



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

Cleomar Reginatto

**BIOVENTILAÇÃO EM UM SOLO ARGILOSO CONTAMINADO COM
MISTURA DE DIESEL E BIODIESEL**

Passo Fundo
2012

Cleomar Reginatto

**BIOVENTILAÇÃO EM UM SOLO ARGILOSO CONTAMINADO COM
MISTURA DE DIESEL E BIODIESEL**

Orientador: Professor Antônio Thomé, Dr.

Coorientadora: Professora Luciane Maria Colla, Dr.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia da Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia, na área de concentração Infraestrutura e Meio Ambiente.

Passo Fundo
2012

CLEOMAR REGINATTO

**BIOVENTILAÇÃO EM UM SOLO ARGILOSO CONTAMINADO COM
MISTURA DE DIESEL E BIODIESEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia da Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia, na área de concentração Infraestrutura e Meio Ambiente.

Data de aprovação: Passo Fundo, 13 de Abril de 2012.

Os membros componentes da Banca Examinadora abaixo aprovam a Dissertação.

Prof. Dr. Antônio Thomé
Orientador

Prof^a. Dr^a. Luciane Maria Colla
Coorientadora

Prof. Dr. Pedro Domingos Marques Prietto
Universidade de Passo Fundo (UPF)

Prof. Dr. Edson Campanhola Bortoluzzi
Universidade Passo Fundo (UPF)

Prof. Dr. Fernando Schnaid
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof^a. Dr^a Maria Claudia Barbosa.
Universidade Federal do Rio de Janeiro (COPPE/ UFRJ)

Passo Fundo
2012

Agradecimento

A Deus por iluminar meu caminho e me permitir chegar até aqui.

A minha família pelo grande incentivo e amor incondicional em todas as fases de minha vida.

Ao professor Antônio Thomé, pela sabia orientação durante todas as fases do mestrado.

A professora Luciane Colla pelo co-orientação e grande auxílio na dissertação.

A todos os meus colegas de mestrado, pelo auxílio e principalmente pelas grandes amizades conquistadas.

A todos os professores do programa, pois sem vocês, não teríamos a formação de grandes mestres.

Ao nosso grupo de pesquisa em biorremediação, pois como grupo sempre conseguimos superar as dificuldades e seguir em frente na pesquisa.

E a todos que colaboraram com ideias e incentivos em algum momento da pesquisa, mesmo não estando citados aqui...

MUITO OBRIGADO

RESUMO

O intenso e crescente consumo de combustíveis fósseis gera a necessidade de buscar fontes alternativas ambientalmente mais adequadas. Assim, para suprir essa necessidade, entra no mercado os biocombustíveis, como é o caso do biodiesel, que hoje está sendo misturado em uma proporção de 5% ao diesel comercial e chegará em 20% (B20) em um futuro próximo. Com isso essa mistura acaba se tornando um provável contaminante do solo e recursos hídricos, assim como o diesel. Vários são os processos empregados para remediação e recuperação de solos contaminados. Alguns destes processos envolvem o uso de microrganismos para degradar e descontaminar os solos. Os microrganismos são considerados biodegradadores eficientes devido a sua abundância, a diversidade de espécies, e sua versatilidade catabólica e anabólica, bem como sua capacidade de adaptação a condições ambientais adversas. Dentre as técnicas biológicas, a bioventilação pode ser usada principalmente devido ao baixo custo de aplicação e o baixo grau de intervenção na área contaminada, pois envolve apenas a inserção de ar no meio, para estimular a atividade aeróbia dos microrganismos nativos. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a biorremediação de um solo argiloso, contaminado com uma mistura B20, utilizando a técnica de Bioventilação. Os experimentos (biorreatores) foram realizados no Laboratório de Geotecnia Ambiental da Universidade de Passo Fundo. Nos ensaios de bioventilação foram testadas três diferentes vazões de ar (2,4 e 6 L/min), além do controle sem aplicação da técnica, em três intervalos de tempo (1h a cada 24h, 1h a cada 36h e 1h a cada 48h) durante 6 dias semanais. Os experimentos foram analisados em 4 tempos de degradação (15,30,60 e 120 dias). A degradação dos contaminantes foi analisada quantitativamente através da extração por ultrassom, qualitativamente através da degradação das cadeias carbônicas, pela cromatografia gasosa, além da atividade enzimática (FDA) e contagem em placas. Os resultados apresentaram uma maior degradação ao final de 120 dias para a amostra V2-1/48 com 87,72%, e o menor valor de degradação para a atenuação natural, com 71,54%, apresentando diferenças estatísticas apenas para a atenuação natural em relação a todas as demais amostras. A atividade enzimática e o crescimento microbiano indicaram um intenso processo de adaptação ao contaminante e uma não estabilização ainda da sua atividade. Os resultados qualitativos mostraram uma maior degradação da fração leve dos hidrocarbonetos, principalmente dos carbonos C15 ao C18. Assim entre as diferentes combinações de vazão e tempo de aplicação, o melhor valor de vazão foi 4L/min e o melhor intervalo de tempo de 1 hora aplicada a cada 48 horas.. A técnica de bioventilação se mostrou eficiente para degradação do contaminante, quando comparada com a atenuação natural.

Palavras-chave: *Solo contaminado, Bioventilação, óleo diesel, biodiesel*

ABSTRACT

The intense and growing consumption of fossil fuels generates the need to seek more environmentally suitable alternative. So to meet this need, enters in the market the biofuels as is the case of biodiesel, which is now being mixed in a ratio of 5% commercial diesel and will come in 20% (B20) in the near future. Thus this mixture turns out to be a likely contaminant of soil and water resources, as well as diesel. Several processes are used for remediation and restoration of contaminated soils. Some of these processes involve the use of microorganisms to degrade and decontaminate the soil. The microorganisms are considered biodegraders efficient due to its abundance, species diversity, catabolic and anabolic versatility and its ability to adapt to adverse environmental conditions. Among the biological techniques, the bioventilação can be used mainly due to the low cost of implementation and low degree of intervention in the contaminated area, since it involves only the insertion of air in the middle, to stimulate the activity of aerobic microorganisms natives. Thus, the aim of this work was to evaluate the bioremediation of a clay soil contaminated with a mixture B20 using the technique of Bioventing. The experiments (bioreactors) were performed at the Laboratory of Geotechnics Environmental at the University of Passo Fundo. In tests of bioventilação were tested three different airflow rates (2.4 and 6 L / min), and a control without application of the technique in three time intervals (1 hour for each 24 hours, 1 hour for each 36 hours and 1 hour for each 48 hours) during 6 days a week. The experiments were analyzed in four times of degradation (15,30,60 and 120 days). The degradation of the contaminants was analyzed quantitatively by extraction by ultrasound, qualitatively through the degradation of the carbon chains by gas chromatography, and enzyme activity (FDA) and plate count. The results showed the greatest degradation at the end of 120 days for sample V2-1/48 with 87.72%, and lowest degradation for the natural attenuation, with 71, 54%, with statistical differences only for the natural attenuation in relation to all other samples. The enzymatic activity and microbial growth indicated an intense process of adaptation to the contaminant and not yet stabilized its activity. The qualitative results showed greater degradation of the fraction of light hydrocarbons, mainly of the carbon C15 to C18. Thus among the different combinations of flow and application time the best value was 4L/min flow and the best time interval of 1 hour applied each 48 hours. The bioventilação technique is efficient for the contaminant degradation compared with the natural attenuation.

