de variância para a evolução do CO₂ foi obtida através do programa SAS (Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC), versão 8.0 para o ambiente Windows, utilizando procedimento General Linear Model, com posterior comprovação através do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4 APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS

Neste capítulo são discutidos os resultados obtidos por cada uma das técnicas aplicadas na pesquisa. Inicialmente foram definidos parâmetros para a contaminação do solo, sendo apresentado os resultados dos testes preliminares de contaminação, em seguida os resultados da caracterização física, química e análises microbiológicas do solo (quantificação microbiológica, testes de resistência das bactérias aos contaminantes), evolução de CO₂ e, após os resultados obtidos na determinação do teor de contaminante pela extração de óleos e graxos (Cromatografia gasosa e método de Soxlet).

4.1 CONTAMINAÇÃO DO SOLO

O teste de absorção foi realizado contaminando o solo com 49,86 cm³, 103,08 cm³ e 150,70 cm³ de diesel, referentes a 25%, 50% e 75% do volume de vazios das amostras. As amostras identificadas como 1, 2 e 3, absorveram apenas 5,69 mL, 12,21 mL e 27,16 mL do contaminante o equivalente a 2,85%, 5,92% e 13,52% do volume de vazios respectivamente de cada amostra, como apresentado na figura 4.1.

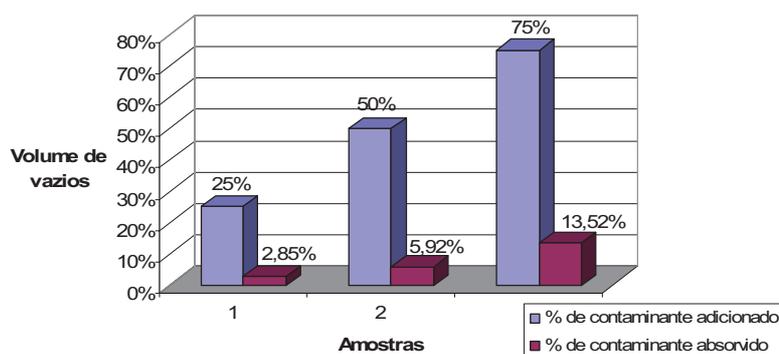


Figura 4.1 Resultado do teste de absorção do contaminante.

A capacidade de absorção do solo em 24 horas não corresponde aos níveis de contaminação pré-determinados, devido a alta permeabilidade do solo em estudo. Desta forma, optou-se por apenas um nível de contaminação, porque independente do teor de contaminante adicionado a capacidade de retenção de contaminante é limitada.

Na tabela 4.1, observa-se o peso dos corpos de prova utilizados na pesquisa, o volume de vazios, o volume de contaminante adicionado (referente 100% do volume de vazios de cada amostra), o volume de contaminante absorvido e porcentagem de contaminante absorvido pelo solo após 24 h de contaminação.

Tabela 4.1 Contaminação dos corpos de prova

CP	Peso do Corpo de Prova (g)	Volume de Vazios	Volume de contaminante adicionado (ml)	Volume de Contaminante Absorvido (ml)	Volume de contaminante Absorvida (%)
01	685,77	291,96	0	0	0
02	673,67	238,67	0	0	0
03	754,64	275,66	0	0	0
04	751,60	260,49	0	0	0
05	794,50	214,26	0	0	0
06	741,64	254,43	0	0	0
07	664,92	233,02	0	0	0
08	644,62	227,89	0	0	0
09	703,91	246,31	0	0	0
10	733,37	246,29	0	0	0
11	743,55	245,42	0	0	0
12	704,43	242,03	0	0	0
13	703,26	243,74	243,74	22,53	2,70
14	710,82	242,28	242,28	29,29	3,47
15	735,75	238,61	238,61	31,57	3,62
16	672,54	248,77	248,77	36,69	4,60
17	702,90	253,78	253,78	40,19	4,82
18	706,51	248,6	248,6	39,64	4,73
19	698,72	231,38	231,38	30,41	3,67
20	691,58	229,76	229,76	28,26	3,44
21	699,64	246,35	246,35	24,95	3,01
22	696,40	252,8	252,8	34,75	4,21
23	670,46	260,72	260,72	48,12	6,05
24	735,12	238,6	238,6	30,83	3,54
25	720,85	243,3	243,3	31,31	3,66
26	726,67	243,24	243,24	29,65	3,44
27	702,58	261,36	261,36	47,79	5,73
28	703,18	240,32	240,32	40,32	4,83
29	661,63	234,12	234,12	37,47	4,77
30	683,91	250,5	250,5	25,02	3,08
31	691,54	242,32	242,32	32,38	3,95
32	737,41	237,34	237,34	25,14	2,87
33	698,34	233,55	233,55	19,80	2,39
34	720,08	229,41	229,41	19,92	2,33
35	661,74	233,06	233,06	40,56	5,17

CP	Peso do Corpo de Prova (g)	Volume de Vazios	Volume de contaminante adicionado (ml)	Volume de Contaminante Absorvido (ml)	% Absorvida
36	682,38	232,71	232,71	19,09	2,36
37	687,70	235,53	235,53	0	0
38	692,80	252,27	252,27	0	0
39	693,94	235,77	235,77	0	0
40	690,22	248,05	248,05	0	0
41	666,95	239,79	239,79	0	0
42	711,60	235,3	235,3	0	0
43	717,67	242,47	242,47	0	0
44	715,66	240,58	240,58	0	0
45	777,05	245,2	245,2	0	0
46	719,77	237,02	237,02	0	0
47	689,15	245,07	245,07	0	0
48	681,17	247,06	247,06	0	0
49	719,25	226,85	226,85	22,70	2,66
50	662,28	235,66	235,66	34,68	4,41
51	669,61	239,42	239,42	36,08	4,54
52	708,82	233,87	233,87	42,25	5,02
53	726,14	229,17	229,17	29,75	3,45
54	718,52	237,56	237,56	26,94	3,16
55	798,68	234,29	234,29	40,24	4,25
56	786,80	237,65	237,65	46,77	5,01
57	720,45	239,19	239,19	34,70	4,06
58	779,14	223,44	223,44	26,24	2,84
59	693,16	233,1	233,1	36,93	4,49
60	697,15	234,62	234,62	39,88	4,82
61	711,08	233,72	233,72	27,75	3,29
62	688,79	217,57	217,57	15,02	1,84
63	698,85	233,62	233,62	37,00	4,46
64	692,77	236,99	236,99	41,63	5,07
65	732,89	235,53	235,53	28,82	3,31
66	713,29	235,02	235,02	33,56	3,97
67	706,65	229,08	229,08	32,73	3,90
68	740,99	234,05	234,05	32,14	3,66
69	701,46	231,18	231,18	31,07	3,73
70	715,49	238,51	238,51	26,68	3,14
71	709,76	239,8	239,8	33,32	3,96
72	695,39	242,35	242,35	38,07	4,62
73	737,77	250,5	250,5	31,07	3,55
74	723,89	262,04	262,04	34,51	4,02
75	686,02	256,51	256,51	45,54	5,60
76	718,01	244,66	244,66	28,58	3,36
77	707,66	252,64	252,64	35,22	4,20
78	669,46	244,34	244,34	32,02	4,03
79	730,97	248,52	248,52	34,63	3,99
80	658,41	236,06	236,06	92,97	11,90
81	753,96	254,54	254,54	0	0
82	726,14	244,73	244,73	0	0
83	699,54	248,85	248,85	0	0
84	718,61	248,21	248,21	0	0
85	760,00	284,72	284,72	0	0
86	746,06	244,49	244,49	0	0

CP	Peso do Corpo de Prova (g)	Volume de Vazios	Volume de contaminante adicionado (ml)	Volume de Contaminante Absorvido (ml)	% Absorvida
87	740,91	261,04	261,04	0	0
88	717,20	213,45	213,45	0	0
89	735,53	235,05	235,05	56,09	6,43
90	730,58	241,12	241,12	32,61	3,76
91	691,93	226,56	226,56	52,77	6,43
92	712,01	225,9	225,9	28,94	3,43
93	693,08	242	242	33,68	4,10
94	687,61	235,38	235,38	45,18	5,54
95	696,67	241,39	241,39	34,27	4,15
96	708,84	239,7	239,7	32,02	3,81

4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DO SOLO

Os resultados apresentados a seguir são referentes aos testes para determinar as características físicas do solo natural, das amostras coletadas no período de março a junho de 2006.

A tabela 4.2, mostra a umidade, a densidade real dos grãos e os resultados dos ensaios Limite de Liquidez, Limite de Plasticidade e Índice de Plasticidade, do solo natural.

Tabela 4.2 Características Físicas do solo natural.

Parâmetros/Solo	Amostra 1
Umidade natural (%)	34
Densidade Real dos Grãos	2,7
Limite de Liquidez (LL) (%)	53
Limite de Plasticidade (LP) (%)	42
Índice de Plasticidade (IP) (%)	11

Na figura 4.2, pode-se observar que a fração granulométrica do solo natural é constituído por 70% de argila, 5% de silte, 22% de areia fina e 3% de areia média.

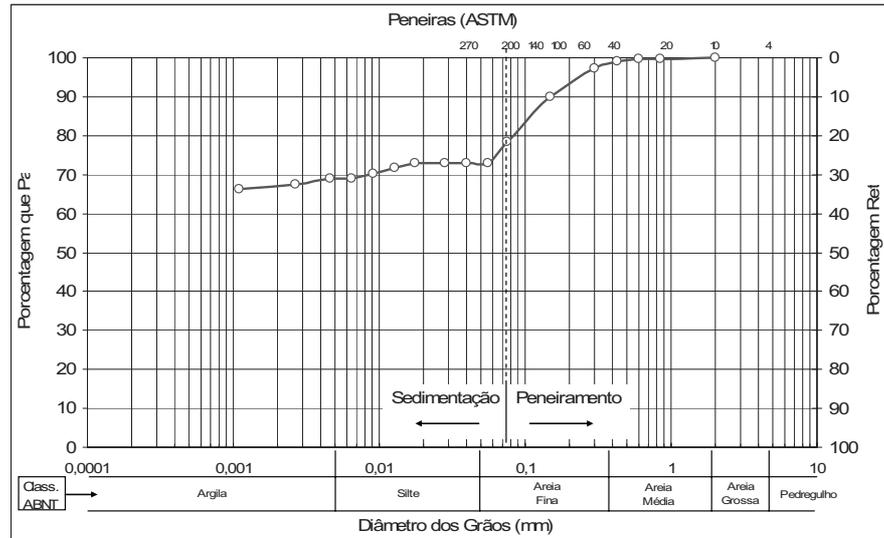


Figura 4.2 Análise granulométrica.

Os índices físicos do solo apresentam-se na tabela 4.3, onde pode-se observar o índice de vazios, o grau de saturação e a porosidade de cada amostra de solo indeformada utilizada na pesquisa.

Tabela 4.3 Índices físicos do solo.

