



UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL  
E AMBIENTAL

Área de Concentração: Infraestrutura e Meio Ambiente

Jaqueline Bonatto

BIOAUMENTAÇÃO *IN SITU* EM SOLO RESIDUAL DE  
BASALTO CONTAMINADO COM BIODIESEL

Passo Fundo

2013

JAQUELINE BONATTO

BIOAUMENTAÇÃO *IN SITU* EM SOLO RESIDUAL DE  
BASALTO CONTAMINADO COM BIODIESEL

Orientador: Prof. Dr. Antônio Thomé.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciane Maria Colla

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental da Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, como requisito a obtenção do título de Mestre em Engenharia.

Passo Fundo

2013

JAQUELINE BONATTO

BIOAUMENTAÇÃO *IN SITU* EM SOLO RESIDUAL DE  
BASALTO CONTAMINADO COM BIODIESEL

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

Data de Aprovação: Passo Fundo, 15 de março de 2013.

Doutor Antonio Thomé  
Orientador

Doutora Luciane Maria Colla  
Coorientadora

Doutor Manoel de Melo Maia Nobre  
Universidade Federal de Alagoas – UFAL

Doutor Nilo Cesar Consoli  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS

Doutor Pedro Domingos Marques Prietto  
Universidade de Passo Fundo – UPF

Doutora Evanisa Fátima Reginato Quevedo Melo  
Universidade de Passo Fundo – UPF

Passo Fundo  
2012

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus pela sua iluminação e conforto até mesmo nos momentos mais difíceis;

Aos meus pais, pelo apoio nos estudos, pelo incentivo e carinho incondicional, meu muito obrigada;

Agradeço aos meus irmãos, que sempre me deram força e apoio;

Ao meu namorado, pela paciência, atenção e carinho;

Um agradecimento especial, ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Thomé pelo incentivo, empenho, e pela sabedoria dedicada.

A professora Dr. Luciane Colla pela coorientação e auxílio.

À equipe do Laboratório de Geotecnia Ambiental, pela amizade, ajuda e contribuição na realização deste trabalho, principalmente aos amigos Amilton e Letícia.

Agradeço o apoio financeiro obtido da CAPES e PRONEX/FAPERGS, pelo auxílio financeiro da bolsa de pesquisa e na compra de equipamentos e materiais para realização da pesquisa.

E à todos aqueles que participaram de forma direta ou indireta para que eu alcançasse esse objetivo.

*“A possibilidade de realizarmos um sonho é o  
que torna a vida interessante.”*

*Paulo Coelho*

## RESUMO

A contaminação dos solos e das águas subterrâneas com hidrocarbonetos de petróleo tem sido alvo de preocupação em todo o mundo, nessas últimas décadas. Os vazamentos de tanques e os derrames acidentais em rodovias são as principais causas de contaminação do solo. O contato dessas substâncias com o meio oferece risco tanto a saúde humana quanto ao meio ambiente. Objetivou-se avaliar a degradação de biodiesel em solo através da técnica de bioaumentação *in situ*. A pesquisa seguiu os seguintes passos: projeto e montagem do equipamento, ensaio piloto, análise de degradação quantitativa de óleos e graxas, e qualitativa das cadeias carbônicas, através da cromatografia gasosa. Foi avaliada a influência da umidade e pH nos três raios e seis profundidades, e realizada a contagem microbiana pelo método NMP. Para a realização dos ensaios de biorremediação, foram moldadas amostras de solo indeformadas retiradas a uma profundidade média de 1,20 m com formato cilíndrico de 300 mm de altura e 300 mm de diâmetro. Os corpos de prova foram contaminados com biodiesel e analisados nos períodos de 0, 15, 30 e 60 dias. Os corpos de prova foram mantidos a temperatura controlada a 24°C. A dispersão do bioaumento ocorreu de forma homogênea nos corpos de prova e a extração do contaminante foi de aproximadamente 60% em 60 dias. O equipamento montado se mostrou de excelente aplicabilidade para aplicação da técnica de bioaumentação *in situ*.

**Palavras-chaves:** hidrocarbonetos, degradação, microrganismos.

## ABSTRACT

Contamination of soil and groundwater by petroleum hydrocarbons has been subject of concern throughout the world in recent decades. The tank leaks and accidental spills on highways are the main causes of soil contamination. The contact of these substances with the medium provides both human health risk for the environment. This research aims to evaluate will evaluate the degradation of biodiesel in soil using the technique of in situ bioaugmentation. The study involved the following steps: designing and assembling the equipment, test pilot, will be analyzed quantitatively, by analyzing oil and grease, and qualitatively, the degradation of carbon chains by gas chromatography, and, moreover, will be evaluated influence of moisture and pH in the three spoke and six depths, and performed the microbial count by NMP. To test of bioremediation, soil samples were molded no deformation removed to an average depth of 1.20 m with cylindrical shape of 300 mm height and 300 mm in diameter. The analyzes were evaluated in five determined times 0, 15, 30, 60 and 90 days of contamination. The CP were maintained at laboratory temperature. The dispersion of bioaugmentation occurred homogeneously in CP, and extraction of the contaminant was approximately 60% in 60 days. The assembled equipment mounted proved of great importance. Satisfactory results indicated good application of the technique of in situ bioaugmentation.

**Keywords:** hydrocarbons, degradation, microorganisms.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Diferentes fases presentes nas zonas insaturada e saturada .....	19
Figura 02. Reação global da transesterificação. ....	20
Figura 03. Hidrólise de um éster catalisado por lipases ou esterases. ....	37
Figura 04. Fluxograma da pesquisa. ....	43
Figura 05. Mapa de situação e localização da Área de Estudo. ....	45
Figura 06. Local de coleta do solo. ....	46
Figura 07. Esquema do sistema completo de bioaumentação. ....	48
Figura 09. Detalhe da haste de injeção. ....	50
Figura 10. Equipamento piloto montado. ....	51
Figura 11. Vista geral da haste de injeção. ....	52
Figura 12. Vista do furo da haste de injeção .....	52
Figura 13. Compactação do solo. ....	53
Figura 14. Corpo de prova finalizado. ....	54
Figura 15. Bloco de solo indeformado. ....	55
Figura 16. Moldagem dos corpos de prova. ....	55
Figura 17. Corpos de prova montados. ....	56
Figura 18. Contaminação dos corpos de prova. ....	57
Figura 19. Bactéria selecionada <i>Bacillus megaterium</i> . ....	58
Figura 20. Bactéria selecionada <i>Bacillus pumilus</i> . ....	59
Figura 21. Corpo de prova deformado com pressão injetada de 300 kPa. ....	63
Figura 22. Corpo de prova de 75 kPa. ....	64
Figura 23. Corpo de prova exumado – 75 kPa. ....	65
Figura 24. Umidade do corpo de prova de 75 kPa. ....	65
Figura 25. Dados da pressão de injeção durante o experimento com aplicação da pressão de 300 KPa. ....	67
Figura 26. Vista externa do corpo de prova injeção de pressão de 75 kPa. ....	67
Figura 27. Vista interna do corpo de prova com pressão de injeção de 75 kPa. ....	68
Figura 28. Variação das umidades entre as camadas do corpo de prova com pressão de 75 kPa. ....	69
Figura 29. Corpo de prova com pressão aplicada de 25 kPa. ....	70
Figura 30. Área de abrangência da pressão aplicada de 75 kPa no corpo de prova indeformado. ....	71

Figura 31. Área de abrangência do corpo de prova indeformado com pressão aplicada de 100 kPa. ....	72
Figura 32. Exumação do CP indeformado com pressão injetada de 100 kPa. ....	73
Figura 33. Variação da umidade ao longo da profundidade do corpo de prova, nos três raios estudados para o tempo inicial.....	74
Figura 34. Variação da umidade ao longo da profundidade do corpo de prova, nos três raios estudados para o tempo de 15 dias. ....	75
Figura 35. Variação da umidade ao longo da profundidade do corpo de prova, nos três raios estudados para o tempo de 30 dias. ....	76
Figura 36. Variação da umidade ao longo da profundidade do corpo de prova, nos três raios estudados para o tempo de 60 dias. ....	76
Figura 37. Variação do pH ao longo da profundidade e nos diferentes raios no tempo inicial. ....	77
Figura 38. Variação do pH ao longo da profundidade e nos diferentes raios no tempo 15 dias. ....	78
Figura 39. Variação do pH ao longo da profundidade e nos diferentes raios no tempo inicial de 30 dias.....	78
Figura 40. Variação do pH ao longo da profundidade e nos diferentes raios no tempo de 60 dias.....	79
Figura 41. Variação do NMP/g de solo ao longo da profundidade e nos diferentes raios no tempo de 0 dias. ....	81
Figura 42. Variação do NMP/g de solo ao longo da profundidade e nos diferentes raios no tempo de 15 dias. ....	82
Figura 43. Variação do NMP/g de solo ao longo da profundidade e nos diferentes raios no tempo de 30 dias. ....	83
Figura 44. Variação do NMP/g de solo ao longo da profundidade e nos diferentes raios no tempo de 60 dias. ....	83
A Figura 45 mostra o comportamento dos microrganismos durante o tempo de experimento. ....	84
Figura 45. Log NMP/g de solo nos diferentes tempos estudados. ....	84
Figura 46. Óleos e Graxas do contaminante ao longo da profundidade e nos diferentes raios para o tempo inicial. ....	85
Figura 47. Óleos e Graxas do contaminante ao longo da profundidade e nos diferentes raios para o tempo de 15 dias. ....	86

Figura 48. Óleos e Graxas do contaminante ao longo da profundidade e nos diferentes raios para o tempo de 30 dias. ....	87
Figura 49. Óleos e Graxas do contaminante ao longo da profundidade e nos diferentes raios para o tempo de 60 dias. ....	87
Figura 50. Interação entre as variáveis estudadas em relação aos Óleos e Graxas extraídos nos tempos.....	95
Figura 51. Gráfico dos efeitos principais para óleos e graxas. ....	95
Figura 51. Interação entre as variáveis estudadas em relação a umidade nos tempos estudados. ....	97
Figura 53. Interação entre as variáveis estudadas em relação ao pH nos tempos estudados....	98

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 PROBLEMA DE PESQUISA.....	14
1.2 JUSTIFICATIVA.....	15
1.3 OBJETIVO GERAL .....	17
1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
2.1 POLUIÇÃO DE SOLOS POR HIDROCARBONETOS.....	18
2.2 BIODIESEL .....	20
2.3 BIORREMEDIAÇÃO.....	22
2.3.1 Fatores que interferem no processo de biorremediação.....	24
2.3.1.1 Nutrientes .....	24
2.3.1.2 Umidade .....	25
2.3.1.3 pH .....	26
2.3.1.4 Temperatura.....	27
2.3.2 Técnicas de biorremediação.....	27
2.3.2.1 Atenuação natural monitorada.....	27
2.3.2.2 Bioestimulação .....	28
2.3.2.3 Bioventilação .....	31
2.3.2.4 Bioaumentação .....	32
2.4 MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE HIDROCARBONETOS.....	34
2.4.1 Processo de degradação do contaminante pelos microrganismos.....	36
2.5 JET GROUTING – TÉCNICA DE TRATAMENTO DE SOLOS .....	38
2.5.1 Parâmetros de execução do <i>Jet Grouting</i> .....	39
2.5.1.1 Velocidade de rotação da vara.....	39
2.5.1.2 Velocidade de subida.....	39
2.5.1.3 Composição da calda .....	41
2.5.1.4 Pressão do fluido aglutinante.....	41
2.5.1.5 Caudal.....	42
3 MÉTODO DA PESQUISA .....	43
3.1 Etapas da pesquisa.....	43
3.1.2 Planejamento experimental.....	44

3.2 LOCAL DE ESTUDO .....	45
3.3 SOLO .....	46
3.4 PROJETO DO SISTEMA DE INJEÇÃO .....	47
3.4.1 Montagem do equipamento.....	50
3.5 MONTAGEM DO EXPERIMENTO .....	53
3.5.1 Montagem dos corpos de prova deformados .....	53
3.5.2 Montagem dos corpos de prova indeformados .....	54
3.5.3 Contaminação do solo.....	56
3.6 COLETA DAS AMOSTRAS .....	57
3.7 PREPARO DO BIOAUMENTO .....	58
3.7.1 Seleção das bactérias para bioaugmentação .....	58
3.7.2 Preparo do inóculo (bioaugmentação) .....	59
3.8 DETERMINAÇÕES ANÁLITICAS .....	59
3.8.1 Óleos e Graxas .....	60
3.8.3 Determinação da Umidade.....	60
3.8.4 Contagem dos microrganismos.....	61
3.8.5 Determinação do pH .....	61
4.1 Realização dos ensaios pilotos.....	62
5. RESULTADOS .....	74
5.1 Umidade e pH.....	74
5.2 Contagem dos microrganismos .....	79
5.3 Óleos e Graxas .....	85
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	94
6.1 Óleos e graxas .....	94
6.2 Umidade .....	96
6.3 pH.....	97
7. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....	99
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	101
9. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	102
REFERÊNCIAS .....	103

## 1. INTRODUÇÃO

A contaminação dos solos e das águas subterrâneas com hidrocarbonetos de petróleo tem sido objeto de preocupação nas últimas décadas. Os pequenos e contínuos vazamentos favorecidos pelo envelhecimento dos tanques de estocagem, os derramamentos durante a operação de transferência de produtos; as falhas estruturais dos tanques ou a instalação inadequada são consideradas as principais fontes de contaminação dos solos e águas subterrâneas, e o contato destas substâncias com o meio físico podem afetar diretamente a população, oferecendo riscos à segurança das pessoas e dos ecossistemas.

Diante deste cenário, muitas pesquisas estão sendo realizadas na intenção de promover a remediação destas áreas contaminadas por hidrocarbonetos. Já existem diversas tecnologias de remediação para a remoção direta dos contaminantes, assim como para o aumento do potencial de biodegradação destes poluentes em áreas contaminadas.

A bioaugmentação é a introdução de microrganismos em ambientes exógenos para acelerar a biorremediação devido o aumento da população bacteriana.

A biorremediação de hidrocarbonetos derivados de petróleo é uma forma eficaz, econômica e ambientalmente correta, sendo considerada um método viável para o tratamento de hidrocarbonetos de petróleo em solos contaminados (ALEXANDER, 1999).

A eficiência da biorremediação é uma função da capacidade dos microrganismos degradarem os compostos xenobióticos presentes no solo. Portanto, aumentar a capacidade dos microrganismos degradadores, utilizando a técnica de bioaugmentação para promover a atividade dos microrganismos degradadores ou melhorar a eficiência da biorremediação, se tornou uma das alternativas eficazes para minimização dos impactos ambientais.

A intensidade da biodegradação dos hidrocarbonetos no solo é influenciada por vários fatores ambientais, como qualidade e quantidade de contaminantes, populações microbianas endógenas, propriedades do solo, pH, temperatura, conteúdo de água e disponibilidade de nutrientes (WALWORTH et al., 2003).

## 1.1 PROBLEMA DE PESQUISA

A forte industrialização e o desenvolvimento econômico do Brasil, principalmente, a partir da década de 70, exigiram grande estruturação de toda a cadeia produtiva dos derivados do petróleo, desde novas descobertas de campos de petróleo passando pela formação de vários pólos petroquímicos e o aumento das redes de distribuição, a ponta dessa cadeia.

Em 2010, segundo a Agência Nacional do Petróleo (ANP, 2011), no Brasil existiam 16 refinarias, 501 bases de distribuição, 387 distribuidoras, 38.235 postos de revenda e uma comercialização de aproximadamente 103 mil m<sup>3</sup>/dia dos principais derivados de petróleo.

Tendo em vista a grande cadeia de produção desses combustíveis na matriz energética, a probabilidade de vazamentos e de derrames durante o refino, o transporte, o armazenamento e a manipulação ainda é elevada.

A busca por fontes energéticas alternativas tem sido estimulada, devido à preocupação em diminuir os índices elevados de poluição e a dependência de combustíveis fósseis. Por esse motivo, vem sendo explorada cada vez mais a utilização de biocombustíveis, como o biodiesel cujas fontes são renováveis, podendo, desse modo, ser produzido a partir de óleos vegetais ou de gorduras animais.

Nessa mesma velocidade, o estudo de novas técnicas para remediação de áreas contaminadas vem sendo realizado, uma vez que vazamentos e derrames acidentais durante o refino, o transporte e, principalmente, durante a estocagem ainda são uma problemática constante.

Segundo um histórico de acidentes relacionados ao transporte de cargas perigosas no estado do Rio Grande do Sul, foram registrados, pela Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler/RS (FEPAM), no período de 1994 a julho/2011, 516 acidentes com produtos químicos das mais diversas origens. Aproximadamente 31% desse montante estavam relacionados ao derramamento de combustíveis tanto derivados do petróleo quanto de origem renovável, como o biodiesel, apresentando maior prevalência de acidentes ocasionados por derrame de óleo diesel. Dentro desse histórico, aproximadamente 94% dos acidentes ocorreram em rodovias ou ferrovias, sendo o solo, portanto, o compartimento ambiental mais impactado.

Com o intuito de mitigar as ocorrências de contaminação de combustíveis dessa natureza no solo, vem se utilizando cada vez mais estratégias de remediação para

descontaminar ambientes impactados. A biorremediação é uma técnica de remediação do local contaminado que utiliza processos biológicos.

A técnica de bioaugmentação utiliza a inserção dos microrganismos para acelerar o processo de degradação do contaminante. O elevado potencial do uso de microrganismos, apontados na literatura como agentes degradadores das mais diversas substâncias indica o tratamento biológico como um dos mais eficientes modos de reduzir os efeitos adversos dos hidrocarbonetos sobre o meio ambiente (ALEXANDER, 1999). Desta forma, a aplicação da técnica de bioaugmentação vem se destacando como uma das estratégias mais promissoras a serem adotadas no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo.

As técnicas de biorremediação são muito utilizadas para remediar áreas contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo em função do seu custo-benefício. No caso da bioaugmentação *in situ*, ainda não se tem conhecimento do comportamento e da distribuição espacial (radial) dos microrganismos inseridos no solo. Além disso, não encontram-se dados na literatura de formas de injeção *in situ* dos microrganismos selecionados para degradação de hidrocarbonetos de petróleo, de uma forma que abranja toda a área impactada.

Buscam-se as respostas para as seguintes questões: Qual a eficiência da técnica de bioaugmentação num processo de remediação de solo contaminado com biodiesel puro (B100)? Qual a influência da umidade no processo de bioaugmentação? Como ocorre a distribuição radial dos microrganismos inseridos no solo?

A hipótese deste estudo situa-se no fato de que o uso da técnica de bioaugmentação pode ser uma metodologia eficiente para a biodegradação do biodiesel. Caso esta hipótese seja correta, a pressão de injeção dos microrganismos abrangerá toda a área afetada e a umidade no meio influenciará o comportamento dos microrganismos no processo de degradação.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, o aumento de acidentes envolvendo transporte de petróleo e seus derivados com a consequente contaminação do ambiente por esses compostos, resultaram em pesquisas que objetivam isolar e identificar microrganismos com a capacidade de degradar

hidrocarbonetos de petróleo para uma eventual utilização em processos de recuperação das áreas poluídas.

A aplicação de processos biológicos ao tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo tem despertado um grande interesse das comunidades científica e industrial, nas últimas décadas. São processos de tratamento que utilizam microrganismos (bactérias, fungos e leveduras) para reduzir ou eliminar compostos orgânicos perigosos ao meio ambiente e à saúde humana, que se acumularam no ambiente. Entre as principais vantagens do emprego dos processos biológicos está o seu baixo custo, comparando-se com os processos convencionais (DAVIS et al., 1995).

Além disso, são processos naturais, com baixo consumo de energia e que causam poucas mudanças nas características físicas, químicas e biológicas do meio. Entre as técnicas biológicas de tratamento de solos contaminados, encontra-se a técnica de bioaugmentação. Nesta técnica, há a inserção de microrganismos selecionados no solo contaminado a fim de degradar o contaminante presente.

No Brasil, há uma grande quantidade de solos contaminados por hidrocarbonetos que precisam de tratamento de baixo custo e ambientalmente correto. A bioaugmentação é um processo que atende a esses quesitos. Contudo, o emprego desta técnica apresenta um desafio tecnológico devido à importância de se conhecer a influência dos microrganismos presentes no solo nos processos biodegradativos dos contaminantes.

Com a quantidade de microrganismos naturalmente presentes no solo, já ocorre degradação, mas esta ainda é muito lenta, sendo assim a estimulação das populações nativas é uma das melhores formas de aumento da atividade microbiana na área contaminada e melhor eficiência na degradação.

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

### 1.3 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do trabalho foi avaliar a degradação de biodiesel em solo através da técnica de bioaugmentação *in situ*.

### 1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

- a) Projetar e montar um equipamento para desenvolver a técnica de bioaugmentação *in situ*;
- b) Avaliar a distribuição espacial (radial e profundidade) da degradação qualitativa e quantitativamente;
- c) Avaliar a influência da umidade no processo de biorremediação.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 POLUIÇÃO DE SOLOS POR HIDROCARBONETOS

A poluição de solos por hidrocarbonetos de petróleo tornou-se uma preocupação ambiental em muitas partes do mundo. Os fatores que contribuíram para isso foram à forte industrialização e o desenvolvimento econômico do Brasil, a partir da década de 70, que exigiram grande estruturação de toda a cadeia produtiva dos derivados do petróleo, desde novas descobertas de campos de petróleo passando pela formação de vários pólos petroquímicos e o aumento das redes de distribuição (VAZ et al., 2008).

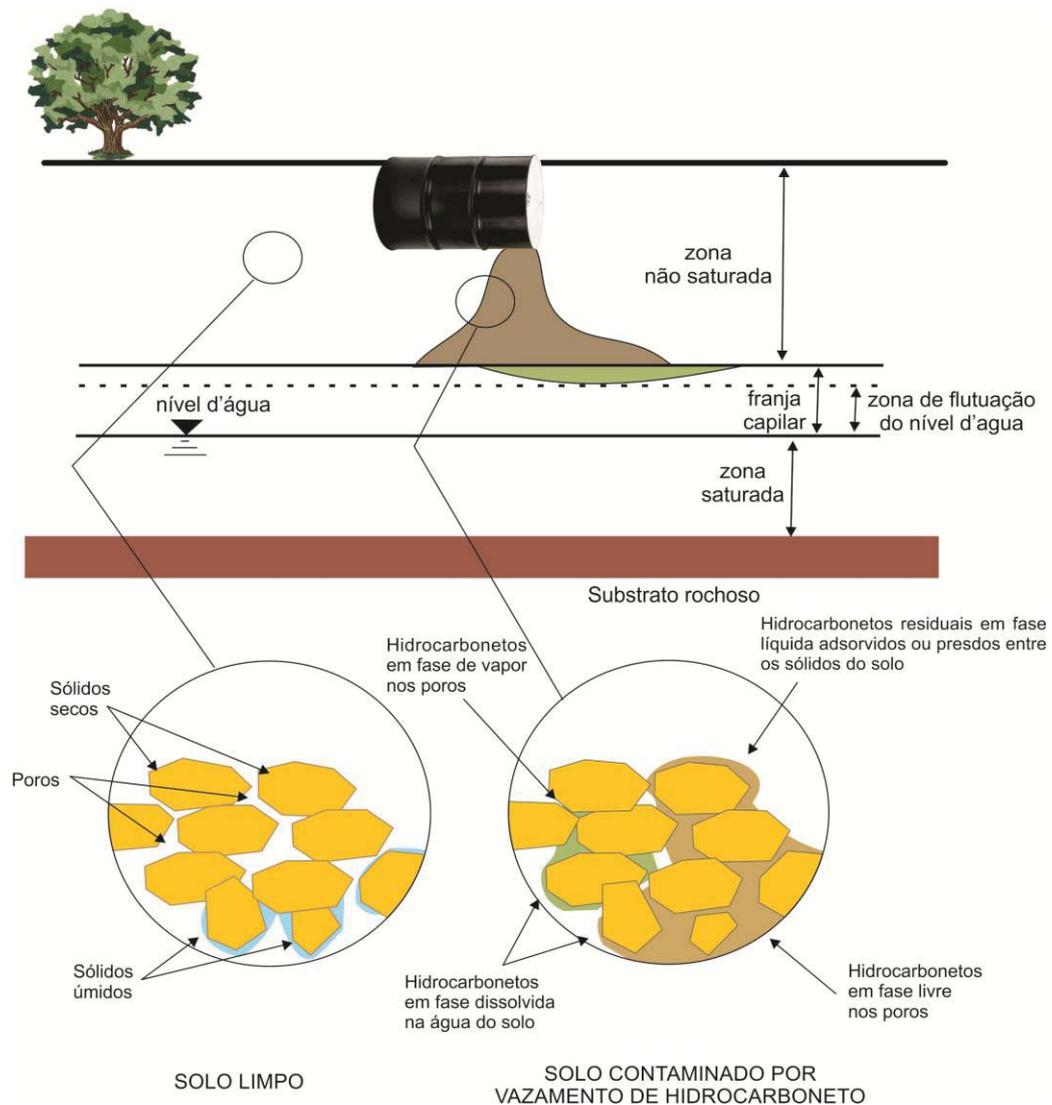
Diante de toda essa estrutura logística da produção e comercialização do petróleo e de seus derivados, as preocupações relacionadas ao potencial de contaminação de solos e águas subterrâneas, principalmente por vazamentos de tanques de armazenamento subterrâneos em postos de combustíveis, vêm crescendo (MARIANO, 2006).

Pearson e Oudijk (1993) relataram que as principais causas de vazamentos relacionados aos sistemas de armazenamento subterrâneos de combustíveis (SASC) encontrados nos postos de combustíveis são:

- a) Os tanques são frequentemente instalados sem nenhum cuidado, podendo provocar algum tipo de dano nas paredes;
- b) Os tanques normalmente não sofrem nenhum tipo de manutenção, permitindo, assim, que a corrosão se instale e comprometa a integridade do material. Tanques que ficam em contato direto com o solo também irão corroer mais rapidamente por causa da umidade e precipitação;
- c) Os SASC são frequentemente instalados sem a proteção catódica, e detectores de vazamentos;
- d) Os tanques são normalmente construídos de parede simples, sem revestimento com material anti-corrosivo;
- e) Oscilações do nível freático provocam condições mais favoráveis para a corrosão dos tanques e suas conexões quando são instalados na altura ou abaixo do nível freático. Água subterrânea com pH ácido pode acelerar a corrosão do tanque.

Segundo Mariano (2006) o transporte dos hidrocarbonetos no solo é caracterizado pela formação de quatro fases distintas que regulam o processo de migração do produto: fase líquida residual, fase líquida livre, fase dissolvida e fase vapor (Figura 1).

Figura 01. Diferentes fases presentes nas zonas insaturada e saturada.



Fonte: GUIGUER, 2000 apud MARIANO, 2006.