Keywords: Contaminated soil, bioventing, diesel oil, biodiesel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Habitat de solo contendo partículas minerais (SA: areia, Si: silt, C: argila), matéria orgânica(OM), água (W), raízes (R), e microrganismos do solo[bactéria(B), actinomicetos(A), esporos de micorrizas e hifas (My), hifas de fungos saprofíticos (H), nematódio(N), protozoário ciliado(CP), e um mite (M)	18
Figura 2: Requisitos para que ocorra a biorremediação	21
Figura 3: Triângulo da Biodegradação.....	22
Figura 4: Processo de degradação do naftaleno pelas bactérias	31
Figura 5: Degradação do fenantreno por fungos não-lignolíticos (A) e lignolíticos (B)	33
Figura 6: Processo de produção de biodiesel	36
Figura 7: Distribuição vertical dos diferentes hidrocarbonetos no solo.....	40
Figura 8: Evolução da pluma de contaminação por combustíveis em subsuperfície	41
Figura 9: Processo esquemático da degradação de petróleo	44
Figura 10: Processos de remediação utilizados em São Paulo no ano de 2010.....	47
Figura 11: Esquema de um sistema típico de bioventilação de solo	51
Figura 12: Vala de coleta do solo deformado para o experimento.....	57
Figura 13: Fluxograma do processo experimental	60
Figura 14: Armazenagem do solo	61
Figura 15: Aspecto visual do contaminante (B20).....	61
Figura 16: Pesagem do solo	62
Figura 17: Adição de água (umidade).....	62
Figura 18: Adição do contaminante	63
Figura 19: Confecção do corpo de prova	63
Figura 20: Corpos de prova finalizados	64
Figura 21: Corpos de prova sendo envolvidos pelo gesso	64
Figura 22: Corpos de prova após o envolvimento com o gesso	65
Figura 23: Filtro de geotêxtil e camada de areia	65
Figura 24: Vedação do cap ao tubo.....	66
Figura 25: Corpos de prova montados para a aplicação da bioventilação	66
Figura 26: Equipamento de bioventilação utilizado no experimento.....	67
Figura 27: Esquema interno do biorreator.....	67
Figura 28: Controle da vazão e tempo de aplicação de ar na bioventilação.....	68
Figura 29: Perfil granulométrico do solo de estudo	72
Figura 30: Monitoramento da umidade de forma gráfica.....	75
Figura 31: Porcentagem de degradação das amostras em todos os tempos analisados.....	78
Figura 32: Porcentagem de degradação das amostra com V1 e atenuação natural	78
Figura 33: Porcentagem de degradação das amostras V2 e atenuação natural	79

Figura 34: Porcentagem de degradação das amostras V3 e atenuação natural	79
Figura 35: Superfície de resposta da degradação aos 60 dias de ensaio	81
Figura 36: Valores de hidrólise do diacetato de fluoresceína em todas as amostras.....	83
Figura 37: Valores de FDA das amostras V1 e Atenuação natural.....	84
Figura 38: Valores de FDA das amostras V2 e Atenuação natural.....	84
Figura 39: Valores de FDA das amostras V3 e Atenuação natural.....	85
Figura 40: Contagem de microrganismos	86
Figura 41: Contagem de microrganismos comparando a V1 com atenuação natural	87
Figura 42: Contagem de microrganismos comparando a V2 com atenuação natural	88
Figura 43: Contagem de microrganismos comparando a V3 com atenuação natural	88
Figura 44: Perfil cromatográfico padrão (C15 a C30)	90
Figura 45: Perfil cromatográfico inicial da mistura B20.....	91
Figura 46: Perfil cromatográfico da amostra V3-1/48 aos 120 dias.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Histórico da biorremediação	16
Tabela 2: Distribuição de microrganismos nos horizontes do perfil de solo (org./g de solo x10 ³).....	19
Tabela 3: Condições ótimas para degradação de hidrocarbonetos em solos.....	23
Tabela 4: Características físico-químicas do óleo diesel comercial (tipo c).	38
Tabela 5: Valores típicos de saturação residual do óleo diesel da zona insaturada em diferentes frações granulométricas do solo.	42
Tabela 6: Diferentes técnicas para remediação de áreas contaminadas	46
Tabela 7: Parâmetros chave para avaliar aplicação do bioventing.....	51
Tabela 8: Caracterização Geotécnica e física do solo de estudo.....	71
Tabela 9: Caracterização química do solo.....	73
Tabela 10: Monitoramento da umidade durante o experimento.....	74
Tabela 11: Valor residual do contaminante (%) durante o processo de biorremediação	76
Tabela 12: Percentual de degradação da mistura B20.....	76
Tabela 13: Nível de significância para cada fator estudado	80
Tabela 14: Hidrólise do diacetato de fluoresceína (mg de fluoresceína/Kg de solo.h)	82
Tabela 15: Contagem em placas (Log UFC/g de solo)	86
Tabela 16: Porcentagem de degradação dos carbonos C15 ao C30	93

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Problema da pesquisa	13
1.2	Justificativa	14
1.3	Objetivo Geral	15
1.4	Objetivos específicos.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Histórico da biorremediação	16
2.2	Microrganismos no solo	18
2.3	Fatores que interferem no processo de biorremediação	21
2.3.1	Nutrientes	23
2.3.2	Potencial redox	25
2.3.3	pH.....	26
2.3.4	Temperatura	26
2.3.5	Umidade	27
2.4	Microrganismos degradadores em solos	28
2.5	Mecanismo de degradação	29
2.6	Contaminantes em solos.....	33
2.6.1	Biodiesel.....	35
2.6.2	Óleo diesel.....	38
2.6.2.1	Hidrocarbonetos	39
2.7	Biorremediação de resíduos oleosos	43
2.7.1	Atenuação natural.....	48
2.7.2	Bioestimulação.....	48
2.7.2.1	Bioventilação.....	49
2.8	Degradação de biodiesel e misturas	54
3	MATERIAL E MÉTODOS	57
3.1	Local de estudo e solo	57
3.2	Contaminante	58
3.3	Delineamento da pesquisa.....	58
3.4	Montagem do experimento.....	60
3.4.1	Preparação do solo	60
3.4.2	Contaminação do solo e moldagem dos corpos de prova.....	61
3.4.3	Montagem dos biorreatores e do sistema de bioventilação	64
3.4.4	Aplicação da bioventilação	66