CORPO DE PROVA	ÍNDICE DE VAZIOS	GRAU DE SATURAÇÃO	POROSIDADE
1	1,47	61,71	59,53
2	1,27	71,62	55,9
3	1,31	69,46	56,55
4	1,24	73,21	55,36
5	0,96	94,09	49,11
6	1,23	73,96	55,1
7	1,25	72,4	55,63
8	1,26	71,77	55,85
9	1,25	72,51	55,59
10	1,2	75,55	54,58
11	1,18	76,87	54,15
12	1,23	73,85	55,14
13	1,24	73,21	55,36
14	1,22	74,44	54,94
15	1,16	78,24	53,71
16	1,32	68,59	56,96
17	1,29	70,28	56,37
18	1,26	72,11	55,73
19	1,18	76,62	54,23
20	1,19	76,37	54,31
21	1,26	72,06	55,75
22	1,3	69,9	56,5
23	1,39	65,35	58,28
24	1,16	78,17	53,73
25	1,21	75,18	54,7
26	1,2	75,8	54,5

CORPO DE PROVA	IND. DE VAZIOS	GRAU DE SATURAÇÃO	POROSIDADE
27	1,33	68,21	57,1
28	1,22	74,24	55,01
29	1,27	71,71	55,87
30	1,31	69,27	56,72
31	1,25	72,41	55,63
32	1,15	78,84	53,52
33	1,2	75,87	54,47
34	1,14	79,64	53,27
35	1,26	72,04	55,75
36	1,22	74,4	54,96
37	1,23	74,09	55,06
38	1,3	69,96	56,48
39	1,22	74,68	54,87
40	1,29	70,6	56,25
41	1,29	70,57	56,26
42	1,18	76,73	54,19
43	1,21	75,1	54,73
44	1,2	75,48	54,6
45	1,3	70,06	56,44
46	1,18	77,05	54,09
47	1,27	71,35	55,99
48	1,3	69,96	56,48
49	1,13	80,45	53,02
50	1,27	71,31	56,01
51	1,28	70,96	56,13
52	1,18	76,9	54,14
53	1,13	80,4	53,03
54	1,18	76,74	54,19
55	1,2	75,66	54,54
56	1,24	73,33	55,32
57	1,19	76,42	54,29
58	1,18	77,12	54,07
59	1,2	75,45	54,61
60	1,2	75,39	54,63
61	1,18	77,2	54,04
62	1,33	80,33	53,05
63	1,2	75,9	54,46
64	1,22	74,17	55,04
65	1,15	78,95	53,48
66	1,18	77,01	54,1
67	1,16	78,27	53,7
68	1,13	80,33	53,05
69	1,18	76,99	54,11
70	1,19	76,12	54,39
71	1,21	75,1	54,73
72	1,25	72,8	55,49
73	1,21	74,73	54,85
74	1,3	70,09	56,43
75	1,34	67,86	57,22
76	1,22	74,46	54,94
77	1,28	71,07	56,09
78	1,31	69,52	56,63
79	1,22	74,63	54,88

CORPO DE PROVA	IND. DE VAZIOS	GRAU DE SATURAÇÃO	POROSIDADE
80	1,29	70,55	56,27
81	1,21	75,16	54,71
82	1,21	75,28	54,67
83	1,27	71,32	56
84	1,24	73,46	55,27
85	1,48	61,13	59,76
86	1,17	77,31	54,01
87	1,3	69,77	56,54
88	1,06	85,26	51,57
89	1,14	79,4	53,34
90	1,18	76,88	54,15
91	1,17	77,49	53,95
92	1,14	79,97	53,16
93	1,25	72,67	55,54
94	1,22	74,12	55,05
95	1,24	73,23	55,35
96	1,23	73,12	55,15

Conforme descrito por Azevedo e Dalmolin (2004), solos argilosos apresentam porosidade total (40 a 60%) maior que os solos arenosos (35 a 50%) e em geral, a movimentação de gases e água nos solos argilosos é mais lenta que em solos arenosos.

Os solos contaminados por petróleo, particularmente os solos argilosos, possuem algumas características que podem limitar a eficácia do processo de biodegradação. Como exemplo, podemos citar a baixa permeabilidade, que pode vir a interferir diretamente tanto na difusão de oxigênio (fundamental ao processo aeróbio de degradação) quanto na incorporação de nutrientes (BAPTISTA & RIZZO, 2004).

Teoricamente solos argilosos possuem baixa permeabilidade, como citado na literatura, porém em Latossolos, que apresentam uma boa estruturação, a quantidade de macroporos é suficiente para que haja uma permeabilidade relativamente rápida de água.

4.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO SOLO

Os resultados apresentados a seguir são referentes a amostra de solo coletadas no mês de junho de 2006. Os resultados da análise básica e micronutrientes apresentam-se na tabela 4.4.

Tabela 4.4 Análise básica e micronutrientes do solo

Parâmetros/Solo	Amostra A
pH H ₂ O	5,4
Ind. SMP	5,7
P (mg/dm ³)	4
K (mg/dm ³)	28
MO (%)	< 0,8
Al (cmol _c /dm ³)	2,4
Ca (cmol _c /dm ³)	1,5
Mg (cmol _c /dm ³)	0,8
H+Al (cmol _c /dm ³)	6,2
CTC (cmol _c /dm ³)	8,6
Saturação – Bases (%)	28
Saturação – Al (%)	50
Saturação – K (%)	0,8
Enxofre (mg/dm ³)	5
Boro (mg/dm ³)	0,5
Manganês (mg/dm ³)	<2
Zinco (mg/dm ³)	1,0
Cobre (mg/dm ³)	0,4

O solo natural analisado apresentou as seguintes características:

- pH ácido. A acidez do solo é determinada principalmente pela concentração de Hidrogênio + Alumínio, presentes no solo. Solos com pH ácido, aumentam a concentração de Alumínio. O aumento da acidez do solo é um processo natural, mas que pode ser acelerado pelas ações humanas. As bactérias são os microrganismos mais tolerantes a acidez, isso justifica a ampla distribuição e concentração no solo em estudo.

- Baixa porcentagem de matéria orgânica. O teor de MO decresce em profundidade, associado ao maior grau de empacotamento das partículas do solo, a tendência é ocorrer a diminuição na porosidade total do solo (AZEVEDO e DALMOLIN, 2004).

- Os micronutrientes encontrados no solo são considerados característicos para um Latossolo. A quantidade de contaminantes inorgânicos (Zinco e Cobre) estão dentro dos padrões de referência determinados pela Lista Holandesa de Valores da qualidade do solo

(CETESB, 2006). O Alumínio é considerado alto; o Cálcio foi considerado bom para a profundidade; o Mg, o Enxofre, o Boro, o Manganês e o Cobre foram considerados médios a baixo. A concentração desses micronutrientes no solo natural, não interfere nos processos de bioremediação. No entanto, a concentração de CNPK está diretamente relacionada a este processo. A quantidade de carbono orgânico e nitrogênio total do solo são considerados baixos e estão relacionados com a quantidade de matéria orgânica do solo. O carbono orgânico do solo é constituído por microrganismos, húmus estabilizado, resíduos vegetais e animais em vários estágios de decomposição e carbono inerte (TEDESCO, 1995). A quantidade de Fósforo (P) e Potássio (K) é considerada baixo. Sabe-se que a relação CNPK ideal para a bioremediação é 100:10:1:1, desta forma, para a obtenção de melhores resultados na bioremediação faz-se necessário a bioestimulação com concentrações maiores de nitrogênio, fósforo e potássio.

- A CTC, mede a capacidade que o solo tem de trocar (adsorver e desorver) cátions. Funciona como um reservatório de nutrientes, evitando a lixiviação dos elementos químicos. De acordo com Azevedo e Dalmolin (2004), de modo grosseiro, pode-se assumir que quanto mais argiloso, quanto maior o conteúdo de matéria orgânica e quanto maior o pH do solo, maior a CTC.

4.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO SOLO

4.4.1 Quantificação Microbiológica

A quantificação de microrganismos indígenas do solo apresentou resultados satisfatórios, indicando a presença de bactérias, actinomicetos e fungos.

O peso seco das amostras de solo foi calculado, e o número de UFC/g de peso úmido, foi convertido para UFC/g de solo. Os resultados da primeira, segunda e terceira análise microbiológica para quantificação de bactérias e actinomicetos do solo em estudo, estão expressos na tabela 4.5, em seus respectivos meios de cultura.

Na tabela 4.5, observa-se o resultado das três análises realizadas para a quantificação microbiológica do solo natural. A segunda e a terceira análise apresentam resultados menos expressivos quando comparados à primeira análise. Isto deve-se a adoção de procedimentos de coleta para a segunda e terceira análises (descritos no item 3.3.3), utilizando materiais esterilizados, evitando contaminações externas.

Tabela 4.5 Microrganismos encontrados no solo natural a 120 cm de profundidade.

Meios de Cultura	UFC/g de solo x 10 ³					
	1° análise		2° análise		3° análise	
	Bactérias	Actinomicetos	Bactérias	Actinomicetos	Bactérias	Actinomicetos
CDA	0,43	0,03	1,35	0,36	1,42	0,38
Extrato de						
Solo	4,58	-	1,77	-	1,91	-
Thornton	4,63	0,07	1,73	-	1,86	-
KADO 523	5,84	0,09	1,85	-	1,93	-

Nestas análises também foram identificados os fungos: *Penicillium* ssp. (figura 4.3) e *Rizoctonia* ssp. (figura 4.4) e um fungo de coloração branca, que devido a falta de esporos não pode ser identificado (figura 4.5).

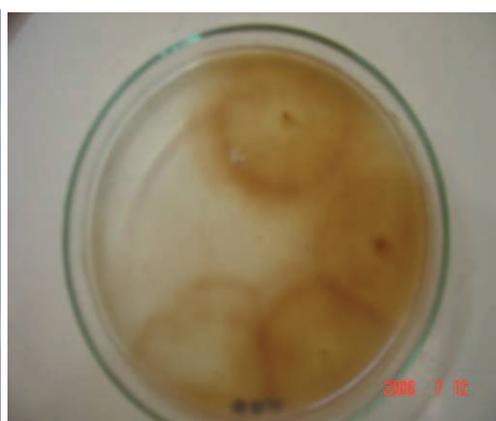
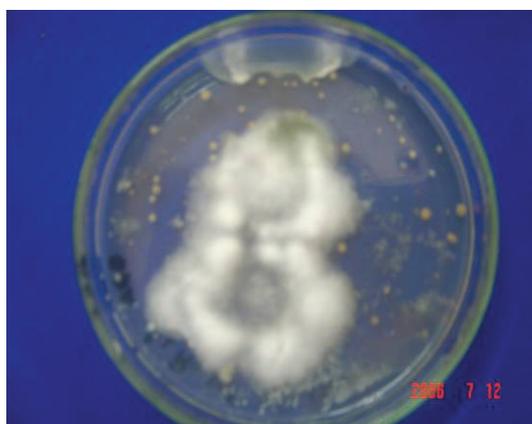
Fig. 4.3 *Penicillium* ssp.Fig. 4.4 *Rizoctonia* ssp.

Fig. 4.5 Fungo não identificado.

Nas análises realizadas as bactérias apresentaram-se em maior quantidade em relação aos fungos e actinomicetos. Em solos com temperatura acima de 20° C, como ocorre em clima tropical e subtropical, predominam as bactérias, havendo menos fungos e actinomicetos (PRIMAVESI, 1981).

No entanto, na profundidade de 120cm do solo em estudo foi encontrado bactérias em população semelhantes à descrita por Alexandre (1977) apud Moreira e Siqueira (2002) na tabela 2.3, que apresenta de 135 a 145cm de profundidade um total de $1,4 \times 10^3$ /g de solo de bactérias (anaeróbias e aeróbias), não relatando a presença de fungos e actinomicetos para esta profundidade. A atividade microbiológica foi avaliada através da Evolução de CO₂ (pelos métodos descritos no ítem 3.3.7).

Os resultados da quantificação microbiológica foram separados por técnica de bioremediação e estudadas separadamente. O tempo 0 indica a população microbiológica do solo natural ($1,93 \times 10^3$). A figura 4.6, mostra os resultados obtidos nos tratamentos da técnica de atenuação natural obtida aos 30, 60, 90 e 120 dias.