A fase líquida residual pode existir no solo como resíduos líquidos relativamente imóveis, adsorvidos ou retidos entre os sólidos do solo. O líquido livre não residual que passa pelo solo é chamado de fase líquida livre, que quando atinge o nível d'água subterrâneo passa a flutuar sobre o mesmo. Hidrocarbonetos em fase dissolvida podem estar presentes na superfície sólida do solo formando películas, ou na água do solo; quando atingem o nível

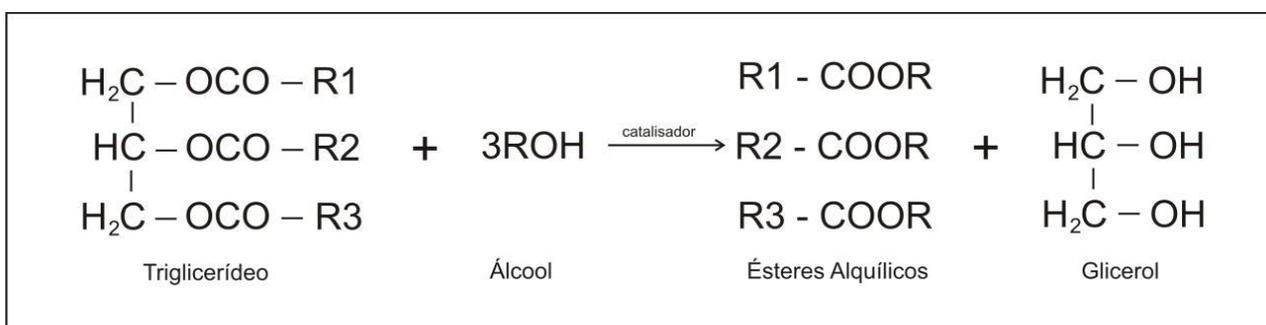
d'água subterrâneo formam a chamada pluma de contaminação. Os hidrocarbonetos em fase de vapor podem existir como componentes do vapor do solo, podendo também se condensar e adsorver-se na superfície sólida ou dissolver-se na água do solo (GUIGUER, 2000 apud MARIANO, 2006).

## 2.2 BIODIESEL

A possibilidade de uso de óleos vegetais como combustíveis é conhecida desde o final do século XIX. No entanto, combustíveis baseados em óleos vegetais passaram a ter importância após a crise do petróleo na década 70, quando os óleos vegetais, de grande importância na indústria de alimentos, passaram a ser testados como combustível, considerando-se uma alternativa ao diesel de petróleo (SCHLEICHER et al., 2009).

A constituição química do biodiesel é de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos de cadeia longa, os quais são obtidos, respectivamente, pela transesterificação de triacilglicerídeos (derivados de óleos vegetais ou de gordura animal) com metanol ou etanol. No processo de transesterificação, a reação entre os triacilglicerídeos e o álcool é catalisada por um ácido ou uma base, ou uma enzima (lipase), resultando na produção do biodiesel e de subprodutos como o glicerol (ANP, 2003).

Figura 02. Reação global da transesterificação.



Fonte: Adaptado de Freedman et al. (1986); Noureddini e Zhu (1997) apud POSSATO (2009)

A baixa complexidade estrutural do biodiesel é devido à sua composição ser predominantemente de oito diferentes ácidos graxos (C12-C18) metil esterificados, incluindo oleato, palmitato, estearato, linoleato, mirístico, laureato e linolenato, e a concentração de

cada ácido graxo variam de acordo com a fonte de origem do biodiesel (MURUGESAN et al., 2009 a, b). No entanto, o perfil de ácidos graxos do óleo de soja favorece o processo de oxidação deste biocombustível, devido a quantidade de ácidos graxos insaturados, principalmente ácido linoléico (C18:2) (53%), oléico (C18:1) (23%), palmítico (11%), linolênico (C18:3) (8%) e esteárico (C18:0) (4%) (DOMINGOS et al., 2007).

O processo de degradação oxidativa do biodiesel pode ser ativado pela luz, ou seja, está sujeito a degradação por foto-oxidação. Este tipo de oxidação é um mecanismo que envolve a adição direta de oxigênio singlete ( $O_2$ ) aos ácidos graxos insaturados. O oxigênio singlete reage diretamente com as duplas ligações presentes no óleo, produzindo hidroperóxidos (FERRARI e SOUZA, 2009).

Além da foto-oxidação, o biodiesel tende a se oxidar sob influência de outras condições abióticas como calor, umidade, ar atmosférico e metais. Uma das consequências da oxidação é o aumento da viscosidade do biodiesel, resultando em reações de condensação envolvendo as duplas ligações (KNOTHE, 2007).

Segundo Dias (2008) os óleos utilizados na base do biodiesel são higroscópicos por natureza, ou seja, facilmente absorvem e retêm umidade. No entanto, Gerpen et al. (1997) e Vieira et al. (2006) confirmam que o biodiesel apresenta uma grande afinidade com água. Esta propriedade higroscópica do produto eleva consideravelmente seu teor de água simplesmente ao entrar em contato com a umidade do ar. Vieira et al. (2006) verificaram que a capacidade de absorção de água do biodiesel é cerca de trinta vezes maior do que absorção de água do diesel de petróleo. Gerpen et al. (1997) constataram que o biodiesel de soja é capaz de absorver 40 vezes mais água do que o diesel. Posteriormente, Vieira et al. (2007) constataram que a capacidade de absorção de água, em misturas biodiesel/diesel, aumenta com o aumento do teor de biodiesel.

Segundo Bücker (2009) uma das vantagens do biodiesel (do ponto de vista ambiental), em relação ao diesel de petróleo, é sua maior biodegradabilidade, que estaria relacionada à ausência de moléculas aromáticas, disponibilidade de pontes de éster de alta energia, e as propriedades higroscópicas.

Segundo Pasqualino et al. (2006), o biodiesel é um combustível renovável limpo, obtido a partir de matérias-primas orgânicas, como óleos vegetais ou gordura animal, e principalmente produzido por meio da transesterificação do óleo ou gordura, com um álcool de cadeia curta na presença de um catalisador (geralmente, NaOH ou KOH). As propriedades físico-químicas do biodiesel são semelhante a do combustível diesel, e pode,

portanto, total ou parcialmente, substituir o diesel fóssil em motores de ignição por compressão. O biodiesel também tem muitas vantagens ambientais quando toma em consideração a redução na emissão de contaminantes, e é biodegradável e não-tóxico.

### 2.3 BIORREMEDIAÇÃO

A tecnologia de biorremediação tornou-se importante para a restauração de ambientes poluídos por resíduos de petróleo, pois utilizam a capacidade dos microrganismos em biodegradar ou biotransformar as mais diversas substâncias perigosas (DIBBLE e BARTHA, 1979; GENOUW et al., 1994; BALBA et al., 1998; MACNAUGHTON et al., 1999; RHYKERD et al., 1999; MISHRA et al., 2001; VASUDEVAN e RAJARAM, 2001; RAHMAN et al., 2003). A biorremediação possui a vantagem de ser um processo natural que promove a destruição ou a transformação a produtos menos tóxicos de muitos poluentes ambientais.

Desde as décadas passadas, as estratégias de biorremediação têm sido consideradas eficazes e de baixo custo para a remediação de solos contaminados por petróleo e de outros compostos orgânicos evitando proporcionar maiores distúrbios na área ambientalmente impactada (MORAIS, 2005).

A biorremediação de óleo diesel e misturas de diesel/biodiesel em solo pode ser promovida pela estimulação de microrganismos endógenos, com a introdução de nutrientes e oxigênio no solo (bioestimulação) (SEKLEMOVA et al., 2001), ou através da inoculação e introdução de um consórcio microbiano enriquecido no solo (bioaumentação) (RICHARD e VOGEL, 1999, BARATHI e VASUDEVAN, 2001 apud BENTO et al., 2004).

O tratamento biológico é sempre necessário para avaliar a viabilidade de testes em laboratório para determinar o potencial microbiano em degradar poluentes e avaliar estratégias para otimizar a taxa de degradação antes do projeto de escala real *in situ* ou *ex situ* (MARIANO et al., 2007).

Braddock e Cattedrall (1999) avaliaram a biorremediação como uma estratégia de tratamento de locais contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, esta técnica tem como dificuldade estabelecer em que ponto a degradação por microrganismos está ocorrendo.

Trindade (2002), Pala (2002) e Borges (2001) realizaram estudos voltados para a remediação de solo argiloso, contaminado com petróleo, utilizando a biodegradação como técnica.

No Brasil, a maioria dos solos apresenta elevados teores de argila, estes são denominados de Latossolos, que são os mais comuns e mais ricos em óxidos de Fe e Al (estes óxidos fixam bastante fósforo no solo) (RESENDE, 2002).

Tendo em vista que, os hidrocarbonetos são pouco solúveis em água, estes são facilmente adsorvidos pela argila ou frações de húmus no solo e sofrem partição lenta para a fase aquosa, no qual serão metabolizados pelos microrganismos (BARDI et al., 2000). De acordo com Huang et al. (2000), em solos insaturados, a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo será influenciada pela área de interface entre o óleo e a água. A área de interface, por conseguinte é um dos fatores limitantes para o crescimento microbiano e para a biodegradação.

As tecnologias de biorremediação *in situ* (atenuação natural, bioestimulação, bioventilação, bioaumentação) possuem baixo custo relativo quando comparadas à tecnologia *ex situ* (landfarming, compostagem, biopilhas e biorreatores). Entretanto, há uma grande dificuldade de aplicá-las na recuperação de solos contaminados por petróleo e/ou derivados quando estes apresentam características argilosas, bastante comuns no Brasil. Dentre as tecnologias *ex situ*, a utilização de biorreatores 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 biorreatores 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).

Trindade et al. (2002) relataram 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 das taxas de nutrientes (C:N:P) ao longo do processo.

### 2.3.1 Fatores que interferem no processo de biorremediação

#### 2.3.1.1 Nutrientes

Siqueira et al. (1999) destaca entre os macronutrientes, o carbono 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 e compostos aromáticos. Em ambientes naturais, o carbono é o nutriente que normalmente limita o crescimento microbiano sendo que os nutrientes inorgânicos estão presentes em quantidades que normalmente excedem as demandas das comunidades microbianas (ALEXANDER, 1999).

Além do carbono, outros nutrientes básicos (macronutrientes) exigidos para o desenvolvimento microbiano são o nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, fósforo, enxofre e, em baixo nível, diversos metais (Fe, Mn, etc.), podendo variar de acordo com o poluente (MARIANO, 2006).

Segundo Frankenberger (1992) e Spinelli (2005) o nitrogênio é a chave da produção de proteínas e ácidos nucleicos. O fósforo ocorre na natureza na forma de fosfatos inorgânicos e orgânicos, sendo os primeiros ( $\text{PO}_4^{-2}$ ) muito utilizados no crescimento microbiano, e os últimos utilizados sob a ação das enzimas fosfatases (SIQUEIRA et al., 1999). O fósforo é necessário na produção de ATP para funções metabólicas, além de constituir ácidos nucleicos, fosfolípidos e ácidos tecóicos (FRANKENBERGER, 1992; SPINELLI 2005).

Outros nutrientes que podem influenciar a degradação dos hidrocarbonetos no solo são o ferro e o enxofre, porque desempenham funções celulares que estão intimamente relacionadas ao metabolismo dos hidrocarbonetos, como a participação na estrutura das enzimas que realizam a degradação destes compostos nas células microbianas (JACQUES et al., 2007).

Para que um microrganismo utilize os compostos oleosos como fonte de carbono e energia para o seu crescimento é necessário que possua várias enzimas que transformam as complexas moléculas em intermediários comuns das suas rotas catabólicas (MORAES e TORNISIELO, 2009).

As fontes de nitrogênio mais comuns utilizados em solos contaminados incluem nitrato de amônia e ureia, sendo que a ureia não é muito utilizada porque os óleos refinados inibem a hidrólise da mesma para amônia e CO<sub>2</sub> (SPINELLI, 2005).

Horel e Schiewer (2009) em um estudo sobre a degradação de diesel e um combustível sintético afirmam que adicionando nutrientes (N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O) ao solo contaminado em uma relação de 300mg/kg, a remoção dos contaminantes foi 50% maior do que uma amostra sem a adição de nutrientes.

Gallego et al. (2001) e Gogoi et al. (2003) demonstraram que a biorremediação de solos poluídos por hidrocarbonetos de petróleo pode ser acelerada com a adição de nutrientes.

### **2.3.1.2 Umidade**

O teor de umidade do solo afeta diretamente a biodisponibilidade de contaminantes, a transferência de gases, o nível de toxicidade dos contaminantes, a movimentação e o estado de crescimento dos microrganismos e a distribuição das espécies (COOKSON, 1994).

Segundo Spinelli (2005), a água, ou umidade do solo é o veículo de transporte de nutrientes e do oxigênio para fora e dentro das células dos microrganismos. Pode estar presente em três formas, que são: livre, capilar (presente nos poros do solo e é aquela disponível para os microrganismos) e higroscópica (interage com a matriz do solo e não está geralmente disponível). A escassez assim como o excesso de água no solo é um fator limitante uma vez que as reações metabólicas dependem desta para ocorrer e o seu excesso pode inibir a passagem de oxigênio através do solo.

O volume total de poros de determinado solo varia de 50% a 60%, sendo 15% a 45% ocupados pela água e o restante por gases. Os gases presentes no solo são os mesmos encontrados na atmosfera (N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) além daqueles decorrentes da atividade biológica como, por exemplo, o CH<sub>4</sub> e o H<sub>2</sub>S (SIQUEIRA et al., 1999). Tanto os gases como a água competem pelo espaço poroso do solo. Dessa forma, pode-se estabelecer a seguinte relação: quando o solo está parcial ou totalmente preenchido por água, a disponibilidade de gases para os microrganismos é menor, ou seja, tem menos disponibilidade de oxigênio para as atividades metabólicas dos microrganismos e conseqüentemente menor degradação (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

A umidade do solo é essencial para a biodegradação uma vez que a maioria dos microrganismos vive no filme d'água em torno da partícula do solo. A degradação do óleo pelos microrganismos do solo ocorre na interface óleo-água (McGILL et al., 1981). O tamanho da interface óleo-água limita o espaço de adesão das bactérias e, conseqüentemente, um aumento desta área estimularia a degradação microbiana (POREMBA et al., 1993). A baixa solubilidade de compostos orgânicos em água limita a ação dos microrganismos. Segundo Ortega-Calvo et al. (1997), os microrganismos do solo degradam os compostos dissolvidos em água mais facilmente que aqueles sorvidos na matriz do solo.

De acordo com dados da literatura, o teor de umidade deve estar na faixa de 25-85% da capacidade de campo do solo, sendo a faixa ótima de 50-80% para a biodegradação de contaminantes em solo (WDNRBRRM, 2004). No entanto, não há unanimidade quanto ao teor ótimo de umidade, posto que alguns autores citam que este se encontra na faixa de 35-65% da capacidade de campo do solo (HUPE et al., 2001).

O principal problema da saturação do solo é a mudança de um ambiente aeróbico para outro anaeróbico. Em condição de anaerobiose, o metabolismo é drasticamente reduzido devido à própria falta de oxigênio e/ou a produção, nesta condição, de toxinas de origem microbiológica. Além disso, a mudança do sistema aeróbico para anaeróbico, normalmente acarreta alterações na relação número de células de fungos por números de células de bactérias, geralmente prejudicando o processo de biodegradação (ALMEIDA e CARVALHO, 1995).

### **2.3.1.3 pH**

O pH ótimo para a ação dos microrganismos é usualmente próximo da neutralidade, mas muitos microrganismos presentes nos solos podem agir sem prejuízos de suas funções para valores de pH entre 5 e 9 (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996). Tem sido relatado que o pH ideal para ação dos microrganismos presentes no solo deve estar entre 5,5 e 8,5 (CARDOSO,1992).

Wei et al. (2005) estudaram a degradação de lamas oleosas de petróleo, monitorando alguns fatores importantes para a degradação. Os valores ideais para degradação deste contaminante foram de pH 7 a 8.

#### **2.3.1.4 Temperatura**

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 entre outros. 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).

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que influenciam a atividade e a sobrevivência dos microrganismos (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996). Baixas temperaturas diminuem a fluidez e a permeabilidade da membrana celular, que controla o transporte de nutrientes (e contaminantes) entre o meio exterior e o interior da célula microbiana. Altas temperaturas são associadas com atividades enzimáticas mais altas e taxas de biodegradação mais rápidas, até um valor que é específico de cada espécie (CORSEUIL e WEBER, 1994).

Ferguson et al. (2003) também verificaram o efeito da temperatura na mineralização de petróleo em sedimentos coletados da Antártida e demonstraram que existe uma correlação positiva entre eles. Em temperaturas próximas ao ponto de congelamento da água foi verificado a ausência da mineralização dos hidrocarbonetos do petróleo enquanto que a 37°C e 42°C foram observadas as maiores taxas de mineralização o que surpreendeu os pesquisadores pois os microrganismos presentes no sedimento apresentaram temperaturas ótimas de crescimento entre 20 e 30°C.

Coulon et al. (2005) estudaram a influência da temperatura junto com adição de nutrientes na degradação de hidrocarbonetos de petróleo, para um solo da antártica. Os autores afirmam que o aumento da temperatura do solo de 4 °C para 20 °C favoreceu muito a degradação destes contaminantes.

### **2.3.2 Técnicas de biorremediação**

#### **2.3.2.1 Atenuação natural monitorada**

A atenuação natural é uma forma de remediação que envolve a atividade microbiana sem que haja intervenção humana, apenas o monitoramento do processo de degradação natural. É uma técnica simples, normalmente lenta, que depende dos processos naturais para reduzir a toxicidade da massa de um contaminante no solo (SCOW e HICKS, 2005). No entanto, as condições ambientais devem ser adequadas para se empregar tal técnica. Além disso, é necessária a presença de microrganismos nativos capazes de biodegradar o contaminante presente no solo (BAPTISTA, 2007).

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.

Meyer (2011) estudou a biodegradação de misturas de diesel/biodiesel em dois tipos de solos por atenuação natural, os autores verificaram que os solos argilosos degradaram mais facilmente que os solos arenosos, isso se deve, ao solo argiloso possuir mais CTC (capacidade de troca catiônica) que o solo arenoso, no entanto, auxiliando a quebra das ligações covalentes do xenobiótico. Neste estudo foram realizadas a quantificação de CO<sub>2</sub>, a atividade enzimática e a contagem de microrganismos. A contagem de bactérias diminuiu após o 13º dia de ensaios. O FDA (Hidrólise de Diacetato de Fluoresceína) se mostrou menor à medida que aumentava a concentração de biodiesel.

### **2.3.2.2 Bioestimulação**

A bioestimulação é uma técnica que estimula o crescimento da população microbiana pela adição de nutrientes ao solo e aceptores de elétrons.

Devido à elevação da população de microrganismos, decorrente da adição de nutrientes e aceptores de elétrons, os hidrocarbonetos são, supostamente, degradados mais rápidos na bioestimulação do que na biorremediação natural (SARKAR et al., 2005).

Margesin e Schinner (2001) compararam a biorremediação de solo poluído por óleo diesel com concentração inicial de 2612 mg/kg de solo através da atenuação natural e

bioestimulação por fertilizantes e verificaram redução de aproximadamente 70% no solo bioestimulado enquanto que no solo não tratado a redução foi de 50%. Estes autores relataram ainda que no solo que recebeu fertilizantes, o número de microrganismos, a respiração do solo e as atividades das enzimas catalase e lipase tiveram aumento significativo estando correlacionados com a diminuição da concentração de hidrocarbonetos.

Baptista et al. (2004) utilizaram a bioestimulação no tratamento de solos argilosos contaminados com petróleo e verificaram ser uma ferramenta a mais no emprego de microrganismos para biodegradação de xenobióticos, no entanto, é necessária a otimização do processo avaliando a relação de fontes de nutrientes necessárias, a temperatura e o pH.

Castro et al. (2005) utilizaram o nitrato de potássio ( $KNO_3$ ) e o peróxido de hidrogênio na biorremediação *in situ* de solos contaminados por petróleo, e observaram nos tratamentos dos quais foram aplicados o peróxido de hidrogênio e nitrato de potássio, respectivamente, que apresentaram reduções de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) de 86 e 91%, indicando que a adição dos compostos estimularam a biodegradação e descontaminação de solos com hidrocarbonetos de petróleo e que esta é uma técnica de remediação de subsolos contaminados, desde que os fatores limitantes que inibem a atividade dos microrganismos sejam adequados para que estes possam agir.

Mariano et al. (2007) estudaram a biodegradação do óleo diesel pelas técnicas de bioestimulação (adição de soluções de nitrogênio e fósforo ou surfactante Tween 80) e bioaugmentação (consórcio bacteriano isolado de um sistema de landfarming). A eficiência de degradação foi satisfatória nas duas técnicas utilizadas, mas se obteve melhores resultados quando adicionado nutrientes. A remoção de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) foram de 45,5% em 55 dias de tratamento.

Abdulsalam e Omale (2009) compararam as técnicas de bioaugmentação e bioestimulação em um solo contaminado com óleo de motor usado. Como resultado foi observado que o tratamento com bioestimulação foi o mais efetivo, sendo que quando acopladas ambas as técnicas também foi observada significativa degradação. O tratamento com bioestimulação obteve melhores resultados quando adicionado nutrientes para os microrganismos endógenos, os microrganismos tiveram uma maior atividade metabólica. Porém, quando o tratamento envolveu a inserção de microrganismos exógenos, houve uma competição maior de nutrientes entre os microrganismos endógenos e os exógenos.

Meneghetti et al. (2009) avaliaram a atividade microbiológica em solo argiloso contaminado com biodiesel, pelos processos de biorremediação: atenuação natural e

bioestimulação (NPK). A maior atividade microbiológica ocorreu nos tratamentos de bioestimulação, apresentando completa redução dos ácidos mirísticos (C14:0) e linolênico (C18:3), sendo que a maior eficiência de degradação foi de 90%.

Thomé et al. (2010), avaliaram a degradação do biodiesel no solo pelas técnicas de atenuação natural e bioestimulação. A técnica de bioestimulação foi a mais eficiente na descontaminação de um solo argiloso contaminado com biodiesel quando comparado ao processo de atenuação natural. A adição de nutrientes (N e P) resultou na maior taxa de degradação do biodiesel entre os tratamentos de biorremediação estudados, com 85% de remoção.

Liu et al. (2010) estudaram a biorremediação de um solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo, utilizando a técnica de bioestimulação com a adição de esterco na área contaminada. Após um período de 360 dias, os autores obtiveram uma remoção do contaminante de 58,2%.

Komilis et al. (2010) estudaram o efeito da adição de nitrogênio na biorremediação aeróbia de um solo contaminado com diesel. O solo foi contaminado artificialmente em uma concentração inicial de 2% de diesel. O nitrogênio foi adicionado como  $\text{NH}_4\text{Cl}$  em uma única carga no início do experimento, em concentrações de 0, 100, 250, 500, 1.000 e 2.000 mg N/kg de solo seco. Os resultados mostraram que as condições ideais para a degradação do diesel em função do teor de N adicionado foi de 250 mg N/kg qual resultou no maior consumo de oxigênio e conseqüentemente maior degradação do contaminante, assim a concentração de N ideal ficaria na faixa de aproximadamente 0,15 g N/g de diesel degradadas ou 1400 mg N/kg de solo seco, com base na concentração inicial de diesel utilizado no estudo.

Kauppi et al. (2011) estudou a biorremediação de um solo contaminado com óleo diesel em condições de frio. Foram adicionados nutrientes e oxigênio para bioestimulação e bactérias com sequencia de RNA clonados. O autor constatou que a bioestimulação favoreceu a biorremediação, enquanto o bioaumento não teve qualquer efeito adicional.

### 2.3.2.3 Bioventilação

A técnica de *bioventing* ou bioventilação como é conhecida, caracteriza-se pela adição de oxigênio no solo para estimular o crescimento dos organismos naturais e/ou introduzidos pela bioaumentação (MENEGHETTI, 2005).

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 aceptor 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 aceptor final de elétrons em substituição ao oxigênio.

Raimundo e Rizzo (2002) avaliaram a eficiência de remoção de petróleo de um solo areno-argiloso contaminado por óleo cru, através do uso de aditivos (nutrientes, microrganismos, surfactantes, enzimas comerciais, dentre outros), em um 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 20 L/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.

Cunha et al. (2004) estudaram a remediação de um solo residual de gnaiss (areno silteoso), contaminado com gasolina e etanol, com o uso de *bioventing*, observando o crescimento dos microrganismos no solo. Um fluxo constante de 13,8 kPa foi injetado por um compressor para garantir oxigenação constante do solo. Os autores concluíram que o *bioventing* é uma boa técnica para auxiliar na descontaminação do solo, mas que no caso de contaminação com gasolina não surtiu grandes efeitos, após 100 d de descontaminação.

Byun et al. (2005) realizaram o monitoramento de um solo arenoso contaminado artificialmente com diesel através da técnica de bioestimulação com oxigênio, analisando três diferentes vazões de ar que foram de 5, 10 e 20 mL/min. As amostras de solo foram contaminadas com 10 g TPH/Kg de solo e a relação C:N:P foi ajustada para 100:10:1. Os resultados para a remoção dos TPH (hidrocarbonetos totais de petróleo) em função da taxa de

ar foram muito semelhantes, sendo que o valor ótimo considerado para a degradação abiótica dos TPH foi de 5 mL/min. A degradação do compostos foi melhor avaliada fazendo a contagem microbiológica e atividade da desidrogenase.

Arrar et al. (2007) estudaram o efeito da injeção de ar em um solo silto arenoso contaminado com 4% de óleo diesel em massa seca. Os autores utilizaram um reator com 16 Kg de solo contaminado, adicionando nitrogênio e fósforo, ao solo para se chegar à relação C:N:P de 100:10:1 e capacidade de campo de 60%. Foram montados dois reatores, sendo que um foi utilizado como controle. A análise da degradação foi feita através de cromatografia gasosa. A degradação foi mais rápida durante os primeiros 7 d, após esse período houve uma diminuição e uma estabilização após 10 d. A remoção proporcional de óleo diesel chegou a 68,7%, 76,5% e 82,0% para as respectivas velocidades de fluidização de 9,9 cm/s, 13,4 cm/s 18 cm/s (que corresponde as respectivas vazões de 1049, 1415 e 1900 mL/min).

#### **2.3.2.4 Bioaugmentação**

A bioaugmentação é um processo em que se adicionam culturas microbianas (exógenas ou endógenas) no meio contaminado.

De acordo com a legislação brasileira, que dispõe sobre os processos de remediação, só é permitida a inoculação de microrganismos autóctones, considerando que, em função de suas peculiaridades ou de um uso inadequado, os microrganismos alóctones podem acarretar desequilíbrio no ecossistema e danos ao meio ambiente (BRASIL, 2002).

Cunningham e Philp (2000) compararam em seu estudo as técnicas de bioaugmentação e bioestimulação em tratamento *ex situ* em solo contaminado com óleo diesel, e mostraram que a técnica de bioaugmentação foi mais efetiva, e que a adição de nutrientes não teve significativa mudanças de remoção.

Pellizari e Luz (2000), afirmam que os microrganismos capazes de degradar um xenobiótico específico são encontrados com maior frequência nos locais contaminados previamente com o poluente.

Quanto à eficiência do bioaumento, foi observado por Trindade (2002), quando houve a adição de microrganismos com habilidade para degradar o óleo cru, isolados do próprio solo, permitiu eliminar a fase de adaptação dos microrganismos no solo contaminado.

Bento et al. (2003) utilizou a técnica de bioaumentação e obteve uma degradação de 75 % do poluente após duas semanas de experimentos, os microrganismos utilizados foram bactérias selecionadas de um solo contaminado.

Rizzo e Raimundo (2003) avaliaram as técnicas de bioaumentação e bioestimulação no tratamento de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo, com teor de umidade de 50% da capacidade de campo. Os autores verificaram que a condição em que foi empregada a junção das técnicas, com bioestimulação na relação C:N:P de 100:1,25:1 e a bioaumentação empregando inóculo de  $10^8$  UFC/g solo, foi a que apresentou maior eficiência de degradação do contaminante.

Mariano et al. (2009) investigou a eficiência da técnica de bioaumentação em solos contaminados com óleo diesel, em escala laboratorial. Os autores testaram diferentes culturas de bactérias e inóculos comerciais, e a que mostrou-se mais eficiência na biodegradação do óleo diesel foram as *Staphylococcus hominis* e *Kocuria palustris*.