3.4.5	Avaliação da biodegradação.....	68
3.4.5.1	Análise de óleos e graxas	68
3.4.5.2	Cromatografia gasosa.....	69
3.4.5.3	Atividade enzimática.....	70
3.4.5.4	Contagem em placas.....	70
3.5	Análise estatística.....	70
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.1	Caracterização do solo	71
4.2	Variação da umidade.....	74
4.3	Avaliação quantitativa da degradação do contaminante (ultrassom)	76
4.4	Atividade enzimática (FDA)	82
4.5	Contagem microbiana no solo.....	85
4.6	Análise qualitativa de degradação (cromatografia gasosa)	89
5	CONCLUSÕES	95
6	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	96
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

1 INTRODUÇÃO

As preocupações com o meio ambiente estão cada vez maiores, devido à certeza de que a atividade humana gera impactos negativos ao ambiente. A contaminação de solos e água por combustíveis derivados de petróleo (óleo diesel, gasolina e demais derivados) tem sido destaque nas últimas décadas, principalmente em função da frequência com que os episódios de contaminação são verificados e da gravidade com que o meio ambiente é afetado (LEAHY e COLWELL, 1990; SPINELLI, 2005).

Embora os grandes vazamentos acidentais de petróleo sejam preocupantes e ocupem grande espaço na mídia, se estima que a principal fonte de contaminação por combustíveis seja devida a pequenos vazamentos ocorridos em reservatórios, devido a falhas mecânicas ou humanas ocorridas nas operações de descarga e por acidentes ocorridos no transporte deste produto químico (CETESB, 2011a). Deste modo, quando ocorre um vazamento, uma das principais preocupações é a contaminação do solo e posteriormente a contaminação dos aquíferos. Dentre as várias técnicas de remediação que podem ser aplicadas as mais utilizadas são a atenuação natural, a bioaumentação e a bioestimulação (MENEGHETI 2007; MARTINS 2003; BENTO et al., 2005; LIN et al, 2010).

Os microrganismos são considerados biodegradadores eficientes devido a sua abundância, a diversidade de espécies, e versatilidade catabólica e anabólica, bem como a sua capacidade de adaptação a condições ambientais adversas (MORAES e TORNISIELO, 2009).

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

No caso da biodegradação de misturas de combustíveis, o biodiesel auxilia na biorremediação dos hidrocarbonetos, por ser este mais biodegradável (OWSIANIAK et al, 2009). Para o uso de técnicas como a bioventilação tem-se a ideia que o aumento na oxigenação do meio também contribui consideravelmente para uma maior degradação dos contaminantes no solo.

1.1 Problema da pesquisa

Segundo dados da FEPAM (2012) entre 2009 até 2011 foram registrados 23 acidentes no Rio Grande do Sul, com cargas envolvendo combustíveis oleosos, principalmente com derrames de diesel e gasolina e destes 3 com derrames de biodiesel, contaminando o solo e alguns casos até os recursos hídricos.

O biodiesel está entrando na matriz energética brasileira, como componente junto ao diesel. Esta fonte de energia alternativa foi decretada pela lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, que dispõe sobre a introdução do biodiesel na Matriz energética brasileira, sendo fixado em 5% (cinco por cento), em volume, o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel (B5) comercializado ao consumidor final, em qualquer parte do território nacional. A adição de pelo menos 20% de biodiesel ao óleo diesel comercializado, o chamado B20, será obrigatório a partir de 2018.

As medidas adotadas diminuem os impactos ambientais negativos decorrentes de um vazamento, considerando os aditivos provenientes de origem vegetal ou animal, os contaminantes tornam-se mais biodegradáveis, mas tornam-se também um importante contaminante do solo.

Além dos acidentes ambientais no transporte estima-se que a maior fonte de contaminação dos solos assim como das águas subterrâneas, sejam através dos tanques de armazenamento de combustíveis em postos e centrais de distribuição (CETESB 2011b). Sendo assim o horizonte B do solo é o meio mais afetado por esse tipo de contaminação

No Brasil existem cerca de 38000 postos de combustíveis (ANP, 2010), muitos operando em condições inadequadas, o que torna o potencial poluente ainda mais elevado. Esses estabelecimentos possuem reservatórios ou tanques que armazenam grandes quantidades deste produto, com vida útil de até 25 anos.

Segundo dados da CETESB (2011b) os postos de combustível estão entre os principais contaminantes do respondendo por 79 % do total das áreas contaminadas no estado de São Paulo, com 2922 registros.

A existência de uma área contaminada pode gerar problemas como danos à saúde humana, comprometimento da qualidade dos recursos hídricos, restrições ao uso do solo e danos ao patrimônio público e privado, com a desvalorização das propriedades, além de inúmeros danos ao meio ambiente (MENEGHETI, 2007).

Não há uma regra geral que determine o melhor tratamento de uma área contaminada por resíduos oleosos. Cada caso deve ser analisado individualmente, avaliando suas particularidades. Tratamentos físicos separam os contaminantes do solo sem destruí-los ou modificá-los quimicamente, mas apresentam muitas limitações, destacando-se o custo elevado (CUNHA e LEITE, 2000). Quando os hidrocarbonetos percolam o solo, grande quantidade permanece sorvida na matriz (aproximadamente 50%) com isso diminuindo a eficiência de remoção (MARIANO et al., 2007).

As técnicas de biorremediação são muito utilizadas para remediar áreas contaminadas em função da versatilidade de técnicas que podem ser utilizadas. No caso do uso da bioventilação ainda não se tem parâmetros adequados quanto ao tempo de aplicação da técnica e principalmente a vazão de ar a ser adicionada na área contaminada em solos de granulometria fina.

1.2 Justificativa

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

Os processos biológicos são uma tecnologia já conhecida internacionalmente e muito desenvolvida, para remover contaminantes oleosos, principalmente devido à eficiência e o custo quando comparados a outras alternativas (ABDULSALAM e OMALE 2009; KARAMALIDIS et. al., 2010). Ainda, segundo Bento et al. (2003), constituem processos simples e aplicáveis à grandes áreas.

Com a quantidade de microrganismos naturalmente presentes no solo, já ocorre degradação, mas esta ainda é muito lenta. Sendo assim a estimulação das populações indígenas é uma das melhores formas de aumento da atividade microbiana na área contaminada e melhor eficiência na degradação. A injeção de ar como bioestimulador já é bastante usada, nesse sentido, sendo muitas vezes associada com extração de vapores do solo, e não apenas como bioestimuladora.

Segundo Meyer (2011), condições aeróbicas e concentrações adequadas de oxigênio nos sistemas de biorremediação são importantes para evitar os odores produzidos pela degradação anaeróbia e para maior produção de oxidação como produto final e com isso aumentar também a atividade degradadora dos microrganismos. Segundo Arrar et al. (2007) os resultados de degradação em condições aeróbicas são consideravelmente maior que os resultados em condições anaeróbicas.