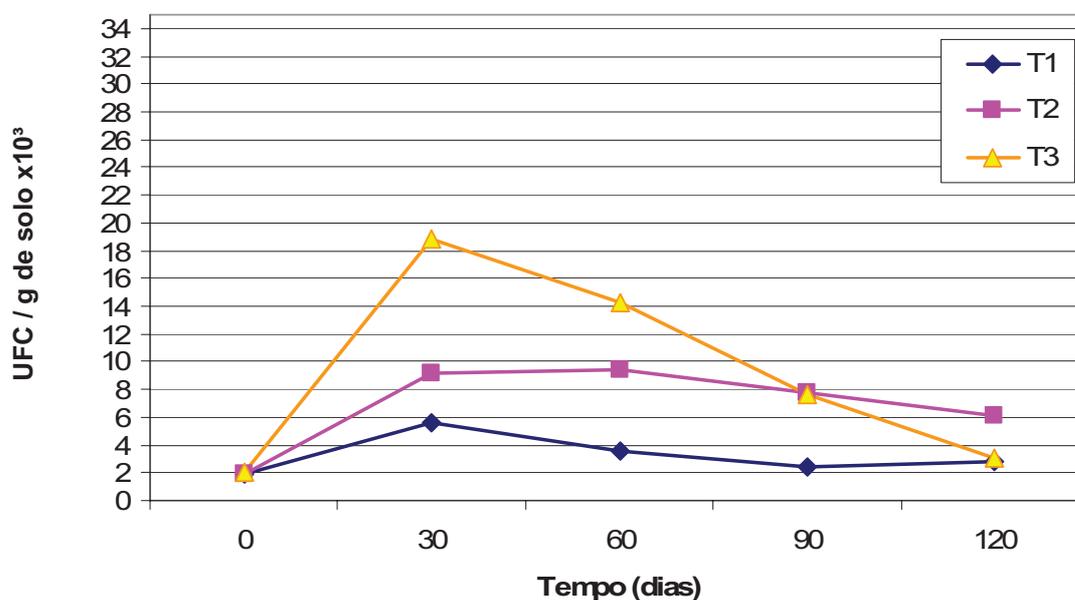


Figura 4.6 Quantificação microbiológica da técnica Atenuação Natural dos tratamentos T1- Atenuação Natural, T2 – Atenuação Natural + Diesel e T3 Atenuação Natural + Biodiesel, nos 4 tempos da pesquisa.

A Atenuação natural apresentou resultados satisfatórios, quanto à quantificação microbiológica. Aos 30 dias, o T3 foi o tratamento que obteve melhores resultados com 18,83 UFC/g de solo x 10³. Aos 60 dias as bactérias que estavam em contato com o diesel (T2),

apresentaram aumento da população atingindo o seu pico máximo com $9,39 \text{ UFC/g de solo} \times 10^3$, enquanto o T1 e o T3 diminuíram consideravelmente. Aos 90 dias, todos os tratamentos decresceram, porém o T2 e o T3 atingiram uma concentração de $7,82 \text{ UFC/g de solo} \times 10^3$ e $7,61 \text{ UFC/g de solo} \times 10^3$, respectivamente. Aos 120 dias, o T2 obteve melhores resultados com $6,12 \text{ UFC/g de solo} \times 10^3$.

A figura 4.7 apresenta a quantificação microbiológica dos tratamentos T4, T5 e T6 nos quais foi aplicado a técnica de Bioaugmentação.

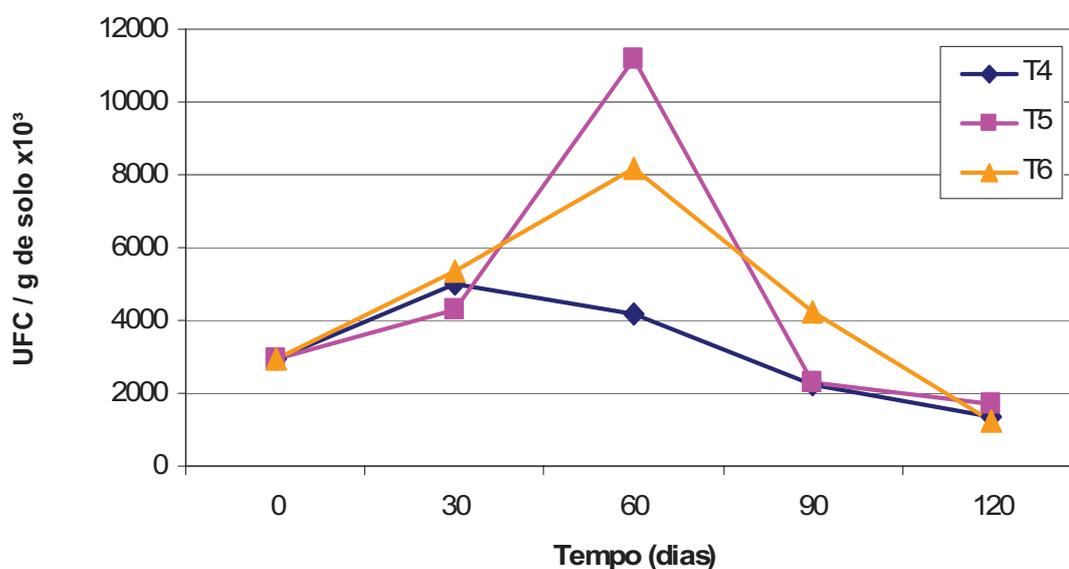


Figura 4.7 Quantificação microbiológica da Bioaugmentação dos tratamentos T4 – Bioaugmentação, T5 – Bioaugmentação + Diesel e T6 – Bioaugmentação + Biodiesel, nos 4 tempos da pesquisa.

A Bioaugmentação, quanto à quantificação microbiológica, foi a técnica que apresentou melhores resultados, devido a inoculação das bactérias consorciadas a uma concentração de $2,93 \text{ UFC/g de solo} \times 10^6$, superior as demais técnicas. Os tratamentos T4, T5 e T6 tiveram um comportamento semelhante até os 30 dias. Apartir daí, a população de bactérias do T4 diferenciou-se das demais diminuindo gradativamente até o período 120 dias. Observa-se a evolução na concentração de bactérias atingindo o pico aos 60 dias dos tratamentos T5 e T6, com $11,18 \text{ UFC/g de solo} \times 10^6$ ou $11180 \text{ UFC/g de solo} \times 10^3$ e, $8,186 \text{ UFC/g de solo} \times 10^6$ ou $8186 \text{ UFC/g de solo} \times 10^3$, respectivamente. Aos 90 dias a concentração de bactérias do T4 e do T5 foi praticamente a mesma. Aos 120 dias, todos os tratamentos tiveram a população de bactérias inferior a inicial (tempo 0).

Os tratamentos T7, T8 e T9, onde foi aplicado a aeração pelo processo Bioaeração, apresentam-se na figura 4.8.

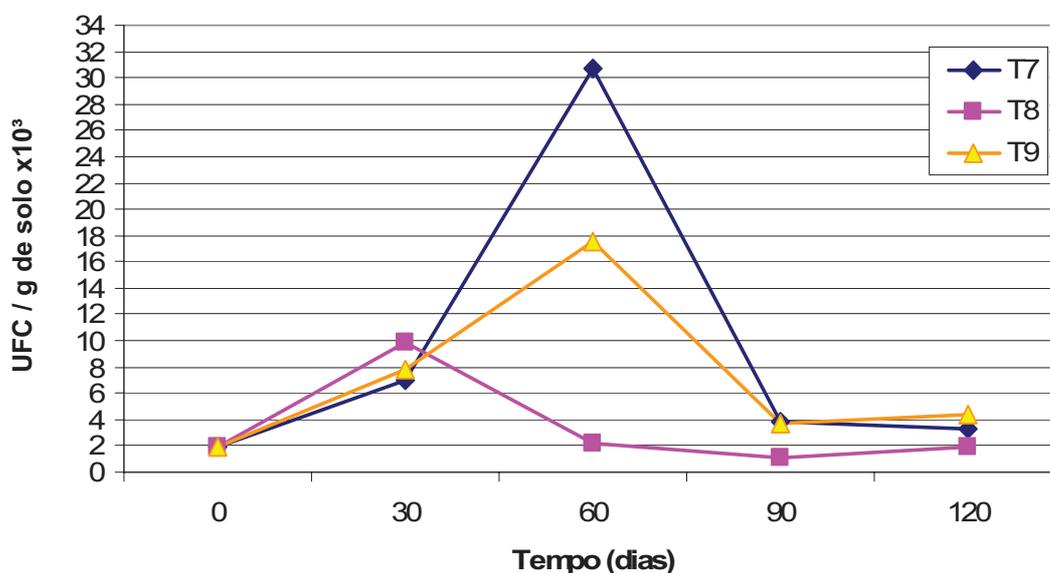


Figura 4.8 Quantificação microbiológica do Bioventing dos tratamentos T7 – Bioaeração, T8 – Bioventing + Diesel e T9 – Bioventing + Biodiesel, durante o período de 120 dias.

Na figura 4.7, o crescimento das bactérias até os 30 dias foi praticamente semelhante. Aos 60 dias as bactérias na presença do diesel começam a diminuir a sua concentração, enquanto que as bactérias dos tratamentos T7 e T9 continuam a se multiplicar atingindo 30,77 UFC/g de solo x 10³ e 17,58 UFC/g de solo x 10³.

Esta técnica diferencia-se da atenuação natural pela adição de ar comprimido como estimulante na degradação dos contaminantes. No entanto ao comparar os dados das duas técnicas observa-se que aos 30 dias a população microbiológica do bioventing é inferior a população da atenuação natural. No entanto aos 60 dias, enquanto que as bactérias da atenuação natural diminuem ou mantêm a sua concentração, as bactérias do bioventing são bioestimuladas e atingem o seu maior pico. Desta forma, o solo em estudo possivelmente apresenta bactérias aeróbias ou facultativas aeróbias.

De acordo com Moreira e Siqueira (2002), a uma profundidade de 135-145 cm as bactérias aeróbias são encontradas em maior quantidade em relação as bactéria anaeróbias.

4.4.2 SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS PARA BIAUMENTAÇÃO

Todas as colônias morfologicamente diferenciadas foram expostas ao teste de seleção das bactérias para a bioaumentação, com o contaminante óleo diesel, porém apenas as bactérias identificadas pelos números 05 (figura 4.9), 07 (figura 4.10), 08 (figura 4.11), 11 (figura 4.12) e 19 (figura 4.13), após 48 horas, cresceram e multiplicaram-se apresentando certa resistência quanto à presença do óleo diesel no meio.

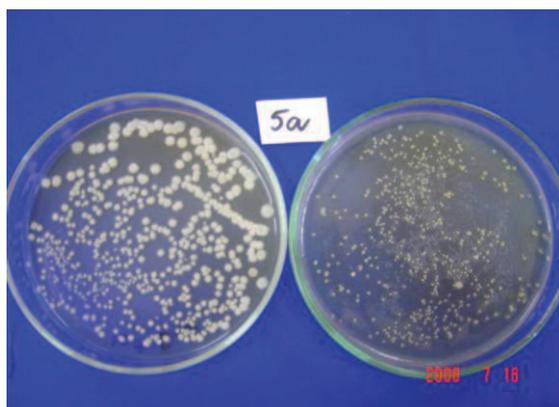


Figura 4.9 Bactéria n° 05.

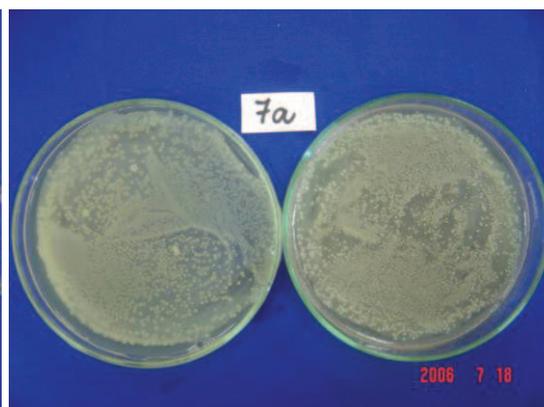


Figura 4.10 Bactéria n° 07.