Karamalidis et al. (2010) estudaram a técnica de bioaumentação com microrganismos encapsulados, cepas únicas e microrganismos livres em solo arenoso. Os autores constataram que os microrganismos encapsulados tem mais eficiência que os microrganismos livres, pois o encapsulamento das células microbianas permite que os microrganismos permaneçam protegidos por mais tempo, facilitando a sua sobrevivência no ambiente contaminado.

Li et al. (2010) estudaram a biorremediação de solo contaminado com borra oleosa pela estimulação de microrganismos endógenos e verificaram que a inserção de microrganismos endógenos por bioaumentação mostrou-se eficiente, apresentando degradação de 58,2 %.

Lebkowska et al. (2011) pesquisou os impactos do bioaumentação múltiplo no tratamento do solo contaminados por combustíveis. O bioaumentação múltiplo de solo com microrganismos indígenas esta sendo aplicada na biorremediação de solo contaminado com altos níveis de concentração de diesel ou outros hidrocarbonetos. A inoculação múltipla de solo com indígenas microrganismos foi então aplicada e o processo teve eficiência de 80% e 98% de remoção de TPH para os solos tratados.

A junção da técnica de bioaumentação com a técnica de bioestimulação tem sido sugerida em muitos trabalhos (CUNNINGHAM e PHILP, 2000; RIZZO e RAIMUNDO, 2003; BENTO et al., 2005; MARIANO et al., 2007), por diminuir o tempo da biorremediação.

## 2.4 MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE HIDROCARBONETOS

Os microrganismos são os principais agentes responsáveis pela ciclagem do carbono na natureza. Em muitos ecossistemas existe uma comunidade autóctone de microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos (hidrocarbonoclasticos) (KATAOKA, 2001).

Gutnick e Rosenberg (1977) avaliam 3 características essenciais para a utilização de hidrocarbonetos pelos microrganismos:

- a) um sistema eficiente de absorção de hidrocarbonetos com sítios especiais de ligação e/ou produção de substâncias biosurfactantes para o transporte do hidrocarboneto ao interior da célula;
- b) enzimas oxigenases específicas;
- c) especificidade induzida – resposta positiva do organismo ao hidrocarboneto.

As bactérias, os fungos e as leveduras são os principais agentes biotransformadores devido à habilidade em degradar uma ampla variedade de substâncias xenobióticas, normalmente encontradas em resíduos de indústrias de óleo (URURAHY et al., 1998). Bactérias e leveduras aparentam ser os principais responsáveis pela degradação dos hidrocarbonetos em ambientes aquáticos enquanto que fungos e bactérias são dominantes no solo (HANSON, 1997 apud BALBA et al., 1998).

Cho et al. (1997) desenvolveram experimentos em escala de laboratório sobre a biorremediação de solo contaminado por petróleo durante a guerra do Golfo em 1991 e verificaram que as frações saturadas de petróleo foram mais rapidamente degradadas comparadas às frações aromáticas pelos microrganismos isolados do local. As principais espécies de bactérias encontradas no solo biorremediado que supostamente foram as responsáveis por essa degradação foram *Rhodococcus sp.* e *Nocarida asteróide*.

Palittapongarnpim et al. (1998) isolaram duas linhagens de leveduras de solos contaminados por óleo e foram identificadas como *Candida tropicalis*. Estas duas linhagens mostraram ser capazes de degradar óleo cru, porém com diferentes capacidades. A linhagem mais eficiente degradou 87,3% do petróleo total sendo que 99,6% dos n-alcanos foram degradados. Isso demonstrou que diferentes linhagens de uma mesma espécie de microrganismo podem apresentar diferenças na habilidade em degradar hidrocarbonetos de petróleo.

Ururahy et al. (1998) estudaram a viabilidade técnica do tratamento biológico de borra oleosa em escala de bancada. A partir de estímulo de microrganismos nativos presentes no resíduo oleoso, concluíram que os mesmos foram capazes de crescer em meio contendo borra de óleo como única fonte de carbono e energia. A identificação desses microrganismos revelou a presença das bactérias *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas picketti*, *Flavobacterium indologenes*, *Xanthomonas maltophilia* e *Ochrobactrum anthropi*, das leveduras *Candida tropicalis* e *Rhodotorula mucilaginosa*, além de duas espécies de fungos filamentosos.

Li et al. (2000) isolaram bactérias como *Xanthomonas*, *Bacillus* e *Hyphomicrobium* de área contaminada por petróleo a mais de 25 anos, verificando que estas eram potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos. Barathi e Vasudevan (2001) isolaram uma linhagem de *Pseudomonas fluorescens*, também de solo contaminado por petróleo, com capacidade em degradar várias frações de hidrocarbonetos.

Microrganismos com habilidade em utilizar hidrocarbonetos de petróleo podem ser encontrados em áreas poluídas ou áreas que não tiveram contato prévio com esses poluentes. A quantidade de microrganismos, porém, que apresentam essa habilidade geralmente é maior no local que foi impactado. Além disso, nas áreas expostas a esses poluentes, a condição de estresse ocasionada pode selecionar melhores linhagens com habilidade em degradar tais compostos. Os microrganismos presentes em solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo provavelmente estão adaptados a esse ambiente e podem utilizar este poluente como fonte de carbono e energia.

Segundo Rosato (1997), o processo de adaptação dos microrganismos ocorre através de três mecanismos interrelacionados: indução e/ou desrepressão de enzimas específicas, mudanças genéticas que resultam na aquisição de novas atividades metabólicas e enriquecimento seletivo de organismos capazes de transformar os compostos.

O uso de culturas mistas de microrganismos eucariotos e procariotos pode ser mais eficiente na biodegradação do petróleo, por ser este uma mistura complexa de compostos (BALBA, et al., 1998). Muitos trabalhos quanto à biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo demonstraram o uso de consórcio de microrganismos (LI et al., 2000; MISHRA et al., 2001; VASUDEVAN e RAJARAM, 2001), pois sua capacidade biodegradativa é maior quantitativamente e qualitativamente quando comparado com a cultura pura. A comunidade mista pode também apresentar maior resistência frente às substâncias tóxicas, pois é maior a probabilidade de que um organismo que tenha a capacidade de detoxificá-las estar presente.

Finalmente, sendo o petróleo e seus resíduos macromoléculas, a utilização de culturas mistas permite uma sucessão de ataques aos mesmos, proporcionando no final uma completa degradação do poluente (GRADY, 1985 apud KATAOKA, 2001).

Ao contrário das bactérias e leveduras que mostram decréscimo na capacidade de degradação de alcanos com o aumento da cadeia do composto, os fungos filamentosos parecem ser mais hábeis em degradar ou transformar hidrocarbonetos de estrutura complexa e de cadeia longa. Entretanto, o metabolismo dos fungos geralmente resulta numa degradação incompleta que necessita da associação de bactérias para alcançar a completa oxidação do composto (RISER-ROBERTS, 1992).

#### **2.4.1 Processo de degradação do contaminante pelos microrganismos**

O crescimento dos microrganismos em uma interface de óleo/água favorece o aparecimento de um biofilme, cuja formação envolve as seguintes etapas: primeiro os microrganismos aderem a superfície de grandes gotas de óleo devido a hidrofobicidade das células, em seguida as células aderidas forma uma camada delgada na interface óleo/água, extraíndo os compostos insolúveis em água da fase oleosa e utilizando os sais minerais da fase aquosa. Quando as células revestem as gotas de óleo produzindo biossurfactantes, a tensão interfacial disponível é reduzida favorecendo o crescimento microbiano. Quando o composto oleoso contido nas gotas desaparece, os microrganismos colonizam outras gotas (BENTO, 2005).

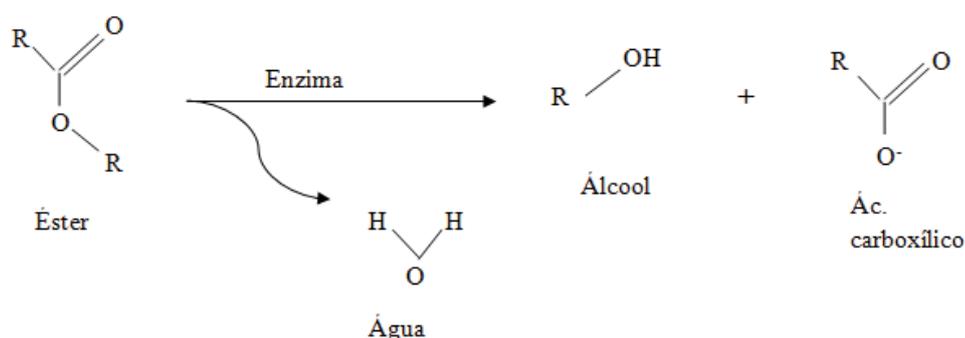
A taxa e a extensão da biodegradação de compostos orgânicos no solo, principalmente, para compostos hidrofóbicos, são afetadas pelas complexas interações entre as moléculas dos contaminantes, as partículas do solo, da água intersticial e dos microrganismos degradadores dos contaminantes (SEABRA, 2005).

A questão da sorção ainda não é bem estudada, porém a sorção do contaminante pela superfície sólida da argila pode inibir a biorremediação por inacessibilidade dos microrganismos presentes ao composto sorvido (SCHMIDT, 2004). De acordo com Alexander (1994) alguns microrganismos são capazes de biodegradar compostos sorvidos e outros apenas os compostos em solução aquosa.

À degradabilidade do biodiesel, enzimas extracelulares como lipases e esterases têm o potencial de hidrolisar ligações de éster, atuando em uma variedade de xenobióticos de origem lipídica resultando, assim, em álcoois e ácidos graxos como produto da oxidação (Boczar et al., 2001).

Segundo Meyer (2011), o mecanismo de hidrólise a partir de uma lipase ou esterase é composto por quatro etapas principais. Primeiro, o substrato se liga a uma serina ativa da enzima; em segundo lugar, um álcool é liberado e um complexo acetil-enzima é formado. Em seguida, há um ataque de uma forma nucleofílica (água em hidrólise, álcool ou éster), transformando-se em um intermediário tetraédrico. Por último, este intermediário é convertido em produto (um ácido ou um éster), e a enzima se desprende do substrato, tornando-se livre novamente (BORNSCHEUER, 2002).

Figura 03. Hidrólise de um éster catalisado por lipases ou esterases.



Fonte: Adaptado de Santos, 2009.

As lipases atuam preferencialmente na degradação de ácidos graxos de cadeia longa, as esterases hidrolisam ésteres simples e triglicerídeos com cadeias relativamente mais curtas de, no máximo, C6. Além disso, se por um lado, as esterases obedecem à cinética clássica de Michaelis-Menten e atuam em substratos somente solúveis em água; as lipases, ao contrário, estão ativas em soluções hidrofóbicas saturadas e apresentam sua atividade drasticamente aumentada no momento em que começam a entrar em contato com uma concentração mínima desses substratos, sendo estes organizados em micelas ou em gotas de emulsão (MEYER, 2011).

## 2.5 JET GROUTING – TÉCNICA DE TRATAMENTO DE SOLOS

A técnica de tratamento de solos *Jet Grouting* consiste no melhoramento das características geotécnicas dos terrenos, realizado no interior do terreno sem escavação prévia, através da injeção a altas pressões (de 20 a 40 MPa). A injeção de calda de cimento é executada através de jatos horizontais, provenientes da transformação de energia potencial de injeção da calda em energia cinética, que tem a capacidade de desagregar a estrutura do terreno natural e assim misturar as partículas do solo com a calda de cimento, proporcionando um material resultante com melhores características mecânicas e de menor permeabilidade do que o terreno original (PINTO, 2009).

A utilização desta técnica tem desempenhado uma função de grande importância nas construções de Engenharia Civil em meio urbano, áreas de grande ocupação urbana. A realização de fundações indiretas, reforço e recalques de fundações, a execução de contenções através de cortinas de colunas de *Jet Grouting*, são alguns exemplos onde a utilização desta técnica de tratamento de solo tem sido frequente (PINTO e FALCÃO, 2010).

A técnica *Jet Grouting* apresenta uma grande versatilidade no melhoramento dos solos, uma vez que pode ser aplicada num elevado tipo de solos. Pode ser utilizada desde em solos incoerentes, tais como areias, seixos e cascalho assim como em solos coesivos como é o caso da argila e das siltes (RIBEIRO, 2010).

A técnica do *Jet Grouting* tem evoluído bastante, de forma a adequar-se às diversas situações que são propostas, sendo assim houve necessidade de desenvolver vários sistemas de injeção, que são os seguintes:

- a) Sistema de Jet 1 ou simples;
- b) Sistema de Jet 2 ou duplo;
- c) Sistema de Jet 3 ou triplo.

Para todos os sistemas é necessário definir os seguintes parâmetros:

- a) Pressão e Caudal do cimento;
- b) Número e diâmetros dos bicos de injeção;
- c) Relação entre a água e o cimento;
- d) Velocidade de subida e rotação da vara.

### 2.5.1 Parâmetros de execução do *Jet Grouting*

Conforme Ribeiro (2010), no sistema de *Jet Grouting* é necessário definir um conjunto de parâmetros no projeto de dimensionamento, tais como: velocidade de subida e rotação da vara, pressão, injeção de calda, caudal injetado, diâmetro e número de injetores e relação água/cimento (a/c), conforme as equações apresentada por Carreto (2000).

#### 2.5.1.1 Velocidade de rotação da vara

A equação da velocidade de rotação da vara é o número mínimo de rotações num determinado tempo e em cada passo de injeção, sendo em geral duas por passo por bico de injeção. A velocidade de rotação da vara é dada pela Equação 1.

$$Vr = \frac{2}{\frac{1}{Vs} \text{passo}} \quad (1)$$

Onde:

- Vr [rpm]

- Vs [m/min]

#### 2.5.1.2 Velocidade de subida

A velocidade de subida da vara depende do tipo solo, em solo não coesivos o jato tende a dispersar-se desagregando as partículas numa área de influência superior, em solo coesivos o jato tende a concentrar-se devendo, assim, optar-se por reduzir o passo, de forma a evitar que porções de argilas permaneçam ligadas. Geralmente adota-se passo da ordem dos 4 centímetros em solos argilosos (em 19 segundos) e da ordem de 8 centímetros (em 19 segundo) para solos arenosos, isto é, a velocidade de subida da vara é o tempo que a vara demora a subir um determina espaço. A velocidade de subida é determinada através da Equação 2.

$$V_s = \frac{Q \cdot \varphi \text{ calda}}{C \cdot (1 + \frac{a}{c})} \quad (2)$$

Sendo:

$V_s$  [m/min]

$Q$  [m<sup>3</sup>/min]

$\varphi$  [Kg/m<sup>3</sup>]

$C$  [Kg/m]

No Quadro 1 estão representados os valores característicos para os diferentes parâmetros que variam dependendo do sistema, conforme Pinto (2009):

Quadro 1: Valores característicos dos parâmetros dos sistemas de *Jet Grouting*.

		Sistema Simples		Sistema Duplo		Sistema Triplo	
		Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
<b>Pressão de Injeção da calda (MPa)</b>		20	60	30	60	3	7
Fluxo de calda (L/min)		40	120	70	150	70	150
Pressão de Injeção de ar (MPa)		-	-	0,6	1,2	0,6	1,2
Fluxo de ar (L/min)		-	-	2000	6000	2000	6000
Pressão de Injeção de água (MPa)		-	-	-	-	20	50
Fluxo de água (MPa)		-	-	-	-	70	150
Diâmetro do bocal	Injeção de calda (mm)	1,5	3	1,5	3	4	8
	Injeção de água (mm)	-	-	1	2	1	2
	Injeção de ar (mm)	-	-	-	-	1,5	3
Velocidade de rotação (rpm)		10	25	5	10	5	10
Velocidade de subida (rpm)		10	50	7	30	5	30

### 2.5.1.3 Composição da calda

Tendo em consideração que a injeção de calda no terreno provoca alterações no solo, uma vez que o tipo de cimento, as relações água/cimento (a/c) e adição de adjuvantes alteram a viscosidade e consistência do mesmo, é de elevada importância a composição das caldas de cimento no resultado final de qualquer tratamento de terrenos. Na constituição da calda de cimento podem existir diferentes relações água/cimento, há que referir que uma das causas possíveis para a instabilidade das caldas é a menor concentração de cimento face a da água. Assim, é possível verificar que quanto menor a quantidade de cimento menor será a viscosidade do terreno, isto é, a consistência da calda será menor quando a/c for maior. Por exemplo, quando a relação a/c é inferior a 0,4, a consistência da calda é reduzida; por outro lado, se a relação a/c for superior a 0,6 a viscosidade do material será aceitável.

A equação do consumo de cimento é deduzida através da Equação 3, colocando a expressão em função da composição da calda (CARRETO, 2000).

$$C = \frac{Q \cdot \left(\frac{1}{v_s}\right) \cdot \gamma_{calda}}{1+a/c} \quad (3)$$

### 2.5.1.4 Pressão do fluido aglutinante

Carreto (2000) explica que a pressão (P) que se aplica ao fluido aglutinante na técnica de *Jet Grouting* é fundamental, uma vez que apresenta um efeito essencial no corte e erosão do solo. É de notar que a pressão é o fator determinante no diâmetro da coluna, isto é, o raio de influência da calda é condicionado pela pressão que se impõe. Como referido anteriormente, os solos finos apresentam uma maior coesão, logo um índice de vazios menor, o jacto de calda não penetra com tanta facilidade quando comparado com solos com maior porosidade, como por exemplo, as areias e seixos. Assim, a pressão a aplicar varia consoante a coesão do solo, isto é, quanto maior a coesão maior terá de ser a pressão a aplicar de forma a desagregar de uma melhor forma o terreno. A pressão define-se através da Equação 4.

$$P = \frac{2.I}{\pi.D_o^2} \quad (4)$$

Sendo:

P – [MPa]

Q - [m<sup>3</sup>/min]

φ – [Kg/m<sup>3</sup>]

C – [Kg/m]

Deduzindo através da Equação 4 é possível obter um fator relevante na execução da técnica, o impacto dinâmico, este fator intervém no mecanismo físico do jacto sendo expresso pela Equação 5.

$$I = 2 \cdot \frac{\pi.D_o^2}{4} \cdot p \quad (5)$$

Sendo:

D<sub>o</sub> – [m]

P – [MPa]

### 2.5.1.5 Caudal

Segundo Carreto (2000), o caudal injetado (Q) no furo depende essencialmente do sistema de Jet utilizado. Deduz a partir da Equação 6 da seguinte forma.

$$Q = \frac{V_s \cdot C \cdot (1 + \frac{a}{c})}{\gamma_{calda}} \quad (6)$$

Sendo:

Q – [m<sup>3</sup>/min];

V<sub>s</sub> – [m/min]

C – [Kg/m]

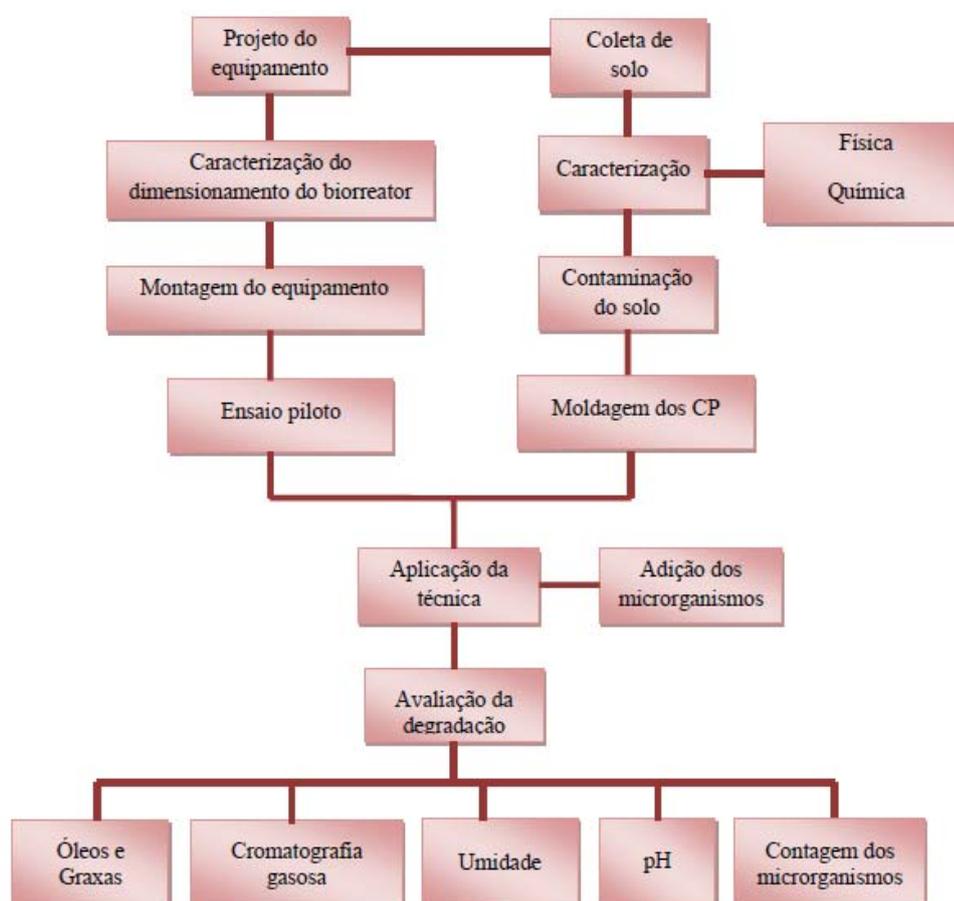
γ – [Kg/m<sup>3</sup>]

### 3 MÉTODO DA PESQUISA

#### 3.1 Etapas da pesquisa

A Figura 04 apresenta o fluxograma das etapas da pesquisa.

Figura 04. Fluxograma da pesquisa.



### 3.1.2 Planejamento experimental

Para fins de planejamento dos experimentos, definiram-se as variáveis de resposta, de controle e de ruído, conforme apresentado no Quadro 2.

Quadro 2. Variáveis de resposta, controle e ruído.

<b>Resposta</b>	<b>Controle</b>	<b>Ruído</b>
Teor de Óleos e Graxas	Raio de dispersão	Contaminação do equipamento (biorreator)
Variação da Umidade	Profundidade	Contaminação do contaminante
Contagem dos microrganismos	Tempo	Contaminação das vidrarias utilizadas
pH		Contaminações e erro de leitura da cromatografia gasosa.

Os níveis estudados das variáveis de controle são apresentados no Quadro 3.

Quadro 3. Níveis das variáveis de controle

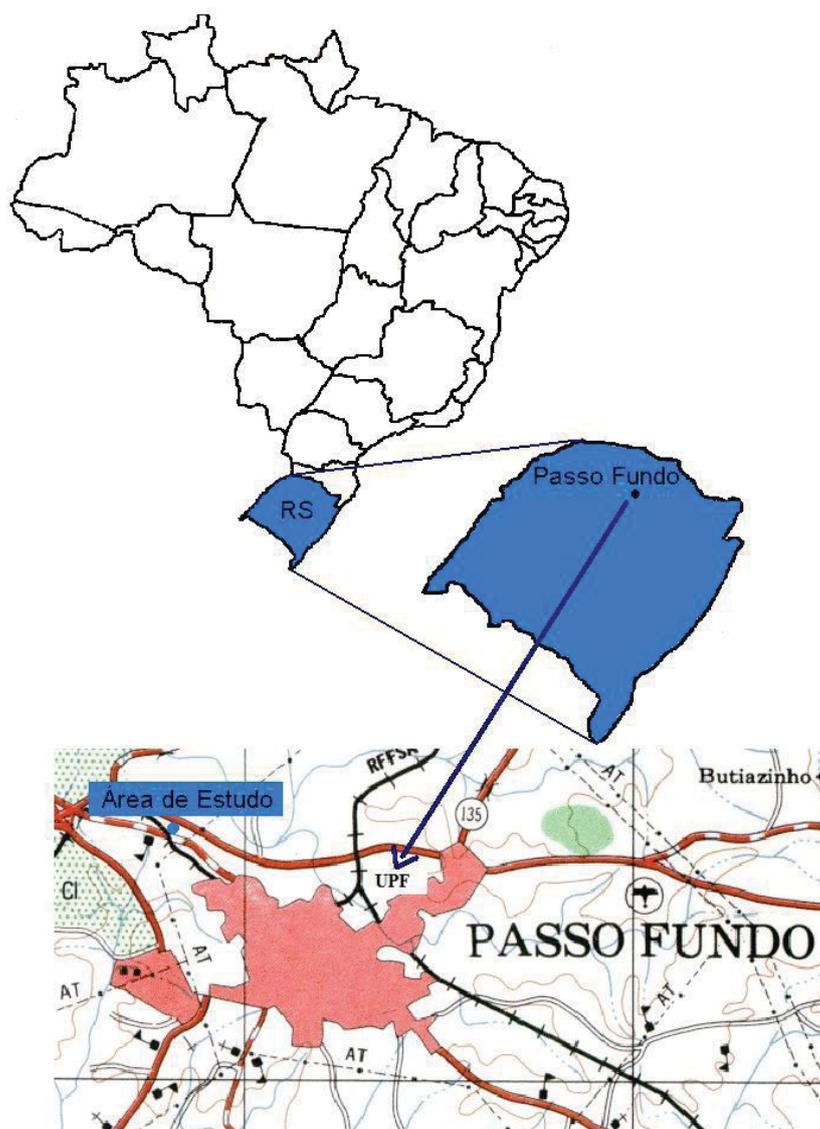
<b>Fator de controle</b>	<b>Níveis</b>	<b>Valor/ Faixa de variação</b>
Raio de dispersão	3	40 mm, 80 mm e 120 mm
Profundidade	6	50, 100, 150, 200, 250 e 300 mm
Tempo	4	0, 15, 30, 60 d

O projeto tem como variáveis fixas, o tipo de solo (argiloso), o contaminante (biodiesel puro), a técnica de biorremediação a ser usada (bioaugmentação), a concentração de microrganismos ( $2,4 \times 10^6$  NMP/g solo) e a pressão aplicada.

### 3.2 LOCAL DE ESTUDO

A área de estudo está situada na região norte do estado do Rio Grande do Sul, na cidade de Passo Fundo (Figura 05). A pesquisa foi executada no Laboratório de Geotecnia Ambiental, no Centro de Tecnologia (CETEC) da Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo.

Figura 05. Mapa de situação e localização da Área de Estudo.



Fonte: MENEGHETTI, 2005.

### 3.3 SOLO

Para as análises de biorremediação foi utilizado um solo argiloso, classificado pedologicamente como um Latossolo Vermelho distrófico húmico (STRECK et al., 2008). Do ponto de vista geotécnico, é classificado como CH, ou argila de alta plasticidade. Este solo é proveniente do campus experimental de Geotecnia da Universidade de Passo Fundo. O mesmo foi coletado do horizonte B, através de uma vala aberta no solo. As amostras foram coletadas indeformadas. A Figura 06 mostra o local de coleta do solo.

Figura 06. Local de coleta do solo.



A caracterização do solo envolveu a busca de dados já existentes, a caracterização física, como a granulometria, limites de consistência (limite de liquidez, limite de plasticidade), compactação, densidade, saturação e índice de vazios. Na caracterização química envolve pH em H<sub>2</sub>O; Índice SMP; Argila (%); teor de Matéria-Orgânica ( %); Macronutrientes (N, P, K, S, Ca, Mg); Cátions trocáveis (Al, Na) e Acidez potencial (H+Al), CTC (total de cátions trocáveis), Micronutrientes (Mn, Zn, Cu, Fe, Mo, B, Cl), Saturação por bases, Saturação por Alumínio e Saturação por K.

A caracterização físico-química do solo está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização físico-química do solo.