Assim o conhecimento de vazões mais adequadas para se usar na bioventilação, e um tempo adequado de bioestimulação se faz muito importante. Além disso, o estabelecimento de vazões adequadas e tempo de aplicação não desnecessário remete automaticamente ao consumo mais adequado de energia e, conseqüentemente, menores gastos na utilização da técnica. Além disso uma mais rápida descontaminação de uma área remete a uma mais rápida reintegração da mesma para a sociedade, deixando de ser um passivo ambiental.

1.3 Objetivo Geral

O objetivo geral foi avaliar a eficiência da biorremediação em um solo argiloso, contaminado com uma mistura B20 utilizando a técnica de Bioventilação.

1.4 Objetivos específicos

- a) Determinar a influência de diferentes vazão de ar na eficiência do bioventilação;
- b) Determinar a influência de diferentes regimes de aplicação do ar na eficiência da técnica;
- c) Avaliar a degradação quantitativa do contaminante.
- d) Avaliar a degradação qualitativa dos constituintes do contaminante.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico da biorremediação

A capacidade de microrganismos em degradar contaminantes oleosos já era evidenciada em 1906, em que um estudos feitos por Sohngen (1906) mostraram haver microrganismos que conseguiam utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono para a produção de energia. Porém as principais evoluções quanto ao uso de microrganismos aconteceu para uso no tratamento de efluentes. (BUSENELL e HAAS, 1941)

Em 1882, o Dr. Angus Smith demonstrou que águas residuárias poderiam ser “estabilizadas” pela aeração. Ardern e Lockett, avançaram esse conceito para desenvolver os processos de tratamento de lama ativada, que foi usada primeiramente em Salford, na Inglaterra, em 1914. Esse processo foi chamado de lama ativada porque contou com uma massa ativada de microrganismos para tratar as águas residuárias (ALLEMAN e PRAKASIM 1983, apud ALVAREZ e ILLMAN, 2006).

A história da biorremediação “in situ” é consideravelmente mais curta, e dessa forma reflete em muitos altos e baixos como um resultado de forças políticas e econômicas, conforme demonstra a Tabela 1.

Tabela 1: Histórico da biorremediação

Década	Eventos
1900	Desenvolvimento dos processos biológicos para tratar águas residuárias municipais e a lama.
1950	Desenvolvimento dos processos de tratamento de águas residuárias industriais. Hipótese de infalibilidade microbiana proposta por Gayle (1952), conduzido fora dos estudos aeróbicos de laboratório.
1960	Pesquisa na biodegradação de produtos químicos orgânicos sintéticos que se apresentam como “micropoluentes” em águas residuárias.
1970	Estatuto ambiental do trecho de escopo sem precedentes e pressão regulatória (1976 RCRA e TSCA, 1980 CERCLA) estimula o desenvolvimento das tecnologias de remediação. A adição de microrganismos aclimatados para locais contaminados se

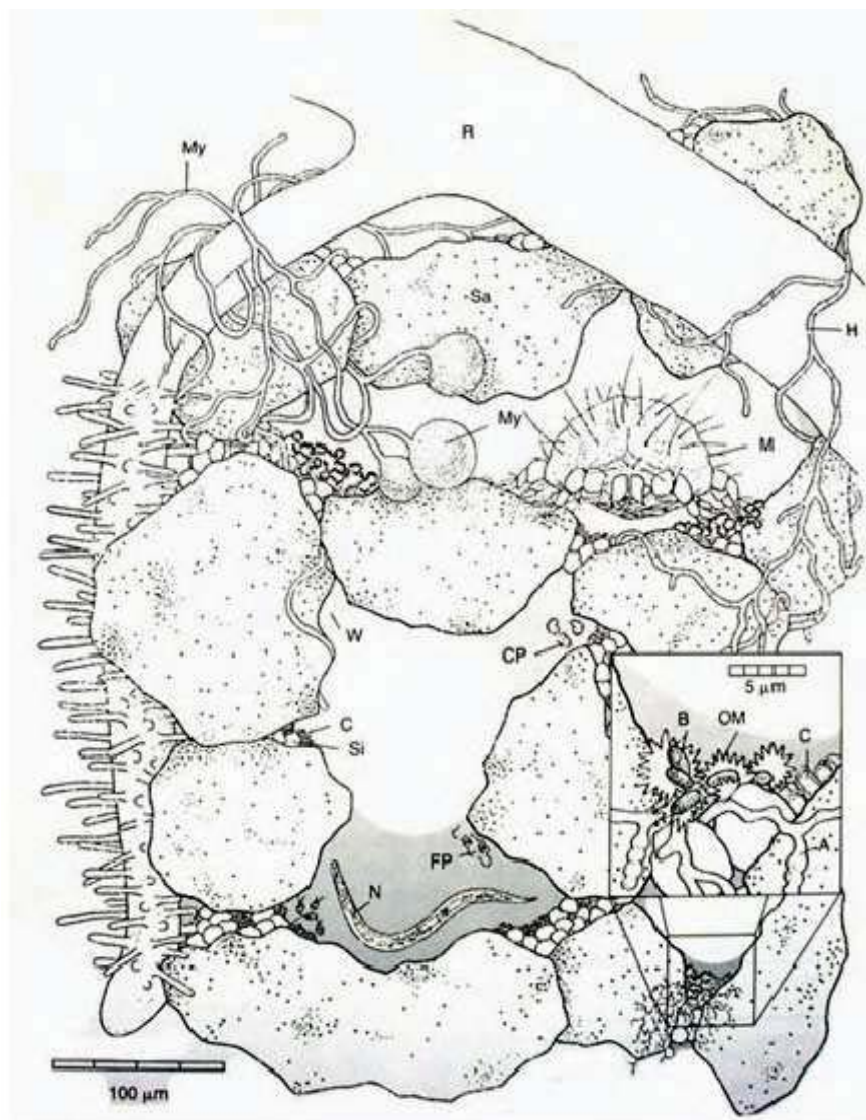
	torna prática comum. Achados anteriores de bioaugmentação frequentemente deixam de reconhecer que as bactérias indígenas já presentes podem estar melhores adaptadas geneticamente e fisiologicamente para degradar os poluentes, mas a biodegradação pode ser limitada pela bioviabilidade do contaminante ou condições redox desfavoráveis e não por uma falta de potencial catabólico.
1980	Fica claro que os processos fundamentais hidrológicos e biogeoquímicos inerentes à biorremediação precisam ser entendidos antes que uma tecnologia de sucesso possa ser planejada.
1990	Muitas abordagens bem sucedidas de tecnologia de biorremediação (principalmente ex situ) e híbridas (microbiológica/química) são desenvolvidas. Entretanto muitos tomadores de decisão continuam a considerar a biorremediação como uma tecnologia de risco e continuam a selecionar as tecnologias de bombeamento e tratamento (P&T) para os propósitos de biorremediação.
2000	A biorremediação in situ e a atenuação natural monitorada são largamente aceitas como alternativas de limpeza para locais contaminados com uma grande variedade de poluentes orgânicos, e o interesse na bioaugmentação cresce para o aumento da remoção dos compostos recalcitrantes.