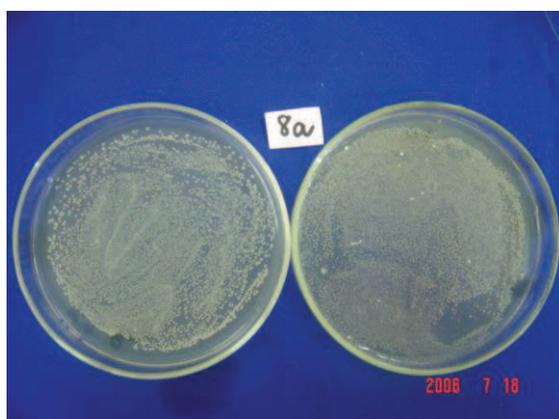


Figura 4.11 Bactéria n° 08.



Figura 4.12 Bactéria n° 11.

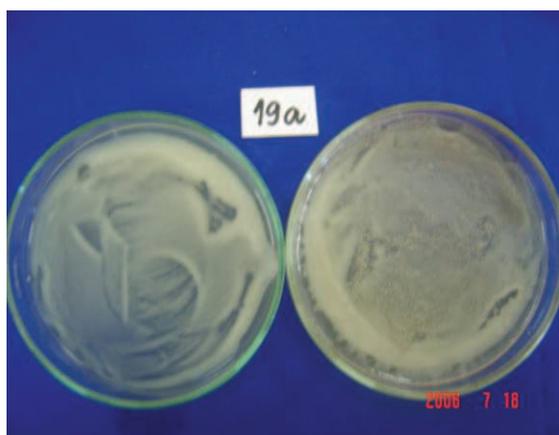


Figura 4.13 Bactéria n° 19.

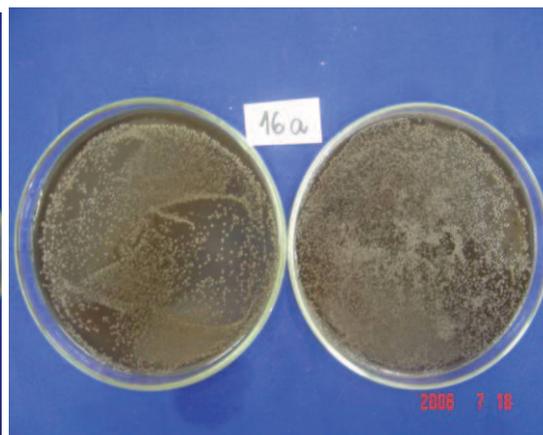


Figura 4.14 Bactéria n° 16.

A bactéria identificada como 16 (figura 4.14), também cresceu e se multiplicou na presença do óleo diesel, porém, desenvolveu uma característica diferente, modificando o meio seletivo alterando a sua pigmentação.

Este teste foi determinante para a seleção das bactérias que foram submetidas à bioaugmentação. Apesar de não podermos avaliar a capacidade de degradação de cada uma delas, sabe-se que elas toleram e crescem na presença do óleo diesel. Além das seis bactérias acima descritas, a bactéria do gênero *Pseudomonas ssp.*, também foi bioaugmentada.

4.4.3 TESTE DE RESISTENCIA DAS BACTÉRIAS AOS CONTAMINANTES

O teste de resistência das bactérias aos contaminantes foi realizado com as bactérias selecionadas no teste de seleção das bactérias para a bioaugmentação. Aos 30 dias do experimento obteve-se apenas resultados na análise de Cromatografia Gasosa (CG). Após 30 dias do início do teste, a bactéria n°16 transformou a coloração do meio de cultura na presença do óleo diesel (figura 4.15) em comparação com as bactérias: *Pseudomonas ssp.* (figura 4.16), Bactéria n° 06 (figura 4.17), Bactéria n° 07 (figura 4.18), Bactéria n° 08 (figura 4.19), Bactéria n° 11 (figura 4.20) e Bactéria n° 19 (figura 4.21).



Figura 4.15 Bactéria n° 16.



Figura 4.16 *Pseudomonas ssp.*.



Figura 4.17 Bactéria n° 06.



Figura 4.18 Bactéria n° 07.



Figura 4.19 Bactéria n° 08.



Figura 4.20 Bactéria n° 11.



Figura 4.21 Bactéria nº 19.



Figura 4.22 Mix de bactérias.

Na figura 4.22, observa-se que a solução com meio de cultura + diesel não apresentou alterações de cor do meio de cultura, quando adicionado o consórcio de bactérias selecionadas (mix).

Na figura 4.23, observa-se que a bactéria nº 16 formou uma emulsão na presença do biodiesel, em comparação com as bactérias: *Pseudomonas* spp. (figura 4.24), Bactéria nº 06 (figura 4.25), Bactéria nº 07 (figura 4.26), Bactéria nº 08 (figura 4.27), Bactéria nº 11 (figura 4.28) e Bactéria nº 19 (figura 4.29).



Figura 4.23 Bactéria nº 16.



Figura 4.24 *Pseudomona* spp..

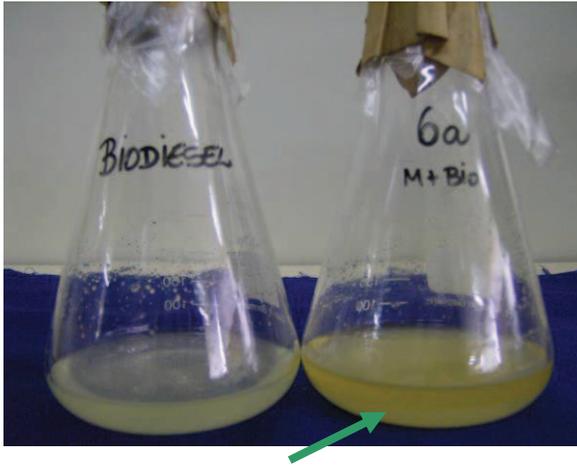


Figura 4.25 Bactéria nº 06.

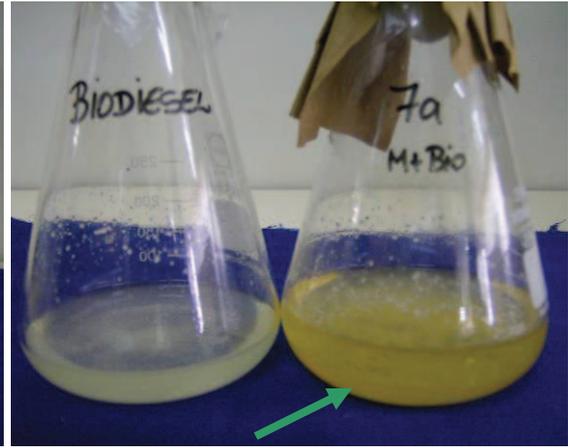


Figura 4.26 Bactéria nº 07.

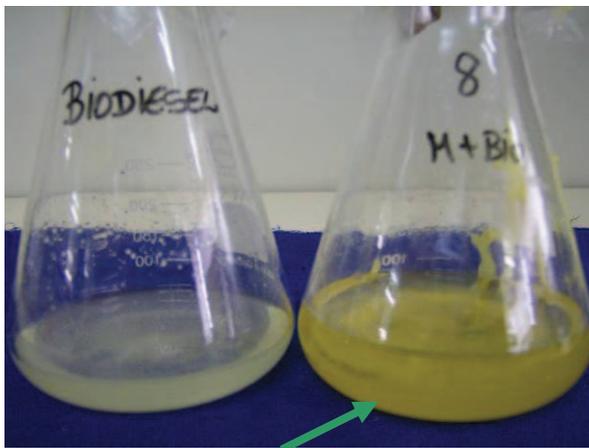


Figura 4.27 Bactéria nº 08.



Figura 4.28 Bactéria nº 11.

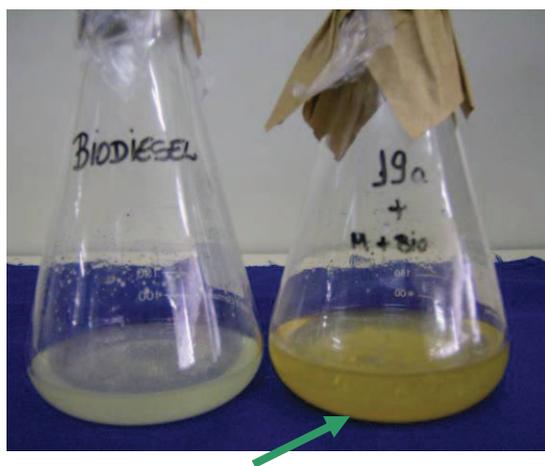


Figura 4.29 Bactéria nº 19.



Figura 4.30 Mix de bactérias.

O mix de bactérias selecionadas adicionado a solução com meio de cultura + biodiesel também formou uma pequena quantidade de emulsão nas laterais do erlenmeyer, conforme figura 4.30.

O perfil cromatográfico realizada para a análise destes testes, reconheceu alguns compostos do biodiesel, ácidos graxos livres presentes na sua constituição.

Aos 30 dias, os melhores resultados foram obtidos pelo experimento com biodiesel + a bactéria n° 16. O perfil cromatográfico realizado para esta análise reconheceu alguns compostos do biodiesel e indicou a transformação ou degradação do composto 18:3 (ácido linolênico) em comparação com os ácidos graxos livres encontrados na cadeia inicial do biodiesel puro.

4.5 EVOLUÇÃO DE CO₂

Neste teste, a evolução de CO₂ foi acompanhada por um período de 45 dias, tempo considerado necessário para a estabilização das curvas de evolução de CO₂. A quantificação do CO₂ pode ser analisada nos diferentes tratamentos; T1 (Atenuação Natural); T2 (Atenuação Natural + Diesel); T3 (Atenuação Natural + Biodiesel); T4 (Bioaugmentação); T5 (Bioaugmentação + Diesel) e T6 (Bioaugmentação + Biodiesel). Todos os tratamentos foram sistematicamente comparados ao T1, considerado controle. Os testes estatísticos foram aplicados aos 2, 6, 15, 25, 31, 38 e 45 dias após o início da incubação do experimento até a estabilização do CO₂. Inicialmente serão apresentados os resultados obtidos pelas técnicas de bioremediação estudadas separadamente, após um conjunto de dados são avaliados e pode-se observar o tratamento que mostrou mais eficiência quanto a liberação de CO₂.

A evolução de CO₂ obtida no período de 45 dias durante, na figura 4.31 avalia a atividade microbiológica durante processo de Atenuação Natural.

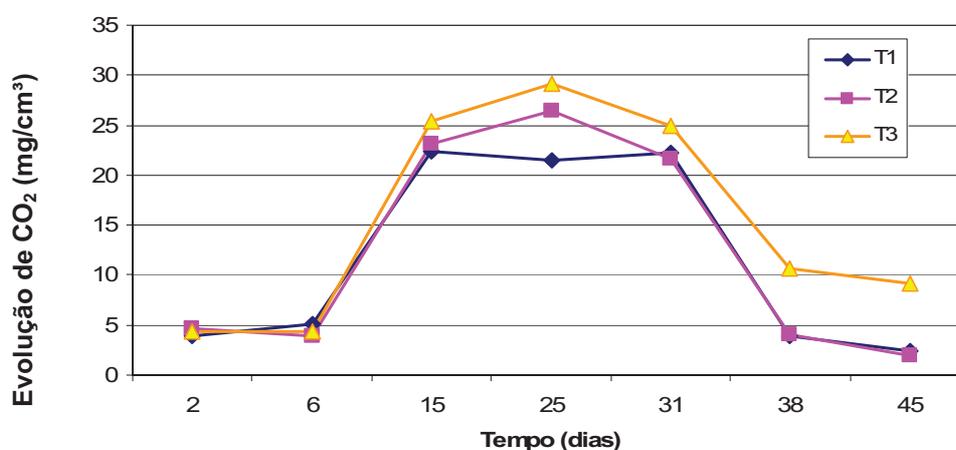


Figura 4.31. Evolução do CO₂ (mg/cm³) acumulado ao longo de 45 dias, da técnica Atenuação Natural aplicado nos tratamentos: T1 – Atenuação Natural, T2 – Atenuação Natural + Diesel e T3 – Atenuação Natural + Biodiesel.