Propriedades	Valores
Limite de liquidez (%)	53
Limite de plasticidade (%)	42
Índice de plasticidade (%)	11
Densidade real dos grãos (G)	2,7
Argila (%)	57
pH (H <sub>2</sub> O)	5,4
P (mg/dm <sup>3</sup> )	3
K (mg/dm <sup>3</sup> )	35
Matéria Orgânica (%)	< 0,8
Al (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	2,0
Ca (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	0,6
Mg (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	0,3
CTC <sup>a</sup> (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	9,6
S (mg/dm <sup>3</sup> )	8
B (mg/dm <sup>3</sup> )	0,2
Mn (mg/dm <sup>3</sup> )	4
Zn (mg/dm <sup>3</sup> )	0,1
Cu (mg/dm <sup>3</sup> )	0,7

<sup>a</sup>Capacidade de troca catiônica

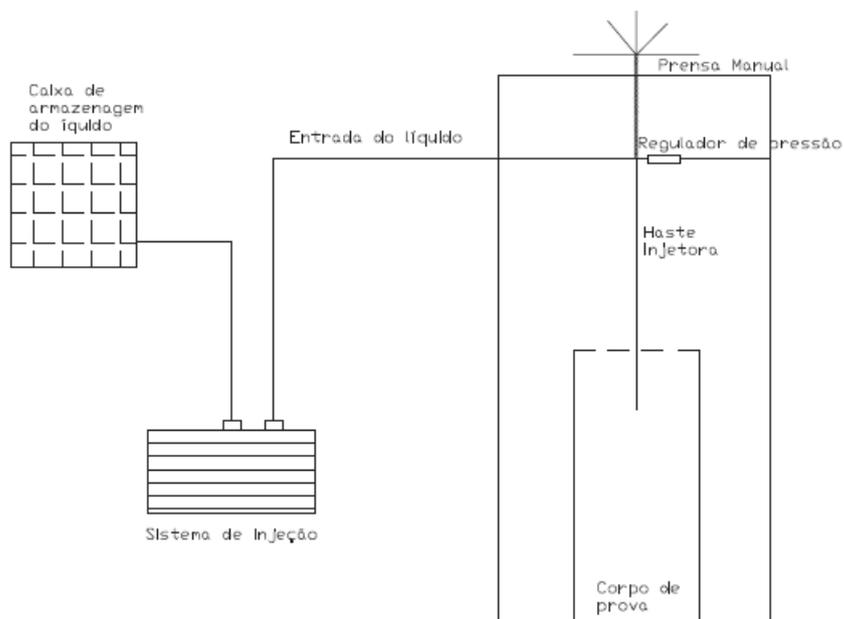
Fonte: MENEGHETTI et al., 2010.

O solo apresenta pH ácido, alto teor de argila, baixo teor de matéria orgânica e baixa CTC, típica de solos com predominância do argilo-mineral caulinita (STRECK et al., 2008).

### 3.4 PROJETO DO SISTEMA DE INJEÇÃO

O equipamento piloto de aplicação do bioaumentação *in situ* foi desenvolvido no Laboratório de Geotecnia, na Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, conforme o esquema simplificado apresenta-se na Figura 07.

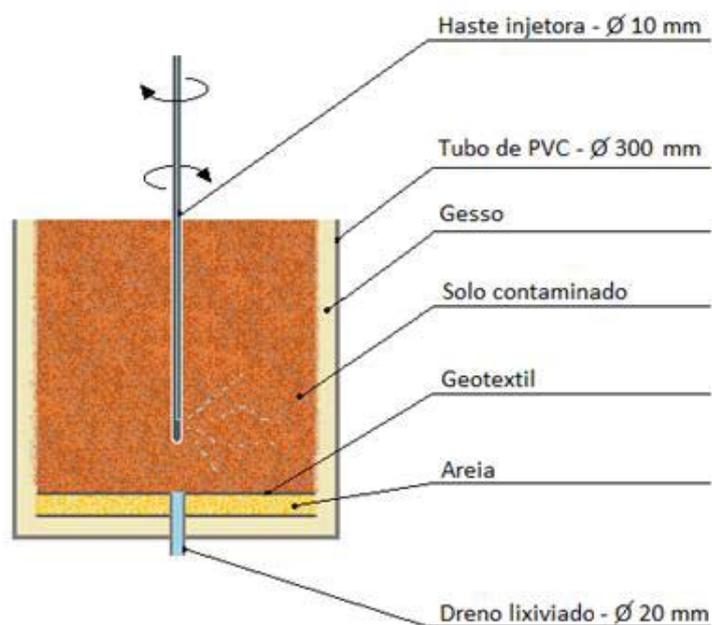
Figura 07. Esquema do sistema completo de bioaumentação.



A Figura 07 mostra o projeto do sistema de injeção do bioaumento, composto por uma prensa manual para auxiliar na descida da haste para dentro do corpo de prova, e de um sistema de injeção com pressão, para que o bioaumento se disperse por todo o corpo de prova.

A Figura 08 mostra o esquema detalhado do biorreator para aplicação da técnica de bioaumentação.

Figura 08. Esquema do biorreator para a técnica de bioaumentação.

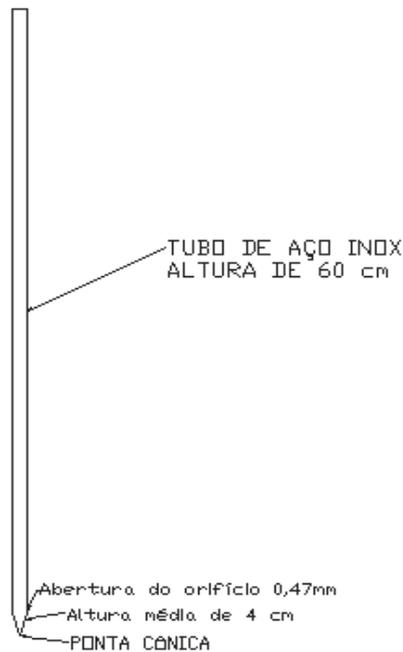


A Figura 08 apresenta os materiais necessários para a montagem do biorreator, o solo foi colocado dentro de um tubo de PVC envolto por gesso para preencher o espaço interno, e assim evitar que o líquido inserido não percorra um caminho preferencial pela parede de tubo.

No interior do tubo de PVC foi colocado uma camada de areia e geotêxtil para a drenagem do lixiviado.

A Figura 09 mostra o detalhe da haste de injeção do sistema de bioaumentação.

Figura 09. Detalhe da haste de injeção.

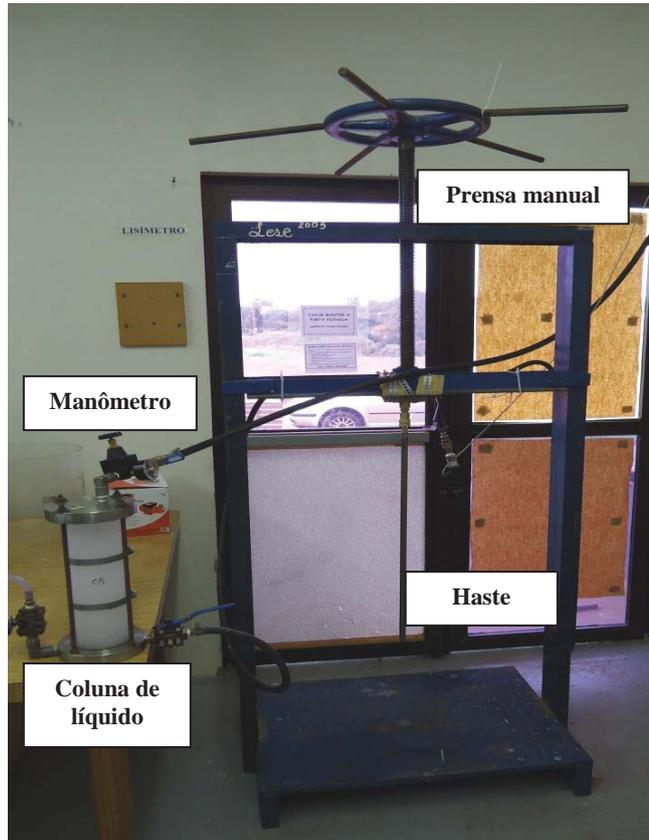


A haste de injeção foi projetada baseada na haste do sistema de *Jet grouting*, conforme dados da GEOSONDA. A haste é constituída de material de aço inox, com altura de 60 cm, diâmetro interno de 10 mm (proporção de trinta vezes menor que o biorreator), possui uma ponta cônica e um orifício a 3 cm do fim da haste, com diâmetro de 0,47 mm para a injeção do líquido.

### 3.4.1 Montagem do equipamento

O equipamento para dispersão do bioaumentado no solo foi composto por uma prensa manual que auxilia na descida da haste injetora até o corpo de prova contaminado com biodiesel, que possui o auxílio de um manômetro para controle da pressão do líquido a ser injetado, como pode ser visto na Figura 10.

Figura 10. Equipamento piloto montado.



A haste de injeção e o detalhe do furo podem ser vistos nas Figuras 11 e 12, respectivamente.

Figura 11. Vista geral da haste de injeção.



Figura 12. Vista do furo da haste de injeção



### 3.5 MONTAGEM DO EXPERIMENTO

#### 3.5.1 Montagem dos corpos de prova deformados

Para montagem dos corpos de prova, iniciou-se com corpos de provas deformados, pois se o corpo de prova resistisse a pressão injetada, facilitaria os ensaios.

Para realização dos ensaios pilotos foram moldados corpos de prova em um cilindro de acrílico transparente, com 300 mm de altura e 300 mm de diâmetro, para verificar o comportamento do solo durante a injeção.

Para a moldagem dos corpos de prova considerou-se índice de vazios de 1,24 e peso específico dos grãos do solo de campo de  $27 \text{ kN/m}^3$ . O solo foi peneirado e submetido à determinação da umidade para verificar a quantidade de água a ser adicionada, ficando com umidade final de 34 %. Depois de realizada o ajuste da umidade, o solo foi dividido em cinco camadas, e colocado no tubo de acrílico para ser feita a compactação do mesmo com soquete. As Figuras 13 e 14 mostra a compactação do solo e o corpo de prova (CP) finalizado, respectivamente.

Figura 13. Compactação do solo.



Figura 14. Corpo de prova finalizado.



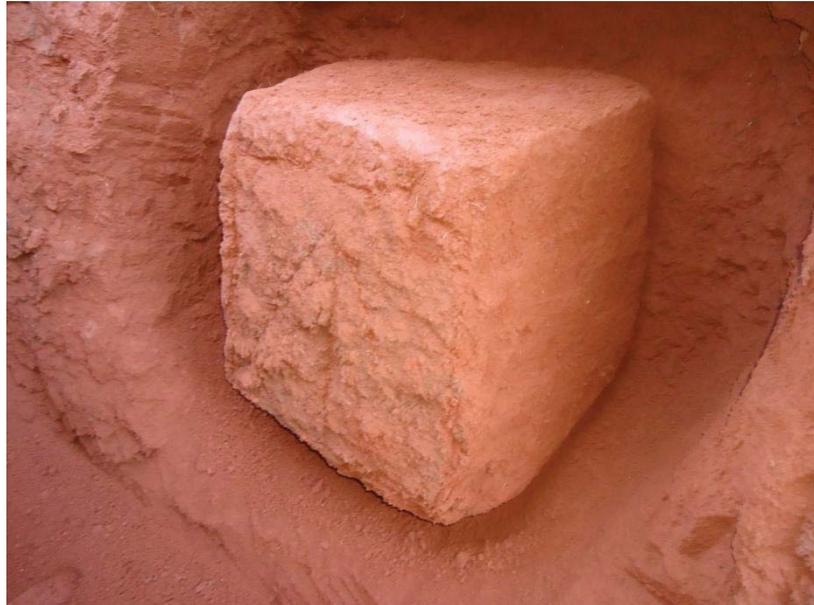
Para evitar a perda de umidade, entre o tempo de moldagem até a realização do ensaio, os corpos de prova foram enrolados em filme plástico, como pode ser observado na Figura 14.

### **3.5.2 Montagem dos corpos de prova indeformados**

O bloco de solo coletado indeformado foi retirado de uma vala com profundidade de 2 m, e com umidade de campo na faixa de 30 %.

A Figura 15 mostra o bloco de solo sendo retirado da vala de 2 m de profundidade no campo experimental.

Figura 15. Bloco de solo indeformado.



A Figura 16 mostra os corpos de prova sendo moldados para posterior colocação nos biorreatores de PVC de 300 mm de diâmetro.

Figura 16. Moldagem dos corpos de prova.



A Figura 17 mostra os corpos de prova montados e colocados numa mesa montada para o experimento.

Figura 17. Corpos de prova montados.



### 3.5.3 Contaminação do solo

Após feita a coleta e a caracterização (físico-química) do solo, foi feita a contaminação do mesmo com biodiesel puro (B100), na proporção de 4% em relação à massa de solo seco, sendo esta quantidade de contaminante descontada da umidade natural de campo do solo.

Nos corpos de provas indeformados, cada corpo de prova variou a umidade natural do solo, com isso cada corpo de prova teve uma quantidade de contaminante adicionado, conforme segue na Tabela 2.

Tabela 2. Volume de contaminante a cada corpo de prova.

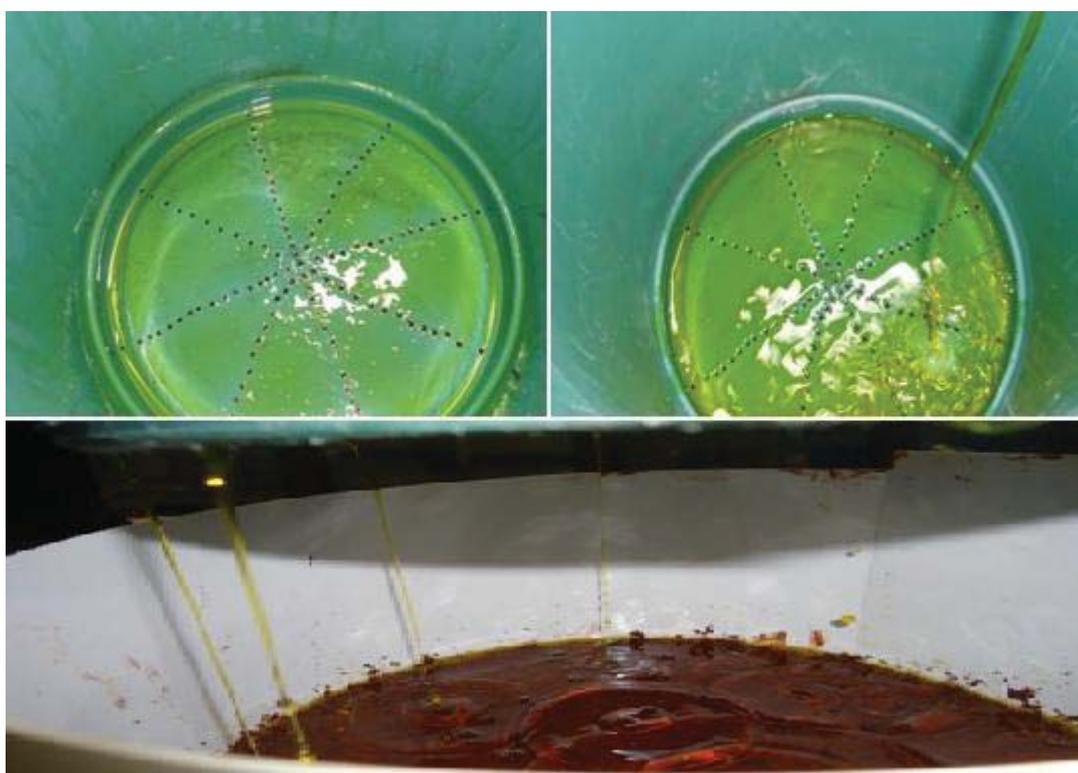
<i>Tratamentos</i>	<i>Umidade natural %</i>	<i>Volume de contaminante (mL)</i>
Atenuação Natural	33,23	1060
Bioaumentamento – T 15 d	32,52	1120
Bioaumentamento – T 30 d	32,06	1000

Bioaumento – T 60 d	30,06	1194
---------------------	-------	------

Para contaminação dos corpos de prova com biodiesel, foi criado um sistema de forma a simular um derramamento com dispersão total na área do biorreator. Para isso, foram feitos vários furos para simular um chuveiro num balde de 18 litros.

A Figura 18 apresenta a realização da contaminação nos corpos de prova.

Figura 18. Contaminação dos corpos de prova.



### 3.6 COLETA DAS AMOSTRAS

As coletas das amostras do solo nos biorreatores ocorreram nos tempos 0, 15, 30 e 60 dias, totalizando 60 dias de investigação da biodegradação do contaminante. A coleta foi realizada em três raios (40, 80 e 120 mm), e seis profundidades (a cada 5 cm) para abranger toda a área do biorreator.

Para cada tempo terá um corpo de prova para coleta das amostras, totalizando, 18 pontos amostrais.

Para a retirada das amostras de solo, foi utilizado duas moldeiras, para separação dos raios.

### 3.7 PREPARO DO BIOAUMENTO

#### 3.7.1 Seleção das bactérias para bioaugmentação

Os microrganismos utilizados para a bioaugmentação são bactérias já selecionadas de solo contaminado com diesel: *Bacillus megaterium* e *Bacillus pumilus*. As Figuras 19 e 20 apresentam os microrganismos selecionados.

Figura 19. Bactéria selecionada *Bacillus megaterium*.



Figura 20. Bactéria selecionada *Bacillus pumilus*.



### 3.7.2 Preparo do inóculo (bioaugmentação)

O preparo do inóculo foi realizado a partir de colônias puras das bactérias selecionadas, cultivados em meio de cultura com nutrientes selecionados.

O meio cultura utilizado foi um meio fertilizante contendo 3 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 g/L glicose, 1 g/L de biodiesel.

O bioaumentação foi aplicado nos biorreatores, os microrganismos selecionados foram multiplicados até atingirem aproximadamente a concentração de  $2,4 \times 10^6$  NMP/g de solo.

### 3.8 DETERMINAÇÕES ANÁLITICAS

Foram realizadas as análises da degradação do contaminante em intervalos de 0, 15, 30 e 60 dias após o início do experimento. Para a pressão de injeção dos microrganismos selecionados foram retiradas amostras de solo, em três raios pré-determinados do biorreator, e seis profundidades, e estas foram então preparadas e encaminhadas para o laboratório para serem feitas as análises. Deste material, foi feito a análise quantitativa da degradação do biodiesel puro (B100), através da extração por Ultrassom e posteriormente, a análise da

degradação qualitativa dos contaminantes degradados, através da cromatografia gasosa, a contagem dos microrganismos pelo Número Mais Provável (NMP), e a determinação do pH.

### **3.8.1 Óleos e Graxas**

A análise de ultrassom faz a remoção de substâncias voláteis e semi-voláteis do solo, podendo esta, ser quantificada quantitativamente. A análise gravimétrica de óleos e graxas foi realizada seguindo a metodologia de extração por ultrassom da USEPA 3500B (1996).

### **3.8.2 Determinação dos metil-ésteres**

A análise qualitativa da degradação dos metil-ésteres foi realizada através da degradação das cadeias carbônicas, identificadas pela cromatografia gasosa pelo Laboratório de Cromatografia Gasosa do CEPA (Centro de Pesquisa em Alimentos) da Universidade de Passo Fundo.

### **3.8.3 Determinação da Umidade**

A determinação da umidade foi realizada através do método NBR 6457/86. As amostras de solo para determinação da umidade foi realizada em cada raio, em cada profundidade. A umidade foi determinada em estufa à 105 °C por 24 horas, com amostras de 10 g de solo. A umidade foi determinada, em porcentagem, pela diferença dos pesos dos solos antes e após a secagem em estufa.

### 3.8.4 Contagem dos microrganismos

A contagem de bactérias totais nas amostras de solo foi realizada pelo Método do Número Mais Provável (NMP), técnica estatística que determina células totais presentes nas amostras segundo a metodologia descrita no *Standard Methods for the Examination of Water & Wasterwater* (APHA, 2005).

Primeiramente, a amostra de solo foi homogeneizada com água destilada estéril na proporção de 1:9 em Blender durante 2 min. Posteriormente, procederam-se diluições até  $10^{-8}$  em tubos de cultivos. Para a determinação de microrganismos heterotróficos totais, foi utilizado o meio R2A em pequenos tubos de cultivos, adicionado de 100  $\mu$ L de cada diluição. Os tubos foram incubados a 30 °C durante 7 dias e o crescimento microbiano foi determinado por turbidimetria. A população microbiana foi então determinada usando tabelas de NMP.

### 3.8.5 Determinação do pH

A determinação do pH foi determinado segundo a NBR 14823/1999. Pesou-se 10 g de amostra de solos em um béquer de 50 mL, adicionou-se 25 mL de água destilada, agitando com um bastão, deixou-se em repouso, e após foi realizada a medida do pH pelo eletrodo de vidro.

## 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística será realizada pelo *software Minitab 15.0*, que permite a determinação da significância dos fatores estudados, bem como os seus efeitos e possíveis interações. E ainda, em alguns casos, torna possível a construção de um modelo matemático para a estimação de resultados dentro da faixa estudada (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

Embora o *software* possa fornecer um grande volume de informação, a análise estatística desse estudo será restrita às informações inerentes à significância e aos efeitos dos fatores. A significância dos fatores está diretamente atrelada ao intervalo de confiança usado. Nesse caso, foi escolhido um intervalo de confiança de 95%, que corresponde ao menor nível em que os dados são significativos em um teste de hipótese utilizando o teste *t* de *Turkey*.

## 4. ENSAIO PILOTO

### 4.1 Realização dos ensaios pilotos

Os ensaios pilotos foram realizados em biorreatores para avaliar o comportamento da pressão injetada. Foi utilizado solo e como simulador de contaminante um corante de cor branca com características semelhantes ao bioaumentado para analisar a dispersão no biorreator.

Na realização dos ensaios pilotos foram testados diferentes pressões em diferentes corpos de provas com corpos de prova com solos deformados e indeformados.

No primeiro ensaio piloto realizado foi aplicado uma pressão de 300 kPa no corpo de prova com solo deformado, umidade do solo de 34%, peso específico dos grãos  $27 \text{ kN/m}^3$  e índice de vazios de 1,24. Quanto à velocidade de subida e rotação da haste foi controlada através de um cronômetro. O experimento teve como velocidade de subida e de rotação, 11,4 cm/min, conforme os dados do sistema de *Jet-grouting*. A Figura 21 mostra o corpo de prova com aplicação de pressão de 300 kPa com sistema de injeção com auxílio de uma bomba de água.

Figura 21. Corpo de prova deformado com pressão injetada de 300 kPa.



Como pode ser observado na Figura 21, o corpo de prova com solo deformado e pressão de 300 kPa, teve ruptura na primeira camada compactada, mostrando que a pressão foi alta demais, potencializando uma fratura no solo. Para avaliar a saturação do solo, foi realizada a determinação da umidade em diferentes camadas do corpo de prova, mostrando que neste caso, onde houve a fratura, o solo se encontra saturado, com umidade de 45%.

Logo após a inserção de 300 kPa de pressão, aplicou-se uma pressão mais baixa, de 75 kPa, a aplicação foi realizada num corpo de prova com as mesmas características físicas do anterior. A Figura 22 mostra o corpo de prova com aplicação de pressão de 75 kPa.

Figura 22. Corpo de prova de 75 kPa.



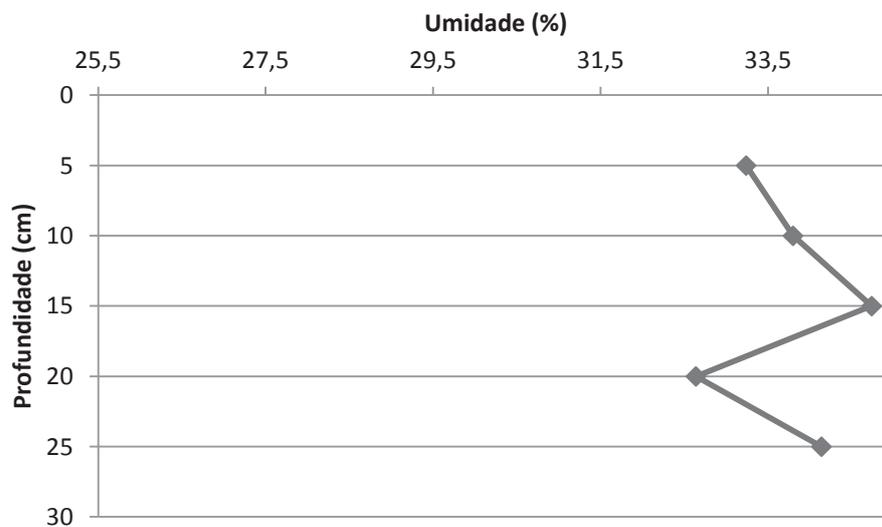
Neste corpo de prova com pressão aplicada de 75 kPa, verificou-se que a pressão foi insuficiente para infiltrar no solo, criando um caminho preferencial pela haste.

Figura 23. Corpo de prova exumado – 75 kPa.



A exumação do corpo de prova, observado na Figura 23, mostra que a infiltração ocorreu apenas nos primeiros centímetros de solos, próximo a haste, mostrando pressão insuficiente para infiltração. A Figura 24 mostra a variação da umidade no corpo de prova exumado.

Figura 24. Umidade do corpo de prova de 75 kPa.



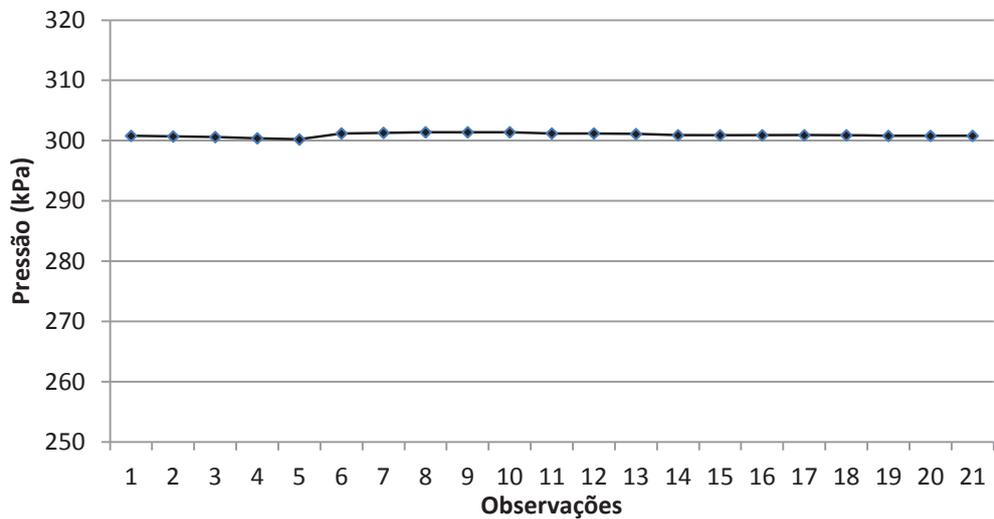
Neste período, houve problema de entrada de ar na bomba, que ocasionava uma variação na pressão, no que veio a ocasionar a queima da bomba. Verificou-se assim, que a quantidade de líquido não era suficiente. Como solução, buscou-se a alteração do procedimento, colocando um sistema em “T” com reguladores de vazão e pressão, com uma saída para a haste e a outra saída para o retorno no reservatório para que a bomba conseguisse manter a quantidade de líquido suficiente para não ocasionar outro estrago na bomba nova. Tentou-se aplicar novamente a pressão e verificou-se que mesmo assim, não foi possível manter a pressão regulada. Após discussões e novas pesquisas, pensou-se em utilizar um sistema com entrada de ar e coluna de líquido, como citado acima, sem a necessidade de utilização da bomba de água.