Fonte: Adaptado de Alvarez e Ilman, 2006.

Nos anos de 1980, torna-se claro que o conhecimento fundamental de microbiologia, ecologia microbiana, hidrogeologia e geoquímica foi necessário para projetar e implementar de forma bem sucedida os sistemas de biorremediação. Numerosos ensaios de biorremediação foram bem sucedidos, primariamente foram aqueles envolvendo a limpeza de lançamentos de produtos de petróleo. A partir daí foram varias as técnicas e procedimentos utilizando microrganismos para remediar solos e águas com diferentes contaminantes.

2.2 Microrganismos no solo

Tanto o solo como as águas contêm elevado número de microrganismos que, gradualmente, vão se adaptando às fontes de energia e carbono disponíveis, quer sejam açúcares facilmente metabolizáveis quer sejam compostos orgânicos complexos como os BTEX (formado pelos hidrocarbonetos: benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos), (MARIANO, 2006a). A Figura 1 apresenta um esquema de um solo típico, contendo os mais diferentes microrganismos.



Fonte: Sylvia et al., 2004.

Figura 1: Habitat de solo contendo partículas minerais (SA: areia, Si: silt, C: argila), matéria orgânica(OM), água (W), raízes (R), e microrganismos do solo[bactéria(B), actinomicetos(A), esporos de micorrizas e hifas (My), hifas de fungos saprofiticos (H), nematódio(N), protozoário ciliado(CP), e um mite (M)

Na microbiota do solo se incluem grande quantidades de bactérias aeróbicas ou anaeróbicas, fungos, actinomicetos e protozoários. Segundo Moreira e Siqueira (2002), a maior concentração microbiológica do solo situa-se, de modo geral, na camada de 0 cm a 20 cm de profundidade, como observado na Tabela 2.

Tabela 2: Distribuição de microrganismos nos horizontes do perfil de solo (org./g de solo x10³)

Profundidade (cm)	Bact. aeróbicas	Bact. Anaeróbicas	Actinomicetos	Fungos	Algas
3-8	7800	1950	2080	119	25
20-25	1800	379	245	50	5
35-40	472	98	49	14	0,5
65-75	10	1	5	6	0,1
135-145	1	0,4	0	3	0

Fonte: Adaptado de Moreira e Siqueira, 2002.

Na camada inicial do solo ocorre maior acúmulo de matéria orgânica do solo por deposição do material vegetal da parte superficial (superior). Os solos sem cobertura vegetal tendem a ter menos matéria orgânica, pois esta não é repostada pelo material vegetal. Portanto, estes solos têm uma comunidade biológica menor e menos diversificada.

Desta forma quanto mais profunda a contaminação de um solo, menor a quantidade de microbiota indígena, para realizar a descontaminação do local. Assim diferentes técnicas de biorremediação devem ser estudadas e aplicadas para cada local específico (MOREIRA E SIQUEIRA, 2002; SPINELLI, 2005; MARIANO et al., 2006b)

As condições químicas e a matéria orgânica do solo são importantes para a população microbiana co-metabolizante, que também atua na biodegradação de certos componentes do petróleo e de outros resíduos (MOREIRA E SIQUEIRA, 2002).

Na grande maioria dos solos o teor de matéria orgânica do solo (MOS) varia de 0,5% a 5% nos horizontes minerais superficiais, podendo apresentar valores mais elevados em solos orgânicos. Apesar de encontrar-se em pequenas quantidades em comparação com a fração mineral, a MOS é importante para os sistemas de biorremediação devido a diversos efeitos que produz nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (MEURER et al. 2006). Ainda segundo Meurer et al. (2006), os compostos de carbono da MOS servem como fonte de energia para os organismos do solo. Portanto, a atividade desses microrganismos está diretamente relacionada à disponibilidade de carbono, além dos outros macro e micro nutrientes.

Desta forma, a atividade biológica do solo é decorrente da presença de organismos que habitam esse ambiente, das interações entre eles e as plantas e as interações bioquímicas que

realizam. Os microrganismos participam de diversas reações e processos que ocorrem no solo, sendo sua existência de fundamental importância no solo (MEURER et al., 2006).

As bactérias do solo formam o grupo de microrganismos que apresenta maior abundância e diversidade entre as espécies. A comunidade bacteriana é estimada em cerca de 10^8 e 10^9 organismos por grama de solo, variando de acordo com o método de contagem utilizado e com o tipo de manejo do solo. Esse grupo apresenta uma elevada taxa de crescimento e alta capacidade de decomposição dos diferentes substratos contidos no solo, exercendo um importante papel na decomposição de matéria orgânica e na ciclagem dos elementos (CARDOSO et al., 1992). As bactérias são encontradas no solo, sob a forma de mantas, moitas e filamentos, denominados colônias, superpostas às partículas de solo, ou ao seu redor, onde houver alimentação (BRADY e WEIL, 1998). Ainda, segundo Brady e weil (1998), bactérias são organismos monocelulares, uma das menores e mais simples formas conhecidas de vida.

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

Os fungos, em quantidades inumeráveis, são encontrados nas camadas de superfície, quando existe ampla matéria orgânica e adequada aeração. Grande número de gêneros estão representados e os quatro mais comuns são: *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium* e *Aspergillus*. Ocorrem, na maioria dos solos, todas as espécies comuns e as condições determinarão qual delas será predominante (BRADY e WEIL, 1998).

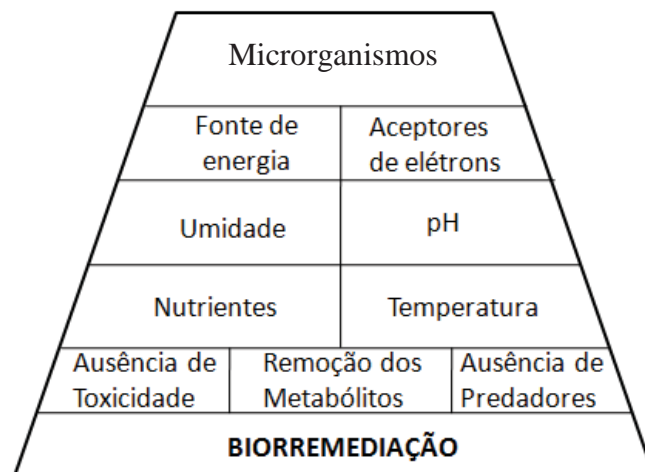
O entendimento de como a biodiversidade é desenvolvida e mantida nas comunidades microbianas naturais irá auxiliar nos processos de biorremediação, de maneira que se possa manipular e controlar essa diversidade, com intuito de melhorar e estimular as taxas de degradação de compostos, como hidrocarbonetos, em ambientes contaminados (PRESCOTT, 1999).