Os tratamentos estudados no experimento apresentados na figura 4.30, mantiveram-se estáveis até o 6º dia após a incubação, período de adaptação das baterias ao ambiente. O início da liberação de CO₂, é observada do 6º ao 15º dia.

O tratamento T1, considerado controle, atingiu o pico de liberação do CO₂ no 15º dia com 21,53 mg/100 cm³, mantendo-se praticamente constante até o 31º dia, apartir daí, a liberação de CO₂ foi decrescente atingindo a estabilidade aos 45 dias de incubação. Os tratamentos T2 e T3, no 25º dia obtiveram o pico máximo da evolução do CO₂ com 26,47 e 29,1 mg/100 cm³, respectivamente. No 31º dia, assim como o tratamento controle, a liberação de CO₂ nos tratamentos T2 e T3 começou a diminuir apartir do 38º, mantendo a estabilidade aos 45 dia.

O T4 foi o tratamento considerado controle para a técnica de bioaugmentação. O gráfico 4.22 mostra que nos 6 primeiros dias, os tratamentos T4, T5 e T6, apresentaram resultados satisfatórios para a bioaugmentação, acelerando o processo de evolução de CO₂ em relação a atenuação natural.

A evolução de CO₂ obtida no período de 45 dias durante, na figura 4.32 avalia a atividade microbiológica durante processo de Bioaugmentação.

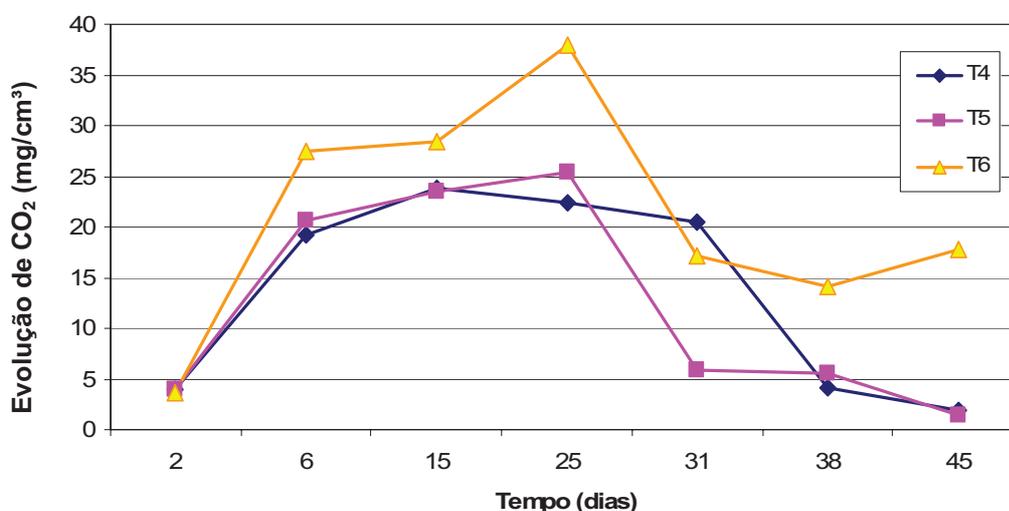


Figura 4.32. Evolução de CO₂ (mg/cm³) acumulado ao longo de 45 dias, da técnica Bioaugmentação aplicado nos tratamentos: T4 – Bioaugmentação, T5 – Bioaugmentação + Diesel e T6 - Bioaugmentação + Biodiesel.

O T4 obteve o pico máximo no 15º dia, com 23,85 mg/100 cm³ de carbono evoluído, decrescendo gradativamente até no 31º dia. O T5 e o T6, atingiram o pico máximo de liberação de CO₂ no 25º dia com 25,35 mg/100 cm³ e 37,87 mg/100 cm³. Do 31º ao 38º observa-se uma queda brusca na liberação de CO₂ em todos os tratamentos, atingindo a estabilidade aos 45 dias com exceção ao T6 que voltou a liberar CO₂.

Independentemente das técnicas de bioremediação ou dos contaminantes aplicados, a resposta em evolução de CO_2 comportou-se linearmente em todos os tratamentos avaliados. Na figura 4.33, pode-se realizar uma comparação entre os tratamentos utilizados durante o experimento. As bactérias tiveram maior atividade microbiana inicial na bioaumentação, este fato justifica-se pela maior concentração de bactérias inoculadas quando comparadas ao solo natural.

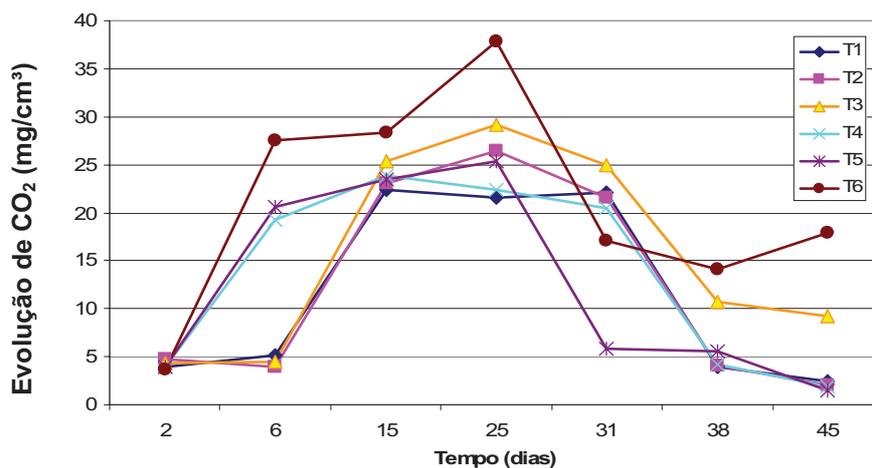


Figura 4.33. Comparação da Evolução do CO_2 (mg/cm^3) acumulado ao longo de 45 dias das técnicas de Atenuação Natural e Bioaumentação aplicado nos tratamentos: T1– Atenuação Natural, T2 – Atenuação Natural + Diesel, T3 – Atenuação Natural + Biodiesel, T4 – Bioaumentação, T5 – Bioaumentação + Diesel e T6 – Bioaumentação + Biodiesel.

Nos tratamentos onde foi utilizado o biodiesel como contaminante obteve-se melhores resultados, quando comparados aos tratamentos com diesel. Este fato deve-se a composição dos contaminantes, pois o biodiesel possui em sua constituição moléculas mais facilmente biodegradáveis. Todos os tratamentos da técnica de atenuação natural apresentaram a curva de crescimento dos microrganismos dividida em 4 fases características: fase de adaptação (2-6), fase log ou exponencial (6-15), fase estacionária (15-31) e fase de declínio (31-45).

A tabela 4.6, apresenta a média de valores de Evolução de CO_2 (mg/cm^3) durante o período de 45 dias pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Relacionando as variáveis: tratamento, tempo e repetições, observa-se estatisticamente que os tratamentos T1, T5, T2 e T4 são significativamente iguais, obtendo o mesmo desempenho durante o experimento. O T4 é igual ao T3, e o T6 é o mais diferenciado entre os tratamentos analisados.

Tabela 4.6 Média de valores de Evolução de CO₂ durante o período de 45 dias, pelo teste de Tukey 5%.

TRATAMENTOS	MÉDIA VALORES Evolução de CO ₂ (mg/cm ³)
T1	14.20 a
T5	14.07 a
T2	14.03 a
T4	13.74 ab
T3	13.42 b
T6	12.33 c

*CV%: 4,44

** Médias seguidas de mesma letra não diferenciam estatisticamente entre si pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade.

Estatisticamente encontra-se uniformidade entre a média de valores obtidos pelas repetições, não evidenciando diferença entre si. Em relação ao tempo, os melhores valores para a atividade microbiana foram obtidos nos períodos P15 e P25 equivalentes aos dias 15 e 25 do experimento.

4.6 DETERMINAÇÃO DE TEOR DE CONTAMINANTE

4.6.1 Cromatografia gasosa (CG)

O potencial de biodegradação das bactérias foi obtido pela diferença de áreas analisadas no perfil cromatográfico realizado para as amostra de solo dos tratamentos retirado aos 120 dias contaminados com biodiesel (tabela 4.7) e diesel (tabela 4.8).

Tabela 4.7 Diferença de áreas obtidas nos perfis cromatográficos dos tratamentos de bioremediação com biodiesel.

ÁCIDOS GRAXOS	PURO	AT. NATURAL	BIOAUMENTAÇÃO	BIOVENTING
C14 : 0	3.452	1.484	350	543
C16 : 0	28.045	11.246	256	820
C16 : 1	2.959	1.255	90	610
C18 : 0	30.759	12.203	257	1.356
C18 : 1	43.592	13.876	377	1.189

O método cromatografia gasosa foi eficiente na identificação dos ácidos graxos livres da composição do biodiesel. O perfil cromatográfico do biodiesel analisado apresentou os ácidos graxos livres característicos do sebo bovino: ácido mirístico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido oléico e ácido oléico, apontando o ácido palmítico como componente majoritário.

A metodologia empregada para a análise do perfil cromatográfico de ácidos graxos não pode ser empregada para a análise do diesel, pois o mesmo não possui ácidos graxos livres em sua composição ou apresenta baixas quantidades que não podem ser identificadas. No entanto a análise de ácidos graxos livres, identificam as ligações de carbono entre os C14 e C20, sendo possível a identificação dos carbonos da fração leve de TPH (Total de Hidrocarboneto de Petróleo) presente neste solo.

Tabela 4.8 Diferença de áreas obtidas nos perfis cromatográficos dos tratamentos de bioremediação com diesel.

HIDROCARBONETO	DIESEL PURO	AT. NATURAL	BIOAUMENTAÇÃO	BIOVENTING
6373	1.297	1.034	350	361
7747	1.383	1.303	256	151
9598	1.161	1.128	237	122
11989	1.372	761	279	443
14999	829	823	185	403
18598	864	623	99	310
22697	1.246	1040	377	643

Pela diferença de área dos perfis cromatográficos tanto nos tratamentos com biodiesel como com diesel, os melhores resultados foram obtidos nas técnicas de bioaumentação e *bioventing*. A atenuação natural também apresentou resultados satisfatórios, porém menos expressivos, essa técnica requer maior tempo para a descontaminação do solo porque a biodegradação ocorre naturalmente sem nenhuma forma de bioestimulação.

No teste de resistência das bactérias aos contaminantes apenas a bactéria identificada pelo nº 16 apresentou características diferentes das demais tanto na presença do diesel como do biodiesel. Desta forma optou-se pela realização da CG, aos 120 dias, apenas das amostras com a bactéria nº 16 e mix de bactérias na presença dos contaminantes biodiesel (tabela 4.9) e diesel (tabela 4.10).

Tabela 4.9 Diferença de áreas obtidas nos perfis cromatográficos das amostras do teste de resistência das bactérias ao contaminante biodiesel.

ÁCIDOS GRAXOS	BIODIESEL PURO	BACTÉRIA n° 16	MIX DE BACTÉRIAS
C14 : 0	3.452	1.419	123
C16 : 0	28.045	10.548	911
C16 : 1	2.959	1.072	62
C18 : 0	30.759	8.745	807
C18 : 1	43.592	17.211	1.176

O mix de bactérias foi mais eficiente na degradação das ligações de carbono dos ácidos graxos que compõem o biodiesel, quando comparado a bactérias n° 16. O biodiesel por ser um combustível biodegradável apresenta ligações carbônicas mais facilmente metabolizáveis pelas bactérias.