O sistema novo no equipamento de bioaugmentação é composto por uma coluna de líquido que possui entrada de ar para comprimir o líquido para fora da coluna. A coluna líquida possui capacidade de armazenagem de 1750 mL de líquido, e o ar é injetado por um compressor de ar da marca SCHULZ Mundial (5,2 pés<sup>3</sup>/min – 100 litros – 1hp). No que diz respeito à pressão da injeção do líquido, o controle é realizado através de dois controladores de pressão, um manômetro situado no sistema de injeção e o outro medidor próximo à haste de injeção, tornando assim possível obter a pressão desejada no local da injeção.

Com o sistema regularizado, foi possível efetuar a injeção com a mesma pressão que a bomba de água para verificar os resultados. Foi aplicada pressão de 300 kPa no corpo de prova deformado para verificar se o resultado se assemelharia com o sistema de injeção com bomba de água. No entanto, com a aplicação do novo sistema de armazenamento de líquido, os corpos de provas deformados se mantiveram como o mesmo comportamento, havendo ruptura no solo com a injeção do líquido sob pressão.

No entanto, pode-se verificar que com a utilização do novo sistema, a pressão de injeção de se manteve estável durante o processo de injeção.

Figura 25. Dados da pressão de injeção durante o experimento com aplicação da pressão de 300 KPa.



A Figura 25 mostra que a pressão teve pouca variação, variando apenas 0,4 % em todo o ensaio.

No próximo ensaio piloto realizado aplicou-se pressão de 75 kPa, o resultado pode ser visto na Figura 26.

Figura 26. Vista externa do corpo de prova injeção de pressão de 75 kPa.



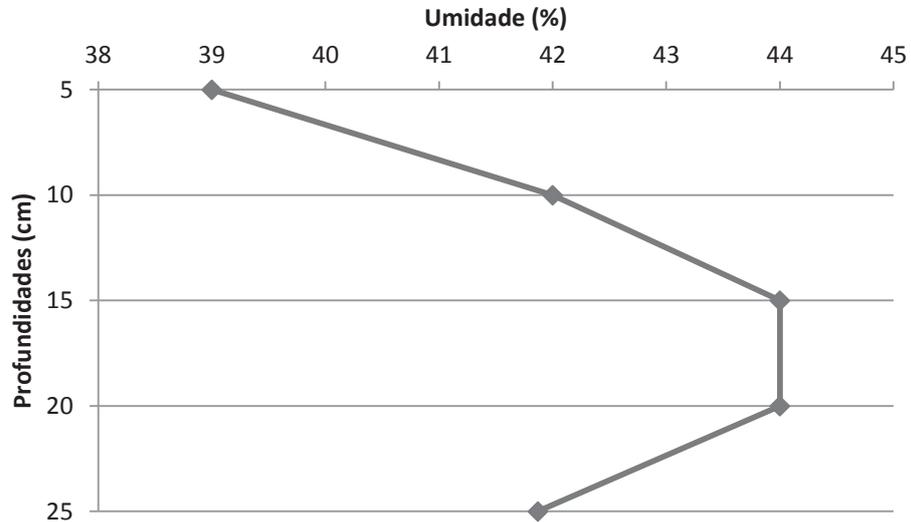
A Figura 26 mostra que a pressão de 75 kPa teve o rompimento do corpo de prova entre as camadas de compactação. A exumação do corpo de prova, como pode ser vista na Figura 27.

Figura 27. Vista interna do corpo de prova com pressão de injeção de 75 kPa.



Foi realizada a exumação do corpo de prova, evidenciando que a infiltração percorreu um caminho preferencial entre as camadas compactadas. A quantidade de líquido inserido no corpo de prova foi de 207,6 mL, em aproximadamente 2 minutos de ensaio. A variação da umidade podem ser vista na Figura 28.

Figura 28. Variação das umidades entre as camadas do corpo de prova com pressão de 75 kPa.



A Figura 28 mostra que houve variação de umidade em todas as camadas, nas profundidades 15 cm e 20 cm se encontraram com mais umidade, quase se aproximando ao valor de saturação, 44 %.

Com o ensaio de pressão de injeção de 75 kPa foi verificado que a pressão rompeu o solo. Realizou-se, então, um novo ensaio com pressão mais baixa, de 25 kPa, como pode ser visto na Figura 29.

Figura 29. Corpo de prova com pressão aplicada de 25 kPa.



No corpo de prova de 25 kPa foi verificado que a pressão foi insuficiente para conseguir infiltrar no solo.

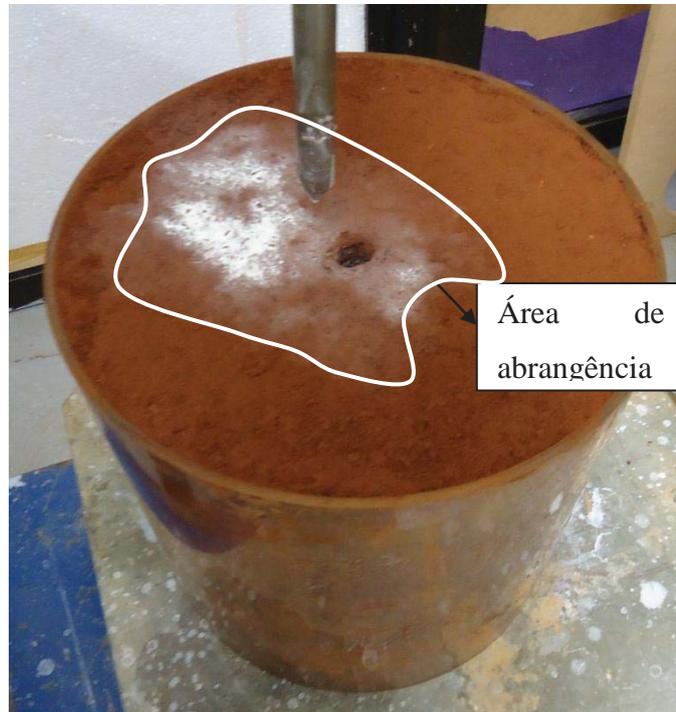
No mesmo momento, injetou-se em um corpo de prova a pressão de injeção de 50 KPa, 65 KPa e foi verificado, novamente que, esta pressão não foi suficiente para infiltrar no solo, mesmo na exumação do corpo do prova, verificou-se que não houve infiltração.

No entanto, pode-se notar que os ensaios com o corpo de prova deformados, a pressão injetada fraturava o solo, ou seja, alterava-se as características física estrutural dos corpos de prova.

Diante deste problema, houve mudança nos ensaios pilotos, os corpos de prova a serem testados seriam com uma estrutura de solo indeformada.

No primeiro ensaio piloto com corpo de prova indeformado, foi aplicada uma pressão de 75 kPa, e pode-se verificar um rompimento no solo devido à falta de confinamento. Verificou-se que a pressão de 75 kPa para esta estrutura de solo abrangeu um raio pequeno para o corpo de prova em questão, como pode ser visto na Figura 30.

Figura 30. Área de abrangência da pressão aplicada de 75 kPa no corpo de prova indeformado.



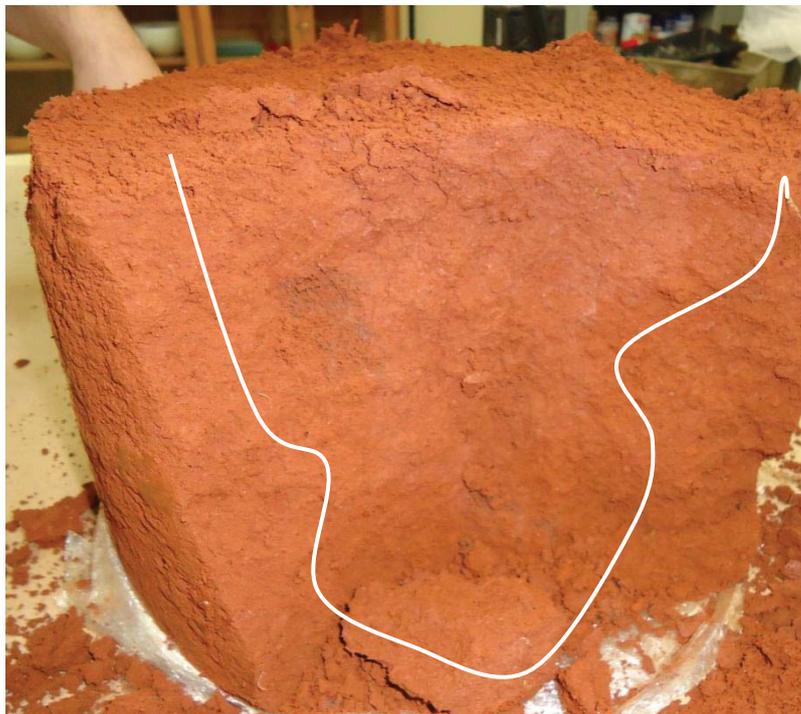
Logo após, então, foi realizado a aplicação 85 kPa e 100 kPa, o qual foi verificado que com pressão de injeção de 100 kPa, o corante abrangia o corpo de prova indeformado.

Figura 31. Área de abrangência do corpo de prova indeformado com pressão aplicada de 100 kPa.



No entanto, foi realizada a exumação do corpo de prova para verificar se o líquido (corante) havia se dispersado heterogeneamente no interior do corpo de prova. A Figura 32, apresenta a exumação do corpo de prova.

Figura 32. Exumação do CP indeformado com pressão injetada de 100 kPa.



Na exumação do CP foi verificado que o líquido percorreu satisfatoriamente no interior do CP. Na exumação, foi realizada medidas de umidade para verificar se com a pressão aplicada de 100 kPa, haveria saturação do solo.

A umidade natural do CP indeformado foi de 35,5%, e após a aplicação do corante pela haste, a umidade ficou na faixa de 39%.

A quantidade de líquido injetada neste ensaio foi de 189,83 mL de corante branco.

No entanto, podemos chegar a conclusão a partir dos resultados dos ensaios piloto, que a pressão adequada para inserção do bioaumentação é de cerca de 100 kPa de pressão, num corpo de prova com solo indeformado e num sistema de injeção sob pressão de ar. O bioaumentação inserido na velocidade de subida e de rotação de, 11,4 cm/min e 10 rpm, respectivamente, com uma quantidade inserção de líquido para que não sature o corpo de prova. Comprovadamente, realizado pelos cálculos segundo Carreto (2000).

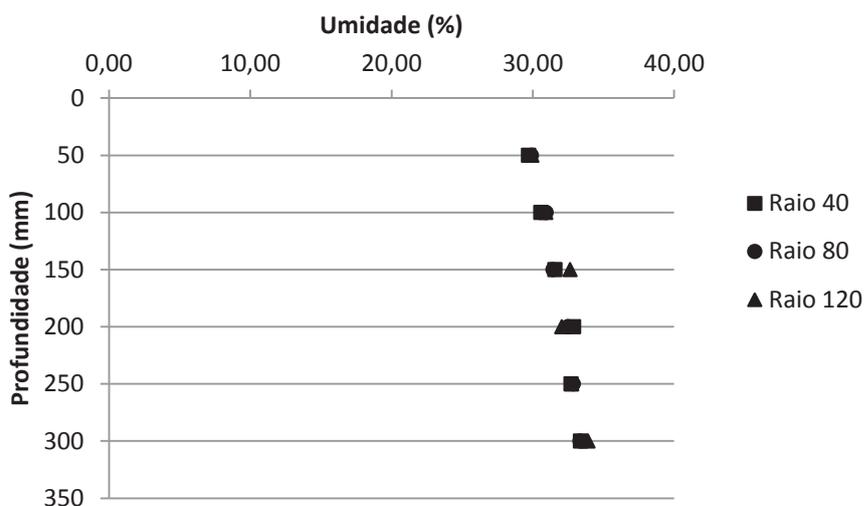
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Umidade e pH

A umidade do solo dos tratamentos foi avaliada no tempo inicial e 15, 30 dias e 60 dias do experimento.

A Figura 33 apresenta a umidade nos diferentes raios e profundidades do biorreator no tempo 0 dias.

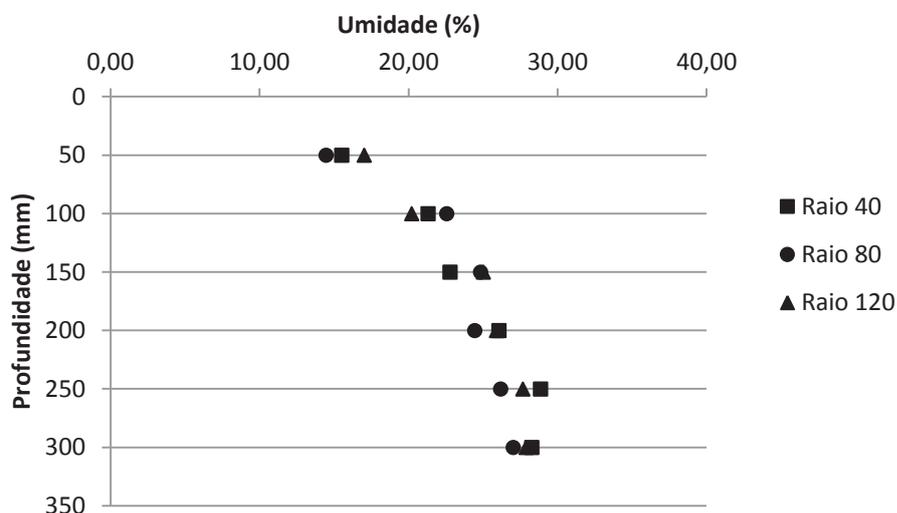
Figura 33. Variação da umidade ao longo da profundidade do corpo de prova, nos três raios estudados para o tempo inicial.



A variação da umidade no corpo de prova inicial mostra que a dispersão do bioaumento no biorreator foi homogênea para a mesma profundidade estudada, pois não houve variação em relação ao raio estudado. Observa-se que conforme aumenta a profundidade, aumenta a umidade no solo, mostrando que houve percolação do bioaumento. A variação da umidade no corpo de prova ficou na faixa dos 30% a 34%.

A Figura 34 apresenta a variação da umidade no tempo de 15 dias após o início do experimento.

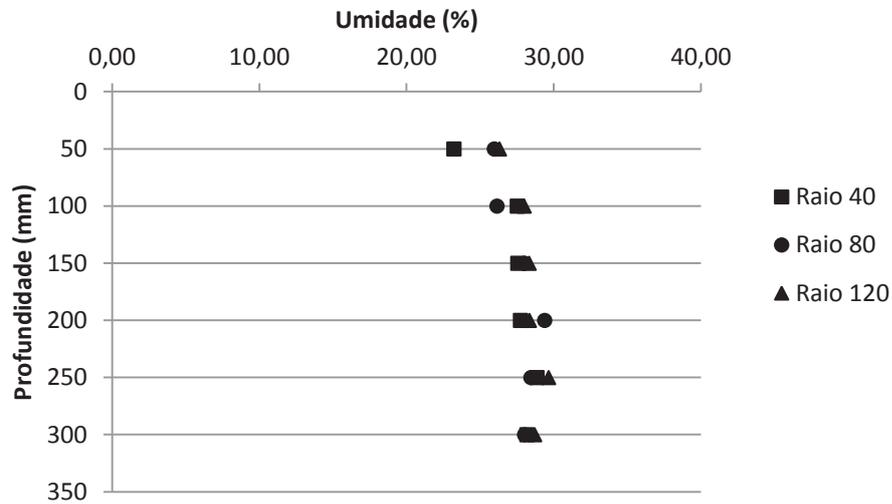
Figura 34. Variação da umidade ao longo da profundidade do corpo de prova, nos três raios estudados para o tempo de 15 dias.



A umidade no tempo 15 dias, a umidade diminuiu em comparação ao tempo inicial. Como ocorreu no tempo inicial, pode observar que a umidade apresenta valores crescentes com a profundidade. Os valores variaram de 15% mais próximo da superfície até 28% na base do corpo de prova. Observa-se que a umidade apresentou pequena variação nas profundidades em função dos raios.

A Figura 35 apresenta a variação da umidade no tempo 30 dias, em função do raio e profundidades.

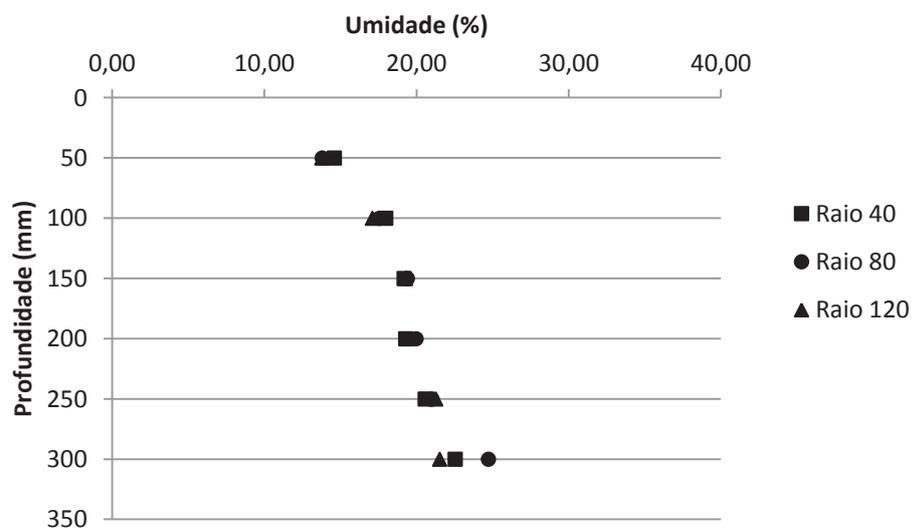
Figura 35. Variação da umidade ao longo da profundidade do corpo de prova, nos três raios estudados para o tempo de 30 dias.



A umidade no tempo 30 dias apresentou pequena variação nas profundidades em nos diferentes raios estudados.

A Figura 36 apresenta a variação da umidade no tempo 60 dias.

Figura 36. Variação da umidade ao longo da profundidade do corpo de prova, nos três raios estudados para o tempo de 60 dias.



No tempo 60 dias, observa-se pouca variação da umidade na profundidade e nos diferentes raios estudados, ressalta-se que a umidade neste tempo teve uma queda maior, chegando a 14 % na superfície do biorreator, e 24 % na profundidade.

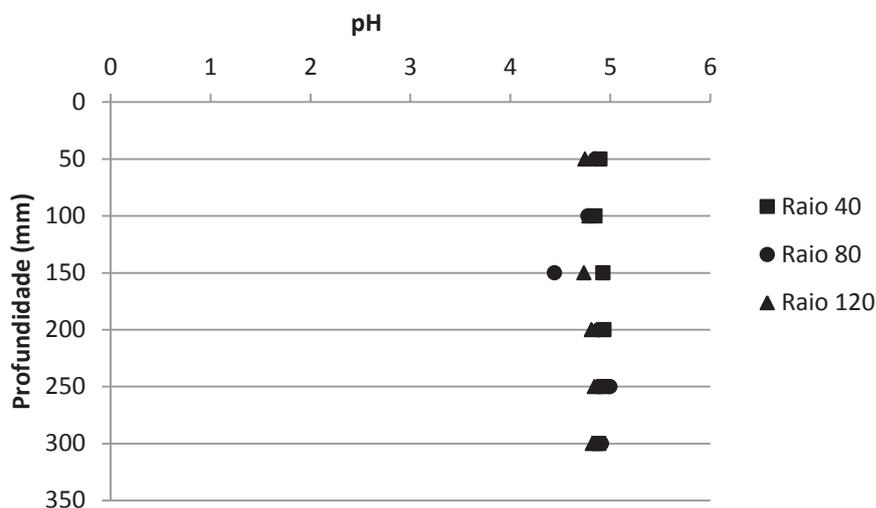
As variações da umidade nos corpos de prova aumentaram com as profundidades ao longo do tempo do experimento. No entanto, observa-se que a umidade dos corpos de provas do experimento diminuiu de 35% para aproximadamente 14% ao longo do tempo.

Durante o período de experimento, os corpos de prova tiveram perdas de umidade, isso deve ter ocorrido devido a superfície do corpo de prova ter ficado exposta a entrada de ar.

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 Figura 37 apresenta os valores medidos de pH nos diferentes raios e profundidade no tempo inicial do experimento.

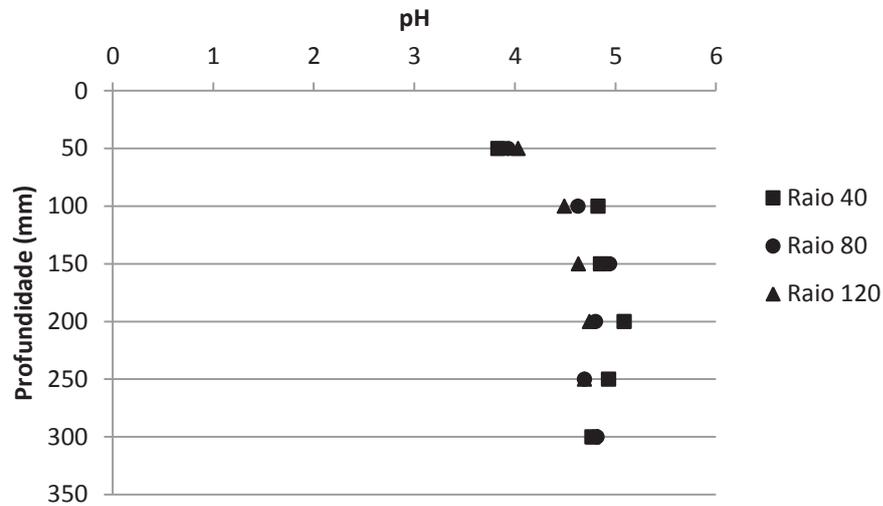
Figura 37. Variação do pH ao longo da profundidade e nos diferentes raios no tempo inicial.



No tempo inicial observa-se que a variação do pH ficou ao longo da profundidade e dos raios, na faixa de pH 5,0. No entanto, isso já era o esperado, devido a que o pH do solo estar nesta ordem de grandeza, pH levemente ácido.

A Figura 38 apresenta os valores medidos de pH no tempo 15 dias, após o início do experimento.

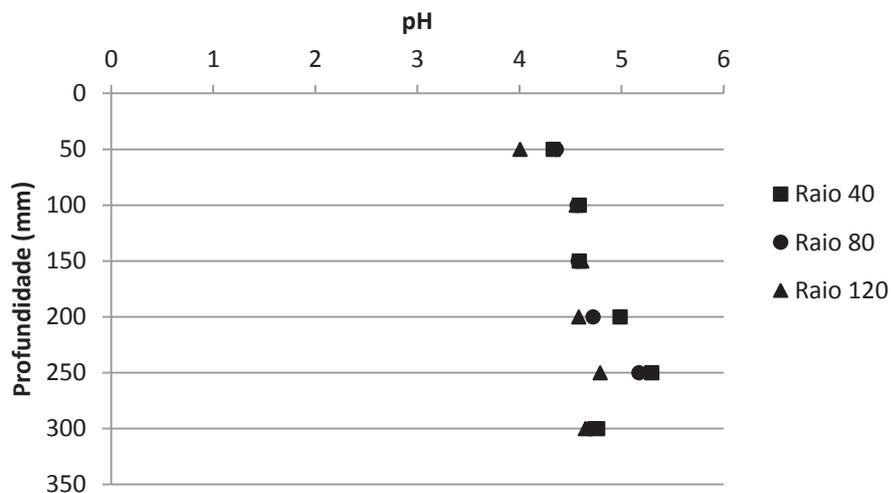
Figura 38. Variação do pH ao longo da profundidade e nos diferentes raios no tempo 15 dias.



A variação do pH do tempo 15 dias, permaneceu na faixa de 4,5 a 5,0, exceção ocorreu na superfície, nos 50 mm de profundidade, aonde o pH está em torno de 4,0. Isto pode ter ocorrido devido ação de microrganismos na superfície do corpo de prova.

A Figura 39 apresenta os valores medidos de pH no tempo 30 dias, após o início do experimento.

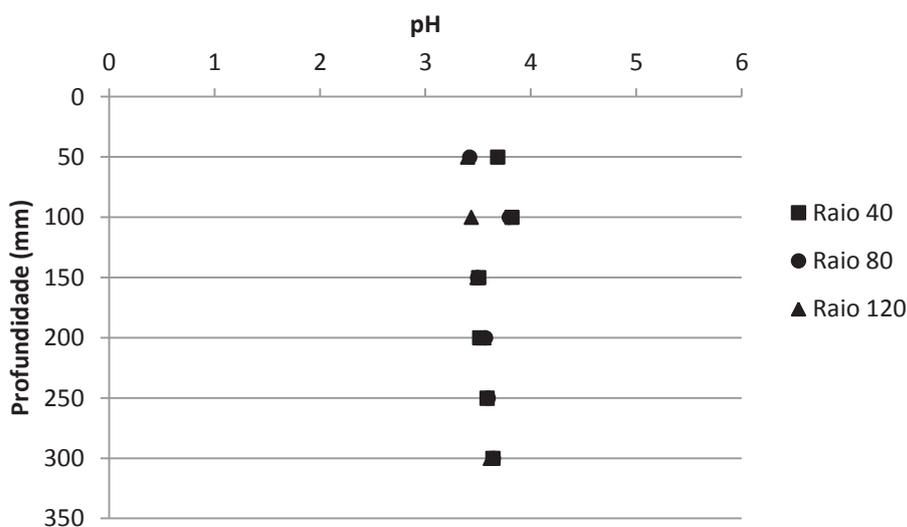
Figura 39. Variação do pH ao longo da profundidade e nos diferentes raios no tempo inicial de 30 dias.



O pH no biorreator do tempo 30 dias de experimento, se manteve o pH na faixa 4,0 a 5,0, faixa boa para ação dos microrganismos.

A Figura 40 apresenta os valores de pH no tempo 60 dias do experimento.

Figura 40. Variação do pH ao longo da profundidade e nos diferentes raios no tempo de 60 dias.



O pH no tempo 60 dias tornou-se mais ácido, porém, sua variação foi pequena no raio e profundidade estudadas.

Ao longo do experimento, observa-se uma variação no pH, tornando-o mais ácido, o qual se esperava, devido ação dos microrganismos na degradação do contaminante no solo. Vale ressaltar, o pH assim como a umidade, não houve influencia nos diferentes raios e profundidades estudadas.

## 5.2 Contagem dos microrganismos

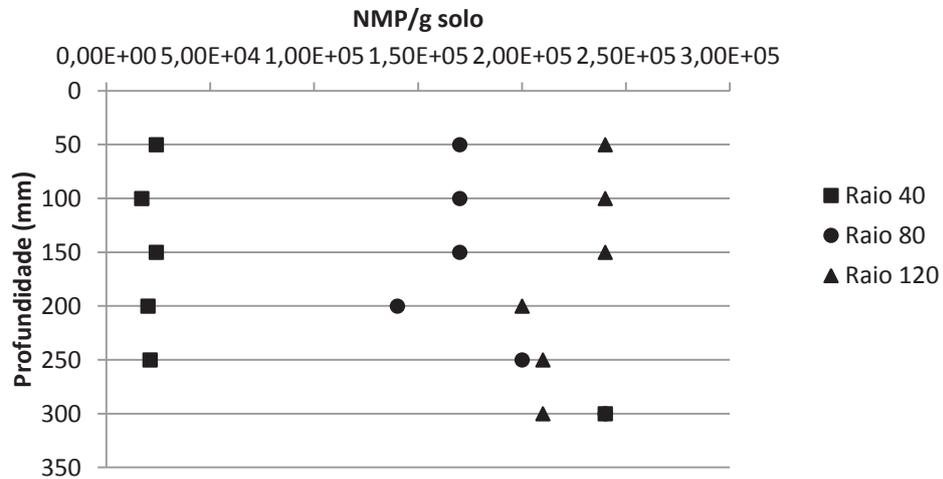
A Tabela 03 apresenta os dados de NMP/g de solo nos tempos estudados.