As tecnologias de biorremediação aumentam o crescimento da população microbiana e criam condições ótimas para o máximo de degradação possível (MOREIRA E SIQUEIRA 2002; BENTO et al., 2005).

2.3 Fatores que interferem no processo de biorremediação

Uma biorremediação bem sucedida requer um entendimento dos fatores específicos do local que, limitem as biotransformações desejáveis ou que resultem em consequências não intencionais, tal como, a produção de metabólitos tóxicos (ALVAREZ e ILLMAN, 2006), condições ambientais adversas tais como um pH extremo, temperatura, ou a presença de metais pesados e concentrações tóxicas podem inibir atividades microbianas específicas.

Alguns requisitos principais para que ocorra um processo de biorremediação são descritos no modelo piramidal conforme Cookson (1994), apresentado na Figura 2.



Fonte: Cookson, 1994.

Figura 2: Requisitos para que ocorra a biorremediação

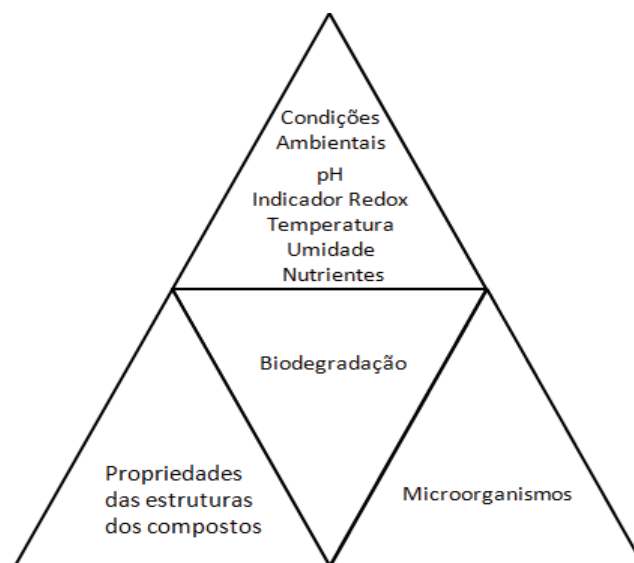
Em ordem de importância, primeiro é necessária a presença de microrganismos capazes de sintetizar enzimas que podem degradar os poluentes alvos. Essas enzimas catalisam reações metabólicas que frequentemente produzem energia celular e formam blocos para as sínteses de material celular novo.

O segundo nível da pirâmide mostra as fontes de energia apropriadas, por exemplo, doadores de elétrons e aceptores de elétrons que devem estar presentes.

Já, o terceiro nível mostra umidade e pH satisfatório; e o quarto nível, o qual mostra a importância de evitar temperaturas extremas, assegurando a disponibilidade de nutrientes tais como oxigênio, fósforo, e metais traços.

Finalmente, na base da pirâmide, há três requisitos ambientais que são importantes para a sustentabilidade da biorremediação: (1) a ausência de altas concentrações de substâncias que são tóxicas para os microrganismos, (2) a remoção de metabólitos que podem inibir atividades microbianas específicas (talvez por outros membros da comunidade microbiana) e, (3) a ausência de altas concentrações de protozoários, que atuam como predadores das bactérias responsáveis pela degradação de contaminante.

A otimização de condições ambientais é alcançada através do entendimento dos princípios biológicos de como esses compostos são degradados, e o efeito das condições ambientais sobre os microrganismos e nas reações metabólicas. Suthersan (2000) apresenta o triângulo da biodegradação (Figura 3) para que se possa entender a degradação microbiana de alguns compostos orgânicos e sintéticos, que consiste de conhecimento das comunidades microbianas, condições ambientais, estrutura e características físico-químicas dos compostos orgânicos a serem degradados.



Fonte: Suthersan, 2000.

Figura 3: Triângulo da Biodegradação.

Segundo Baptista et al., (2005) e Alvarez e Ilman (2006) alguns dos principais fatores ambientais para que ocorra um melhor processo de biorremediação, em solos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Condições ótimas para degradação de hidrocarbonetos em solos

Fator ambiental	Nível ótimo
Nutrientes	C:N:P = 100:10:1*
Temperatura	25-35°C (mesófila)
Umidade	50-85% da capacidade de campo do solo
Potencial redox	Maior que + 50mV
pH	5.5-8.5

Fonte: Modificado de Alvarez e Ilman, 2006 (*Pereira e Lemos, 2006, Rizzo et al, 2008 e Jacques et al., 2007)

Rizzo et al., (2008) indica que o problema principal de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo pode estar associado à baixa biodisponibilidade destes no solo e não apenas à recalcitrância intrínseca do poluente residual, além dos fatores ótimos para a degradação.

2.3.1 Nutrientes

Os nutrientes necessários aos microrganismos são subdivididos em macro e micronutrientes, conforme sejam necessários às células em grande e pequena quantidade, respectivamente. Siqueira et al. (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 os 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, 2006b).

Segundo Frankenberger (1992) e Spinelli (2005) o nitrogênio é a chave da produção de proteínas e ácidos nucléicos. O nitrogênio (12 a 15% da massa celular) é absorvido principalmente como amônia e nitratos pelos microrganismos decompositores, e como nitrogênio molecular atmosférico, N₂, pelos fixadores desse elemento (SIQUEIRA et al., 1999, CARDOSO, 1992).

O fósforo ocorre na natureza na forma de fosfatos inorgânicos e orgânicos, sendo os primeiros (PO₄²⁻) 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, fosfolipídeos 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 as várias enzimas que transformam as complexas moléculas em intermediários comuns das suas rotas catabólicas (MORAES e TORNISIELO, 2009).

Os fertilizantes mais comuns utilizados em solos contaminados incluem nitrato de amônia e uréia, sendo que a uréia não é muito utilizada porque os óleos refinados inibem a hidrólise da mesma para amônia e CO₂, (SPINELLI, 2005).

Horel e Schiewer (2009) em um estudo sobre a degradação de diesel e um combustível sintético afirmam que adicionando nutrientes (N-P₂O₅-K₂O) 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.

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 (em uma base de solo seco). O nitrogênio foi adicionado como NH₄Cl 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, sendo a degradação do contaminante analisada através do método respirométrico. Os resultados mostraram que as condições ideais para a degradação do diesel em função do teor de Nitrogênio adicionado foi de 250 mg N/kg, o qual resultou no maior consumo de oxigênio e consequentemente 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.

2.3.2 Potencial redox

O potencial redox pode ser definido através de uma medida quantitativa de oxidação ou redução que um meio se encontra e o potencial redox pode ser determinado pelo símbolo E_h . Quando o E_h encontra-se acima de zero é comumente interpretado como um meio em oxidação, e quando E_h é menor do que zero, o meio está em redução. A escala de E_h em um meio natural é de +800 mV (alto O_2 , com nenhum processo de esgotamento de O_2) para cerca de -400 mV (alto H_2) (SUTHERSAN, 2000).