Tabela 4.10 Diferença de áreas obtidas nos perfis cromatográficos das amostras do teste de resistência das bactérias ao contaminante diesel.

HIDROCARBONETO	DIESEL PURO	BACTÉRIA n° 16	MIX DE BACTERIAS
6373	1.297	33	495
7747	1.383	34	501
9598	1.161	40	419
11989	1.372	161	216
14999	829	33	260
18598	864	31	392
22697	1.246	7	78

No teste de resistência das bactérias ao contaminante a bactéria n° 16 apresentou o melhor resultado para a degradação do diesel, quando comparado ao mix de bactérias. Esse fato determina que a bactéria n° 16 apresenta um potencial de biodegradação das moléculas de hidrocarbonetos diferenciando-se das demais bactérias.

4.6.2 Óleos e graxos

Os resultados são discutidos de acordo com o tempo em que o experimento foi realizado, apresentando mostrando eficiência quanto à extração de lipídios do solo, já que a técnica original é eficiente na extração de lipídios de alimentos. Contudo, em alguns casos a extração de diesel e biodiesel foram maiores em relação à porcentagem destes absorvidos pelo solo inicialmente, o que pode ser observado nas amostras retiradas aos 30 e 60 dias. Aos 90 e 120

dias, observa-se que a extração foi menor em relação à quantidade absorvida inicialmente. Nota-se também, que os tratamentos que não foram expostos a nenhum tipo de contaminação (T1 - Atenuação Natural, T4 - Bioaugmentação e T7 - Bioventing) apresentaram valores iguais e inferiores a 0,62 % de óleos e graxos extraídos.

Figura 4.34 apresenta os resultados obtidos pelo método de soxlet na extração de óleos e graxos das amostras retiradas após 30 dias, para avaliar a porcentagem de contaminante residual em relação à quantidade de contaminante absorvido, relacionado a quantidade de contaminante absorvido pelo solo inicialmente.

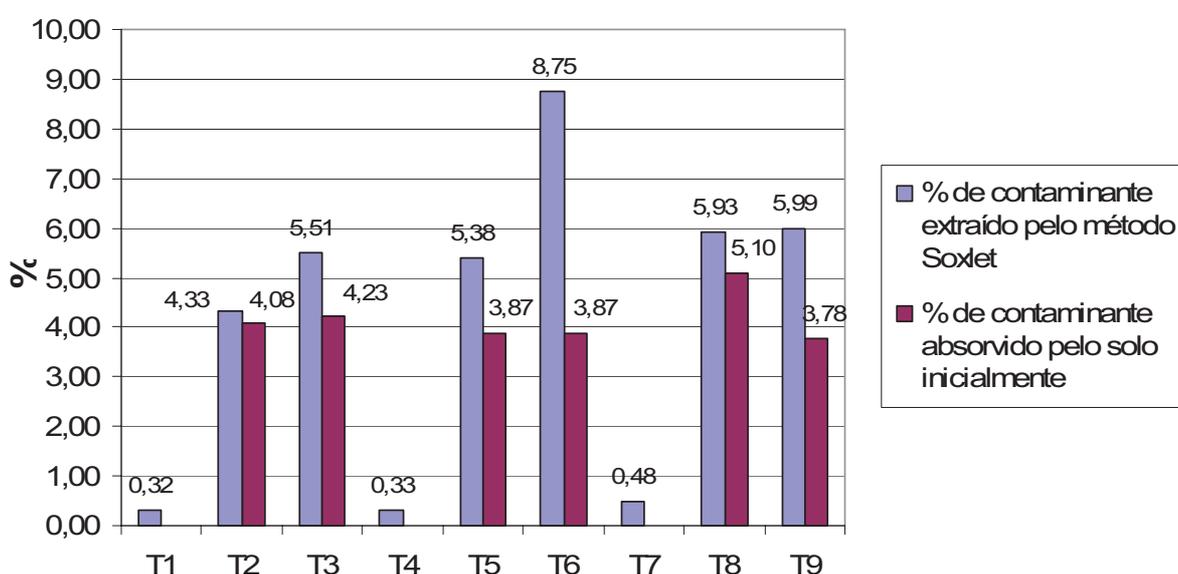


Figura 4.34 Extração de óleos e graxos das amostras de solo retiradas no período de 30 dias dos tratamentos: T1 – Atenuação Natural, T2 – Atenuação Natural + Diesel, T3 – Atenuação Natural + Biodiesel, T4 – Bioaugmentação, T5 – Bioaugmentação + Diesel, T6 – Bioaugmentação + Biodiesel, T7 – Bioventing, T8 – Bioventing + Diesel e T9 – Bioventing + Biodiesel.

Nos tratamentos T2 (Atenuação Natural + Diesel) e (T3) Atenuação Natural + Biodiesel, obteve-se 4,08% e 4,23% de absorção do contaminante sendo extraído 4,33% e 5,51% de diesel e biodiesel respectivamente.

Nos tratamentos T5 (Bioaugmentação + Diesel) e (T6) Bioaugmentação + Biodiesel, observa-se a absorção de 3,87% e 3,19% e a extração de 5,38% e 8,75%. O tratamento T8 (Bioventing + Diesel) apresentou maior absorção do contaminante com 5,10%, quando comparado aos demais tratamentos, e extração de 5,92%; e o T9 (Bioventing + Biodiesel), apresentou absorção de e 3,78% e extração de 5,98%.

Aos 60 dias, as amostras de todos os tratamentos foram retiradas para avaliar a porcentagem de contaminante residual em relação à quantidade de contaminante absorvido conforme a figura 4.35.

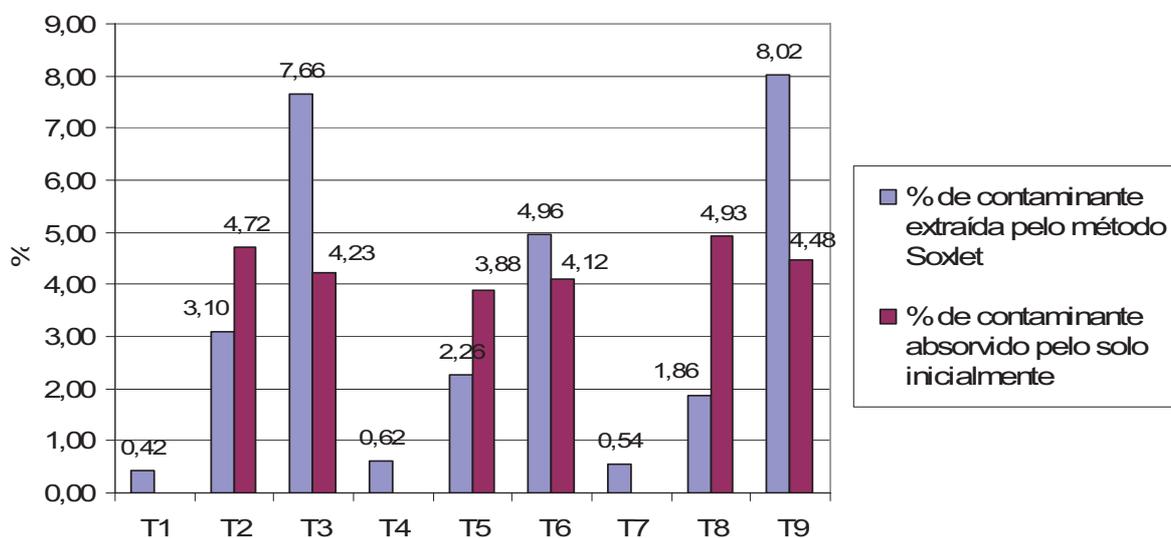


Figura 4.35 Extração de óleos e graxos das amostras de solo retiradas no período de 60 dias dos tratamentos: T1 – Atenuação Natural, T2 – Atenuação Natural + Diesel, T3 – Atenuação Natural + Biodiesel, T4 – Bioaugmentação, T5 – Bioaugmentação + Diesel, T6 – Bioaugmentação + Biodiesel, T7 – Bioventing, T8 – Bioventing + Diesel e T9 – Bioventing + Biodiesel.

Neste período de tempo, observa-se que o biodiesel continua sendo o contaminante mais facilmente extraído, como apresentado no T3 com 7,66%, no T6 com 4,96% e no T9 com 8,02%, no entanto a porcentagem extraída continua sendo superior à porcentagem absorvida. Observa-se também, neste caso, que nos tratamentos com diesel os resultados da extração foram satisfatórios sendo a extração inferior a porcentagem de diesel absorvida, como apresentado no T2 com 3,10%, no T5 com 2,26% e no T8 com 1,86%, atingindo os objetivos do experimento.

Visando obter melhores resultados, a metodologia para esta técnica foi revista, e adotou-se um tempo maior para a recuperação do hexano, passando de 30 para 60 minutos.

A figura 4.36 apresenta os resultados, obtidos das amostras retiradas aos 90 dias, para avaliar a porcentagem de contaminante residual em relação à quantidade de contaminante absorvido inicialmente pelo solo.

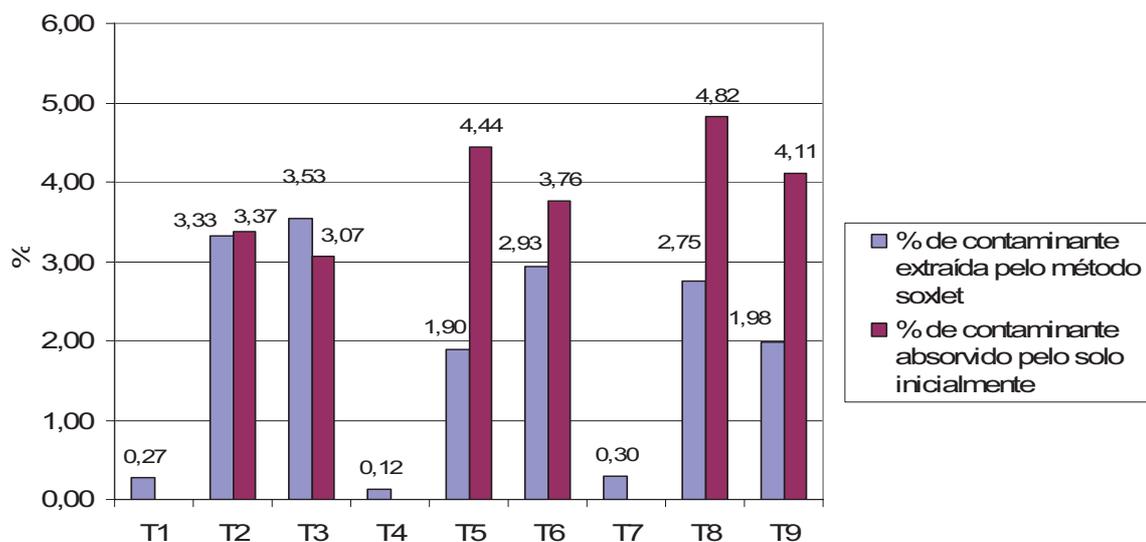


Figura 4.36 Figura 4.35 Extração de óleos e graxos das amostras de solo retiradas no período de 90 dias dos tratamentos: T1 – Atenuação Natural, T2 – Atenuação Natural + Diesel, T3 – Atenuação Natural + Biodiesel, T4 – Bioaugmentação, T5 – Bioaugmentação + Diesel, T6 – Bioaugmentação + Biodiesel, T7 – Bioventing, T8 – Bioventing + Diesel e T9 – Bioventing + Biodiesel.

Com as novas medidas adotadas e considerando a baixa volatilidade do óleo diesel e do biodiesel, os resultados das amostras retiradas aos 90 dias com exceção do tratamento T3, apresentaram-se abaixo da percentagem absorvida.

A figura 4.37 mostra os resultados das amostras de solo retiradas aos 120 dias, para a avaliação da percentagem de contaminante residual em relação à quantidade de contaminante absorvido inicialmente.