Tabela 03. NMP/g de solo nos tempos, raios e profundidades estudadas.

	NMP/g solo				Log NMP/g solo			
	T 0 d	T 15 d	T 30 d	T 60 d	T 0 d	T 15 d	T 30 d	T 60 d
R1P1	2,40E+04	1,70E+03	2,40E+05	3,60E+01	4,38	3,23	5,38	1,56
R2P1	1,70E+05	2,10E+03	1,70E+05	2,00E+01	5,23	3,32	5,23	1,30
R3P1	2,40E+05	2,40E+02	2,40E+04	2,00E+03	5,38	2,38	4,38	3,30
R1P2	1,70E+04	2,40E+03	2,00E+07	4,00E+01	4,23	3,38	7,30	1,60
R2P2	1,70E+05	2,40E+03	9,20E+01	9,20E+01	5,23	3,38	1,96	1,96
R3P2	2,40E+05	2,10E+03	2,40E+04	9,20E+01	5,38	3,32	4,38	1,96
R1P3	2,40E+04	2,40E+03	2,40E+07	8,20E+02	4,38	3,38	7,38	2,91
R2P3	1,70E+05	2,40E+03	2,40E+03	1,20E+02	5,23	3,38	3,38	2,08
R3P3	2,40E+05	2,00E+03	2,40E+04	6,10E+01	5,38	3,30	4,38	1,79
R1P4	2,00E+04	2,40E+03	2,40E+03	1,70E+02	4,30	3,38	3,38	2,23
R2P4	1,40E+05	2,40E+03	2,10E+04	1,40E+02	5,15	3,38	4,32	2,15
R3P4	2,00E+05	2,10E+03	2,10E+05	1,40E+02	5,30	3,32	5,32	2,15
R1P5	2,10E+04	2,40E+03	2,40E+03	4,00E+01	4,32	3,38	3,38	1,60
R2P5	2,00E+05	2,40E+03	2,40E+05	1,40E+03	5,30	3,38	5,38	3,15
R3P5	2,10E+05	2,10E+03	2,40E+06	2,10E+03	5,32	3,32	6,38	3,32
R1P6	2,40E+05	2,40E+03	1,70E+04	2,00E+02	5,38	3,38	4,23	2,30
R2P6	2,40E+05	2,40E+03	2,40E+03	2,00E+02	5,38	3,38	3,38	2,30
R3P6	2,10E+05	2,40E+03	2,40E+04	1,40E+02	5,32	3,38	4,38	2,15

A Figura 41 apresenta os dados de NMP/g de solo na profundidade e nos raios estudados no tempo inicial do experimento.

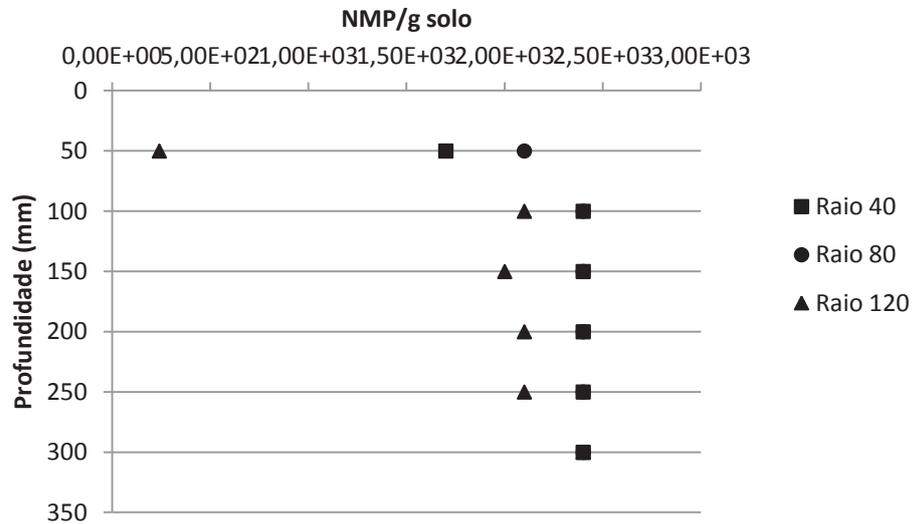
Figura 41. Variação do NMP/g de solo ao longo da profundidade e nos diferentes raios no tempo de 0 dias.



A variação do número de microrganismos (NMP/g de solo) no tempo inicial, mostrou que a injeção dos microrganismos se dispersaram nos raios e profundidades foi homogênea. Porém, vale destacar que há maior quantidade de microrganismos na maior profundidade do corpo de prova. Isso se deve a maior concentração de umidade no biorreator nesta profundidade, sendo local adequado para o desenvolvimento dos microrganismos.

A Figura 42 apresenta os dados de NMP/g de solo na profundidade e nos raios estudados no tempo 15 dias de experimento.

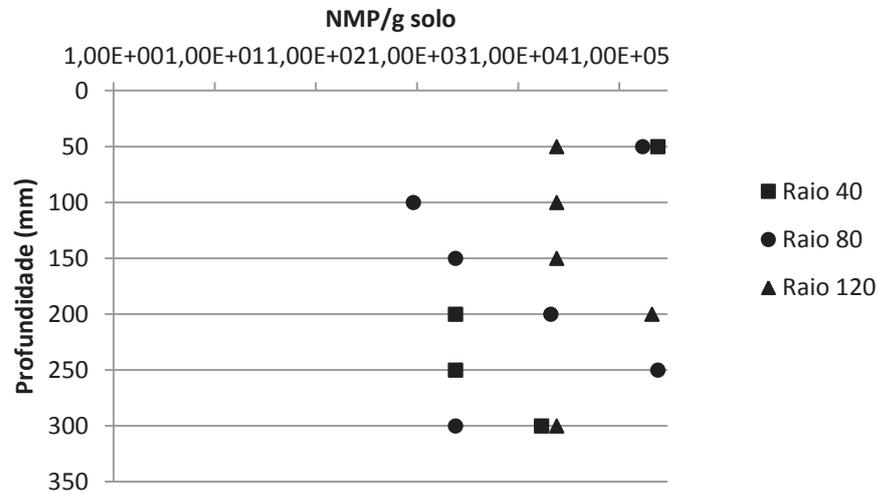
Figura 42. Variação do NMP/g de solo ao longo da profundidade e nos diferentes raios no tempo de 15 dias.



No tempo 15 dias, a dispersão de microrganismos se apresentou mais homogênea, tanto no raio quanto na profundidade, com NMP/g solo na faixa de  $10^3$ . No entanto, vale destacar que na profundidade de 50 mm, a concentração foi baixa. Isso se deve provavelmente pelo efeito da umidade/percolação.

A Figura 43 apresenta os dados de NMP/g de solo na profundidade e nos raios estudados no tempo 30 dias.

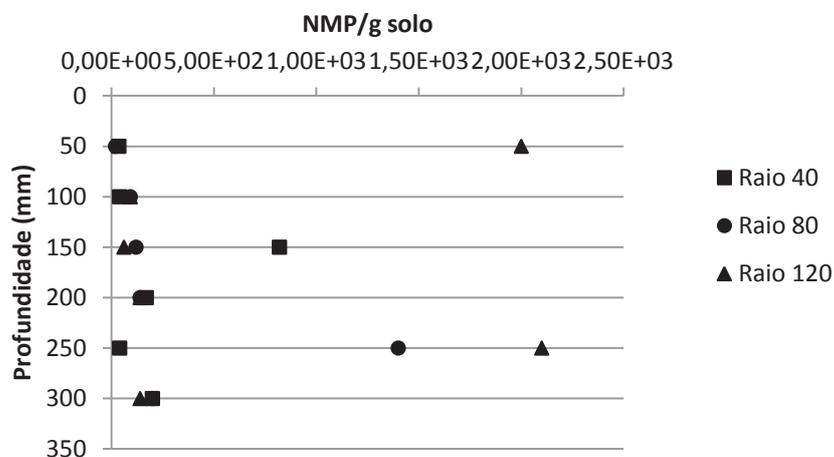
Figura 43. Variação do NMP/g de solo ao longo da profundidade e nos diferentes raios no tempo de 30 dias.



A Figura 43 apresenta os dados de NMP/g de solo no tempo 30 dias, mostrando que no tempo 30 dias, os microrganismos tiveram na faixa de  $10^3$  a  $10^5$  NMP/g de solo, sendo a maior quantidade de microrganismos durante o tempo de experimento. Isso ocorre devido nesta fase os microrganismos já estarem adaptados ao meio inserido.

A Figura 44 apresenta os dados de NMP/g de solo na profundidade e nos raios estudados no tempo 60 dias.

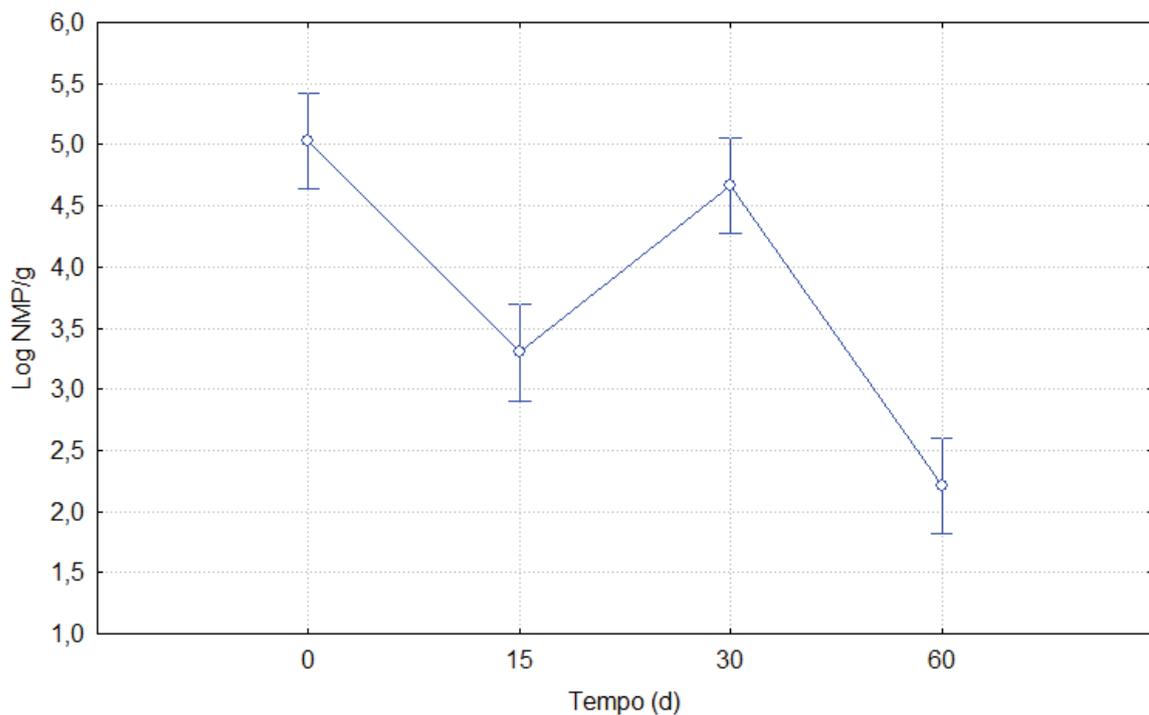
Figura 44. Variação do NMP/g de solo ao longo da profundidade e nos diferentes raios no tempo de 60 dias.



Na Figura 44, observa-se que a quantidade de microrganismos no corpo de prova diminuiu, mostrando que esta queda possivelmente deve-se à morte dos microrganismos por falta de alimento no meio ou condições ambientais adequadas.

A Figura 45 mostra o comportamento dos microrganismos durante o tempo de experimento.

Figura 45. Log NMP/g de solo nos diferentes tempos estudados.



No tempo 15 dias, houve uma queda de microrganismos no corpo de prova, de  $10^5$  NMP/g solo para  $10^3$  NMP/g solo, devido a fase de adaptação dos microrganismos no meio. Nos primeiros dias, acredita-se que alguns microrganismos estejam na sua fase de adaptação no meio contaminante. Porém, no tempo 30 dias, foi a fase em que os microrganismos tiveram mais atuação, demonstrando estarem adaptados ao meio em que se encontravam. Logo após 60 dias, os microrganismos começaram a ter uma queda, isto se deve pela competição de alimento no meio em que se encontram, atingindo um valor mínimo de  $10^1$  NMP/g solo.

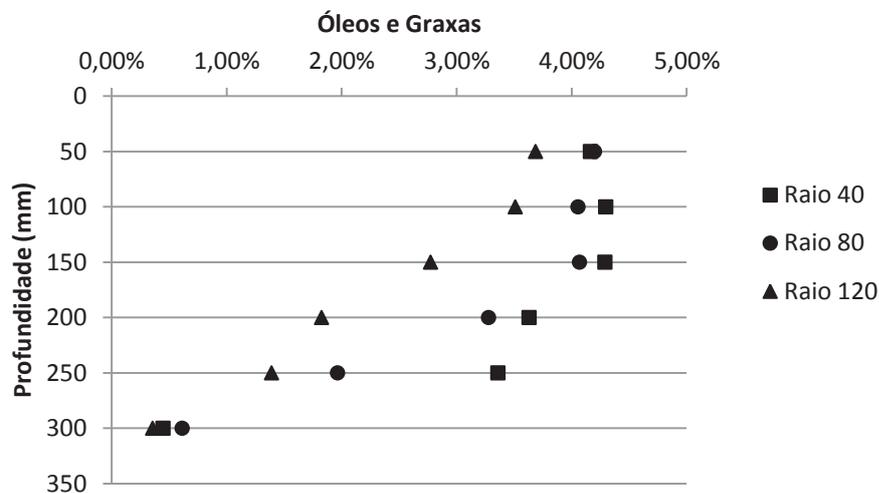
Os resultados da NMP/g de solo mostram que no tempo inicial, a concentração se manteve homogênea em todos os raios e profundidades, indicando que o bioaumento se dispersa em todo o corpo de prova.

É importante ressaltar que durante a produção do inóculo em meios líquidos envolvendo principalmente bactérias, alguns cuidados devem ser tomados para que o mesmo ao ser adicionado no local poluído tenha sua fase lag ou fase de adaptação reduzida e esteja na fase de crescimento, ou seja, fase log, aumentando sua capacidade para competir como os microrganismos indígenas (MADIGAN et al., 2003).

### 5.3 Óleos e Graxas

A Figura 46 apresenta os resultados dos valores de extração do contaminante nos corpos de prova no tempo inicial nos diferentes raios e profundidades estudadas.

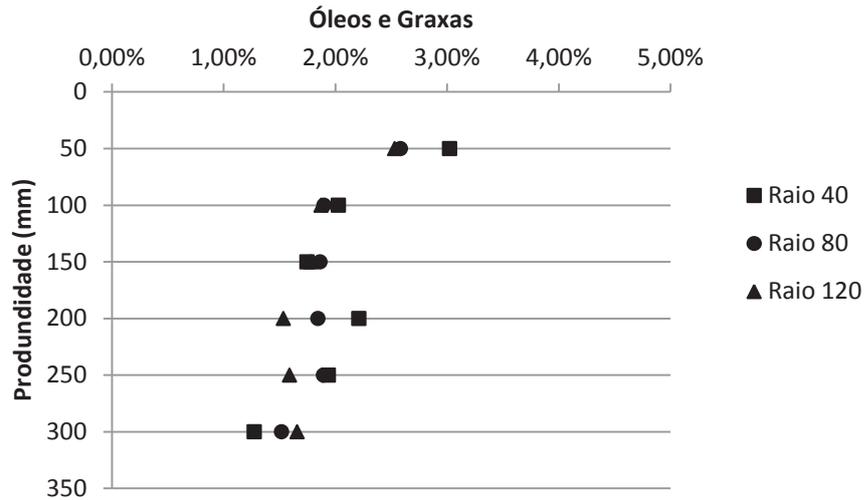
Figura 46. Óleos e Graxas do contaminante ao longo da profundidade e nos diferentes raios para o tempo inicial.



No tempo inicial, observa-se que a extração do contaminante foi maior na superfície do corpo de prova, mostrando que devido à forma de aplicação do contaminante, o contaminante não conseguiu ficar homogêneo em todo o corpo de prova. No entanto, a contaminação de 4% não conseguiu chegar na profundidade 200 mm, 250 mm e 300 mm. Pode-se destacar também, que no raio maior (120 mm), a quantidade de contaminante também foi menor.

A Figura 47 apresenta a extração no tempo 15 dias após a aplicação do bioaumento no corpo de prova.

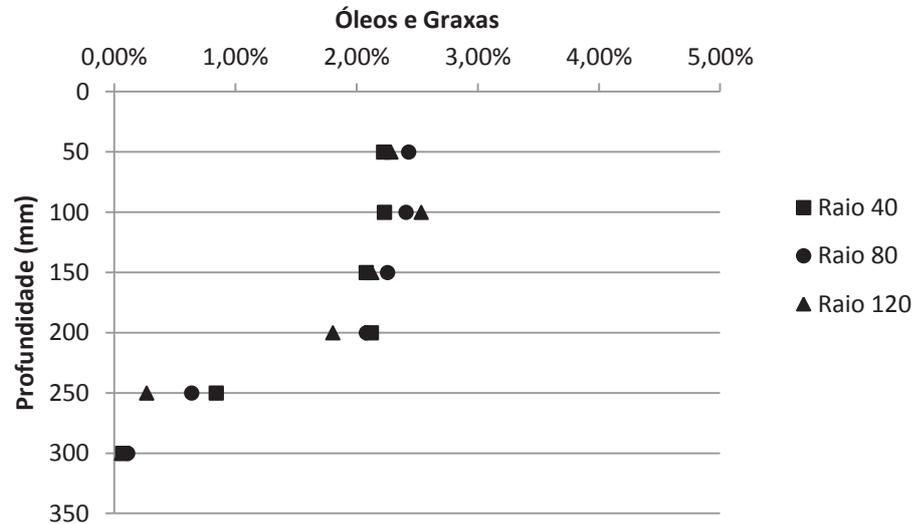
Figura 47. Óleos e Graxas do contaminante ao longo da profundidade e nos diferentes raios para o tempo de 15 dias.



A extração do contaminante no tempo 15 dias foi menor, devido à degradação do contaminante com ação dos microrganismos. Pode-se destacar, porém, que a percolação do contaminante no tempo 15 dias foi maior que no tempo inicial, nas profundidades 200 mm, 250 mm e 300 mm. O mesmo aconteceu para Barros et al (2010), o qual destaca que na maior profundidade, não foi percebida qualquer redução do contaminante, possivelmente em consequência da lenta percolação do óleo diesel pelas camadas do solo.

A Figura 48 apresenta o resultado da extração do contaminante no tempo 30 dias.

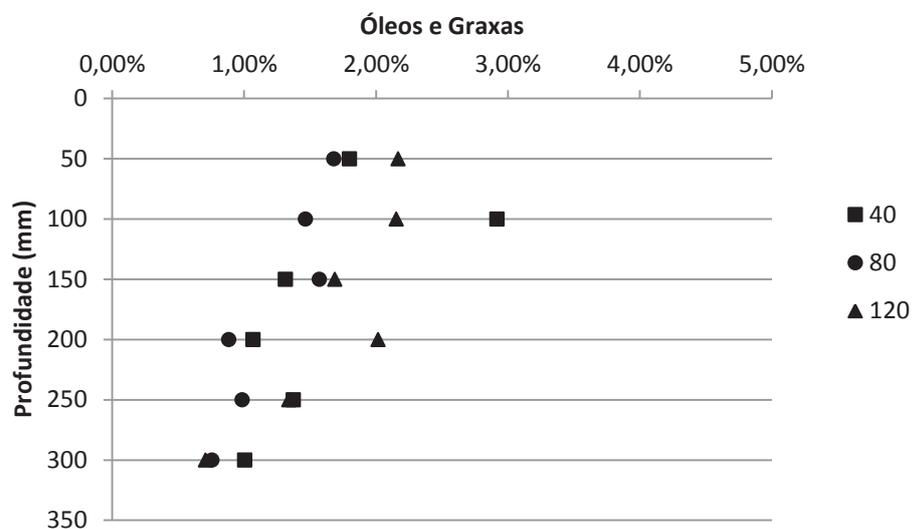
Figura 48. Óleos e Graxas do contaminante ao longo da profundidade e nos diferentes raios para o tempo de 30 dias.



No tempo 30 dias, observa-se uma menor extração do contaminante, com diminuição de 50 % em relação ao valor inicial.

A Figura 49 apresenta o resultado de extração do contaminante no tempo 60 dias de experimento.

Figura 49. Óleos e Graxas do contaminante ao longo da profundidade e nos diferentes raios para o tempo de 60 dias.



No tempo 60 dias, observa-se que a variação dos valores de extração foram maiores nos raios e profundidades estudadas. Vale ressaltar que por estar trabalhando com amostras indeformadas, cada corpo de prova possui heterogeneidade inerente à formação dos solos. Isto ficou comprovado pela variação do teor de contaminação nas profundidades maiores, indicando materiais com diferentes permeabilidades.

Os resultados de extração, umidade e pH, mostraram-se que não houve influencia dos diferentes raios e profundidades durante o tempo do experimento.

Os bons resultados de extração mostram que o bioaumento nos corpos de provas analisados se mostraram eficientes na degradação do biodiesel no solo indeformado.

#### **5.4 Análise qualitativa de degradação (cromatografia gasosa)**

A análise cromatográfica demonstra quais carbonos foram degradados durante o processo de biorremediação. Através do perfil cromatográfico já se observa diferenças entre os picos de retenção em alguns carbonos, o que representa a degradação.

A Figura 50 é apresentado o perfil do biodiesel puro, na Figura 51 e 52 são apresentados os perfis cromatográficos para o tempo 30 d.

Figura 50. Perfil cromatográfico do biodiesel puro.

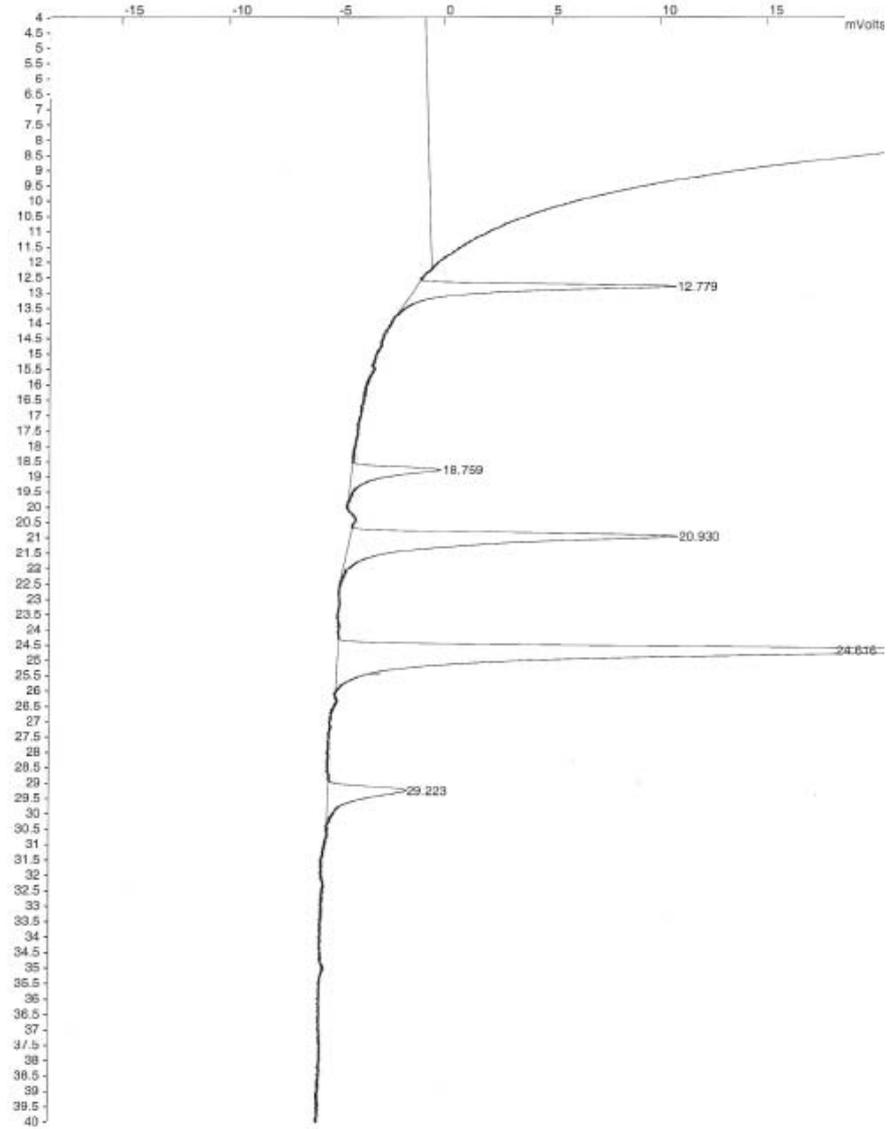


Figura 51. Perfil cromatográfico no tempo 30 dias.