O potencial redox do solo é afetado pela profundidade abaixo da superfície e a taxa de difusão de oxigênio, que é determinada pelo tamanho e número de poros preenchidos por ar, que é função da textura, estrutura, pH, teor de água no solo, presença de carbono orgânico e microrganismos (CASARINI e SPILBORGHES, 1992). Os microrganismos aeróbios do solo e aquífero requerem um potencial redox em torno de 800 mV para as suas reações, enquanto que os anaeróbios requerem Eh de -240 mV (a 25°C e pH 7) (BITTON e GERBA, 1984).

A biodegradação de hidrocarbonetos é essencialmente uma reação de oxi-redução onde o hidrocarboneto é oxidado (doador de elétrons) e um acceptor de elétrons é reduzido (MARIANO, 2006).

Quase todos os hidrocarbonetos do petróleo são biodegradados sob condições aeróbias. O Oxigênio é um cosubstrato para a enzima que pode inicializar o metabolismo do hidrocarboneto e por fim é utilizado como acceptor final de elétrons para a geração de energia (YOUNG, 1984).

O oxigênio é o principal acceptor de elétrons na degradação da matéria orgânica e contaminantes (MESQUITA, 2004). Na sua ausência, o potencial redox se torna um fator limitante na degradação de contaminantes oleosos. Isto decorre uma vez que a transformação aeróbica dos hidrocarbonetos no solo leva frequentemente a um rápido esgotamento do oxigênio dissolvido, e esse eventualmente descreve o potencial redox. (KARTHIKEYAN E BHANDARI, 2001)

Há vários compostos que podem agir como aceptores de elétrons, tais como o oxigênio (O_2), nitrato (NO_3^-), óxidos de ferro ($Fe(OH)_3$), sulfato (SO_4^{2-}), água (H_2O) e dióxido de carbono (CO_2). A seguinte seqüência de preferência de utilização desses aceptores foi observada: oxigênio>nitrato>óxidos de ferro>sulfato>água. Esta seqüência reflete a diminuição do potencial de oxidação dos aceptores. Em geral, a cinética de oxidação dos hidrocarbonetos é mais rápida para aceptores de elétrons com potenciais de oxidação mais altos (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996).

2.3.3 pH

O pH tem relação direta com a solubilidade dos nutrientes e a atividade dos microrganismos. Enzimas são polímeros de aminoácidos e suas atividades requerem um grau de protonação adequado dos aminoácidos, sendo que este processo é controlado pelo pH. Bactérias heterotróficas dependem de um pH neutro ou próximo disso para biodegradar xenobióticos de modo eficiente. Os fungos, por sua vez, dependem de um meio mais ácido (CARDOSO, 1992).

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).

Distinguem-se quatro categorias de microrganismos: a) Indiferentes: crescem numa faixa ampla de valores de pH. É o caso de numerosas bactérias que apresentam crescimento satisfatório entre valores de pH 6,0 a 9,0. Para os fungos os valores variam entre pH 2,0 e 8,0; b) Neutrófilos: preferem pH próximo a neutralidade até ligeiramente alcalino. Numerosos actinomicetos não apresentam crescimento para valores de pH inferiores a 5,5; c) Acidófilos: são os que preferem ambientes ácidos e; d) Basófilos: não suportam valores de pH inferiores a 8,0.

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 7 a 8.

2.3.4 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. Nesta faixa, por exemplo, a taxa de biodegradação dos BTEX pode triplicar em função de um aumento de temperatura em 10 °C (CORSEUIL e WEBER, 1994).

De acordo com Brady e Weil (1998), as reações químicas e biológicas em solos frios são lentas. As decomposições biológicas são praticamente inexistentes, limitando assim o ritmo com que certos nutrientes, como nitrogênio, fósforo, enxofre e cálcio, tornam-se assimiláveis. (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

Se a temperatura aumenta muito acima do valor ótimo, proteínas, enzimas e ácidos nucléicos tornam-se desnaturados e inativos. A temperatura dos primeiros 10 m de subsuperfície pode variar sazonalmente; contudo, entre 10 e 100 m de profundidade, a temperatura se aproxima da média anual da região (LEE et al., 1988).

Coulen et al. (2005) estudaram a influencia 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.

2.3.5 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. A água no solo pode estar presente em três formas (BAKER e HERSON, 1994):

- a) Água gravitacional ou livre: é aquela água que podem se mover livremente através do solo por forças gravitacionais, ocupando primeiramente os macroporos da matriz do solo;
- b) Capilar: é aquela presente nos microporos do solo e é aquela disponível para os microrganismos;

- c) Higroscópica: interage com a matriz do solo e não está geralmente disponível para os microrganismos.

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_2 , O_2 , CO_2) além daqueles decorrentes da atividade biológica como, por exemplo, o CH_4 e o H_2S (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 quase 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).

2.4 Microrganismos degradadores em solos

Vários são os microrganismos que podem remediar um solo contaminado com compostos oleosos, sendo alguns destes estudados e citados por vários autores, como apresentado no Quadro 1.

Quadro 1: Microrganismos degradadores estudados por vários autores

Contaminante	Microrganismo utilizado	Tipo de microrganismos	Fonte
Hidrocarbonetos	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus sphaericus</i> , <i>Bacillus fusiformis</i> , <i>Bacillus pumillus</i> , <i>Acinetobacter junni</i> e <i>Pseudomonas sp</i>	Bactérias	Bento et al., (2003)
Hidrocarbonetos	<i>Azospirillum</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Proteus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Mucor</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Chaetomium</i> , <i>Phanerochaete</i> e <i>Tramete</i>	Bactérias e fungos	Moreira e Siqueira (2002)
Hidrocarbonetos	<i>Pseudomonas</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Beijerinckia</i> , <i>Flavobacterium</i> ,	bactérias	Jacques et al., (2005 ^a); Jacques

	<i>Nocardia, Corynebacterium, Sphingomonas, Mycobacterium, Stenotrophomonas, Paracoccus, Burkholderia, Microbacterium</i>		et al., (2005b); Jacques et al., (2007)
Hidrocarbonetos	<i>Cunninghamella, Phanerochaete, Fusarium, Candida, Penicillium, Pleorotus, Trametes, Aspergillus, Bjerkandera, Chrysosporium</i>	Fungos	Jacques et al., (2005a)
Gasolina	<i>Pseudomonas putida, Burkholderia cepacia, Pseudomonas alcaligenes</i>	Bactérias	Cunha e Leite (2000)
Hidrocarbonetos	<i>Aspergillus versicolor,</i>	Fungo	Lemos et al., (2003)
Gasolina, óleo diesel, óleo cru	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactéria	Karamalidis et al.,(2010)
Biodiesel	<i>Pseudomonas oleovorans, Pseudomonas mendocina, Pseudomonas aeruginosa, Marinomonas vaga, Escherichia coli, Burkholderia gladioli, Burkholderia cepacia, Bacillus subtilis</i>	Bactérias e fungos	Vieira et. al (2006)

2.5 Mecanismo de degradação

A degradação dos HAPs no ambiente pode ocorrer através de processos químicos e físicos. A interação entre moléculas e íons ou a excitação de átomos por efeito da luz e da temperatura conduzem a desestabilização da estrutura das moléculas e ao rompimento das ligações. No entanto, estes processos são lentos e incompletos, sendo que a biodegradação é a principal via de eliminação dos HAPs no solo (PRINCE e DRAKE, 1999)

A biodegradação de hidrocarbonetos é Basicamente uma reação de oxi-redução onde o hidrocarboneto é oxidado (doador de elétrons) e um acceptor de elétrons é reduzido (MARIANO et al., 2006b).