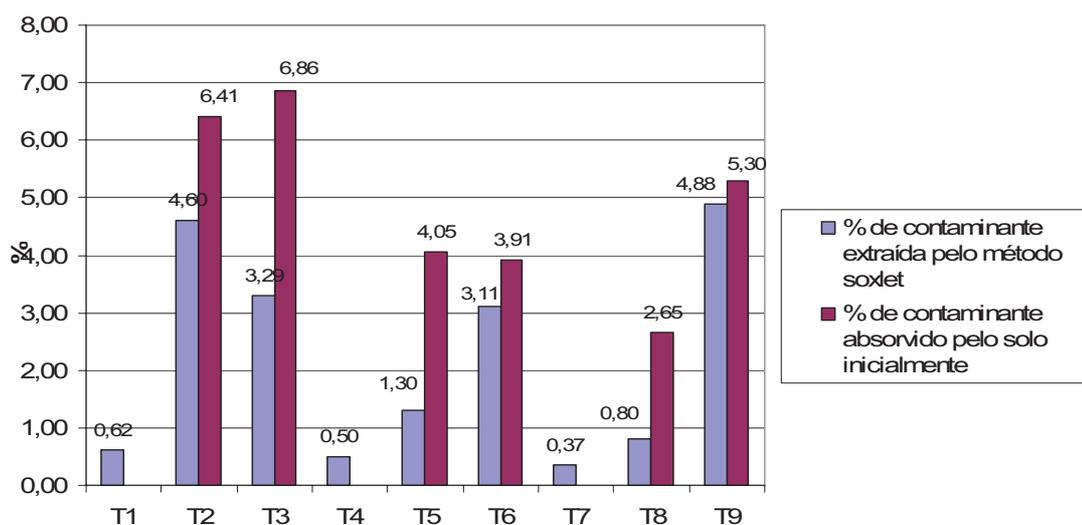


Figura 4.37 Figura 4.35 Extração de óleos e graxos das amostras de solo retiradas no período de 120 dias dos tratamentos: T1 – Atenuação Natural, T2 – Atenuação Natural + Diesel, T3 – Atenuação Natural + Biodiesel, T4 – Bioaumentação, T5 – Bioaumentação + Diesel, T6 – Bioaumentação + Biodiesel, T7 – Bioventing, T8 – Bioventing + Diesel e T9 – Bioventing + Biodiesel.

Aos 120 dias, os resultados apresentaram-se mais uniformes, tendo todos os tratamentos contaminados com diesel e biodiesel valores de extração inferior à porcentagem de contaminante absorvida inicialmente, no entanto, os tratamentos que não foram contaminados continuaram apresentando baixas porcentagens de lipídios.

A quantidade de óleos e graxos encontrados nos tratamentos que não sofreram nenhum tipo de contaminação podem estar associados a quantidade de biomassa microbiana (as bactérias possuem uma camada lipoprotéica em sua constituição) ou a quantidade de matéria orgânica do solo, contudo, sabe-se que o horizonte B não é característico por possuir MOS e nem microrganismos em grandes concentrações.

Desta forma a explicação mais viável para a quantidade de óleos e graxos encontrado nos tratamentos T1, T4 e T7, esta associada ao erro do método de soxlet, já que este foi adaptado para a extração de lipídios em solos.

De acordo com Baptista e Rizzo (2004), a diminuição dos óleos e graxos pode ocorrer não só pelos fatores relacionados a atividade microbiológica, mas também por fatores físico químico como lixiviação e volatilização (BAPTISTA E RIZZO, 2004).

Considerando que não houve lixiviação dos contaminantes e a baixa volatilidade do óleo diesel e do biodiesel, a diminuição dos óleos e graxos no decorrer do tempo pode ser considerado um indicativo de biodegradação dos contaminantes pelas bactérias.

4.7 TEMPERATURA, UMIDADE e pH.

Apesar da temperatura externa do laboratório variar muito durante o período do experimento, a temperatura interna era praticamente constante, oscilando em torno dos 25°C (+ou- 5°C).

A figura 4.38, apresenta a temperatura interna do laboratório obtidas nos 30, 60, 90 e 120 dias do experimento.

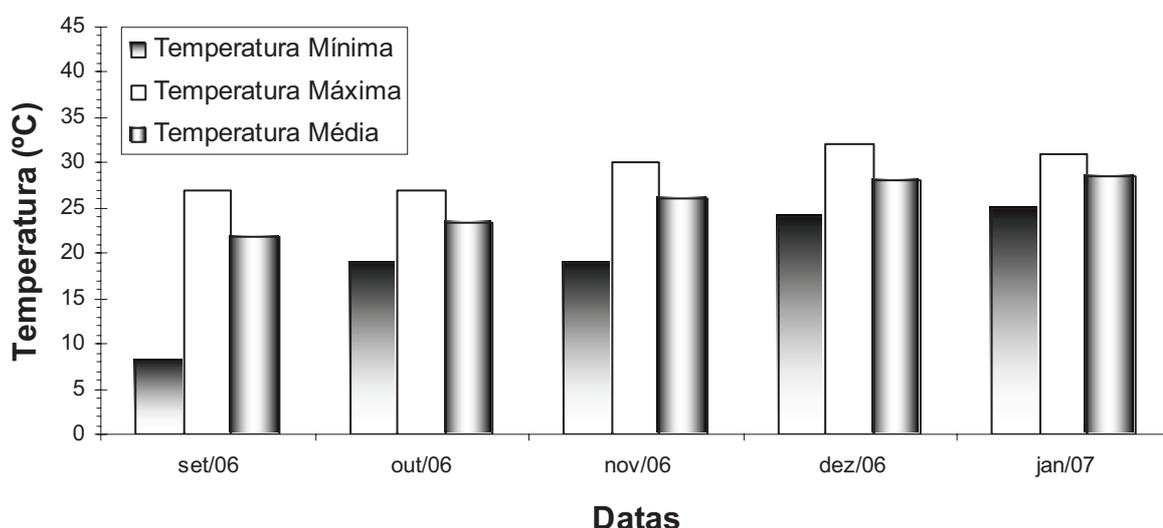


Figura 4.38 Temperatura interna do laboratório durante os 120 dias do experimento.

Do dia 5 de setembro ao dia 06 de outubro de 2006, a temperatura interna variou de 8°C a 27°C, sendo considerado uma temperatura média de 21,9°C.

Do dia 9 de outubro ao dia 08 de novembro de 2006, a temperatura interna aumentou em relação à temperatura obtida nos 30 dias anteriores, variando de 19°C a 30°C, sendo considerado uma temperatura média de 24,5°C.

Do dia 9 de novembro ao dia 08 de dezembro de 2006, a temperatura mínima foi de 19°C e a máxima chegou aos 32°C, sendo considerado a temperatura média de 25,9°C.

Do dia 11 de dezembro de 2006 ao dia 10 de janeiro de 2007, a temperatura mínima foi de 23°C e a máxima chegou aos 32°C, sendo considerado a temperatura média de 28,3°C.

Ao longo do experimento a umidade e o pH sofreram alterações significativas quando comparados as características do solo natural.

A umidade do solo dos tratamentos foi avaliada aos 30 e 120 dias após o início do experimento, conforme observado na tabela 4.7. Os resultados foram posteriormente comparados a umidade do solo no momento da coleta (34%).

Tabela 4.11 Umidade avaliada aos 30 e 120 dias.

TRATAMENTOS	UMIDADE (%)	
	30 dias	60 dias
T1 - Atenuação Natural	31,08	31,08
T2 - At. Natural + Diesel	31,82	29,05
T3 - At. Natural + Biodiesel	32,74	28,48
T4 - Bioaugmentação	31,35	29,68
T5 - Bioaugmentação + Diesel	32,59	30,56
T6 - Bioaugmentação + Biodiesel	30,37	28,38
T7 - Bioventing	31,77	25,25
T8 - Bioventing + Diesel	30,41	26,38
T9 - Bioventing + Biodiesel	32,85	26,83

Observa-se na tabela 4.11, que ocorreu uma diminuição em relação a umidade natural do solo, nos dois períodos de tempo. Aos 30 dias, a umidade manteve-se constante entre os tratamentos, variando de 30,37% (T6) a 32,85% (T9). Aos 120 dias, a perda da umidade foi maior, quando comparado aos 30 dias, variando a umidade entre 25,25% (T7) e 31,08 (T1). Os tratamentos T7, T8 e T9, durante o mesmo período, tiveram perdas de umidade maiores em relação aos demais tratamentos, devido a injeção de ar pelo equipamento de aeração.

Assim como a umidade o pH do solo é um fator limitante para os microrganismos e um importante parâmetro de monitoramento. Muitas espécies de microrganismo sobrevivem a faixas extremas de pH, no entanto, o pH neutro é o ideal para o crescimento das bactérias.

A tabela 4.12 apresenta o pH do solo avaliados aos 30 e 120 dias, sendo posteriormente comparados ao pH do solo natural (5,4) no momento da coleta.

Tabela 4.12 pH avaliado aos 30 e 120 dias.

TRATAMENTOS	pH	
	30 dias	120 dias
T1 – Atenuação Natural	4,2	4,3
T2 – Atenuação Natural + Diesel	4,8	4,8
T3 – Atenuação Natural + Biodiesel	4,6	5,1
T4 – Bioaugmentação	4,8	4,7
T5 - Bioaugmentação + Diesel	4,5	4,7
T6 - Bioaugmentação + Biodiesel	4,5	4,6
T7 – Bioventig	4,8	4,5
T8 - Bioventig + Diesel	4,3	4,9
T9 - Bioventig + Biodiesel	4,8	4,3

Ao longo do experimento, observa-se uma variação significativa no pH, tornando-o mais ácido. Desta forma, para se obter melhores resultados da biodegradação deve ser realizada a manutenção do pH.

5 CONCLUSÃO

A seguir são apresentadas as conclusões obtidas nesta investigação, sendo possível alcançar os objetivos traçados inicialmente, como: caracterização física e química do solo, projetar e montar um equipamento de aeração, quantificação dos microrganismos nativos, avaliação da atividade microbiológica e testar a resistência dos microrganismos na presença dos contaminantes.

As considerações finais são descritas de acordo com os objetivos citados:

- Tanto as caracterizações físicas quanto a química do solo apresentaram-se adequadas para a aplicação das técnicas de bioremediação.
- O equipamento de aeração foi projetado e construído, tornando possível a bioestimulação com ar comprimido.
- As análises de quantificação microbiológica mostraram que o solo natural, apresentou bactérias, fungos e actinomicetos em quantidades semelhantes a concentrações referenciadas para a profundidade em estudo.
- A atividade microbiana, avaliadas pela liberação de CO₂, apresentou diferenças significativas no período de 45 dias, apresentando melhores resultados para a Bioaugmentação em relação a Atenuação Natural.
- Determinar o teor de contaminante residual e verificar o potencial de descontaminação do solo através das técnicas Atenuação Natural, Bioaugmentação e *Bioventing*, foi realizado através do método de Cromatografia gasosa e pelo Método de Soxhlet.
- A CG realizada nos tratamentos com solo, indicou que a Bioaugmentação foi a melhor técnica de descontaminação de um solo residual de basalto contaminado com diesel; e a técnica *bioventing* foi mais eficiente na descontaminação de um solo residual de basalto contaminado com biodiesel. A Atenuação natural apresentou uma considerável degradação dos contaminantes, no entanto sabe-se que para a obtenção de resultados mais expressivos

nessa técnica é necessário um período de tempo maior, já que a degradação neste caso ocorre naturalmente.

- O Método Soxlet utilizando o hexano como solvente orgânico foi eficiente na solubilidade dos óleos diesel e biodiesel, porém, algumas adaptações ainda precisam ser pesquisadas, para que este método possa ser utilizado na determinação do teor de contaminante residual.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Bioestimular o solo com os nutrientes nitrogênio, fósforo e potássio nas concentrações de C:N:P:K ideais para o desenvolvimento das bactérias, acelerando o processo de biodegradação dos contaminantes.