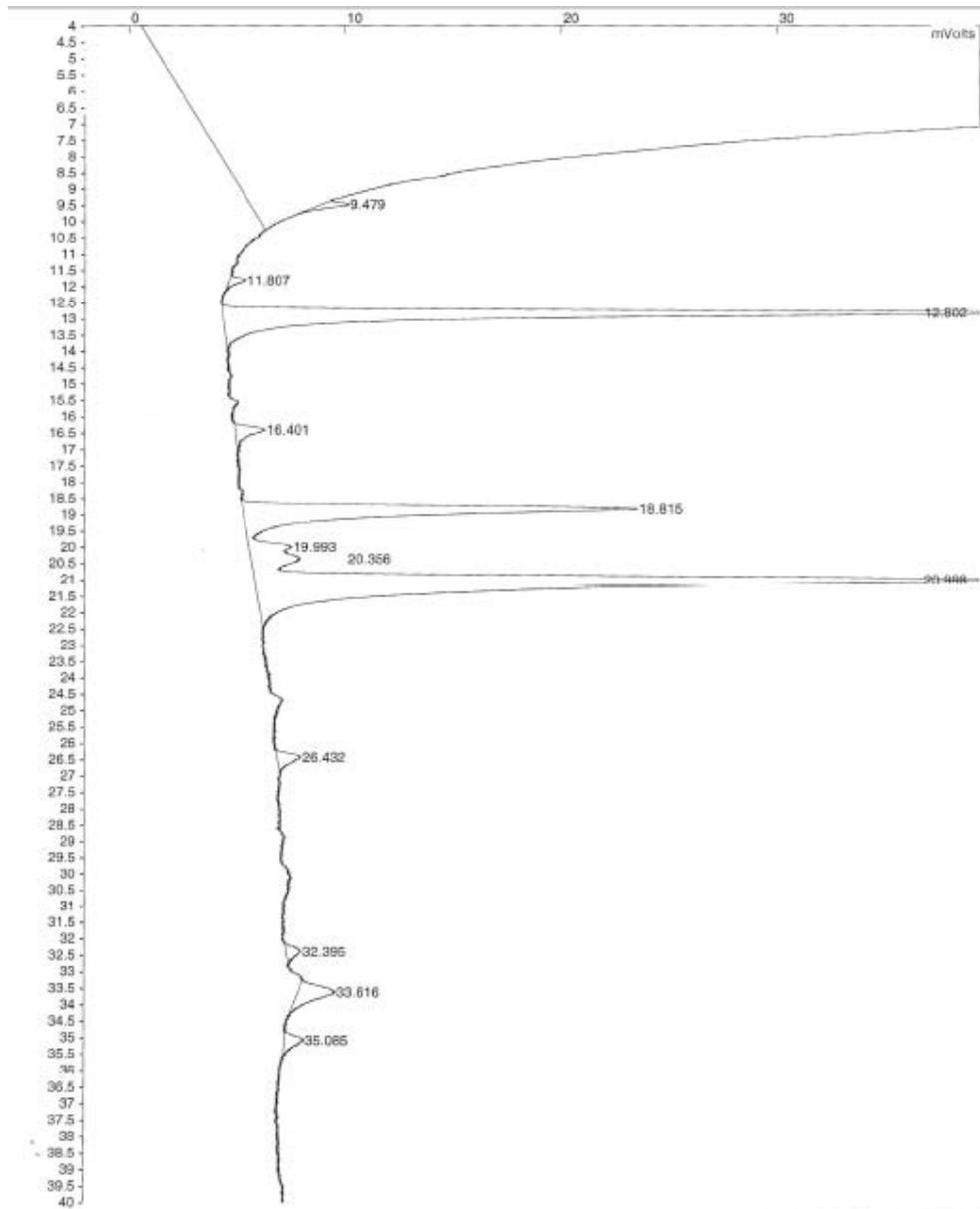
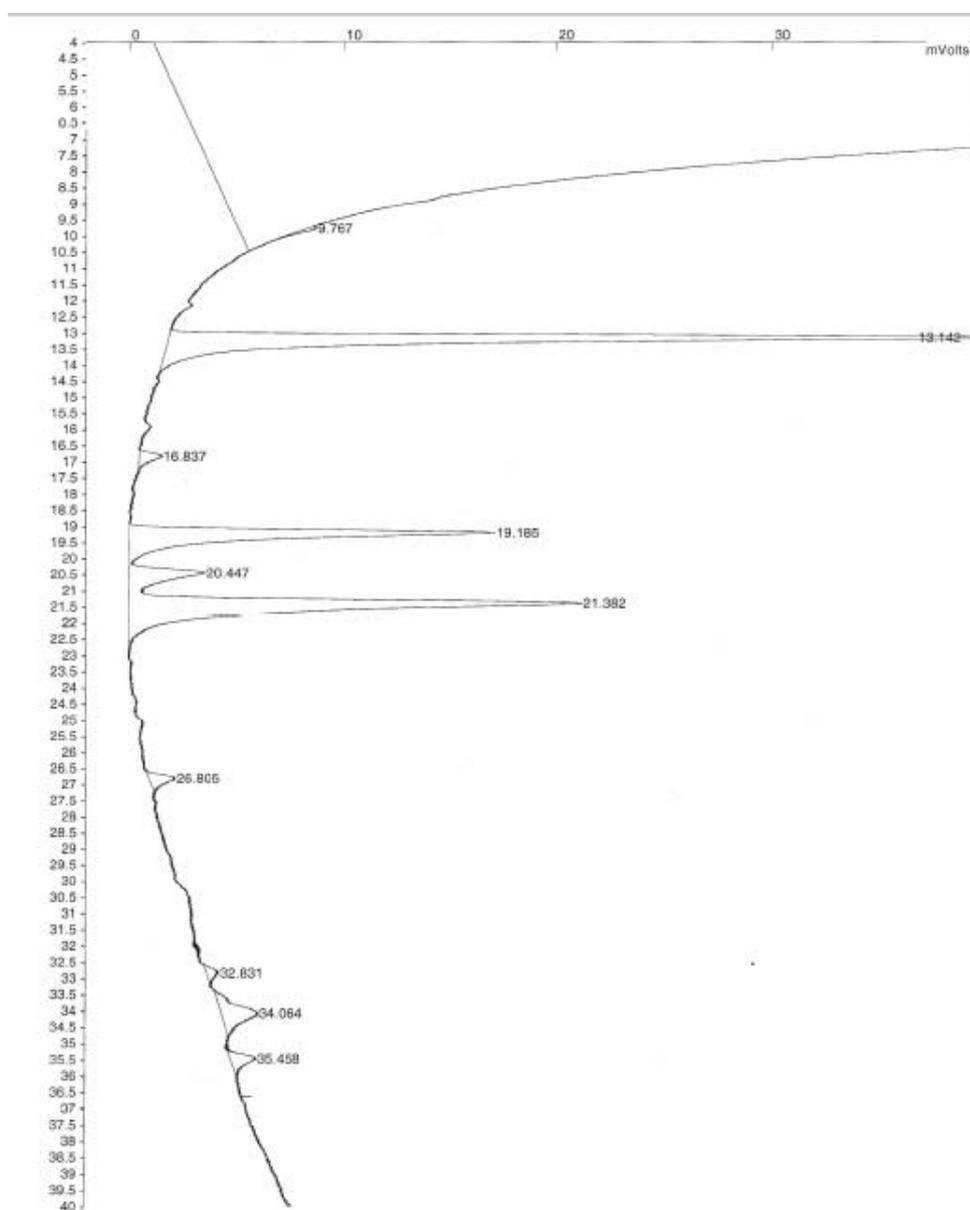


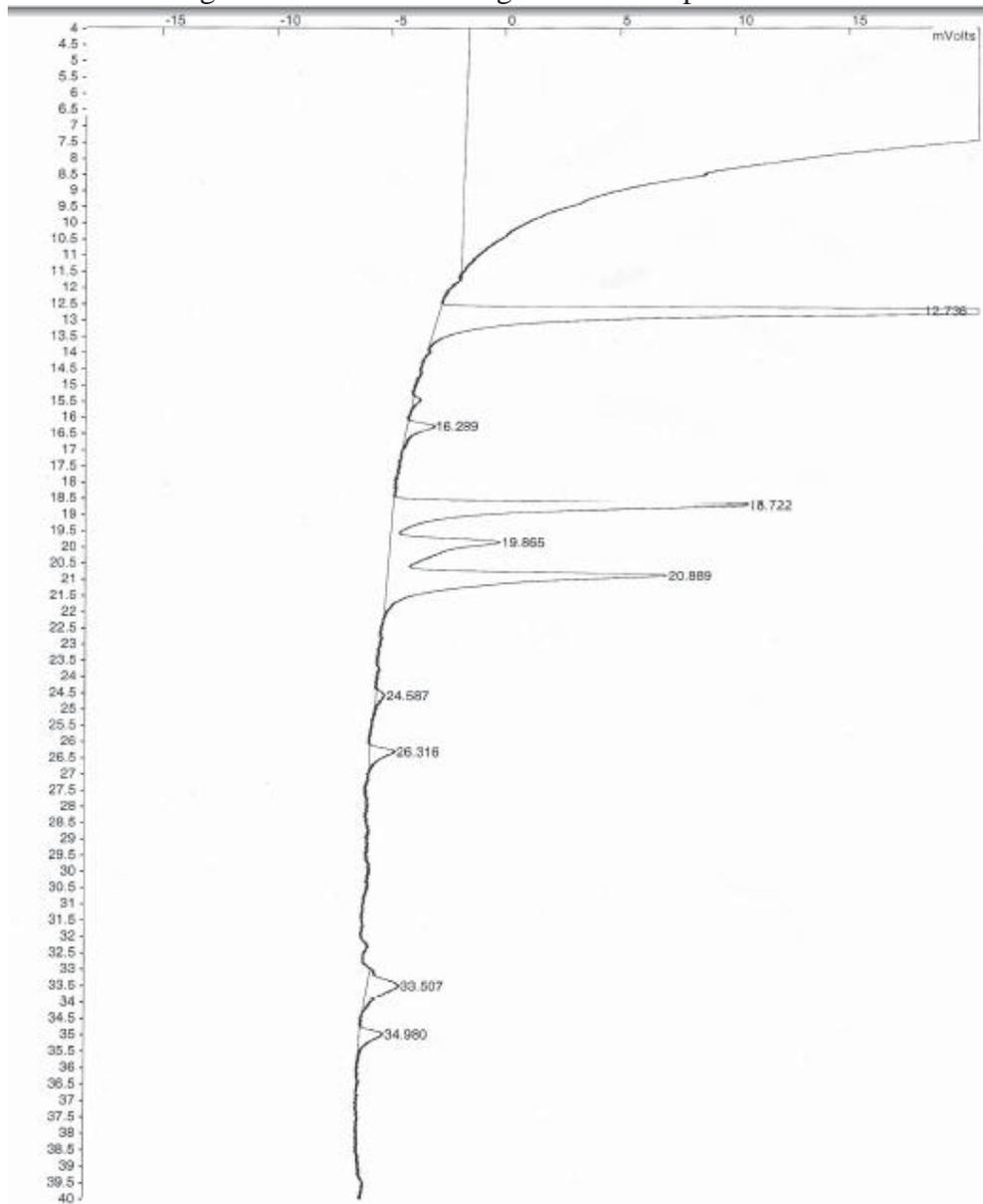
Figura 52. Perfil cromatográfico 2 no tempo 30 dias.



Foi realizado dois perfis cromatográficos no tempo 30 dias, em duas profundidades, 100 mm e 200 mm, respectivamente, num mesmo raio (40mm), para verificar se haveria mudanças nos resultados. No entanto, verifica-se pelas Figuras 51 e 52 que o perfil apresentou semelhanças, não havendo necessidade de realização de mais de uma amostra no tempo 60 dias, face aos elevados custos de análise.

A Figura 53 apresenta o perfil cromatográfico no tempo 60 dias de experimento.

Figura 53. Perfil cromatográfico no tempo 60 dias.



A Tabela 04 apresenta os percentuais de ácidos graxos obtidas nos perfis cromatográficos do biodiesel puro, no tempo 30 d e 60 d.

Tabela 04. Percentual de ácidos graxos obtidas nos perfis cromatográficos.

<b>ÁCIDOS GRAXOS</b>	<b>BIODIESEL PURO (%)</b>	<b>T 30 d (%)</b>	<b>T 60 d (%)</b>
C14:0	-	1,82	-
C16:0	12,33	81,71	87,09
C18:0	5,93	8,28	-
C20:0	51,28	-	3,20
C22:0	-	-	6,42
C16:1 cis	-	3,50	3,30
C18:1 cis	24,00	-	-
C18:2 cis	-	2,90	-
C18:3 cis	6,44	1,79	-

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.

Pela diferença no percentual de ácidos graxos dos perfis cromatográficos, no tempo 60 dias observa-se os melhores resultados. No entanto, verifica-se uma diminuição de alguns carbonos.

Segundo Bento et al.,(2005), os carbonos podem ser divididos em duas faixas, a fração leve (C12-C23) e a fração pesada (C24-C40). Na fração leve foi onde ocorreu a maior diminuição nas áreas dos carbonos em relação aos valores iniciais. Isso pode ser confirmado com o estudo de Kauppi et al.,(2011), onde os carbonos da fração leve dos hidrocarbonetos são mais facilmente biodegradados.

Os hidrocarbonetos da fração leve são mais facilmente degradados pelos microrganismos, devido estes possuir uma estrutura menos complexa e com menos ligações do que os carbonos da fração pesada.

## 6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Neste estudo, diversos fatores podem interferir, tanto positiva quanto negativamente, na degradação dos contaminantes. O presente trabalho se restringiu a avaliar as variáveis em diferentes raios e profundidades através de três variáveis de resposta que foram: umidade, pH e teor de óleos e graxas no solo.

### 6.1 Óleos e graxas

A Tabela 5 apresenta o resultado da análise de variância realizada para verificação da significância estatística da variação dos teores de óleos e graxas em relação ao tempo a profundidade estudadas. A análise estatística indicou um valor P menor que 0,001, o qual representa a que o tempo e a profundidade afeta significativamente os teores de óleos e graxas.

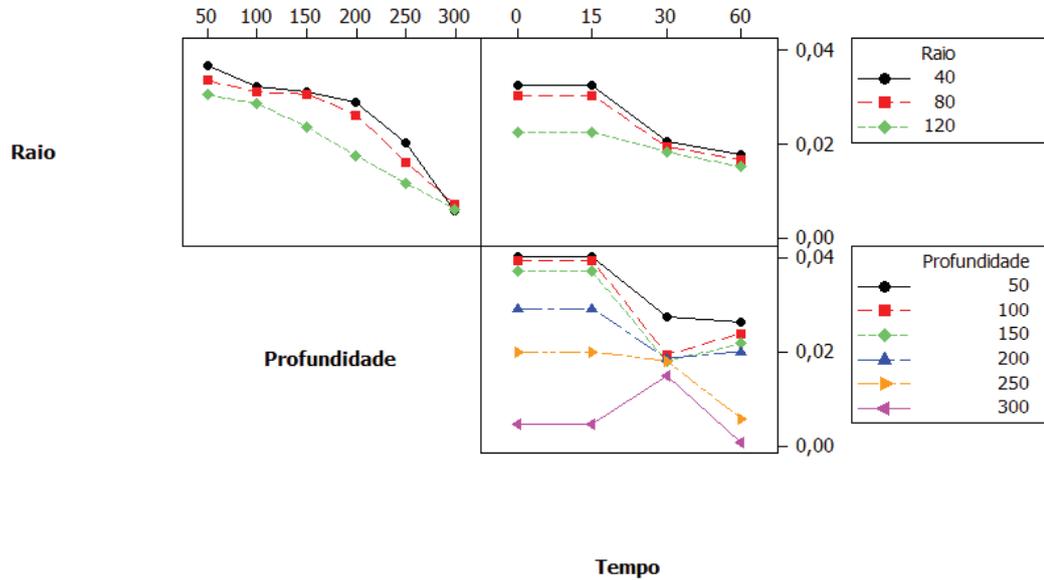
Tabela 5. Análise de variância dos teores de óleos e graxas.

Fonte de Variação	GL*	SQ*	QM*	F*	P*
Tempo	3	0,0041	0,0013	73,36	<0,001
Profundidade	5	0,0127	0,0025	135.42	<0,001
Interação	15	0,0027	0,0001	9,92	<0,001
Erro	120	0,0022	0,0000		
Total	143	0,0218			

(\*GL- Graus de liberdade; SQ – Soma dos quadrados; QM – Média dos quadrados; F – Valor F calculado)

A Figura 54 apresenta os efeitos das interações entre as variáveis estudadas, raio, profundidade e tempo.

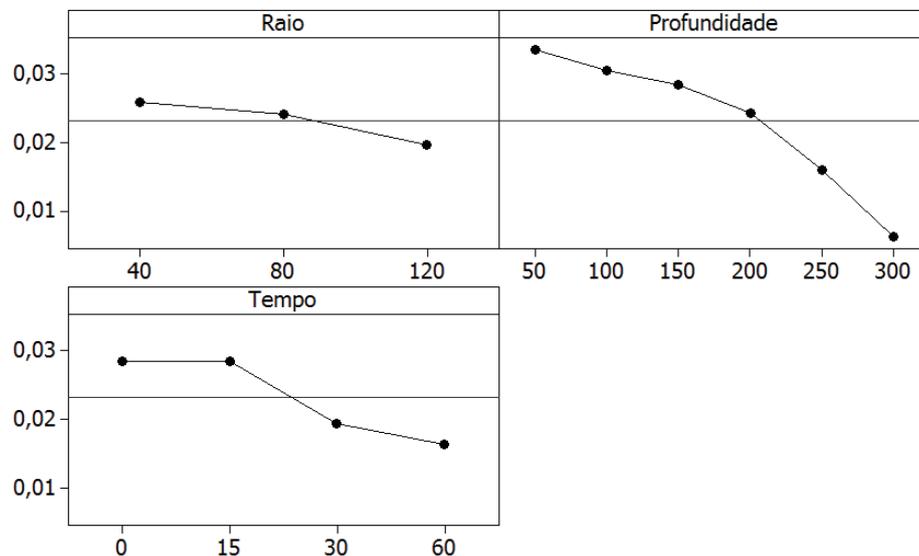
Figura 54. Interação entre as variáveis estudadas em relação aos Óleos e Graxas extraídos nos tempos.



Na análise qualitativa das variáveis de matriz de interação (Figura 54), observa-se que as extrações ocorreram homogeneamente nos três raios, e nas profundidades estudadas, ficando clara a baixa interação entre as variáveis estudadas.

A Figura 55 apresenta o gráfico dos efeitos principais para variável de óleos e graxas.

Figura 55. Gráfico dos efeitos principais para óleos e graxas.



Na análise dos efeitos principais, observa-se que óleos e graxas diminuí com o aumento do raio e aumento da profundidade, mostrando que os efeitos foram significativos para todas as variáveis estudadas.

## 6.2 Umidade

A Tabela 6 apresenta o resultado da análise de variância realizada para verificação da significância estatística da variação da umidade em relação ao raio e a profundidade estudadas.

Tabela 6. Análise de variância da umidade.

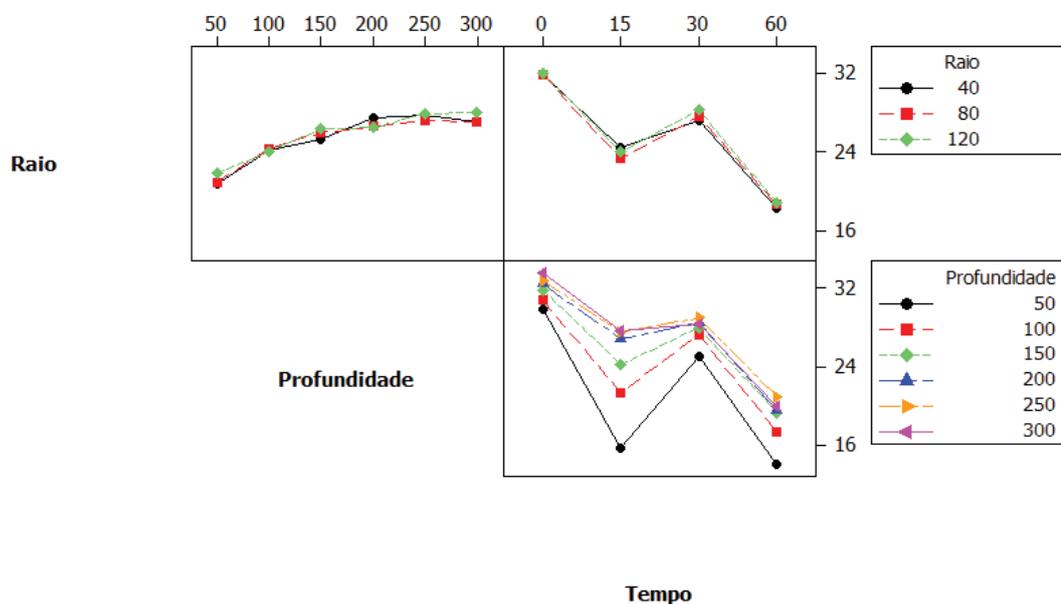
Fonte de Variação	GL*	SQ*	QM*	F*	P*
Raio	2	4,75	2,374	0,08	>0,005
Profundidade	5	730,36	146,07	4,75	<0,001
Interação	10	17,64	1,764	0,06	>0,005
Erro	126	3870,87	30,721		
Total	143	4623,61			

(\*GL- Graus de liberdade; SQ – Soma dos quadrados; QM – Média dos quadrados; F – Valor F calculado)

A análise estatística indicou um valor P menor que 0,001 somente para profundidade, para o raio, o valor P foi maior que 0,005, mostrando que o raio não foi significativo.

A Figura 56 apresenta os efeitos das interações entre as variáveis estudadas, raio, profundidade e tempo.

Figura 56. Interação entre as variáveis estudadas em relação a umidade nos tempos estudados.



Na análise qualitativa das variáveis de matriz de interação (Figura 56), observa-se, aparentemente, que o raio e o tempo tiveram interação na umidade. Porém, para as profundidades estudadas, a interação fica aparentemente obscura. A umidade diminui em função do tempo, como esperado, porém destaca-se que no tempo 15 dias a umidade estava menor do que a umidade de 30 dias, mostrando que há heterogeneidades entre as amostras.

### 6.3 pH

A Tabela 7 apresenta o resultado da análise de variância realizada para verificação da significância estatística da variação do pH em relação ao raio e a profundidade estudadas.

Tabela 7. Análise de variância do pH.

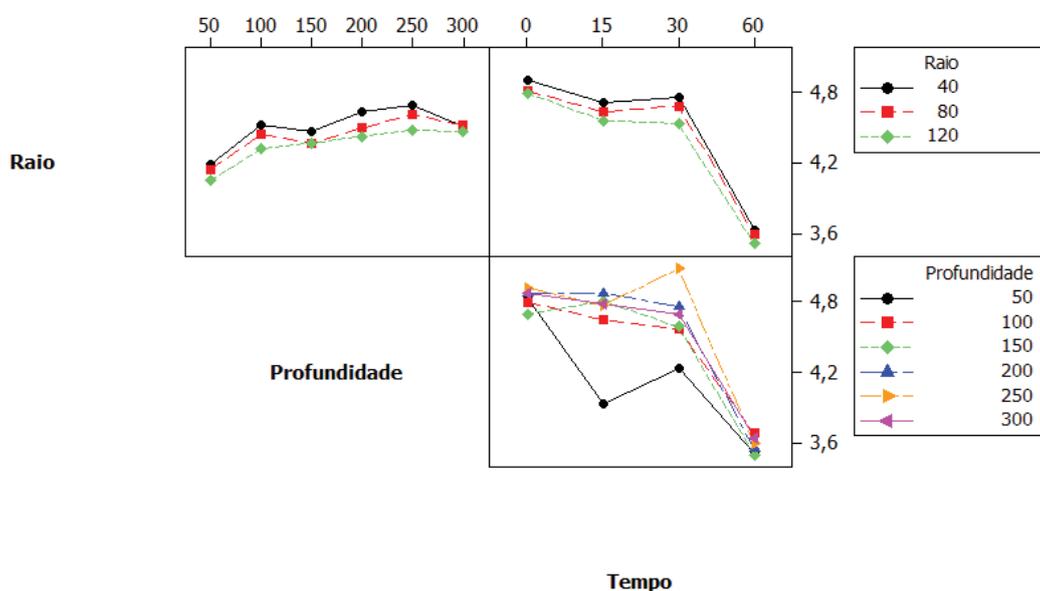
Fonte de Variação	GL*	SQ*	QM*	F*	P*
Raio	2	0,552	0,276	0,87	>0,005
Profundidade	5	3,185	0,637	2,01	>0,001
Interação	10	0,124	0,012	0,04	>0,005
Erro	126	39,87	0,316		
Total	143	43,73			

(\*GL- Graus de liberdade; SQ – Soma dos quadrados; QM – Média dos quadrados; F – Valor F calculado)

A análise estatística indicou um valor P maior que 0,001 para todas as variáveis estudadas.

A Figura 57 apresenta os efeitos da interações entre as variáveis estudadas, raio, profundidade e tempo.

Figura 57. Interação entre as variáveis estudadas em relação ao pH nos tempos estudados.



A Figura 57 apresenta que as variáveis estudadas apresentaram interação em relação ao pH apenas com a profundidade, sendo o raio e o tempo ficando as retas paralelas entre si, no entanto mostrando que há pequena interação entre eles.

## 7. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos mostraram que as profundidades e os raios estudados não apresentaram influencia significativa nos resultados. Isso aponta que o experimento se mostrou homogêneo em todos os tempos avaliados.

A umidade e o pH do experimento diminuíram conforme o tempo foi passando, sendo o esperado, pois os corpos de prova vão perdendo umidade, pois não há mais inserção de líquido no mesmo. O pH, no tempo 60 dias, ficou na faixa de 3,5, mostrando que com o passar do tempo, o pH se torna mais ácido. Isso se deve, à ação dos microrganismos no meio, faz com que o pH fica mais ácido com ação da degradação das cadeias carbônicas. Dessa maneira, o monitoramento e correção do pH deve ser realizada durante a biorremediação de solos poluídos por hidrocarbonetos de modo que valores extremos desse parâmetro não sejam desfavoráveis à atividade microbiana.

A umidade é um dos fatores essenciais para o processo de degradação dos contaminantes visto que ela é o veículo de transporte de nutrientes e oxigênio, para dentro e fora das células dos microrganismos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Ainda segundo Borresen e Rike (2007), a umidade é essencial para o crescimento multiplicação dos microrganismos e afeta a degradação de contaminantes orgânicos, influenciando na difusão de ar e mobilidade do contaminante e microrganismos. Os autores Linn e Doran (1984) descreve que à medida que o teor de água diminui, a difusão de oxigênio vai se tornando mais reduzida, criando condições anaeróbicas no meio.

Para a quantificação dos microrganismos pode-se destacar que os microrganismos no tempo 15 dias tiveram uma queda devido à sua fase de adaptação ao meio. Segundo vários autores, o emprego de uma população microbiana adaptada ao contaminante é crucial nos tratamentos de biorremediação (VIDALI, 2001; OLANIRAM et al., 2006).

Como mostra Simon et al. (2004), que a habilidade dos microrganismos exógenos em se adaptarem as condições presentes no campo pode ser considerado o principal fator limitante para a utilização do bioenriquecimento do solo. No entanto, a quantificação de microrganismos presentes no solo apresentou resultados satisfatórios, devido o equipamento de dispersão ter demonstrado boa dispersão no corpo de prova. No entanto, verifica-se que as espécies de *Bacillus* também apresenta uma série de genes importantes para a biorremediação (VARY et al., 2007).

A biodegradação de hidrocarbonetos tem início com a introdução de oxigênio na molécula com a formação de ácidos orgânicos que são responsáveis pela acidificação do meio. Isso foi provado por Meredith et al. (2000) que demonstraram que um óleo específico submetido ao processo de biodegradação apresentou maior acidez comparado ao mesmo óleo não biodegradado devido à maior quantidade de ácidos carboxílicos que foi formado durante o ataque microbiano. Barth et al. (2004) também quantificaram os ácidos orgânicos presentes em amostras de petróleo submetidas ao processo de biodegradação e amostras não biodegradadas. No hidrocarboneto biodegradado a quantidade de compostos ácidos foi maior e esses autores também relataram que tais ácidos provavelmente são produzidos durante o processo de degradação microbiana.

Os dados de extração de óleos e graxas se mostrou satisfatória. Porém, na parte superior, houve maior extração em relação à parte mais profunda dos biorreatores. Isso ocorre certamente, ao fato do contaminante não ter percolado totalmente para as partes mais profundas do biorreator. Conforme constatado por Ferreira (2010), a degradação do contaminante foi maior na parte superior do biorreator. Nas camadas mais profundas mostrou-se degradação lenta. No entanto, o mesmo comportamento pode ser observado nos experimentos deste trabalho.

Conforme estudo realizado por Baptista e Rizzo (2004), a diminuição dos óleos e graxos pode ocorrer não só pelos fatores relacionados à atividade microbiológica, mas também por fatores físico químico, tais como lixiviação e volatilização.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na sequencia, estão apresentadas as conclusões acerca do estudo realizado na aplicação da técnica de bioaumentação.

O projeto e montagem do equipamento para aplicação da técnica de bioaumentação *in situ* se mostrou eficiente, destacando que a dispersão do bioaumentação ocorreu de forma homogênea nos raios e profundidade em todos os corpos de prova. O sistema de *Jet Grouting* se mostrou importante como base no estudo. O equipamento montado se mostrou de grande importância para aplicação, atendendo resultados satisfatórios, e de grande valia para aplicação da técnica de bioaumentação *in situ*.

As análises nos teores de óleos e graxas, umidade e pH, evidenciaram que não houve influencia dos diferentes raios e profundidades durante o tempo do experimento, comprovando que os raios e a profundidades não possuem influência no processo de degradação do contaminante.

As variações da umidade nos corpos de prova aumentaram com as profundidades ao longo do tempo do experimento. No entanto, observa-se que a umidade dos corpos de provas do experimento diminuiu de 35% para aproximadamente 14% ao longo do tempo. Assim, a umidade do solo é um fator limitante para os microrganismos e um importante parâmetro de monitoramento no processo de biorremediação.

Os resultados deste trabalho permitem afirmar que a tecnologia de bioaumentação *in situ* é um importante meio de remoção do contaminante biodiesel, através da degradação da massa do contaminante e sua destruição *in situ*. A aplicação de microrganismos selecionados estimula e acelera a degradação do contaminante. Os microrganismos adicionados no solo tiveram uma atividade microbiana e adaptação favorável para o meio em que se encontravam.

## 9. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Mecanizar o equipamento montado para facilitar a aplicação do bioaumentamento nos biorreatores.
- ✓ Estudar outros tipos de técnicas para aplicação com o equipamento montado.
- ✓ Modelar o comportamento do bioaumentamento no solo.
- ✓ 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.

## REFERÊNCIAS

ABDULSALAM, SURAJUDEEN; OMALE, A. BENJAMIN. Comparison of biostimulation and bioaugmentation techniques for the remediation of used motor oil contaminated soil. **Braz. arch. biol. technol.** [online], v.52, n.3, pp. 747-754, 2009.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**, 302 p, Academic Press, 1994.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. 2.ed. New York: Academic, 453p., 1999.

ALMEIDA, M. H.; CARVALHO, F. P. (1995) **Manual de Operação do Landfarming**. PETROBRAS - REPAR, Araucária.

ANP. Agencia Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Anuário estatístico 2011**. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=58071&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=131954546810>. Acesso em 25 out. 2011.

ANP. 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%20biodiese1%20%2001%20set.pdf](http://www.anp.gov.br/doc/biodiesel/14%20_20rev_port_anp_p310_2001Ver%20biodiese1%20%2001%20set.pdf). Acesso em 10 ago 2011.

APHA. American public health association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Washington, 2005, 19. ed.

ARRAR J.; NADIA C.; FATIHA B. Treatment of diesel fuel contaminated soil in jet-fluidized bed. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, p.131–138, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6457**: Amostras de solo - Preparação de ensaios de compactação e caracterização. Rio de Janeiro, 1986.

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

BAPTISTA, S. J. 2007. **Avaliação do emprego de biossurfactante na biorremediação de solos contaminados com óleo diesel**. Tese (Doutorado em Tecnologia dos Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

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

BAPTISTA, S. J.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D. D. C. **Avaliação da bioestimulação em solos argilosos contaminados com petróleo**. Anais:...In: 2º Congresso Brasileiro de P & D em Petróleo & Gás 2004.

BARATHI, S.; VASUDEVAN, N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. **Environment International**, v. 26, p. 413-416, 2001.

BARTH, T.; HOILAND, S.; FOTLAND, P.; ASKVIK, K. M.; PEDERSEN, B. S.; BOURGUND, A. E. Acidic compounds in biodegraded petroleum. **Org. Geochem.**, v.35, p.1513-1525, 2004.

BARDI, L. et al. Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with  $\beta$ -cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p.709-713, 2000.

BENTO, D. M., 2005 **Análise Química da Degradação dos Hidrocarbonetos de Óleo Diesel no Estuário da Lagoa dos Patos – Rio Grande/RS**. Dissertação de Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica. Fundação Universidade Federal do Rio Grande - RS.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B.; FRANKENBERGER-JÚNIOR, W. T. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 65-68, 2003.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 65-68, 2004.

BENTO, F. M., CAMARGO F. A. O., OKEKE, B. C. FRANKENBER, W. T. Diversity of producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel soil. **Microbiological Research**, v. 160; p. 249-255, 2005.

BOCZAR, B. A.; FORNEY, L. J.; BEGLEY, W. M.; LARSON, R. J.; FEDERLE, T. W. Characterization and Distribution of Esterase Activity in Activated Sludge. **Water Research**, v. 35, n. 17, p. 4208–4216, 2001.

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

BORGES, R. M. H., 2001. **Biodegradação em solo argiloso contaminado com petróleo. Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado. EQ/UFRJ.**

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **Microbiology reviews**, v. 26, n. 17, p. 73–81, 2002.

BRADDOCK, J. F.; CATTERALL, P. H. A simple method for enumerating gasoline and diesel degrading microorganisms. **Biorremediation Journal**, v. 3, p. 81-84, 1999.

BORRESEN M.H.; RIKE A.G. Effects of nutrient content, moisture content and salinity on mineralization of hexadecane in an Arctic soil. **Cold regions science and technology**, v.48, p.129–138, 2007.

BRAUN, S., SCHMAL, M. A poluição gerada por máquinas de combustão interna movidas a diesel: a questão dos particulados. Estratégias atuais para a redução das emissões e tendências futuras. **Química Nova**, v. 7, p. 472-482, 2003.

BYUN, I.; HAE-UK, N.; SEUNG KOO, S.; IN-SEONG, H.; TAE-HO L.; TAE-JOO P. Monitoring of Bioventing Process for Diesel-Contaminated Soil by Dehydrogenase Activity, Microbial Counts and the Ratio of n-Alkane/Isoprenoid. **Korean J. Chem. Eng.**, v. 22, p. 917-921, 2005.

BÜCHER, F. **Biodeterioração de Misturas de Diesel e Biodiesel e seu Controle com Biocidas**. 2009. 147 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e Ambiental). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D.C. 2003. **Planejamento de Experimentos utilizando o Statistica**. E-papers Serviços Editoriais LTDA.

CARDOSO, E. J. B. N.. Ecologia microbiana do solo. In: CARDOSO, E. J. B. N. (coord.), TSAI, S. M., NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 360 p., 1992.

CARRETO, J. (2000). **Jet grouting: Uma técnica em desenvolvimento**. In VII Congresso Nacional de Geotecnia. Porto, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

CASTRO, R. A.; CARVALHO, F. J. P. C.; KRENZCZYNSKI, M. C.; JOANELLO JR, L. A.; CONEGLIAN, D. **Utilização de Nitrato de Potássio e Peróxido de Hidrogênio para Biorremediação “in situ” de Solos Contaminados pó Petróleo**. Anais:...In: 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, Salvador. 2005.

CHO, B. H.; CHINO, H.; TSUJI, H.; KUNITO, T.; NAGAKOA, K.; OTSUKA, S.; YAMASHITA, K.; MATSUMOTO, S.; OYAIZU, H. Laboratory-scale bioremediation of oil-contaminated soil of Kuwait with soil amendment materials. **Bioremediation Journal**. v. 3, p. 269-1283, 1997.

CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente. **Resolução nº. 314**, de 29 de outubro de 2002. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res02/res31402.html>. Acesso em 10 set. de 2011.

COOKSON, J. T. **Bioremediation Engineering: Desing and Application**. McGraw-Hill. New York. 1994.

CORSEUIL, H. X.; ALVAREZ, P. J. J. Natural bioremediation perspective for BTX contaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol. **Wat. Sci. Tech.**, v. 34, p.311-318, 1996.

CORSEUIL, H. X.; WEBER, W. J. Jr. Potential biomass limitations on rates of degradation on monoaromatic hydrocarbons by indigenous microbes in subsurface soils. **Water Research**, v. 28, p.1415-1423, 1994.

COULON, F.; EMILIEN, P.; LÉNAICK, G.; DANIEL, D. Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sub-Antarctic soil. **Chemosphere**. v. 58, p. 1439-1448, 2005.

CUNHA, P. O.; EURÍPEDES A. V.; JR. JEAN R. D. G.; CAMPOS, T. M. P.; NUNES, C. E M. F., ARIIVALDO, C.; FRANKLIN, S. A.; SILVA, M. I. P.; MANO, D. M. Evaluation of bioventing on a gasoline-ethanol contaminated undisturbed residual soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 110, p.63-76, 2004.

CUNNINGHAM, C.J., PHILIP, J.C. "Comparison of Bioaugmentation and Biostimulation in Ex Situ Treatment of Diesel Contaminated Soil". **Land Contamination and Reclamation**, v. 8, p. 261-269, 2000.

DAVIS, K.L., REED, G.D., WALTER, L., 1995, "A Comparative Cost for Petroleum Remediation Technologies". In: Hinchee et al. (eds.), *Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon*, Battelle Press, Columbus, Ohio.

DIAS, T. Para a pureza do Biodiesel. **Revista Meio Filtrante**. v. 35. Nov-Dez/2008.

DIBBLE, J. T., BARTHA, R. Effect of environmental parameter on the biodegradation of oil sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 729-739, 1979.

DOMINGOS, A. K. et al. The influence of BHA, BHT, and TBHQ on the oxidation stability of soybean oil ethyl esters (Biodiesel). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 416-423, 2007.

FEPAM. Fundação Estadual de Proteção Ambiental do estado do Rio Grande do Sul. **Acidentes de Transportes de Cargas Perigosas**. Disponível em: [http://www.fepam.rs.gov.br/emergencia/rel\\_acidentes.asp](http://www.fepam.rs.gov.br/emergencia/rel_acidentes.asp). Acesso em 25 out. 2011.

FERGUSON, S. H.; FRANZMANN, P. D.; SNAPE, I.; REVILL, A. T.; TREFRY, M. G.; ZAPPIA, L. R. Effects of temperature on mineralization of petroleum in contaminated Antarctic terrestrial sediments. **Chemosphere**, v.52, p. 975-987, 2003.

FERRARI, R. A., SOUZA, W. L. Avaliação da estabilidade oxidativa de biodiesel de óleo de girassol com antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n.1, p. 106-111, 2009.

FERREIRA, D. G. **Biorremediação de Solo Argiloso Contaminado com Gasolina Aditivada com Diferentes Teores de Etanol**. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Ciências. 2010.

FRANKENBERGER, JR.; W.T. the need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons. In CALABRESE, E.J.; KOSTECKI, P.T. **Hydrocarbon contaminated soils and groundwater**, v. 2, p. 237-293, 1992.

GALLEGO, J. L. R.; LOREDO, J.; LLAMAS, J. F.; VÁZQUEZ, F.; SÁNCHEZ, J. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. **Biodegradation**, v.12, p.325-335, 2001.

GERPEN, J. H. V. Determining the influence of contaminants on biodiesel properties. SP – **Society of automotive engineers**, n. 1274, p. 173-190, 1997.

GENOUW, G., DE NAEYER, F., VAN MENEEN, P., VAN DE WERF, H., DE NIJS, W., VERSTRAETE, W.X. “Degradation of Oil Sludge by Landfarming – A Case-Study at the Ghent Harbour”, **Biodegradation Journal**, v. 5, p. 37-46, 1994.

GOGOI, B.K.; DUTTA, N.N.; GOSWAMI, P.; KRISHNA MOHANB, T.R. A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. **Advances in Environmental Research**, p. 767–782, 2003.

HOREL A., SCHIEWER S. Investigation of the physical and chemical parameters affecting biodegradation of diesel and synthetic diesel fuel contaminating Alaskan soils. **Cold Regions Science and Technology**. v.58, p. 113–119, 2009.

HUANG, W.; LI, G.; LERNER, D.N. & ZHANG, X. 2000. Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. **Water Research**, p. 3845-3853, 2000.

HUPE, K., KONING, M., LÜTH, J.C., HEERENKLAGE, J., STEGMANN, R. Optimization of microbial soil treatment. In: **Treatment of contaminated soil: fundamentals, analysis, applications**. Stegmann, R., Brunner, G., Calmano, W., Matz, G. (Eds). Berlin: Springer, 2001. 658p.

JACQUES, R. J. S.; BENEDICT, C. O.; BENTO, F. M.; PERALBA, M. C. R.; CAMARGO, A. O. Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial consortium from a petrochemical sludge landfarming site. **Bioremediation Journal**, v.11, n.1, p.1-11, 2007.

LEBKOWSKA, M.; ZBOROWSKA, E.; MIASKIEWICZ-PESKA, E.; MUSZYNSKI, A.; TABERNACKA, A.; NAUMCZYK, J.; JECZALIC, M. Bioremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native microorganisms: Field-scale processes in Poland. **Ecological Engineering**. p. 1895-1900, 2011.

LINN, D.M., DORAN, J.W. Effect of water-filled pore space on carbon dioxide and nitrous oxide production in tilled and nontilled soils. **Soil Science Society of America Journal**,

v.48, p. 1267–1272, 1984.

KATAOKA, A. P. A. G. **Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de “landfarming”**. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 2001.

KARAMALIDIS, A. K.; A. C. EVANGELOU; E. KARABIKA; A.I. KOUKKOU; C. DRAINAS; E.A. VOUDRIAS. Laboratory scale bioremediation of petroleum-contaminated soil by indigenous microorganisms and added *Pseudomonas aeruginosa* strain Spet. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6545-6552, 2010.

KAUPPI, S.; SINKKONEN, A.; ROMANTSCHUK, M. Enhancing bioremediation of diesel-fuel-contaminated soil in a boreal climate: Comparison of biostimulation and bioaugmentation. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 37, p. 359-368, 2011.

KNOTHE, G. Some aspects of biodiesel oxidative stability. **Fuel Processing Technology**. Pennsylvania, v. 88, n. 7, p. 669-677, 2007.

KOMILIS, DIMITRIOS P.; VROHIDOU, AGGELIKI-ELENI K.; VOUDRIAS, EVANGELOS A. Kinetics of aerobic bioremediation of a diesel contaminated Sandy soil effect of nitrogen addition. **Water, air and Soil pollution**, v. 208, p. 193-208, 2010.

LEE, J., HUNDAI, L. S., HORTON, R., TOMPSON, M. L. Vadose zone processes and chemical transport, sorption and transport behavior of naphthalene in an aggregated soil. **Environmental Journal**, p. 1716-1721, 2002.

LEE, M. D.; THOMAS, J. M.; BORDEN, R. C.; BEDIENT, P. B.; WARD, C. H.; WILSON, J. T. Bioremediation of aquifers contaminated with organic compounds. **CRC Critical Reviews in Environmental Control**, v. 1. p. 29-89, 1988.

LI, G.; HUANG, W.; LERNER, D. N.; ZHANG, X. Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. **Water Research**, v. 15, p. 3845-3853, 2000.

LIU WUXING; YONGMING LUO; YING TENG; ZHENGGAO LI; LENA Q. M .A. Bioremediation of oily sludge-contaminated soil by stimulating indigenous microbes. **Environ Geochem Health**, v. 32, p. 23–29, 2010.

MACNAUGHTON, S. J.; STEPHEN, J. R.; VENOSA, A. D.; DAVIS, G. A.; CHANG, Y. J.; WHITE, D. C. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n.8, p. 3566-3574, 1999.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. 2004. Microbiologia. 10 ed. Editora Pearson/Prentice Hall. 624 p.

MAKAREVICIENE, V.; JANULIS, P. Environmental Effect of Rapeseed Oil Ethyl Ester. **Renewable Energy**, v. 28, p. 2395- 2403, 2003.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 3127–3133, 2001.

MARIANO P. A. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. Tese de Doutorado em Geociências e Meio Ambiente. Instituto de Ciências Exatas e Geociências. Universidade Estadual Paulista. 2006.

MARIANO, A. P.; ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M. Monitoramento de indicadores geoquímicos e avaliação de biodegradação em área contaminada com óleo diesel. **Eng. Sanit. Ambient. [online]**, v.12, n.3, p. 296-304. 2007.

MARIANO, A. P.; ANGELIS, D. F.; PIRROLO, M. P. S.; CONTIERO, J.; BONOTTO, D. M. Investigation about the Efficiency of the Bioaugmentation Technique when Applied to Diesel Oil Contaminated Soils. **Brazilian archives of Biology and technology and international journal**, v.52, n. 5, p. 1297-1312, 2009.

McGILL, W.B., ROWELL, M.J., WESTLAKE, D.W.S. (1981) Biochemistry, Ecology and Microbiology of Petroleum Components in Soil. **Soil Biochemistry** Ed. E.A . Paul and J.N. Ladd, Marcel Dekker, New York, v. 5. 229p.

MENEGHETTI, L. **Biorremediação na descontaminação de um solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel**. Dissertação (Mestrado em Engenharia: área de concentração: Infra-estrutura e Meio Ambiente). Faculdade de Engenharia e Arquitetura. Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2007.

MENEGHETTI, L., CAVELHÃO, G., TRENTIN, A., THOMÉ, A., SCHNAID, F. **Avaliação da Influência de Diferentes Índices de Vazios do Solo na Biodegradação de Biodiesel**. COBRAMSEG, 2010.

MENEGHETTI L.R.R. et al. (2009). **Monitoring of bioremediation in clay soil contaminated with biodiesel**. V Seminar of Geotechnical Engineering of Rio Grande of Sul. Pelotas, Brazil.

MEREDITH, W.; KELLAND, S. J.; JONES, D. M. Influence of biodegradation on crude oil acidity and carboxylic acid composition. **Org. Geochem**, v. 31, p. 1059-1073, 2000.

MEYER. D. **Avaliação da biodegradabilidade de misturas de diesel e de biodiesel (B0, B20 e B100) em dois solos com diferentes granulometrias**. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e Ambiental. Instituto de Ciências Básicas de Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2011.

MISHRA, V.; LAL, R.; SRINIVASAN. Enzymes and operons mediating xenobiotic degradation in bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 27, n.2 p.133-166, 2001.

MORAES, B. E.; TORNISIELO, T. M. S. Biodegradation of Oil Refinery Residues Using Mixed- Culture of Microorganisms Isolated from a Landfarming. **Brazilian archives of Biology and technology**, v.52, n. 6, p. 1571-1578, 2009.

MORAIS, E. B. **Biodegradação de resíduos oleosos provenientes de refinaria de petróleo através do sistema de biopilha**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada). Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro. Universidade Estadual Paulista. 2005.

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

MURUGESAN, A.; et al. Biodiesel as an alternative fuel for diesel engines – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.13, n. 3, p. 653-662, 2009a.

MURUGESAN, A.; et al. Production and analysis of biodiesel from non-edible oils – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.13, n. 4, p. 825-834, 2009b.

OLANIRAM,A.O.; PILLAY, D.; PILLAY,D. Biostimulation and bioaugmentation enhances aerobic biodegradation of dichloroethenes. **Chemosphere**, v. 63, p. 600-608, 2006.

ORTEGA-CALVO, J.J., LAHLOU, M., SAIZ-JIMENEZ, C. Effect of organic matter and clays on the biodegradation of phenanthrene in soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.40, p.101-106, 1997.

PALA, D. M.; 2002. **Estudo da biorremediação de solo impactado por petróleo.** Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro. COPPE/UFRJ.

PALITTAPONGARNPIM, M.; POKETHITIYOOK, P.; UPATHAM, E. S.; LADDA TANGBANLEUKAL, L. Biodegradation of crude oil by soil microorganisms in the tropic. **Biodegradation**, v. 9, p. 83-90, 1998.

PASQUALINO, JORGELINA C., DANIEL MONTANE; JOAN SALVADO. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. **Biomass and Bioenergy**. v. 30, p. 874–879, 2006.

PEARSON, G.; OUDIJK, G. Investigation and remediation of petroleum product releases from residential storage tanks. **Ground Water Monitoring Review**, v.13, p. 124-128, 1993.

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.

PINTO, A. **Tratamento de solos de fundação.** Lisboa : Slides da disciplina de FOA-Mestrado Integrado em Eng. Civil, 2009.

PINTO, A. E FALCÃO, J. **Consolidação e reforço de terrenos. Tuneis e obras subterrâneas em meio urbano.** Lisboa : Sociedade Portuguesa de Geotecnia., 2010.

POREMBA, K. Influence of synthetic and biogenic surfactants on the toxicity of watersoluble fractions of hydrocarbons in sea water determined with the bioluminescence inhibition test. **Environmental Pollution**, v. 80, p. 25-29, 1993.

POSSATO, A. R. **Micro-algas como matéria-prima para produção de biodiesel: Uma revisão.** Monografia (Pós-graduação em biocombustíveis). Departamento de Biologia e Química. Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. UNIJUÍ, 2009.

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; KOURKOUTAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. **Bioresource Technol.**, v.90, p.159-168, 2003.

REGINATTO, C. **Uso da bioventilação na remediação de um solo argiloso contaminado com uma mistura B20**. Dissertação de Mestrado (Qualificação). Mestrado em Engenharia. Universidade de Passo Fundo. 2011.

RHYKERD, R. L.; CREWS, B.; MCINNES, K. J.; WEAVER, R. W. Impact of bulking agents, forced aeration, and tillage on remediation of oil-contaminated soil. **Bioresour. Technol**, v.67, p. 279-285, 1999.

RISER-ROBERTS, E. **Remediation of Petroleum Contaminated Soil: Biological, Physical, and Chemical Processes**, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 1998.

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

RIBEIRO, A. L. **Técnica de tratamento de solos – Jet Grouting**: Acompanhamento de um caso real de estudo – Cais de Santa Apolónia e Jardim do Tabaco. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Engenharia Civil. Universidade Técnica de Lisboa. 2010.

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

RIZZO, A. C. L.; RAIMUNDO, R. S. **Avaliação das técnicas de bioaugmentação e bioestimulação no tratamento de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo**. In: 26º Reunião anual da sociedade brasileira de química. CETEM/MCT. 2003.

ROSATO, Y.B., 1997, “Biodegradação do Petróleo”. In: Melo, I.S., Azevedo, J.L. (eds), **Microbiologia Ambiental**, pp. 307, Jaguaríuna, Embrapa-CNPMA.

ROSENBERG, M.; GUTNICK, D. L. The hydrocarbon-oxidizing bacteria. Em: STARR, M. P., STOLP, H., TRUPER, G. H., BALOWS, A., SCHLEGEL, H. G. **The prokaryotes**. New York, Springer-Verlag, 1977.

SANTOS, F. K. G.; ALVES, J. A. A.; DANTAS, T. N. C.; NETO, A. A.; JÚNIOR, T. V. D.; NETO, E. L. B. **Determinação da concentração micelar crítica de tensoativos obtidos a partir de óleos vegetais para uso na recuperação avançada de petróleo**. 4º PDPETRO, Campinas, SP, 21-24 de Outubro de 2007.

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

SCHMIDT, C. A. B. **Aplicação de técnica eletrocinética em laboratório a dois tipos de solos argilosos**. Tese de Doutorado em Engenharia Civil. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2004.

SCHLEICHER, T. et al. Microbiological stability of biodiesel – diesel mixtures. **Bioresource Technology**, v.100, n.2, p. 724-730, 2009.

SCOW, K.M., HICKS, K.A. Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p.1-8, 2005.

SEABRA, P. N. C. **Aplicação de biopilha na biorremediação de solos argilosos contaminados com petróleo**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

SEKLEMOVA, E.; PAVLOVA, A.; KOVACHEVA, K. Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel: field demonstration. **Biodegradation**, v.12, p. 311–316, 2001.

SIQUEIRA, J. O; MOREIRA, F. M. de S.;GRISI, B. M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S.. **Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental**. Solos. Brasília: Embrapa Produção de Informação: Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1999.

SIMON, M. A.; BONNER, J. S.; PAGE, C. A.; TOWNSEND, R. T.; MUELLER, D. C.; FULLER, C. B.; AUTENRIETH, R. L. Evaluation of two commercial bioaugmentation products for enhanced removal of petroleum from a wetland. **Ecol. Eng**, v. 22, p. 263-277, 2004.

SPINELLI, LEANDRO. DE FREITAS. **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.

STRECK, E. V. Solos do Rio Grande do Sul. 2. ed. Porto Alegre: EMATER/RS, Brasil, 2008.

TEDESCO, M. J. ; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análise de solos, plantas e outros materiais**, Porto Alegre, Departamento de Solos, UFRGS, 174 p., 1995.

THOMÉ, A., MENEGHETTI, L., SCHNAID, F., PRIETTO, P. D. **Natural Attenuation and Biostimulation Techniques in Soil Contaminated with Biodiesel**. VI ICEG, 2010.

TRINDADE, P. V. O.; SOBRAL, L. G.; RIZZO, A. C. L.; LEITE, S. G. F.; LEMOS, J. L. S. **Evaluation of biostimulation and bioaugmentation techniques in the bioremediation process of petroleum hydrocarbons contaminated soil**. In: 9th International petroleum environmental conference, New Mexico, USA, 2002.

TRINDADE, P. V. O., 2002. **Avaliação das técnicas de bioaugmentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo**. Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado. EQ/UFRJ.

URURAHY, A. F.P., PEREIRA, N. J.; MARTINS, M. D. M. Desemprnho de um biorreator tipo CSTR no Processo de degradação de borra oleosa. **Boletim técnico da Petrobras**, v. 41, n. ¾, p. 125-132, 1998.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). **Method 3550B, ultrasonic extraction**, 1996.. Disponível em <[www.epa.gov/sw-846/pdfs/3550b.pdf](http://www.epa.gov/sw-846/pdfs/3550b.pdf)> acesso em: 02 Fev. 2012.

VARY, P.S.; BIEDENDIECK, R.; FUERCH, T.; MEINHARDT, F.; ROHDE, M.; DECKWER W.D. & JAHN, D. Bacillus megaterium from simple soil bacterium to industrial protein production host. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 957-967, 2007.

VASUDEVAN N., RAJARAM, P. Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. **Environment International**, v. 26, p. 409–411, 2001.

VAZ, E. A. C; GONÇALVES, E. L. T.; GAUER, F. R.; TOMBESI, G. C. **Biorremediação de solos**. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. 2008.

VIDALI, M. Bioremediation: An Overview. **Pure Applied Chemistry**, v. 73, p. 1163-1172, 2001.

VIEIRA, J. A. V.; PORTILHO, B. D.; LIMA, M. S. **Remoção e reabsorção de água em biodiesel de mamona e soja**. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2006. Brasília. Artigos técnico-científico. Disponível em: [http://www.biodiesel.gov.br/rede\\_arquivos/armazenamentoII.htm](http://www.biodiesel.gov.br/rede_arquivos/armazenamentoII.htm). Acesso em: 31 out. 2011.

WALWORTH J.L., WOOLARD, C.R., BRADDOCK, J.F., REYNOLDS, C.M., 1997, “The Role of Soil Nitrogen Concentration in Bioremediation”. In: In Situ and Onsite Bioremediation: Volume 4, [Pat. Int. In Situ On-Site Bioremediation. Symp., New Orleans, USA, April 28- May 1 1997], 4th, pp. 283-288. Alleman, B.C., Leeson, A. (eds), Battelle Press, Columbus, Ohio.

WEI OUYANG; HONG LIU; V. MURYGINA; YONGYONG YU; ZENGDE XIU; KALYUZHNYI, S. Comparison of bio-augmentation and composting for remediation of oily sludge: A field-scale study in China. **Process Biochemistry**, v.40, p. 3763–3768, 2005.

WDNRBRR – Wisconsin Department of Natural Resources Bureau for Remediation and Redevelopment. **Naturally Occurring Biodegradation as a Remedial Action Option for Soil Contamination – Interim Guidance (Revised)**. PUBL-SW-515-95. Madison: WI53707, 1994. Updated Disclaimers September, 2004.

ZHANG, X; PETERSON, C; REECE, D; MOLLER, G; HAWS, R. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environmental. **Transaction ASABE**, v. 41, n. 5, p.1423–30, 1998.

## APÊNDICE I

1. Cálculos referente à confirmação dos resultados práticos dos ensaios pilotos:

$$I = 2 \cdot \frac{\pi \cdot D_o^2}{4} \cdot p$$
$$= 2 \cdot \frac{(\pi \cdot 0,3^2)}{4} \cdot 0,1 = 0,014$$

$$P = \frac{2 \cdot I}{\pi \cdot D_o^2}$$
$$= \frac{(2 \cdot 0,014)}{\pi \cdot 0,3^2} = 0,1 \text{ MPa} = 100 \text{ kPa}$$