- Monitorar e adequar os fatores ambientais como: temperatura, umidade e pH do solo, às necessidades microbiológicas.

- Utilização da cromatografia gasosa em todas as amostras do solo, para identificar o potencial de degradação das técnicas de bioremediação.

- No Método Soxlet, recomenda-se a utilização das amostras secas de solo, pois considerando o que o hexano ferve a 70°C, e tendo em vista a baixa volatilidade do diesel e do biodiesel (ponto inicial de ebulição 200°C), podem ser utilizadas amostras secas do solo, pois usando esse solvente não ocorrem perdas por volatilização dos contaminantes.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. Especificações e limites para o óleo diesel. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/doc/biodiesel/14%20_20rev_port_anp_p310_2001Ver%20biodiesel%20%2001%20set.pdf>. Acesso em: fev. 2007.

AMBIENTE BRASIL. Disponível em <<http://ambientebrasil.com.br/Biorremediação/microrganismos>>. Acesso em: nov. 2005.

APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1998.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6459: Solo – **Determinação do limite de liquidez**. Rio de Janeiro, 1984.

_____. NBR 6508: Grãos de solo que passam na peneira 4,8 mm – **Determinação da massa específica**. Rio de Janeiro, 1984.

_____. NBR 7180: Solo – **Determinação do limite de plasticidade**. Rio de Janeiro, 1984.

_____. NBR 7181. Solo: **Análise granulométrica**. Rio de Janeiro, 1984.

AZEVEDO, A. C de; DALMOLIN, R. S. D. **Solos e ambiente: uma introdução**. Santa Maria: Ed. Pallotti, 2004.

BAPTISTA, P. M., RIZZO, A. C. de. L. **Acompanhamento do processo de Atenuação Natural de solo contaminado por petróleo**. XII Jornada de Iniciação Científica do CETEM/MCT, 2004.

BARBER, D. A.; Martin. J. K. *The release of organics substances by cereal roots into soil*. New Phytologist. London. v. 76. p.69-80, 1976.

BENTO, F. M. et al. *Bioremediation of soil contaminated by diesel oil*. Brazilian Journal of Microbiology. 34(Suppl.1), 65-68, 2003.

BERNOTH, L. et al. *Biotechnologies For Remediation and Pollution Control in the Mining Industry*. Minerals & Metallurgical Processing, v.17 n.2, p. 105-111, 2000.

BORDEN, R. C.; GOMES, C. A.; BECKER, M. T. *Geochemical indicators of intrinsic bioremediation*. Ground Water, 33:180-189, 1995.

BOUCHER, A. et al. *Purification and Characterization of a chitosanase from streptomyces*. N 174. Appl. Microbiology Biotechnology. v.38,p.188-193, 1992.

BRADY, N. C.; BUCKMAN, H. O. **Natureza e propriedade dos solos**. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1994.

BRASIL. Decreto-Lei nº11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira, altera as leis nº 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999, e 10.636, de 30 de dezembro de 2002, e dá outras providências. Diário Oficial, Brasília, v.142, n.10, p.8, 14 jan. 2005. Seção 1. Disponível em: http://www.aneel.gov.br/biblioteca/remissiva_leg.cmfvalida=56810. Acesso em: dez.2006.

CARDOSO, E. J. B. N. et al. **Microbiologia do solo**. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992.

CAPELLI, S. M.; BUSALMEN, J. P.; SANCHES, S. R. de. *Hydrocarbon bioremediation of a mineral-base contaminated waste from crude oil extraction by indigenous bacteria*. International Biodeterioration and Biodegradation. v.47, 2001.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo. **Meio Ambiente**. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br>. Acesso em: nov. 2006.

CHANG, Y.Z.D., GERPEN, V.H.J., LEE, I., JHONSON, A.L., HAMMOND, G. E., MARLEY, J.S. J. Am. *Oil chem.* Soc. 73, 1996.

CUNHA, D. C.; LEITE, S. G. F. *Gasoline Biodegradation in Different Soil Microcosms*. Brazilian Journal of Microbiology. v.31, n.1. São Paulo. jan/mar. 2000.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Brasília: Embrapa Produção de Informação: Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1999.

EPA. Environmental Protection Agency. Disponível em: <http://www.epa.gov/indicators/bioremediation.roe/pdf.td.health.pdf>> Acesso em: maio 2006.

FERNANDES, F. M.; ALCÂNTARA, G. Z. **Bioremediação de solos: estado da arte.** Disponível em: <<http://www.Daqbi.cefet.br/professores/mauricio/pedologia/Bioremediacao%e7%e3odesolo.pdf>>. Acesso em: jan. 2007.

FRANKENBERGER, Jr. W.T. *Hydrocarbon contaminated soils and groundwater.* v.2, Chelsea: Lewis Publishers, 1992.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. *Selective media for isolation of Agrobacterium, Corynebacterium, Erwinia, Pseudomonas, and Xantomonas.* Phytopathology, v.60, p.969-976, 1970.

LANGENBACH, T. **A bioacumulação e persistência dos xenobiontes no ambiente.** Microbiologia do solo: desafios para o século XXI. Londrina, 1994.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. *Efficiency of indigenous and inoculated cold adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpine soil.* Applied and Environmental Microbiology, v.63, n.7, 1997.

MEURER, E. J. **Fundamentos de química do solo.** Porto Alegre: Gênese, 2000.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo.** Lavras: Ed. UFLA, 2002.

MOTA, S. **Introdução à Engenharia Ambiental.** 1ª ed. Rio de Janeiro: ABES, 1997.

MOURA, A. SAMARA, F. **O que são hidrocarbonetos.** Disponível em: <http://www.Bioremediacao\hidrocarbonetos\2 Rosas O que são os Hidrocarbonetos.htm>>. Acesso em: mar. 2006.

NATIONAL BIODIESEL BOARDS. In: Anais do Congresso Internacional de Biocombustíveis Líquidos a Partir de Óleos Vegetais. Instituto de Tecnologia do Paraná, Secretaria de estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior; Curitiba, PR, 19 a 22 de julho, 1998, p. 42.

NETO, P.F. da S., SANTOS, R., RIZZO. A. **Estudo da aplicação de material estruturante na biorremediação de solos contaminados por petróleo em biorreator.** Disponível em: http://www.cetem.gov.br/publicacao/serie_anais_XII_jic_2005/pedro%20Felix%20da%20%silva%20neto.pdf>.

PELCZAR, Jr. M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2ª ed. v.1. São Paulo: MAKRON Books, 1996.

OLSON, J. J. et al. *Biodegradation rates of separated diesel components*. Environmental Toxicology and Chemistry, v.18, n.11, 1999.

PELLIZARI, V. H.; LUZ, A. P. **Biodiversidade e dispersão dos genes catabólicos de microrganismos degradadores de compostos xenobióticos (PCBs) no ambiente**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

PEREIRA, L. T. C.; LEMOS, J. L. S. **Degradação de hidrocarbonetos de petróleo por *Aspergillus Niger* e *Penicillium Corylophilum***. Disponível em: <http://www.scielo.com.br/>. Acesso em: mar. 2006.

PETROBRÁS. Petróleo Brasileiro S.A. Óleo diesel. Disponível em: <<http://petrobras.com.br/oleodiesel>> . Acesso em mar.2006.

_____. Petróleo Brasileiro S.A. Biodiesel. Disponível em: <<http://petrobras.com.br/biodiesel>> . Acesso em nov.2006.

PRAMER, D.; SCHMIDT, E. L. *Experimental Soil Microbiology*. Burgess Publishing. Minneapolis. Minnesota, 1964.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. *Microbiology*. Boston: McGraw-Hill, 1999.

PRIMAVESI, A. **O Manejo ecológico do solo: agricultura em regiões tropicais**. São Paulo: Nobel, 3ª ed, 1981.

RAIMUNDO, R. S.; RIZZO, A. C. L. **Utilização de biorreatores no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo**. X Jornada de Iniciação Científica do CETEM/MCT. 2002.

_____. **Emprego de biorreator não convencional no tratamento de solo contaminado por petróleo**. XI Jornada de Iniciação Científica do CETEM/MCT. 2003.

_____. **Efeito da adição de surfactantes na biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em solos**. XII Jornada de Iniciação Científica do CETEM/MCT. 2004.

RAMOS, L. P. et al. **Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras.** Química Nova, v.23, p 531-537, abr. 2000.

REFAP. Refinaria Alberto Pasqualini. **Óleo diesel: o que é.** Disponível em: <http://www.refap.com.br/oleo_diesel.asp>. Acesso em: dez. 2005.

RICHARD, J. Y.; VOGEL, T. M. **Characterization of a soil bacterial consortiun capable of degrading diesel fuel.** *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.44, p. 93-100, 1999.

RODRIGUES, E. F. G. Biomassa microbiana e ciclagem de nutrientes. In: SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. **Fundamentos da Matéria Orgânica no Solo: Ecossistemas tropicais e subtropicais.** Porto Alegre, 1999. p. 127-143.

SARKAR, D. et al. **Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation.** *Environmental Pollution*, v.136, p. 187-195, 2005.

SIQUEIRA, J. O. et al. **Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental.** EMBRAPA, SPI, Brasília, DF, 1994.

SCHULLER, A. **Produção de biodiesel e controle de qualidade por cromatografia.** Disponível em: <http://www.perkinelmer.com.br/home/seminarios/biodiesel%20_%20prof.%20schuller.pdf>. Acesso em: jan. 2007.

SMITH, D.; ONIONS, A. H. S. **The preservation and maintenance of living fungi.** Kew: CAB. International Mycological Institute, 1983.

SPINELLI, L. de F. **Biorremediação, Toxicidade e Lesão Celular em derrames de gasolina.** 2005. Tese (Doutorado em Engenharia/Civil) – Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

SPINELLI, L.F.; SCHNAID, F.; SELBASC, P.A.; BENTO, F. M.; OLIVEIRA, J.R.; **Enhancing bioremediation of diesel and gasoline in soil amended with an agroindustrial sludge.** *Journal of the air & Waste Management Association*. vol. 55: 421-429, april 2005.

TAUK, S. M. **Biodegradação de Resíduos Orgânicos no Solo**. Disponível em: <http://www.sbgeo.org.br/rgb/vol20_down/2001-2-3-4/2001299.pdf> Acesso em: jul 2006.

THORNTON, H. G. *On the development of a standardized agar medium for counting soil bacteria with special regard to the repression of spreading colonies*. Annals of Applied Biology. Cambridge, v.9, p.241-274, 1922.

TEDESCO, M. J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. Boletim técnico nº 5, Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 1995.

TRINDADE, P. V. O. et al. *Evaluation of the biostimulation and bioaugmentation techniques in the bioremediation process of petroleum hydrocarbons contaminated soil*. Disponível em: <<http://ipec.utusa.edu/ipec/conf2002/trindadesoriano21.pdf>>. Acesso em: jan 2007.

URURAHY, P. F. et al. *Effect of aeration on biodegradation of petroleum waste*. *Revista de Microbiologia*. v. 29, n. 4, São Paulo, out/dez. 1998.

WHYTE, L. G. et al. **Assessment of the Biodegradation Potencial of Psychrotrophic Microorganisms**. *Can. J. Microbiol.*, 1996.

WOLLUM, A. G. Cultural Methods for Soil Microorganisms. In: MILLER, R. H.; KEENEY, D. R. *Methods of soil analysis: chemical and microbiologic properties*. Medson: Soil Science of Americam, p. 781-802, 1982.

ZHOU, E.; CRAWFORD, R. L. **Effects of oxygen, nitrogen and temperature on gasoline biodegradation in soil**. *Biodegradation*, v.6, p.127-140, 1995.