Há vários compostos que podem agir como aceptores de elétrons, tais como o oxigênio (O₂), nitrato (NO₃⁻), óxidos de ferro (p.e. Fe(OH)₃), sulfato (SO₄²⁻), água (H₂O) e dióxido de carbono (CO₂). A seguinte sequência de preferência de utilização desses aceptores foi observada: oxigênio > nitrato > óxidos de ferro > sulfato > água. Esta sequência reflete a

diminuição do potencial de oxidação dos aceptores. Em geral, a cinética de oxidação dos hidrocarbonetos é mais rápida para aceptores de elétrons com potenciais de oxidação mais altos (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996).

Quase todos os hidrocarbonetos do petróleo são biodegradados sob condições aeróbias. Oxigênio é um co-substrato para a enzima que pode inicializar o metabolismo do hidrocarboneto e por fim é utilizado comoceptor final de elétrons para a geração de energia (YOUNG, 1984).

Para que um microrganismo utilize estes compostos como fonte de C e energia para o seu crescimento, é necessário que possua as várias enzimas que transformam as complexas moléculas dos HPAS (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) em intermediários comuns das suas rotas catabólicas.

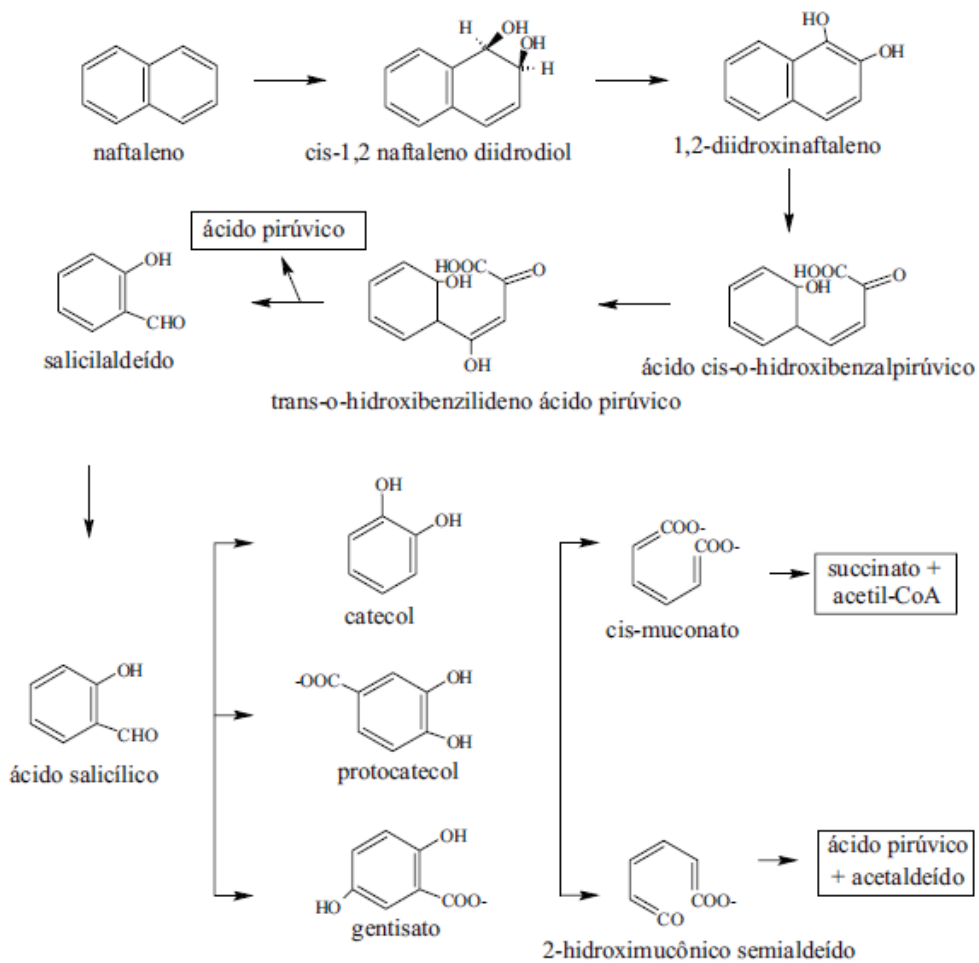
Os processos de biorremediação se dão pelo fato de microrganismos como bactérias e fungos, por exemplo, utilizarem o carbono orgânico como substrato. É notável que após metabolismo do substrato pela microbiota são produzidos metabólitos como compostos biotransformados resultantes do mecanismo de degradação microbiana, gases como dióxido de carbono (CO_2) e metano (CH_4), nova biomassa celular, energia e água (SPINELLI, 2005).

A decomposição em geral nos sistemas de biorremediação se dá por dois estágios: ação aeróbia e anaeróbia ou metanogênica. O estágio aeróbio consiste nas reações de transformações com a presença de oxigênio molecular (O_2) e ocorre liberação do gas CO_2 . O estágio anaeróbio ocorre sob condição de ausência de oxigênio molecular e as transformações geram metano (CH_4).

No metabolismo bacteriano, a oxigenação inicial dos HPAs é realizada por uma enzima intracelular dioxigenase, que tem a função de reconhecer o HPA e adicionar dois átomos de oxigênio, quebrando a estabilidade devido à ressonância do anel aromático. Após sucessivas oxidações, o último anel aromático é transformado em um dos intermediários centrais da via de degradação dos HPAs,. A partir de então, atuam as denominadas enzimas de fissão, que converterão os intermediários centrais em compostos que possam ser utilizados nas vias comuns de geração de carbono e energia da bactéria (JACQUES et al., 2007).

As enzimas de fissão podem ser divididas em dois grupos, conforme o local da clivagem no intermediário central: as enzimas intradiol abrem o anel aromático por via orto, originando o cis-muconato, que, por passos sucessivos, será convertido em succinato e acetil-coenzima; e as enzimas extradiol fazem a abertura do anel aromático por via meta, originando o semialdeído 2-hidroximucônico, que, por passos sucessivos, será transformado em ácido

pirúvico e acetaldeído (JACQUES et al., 2007). A Figura 4 apresenta um exemplo para o processo de degradação para o naftaleno.



Fonte: Bamforth e Singleton, 2005.

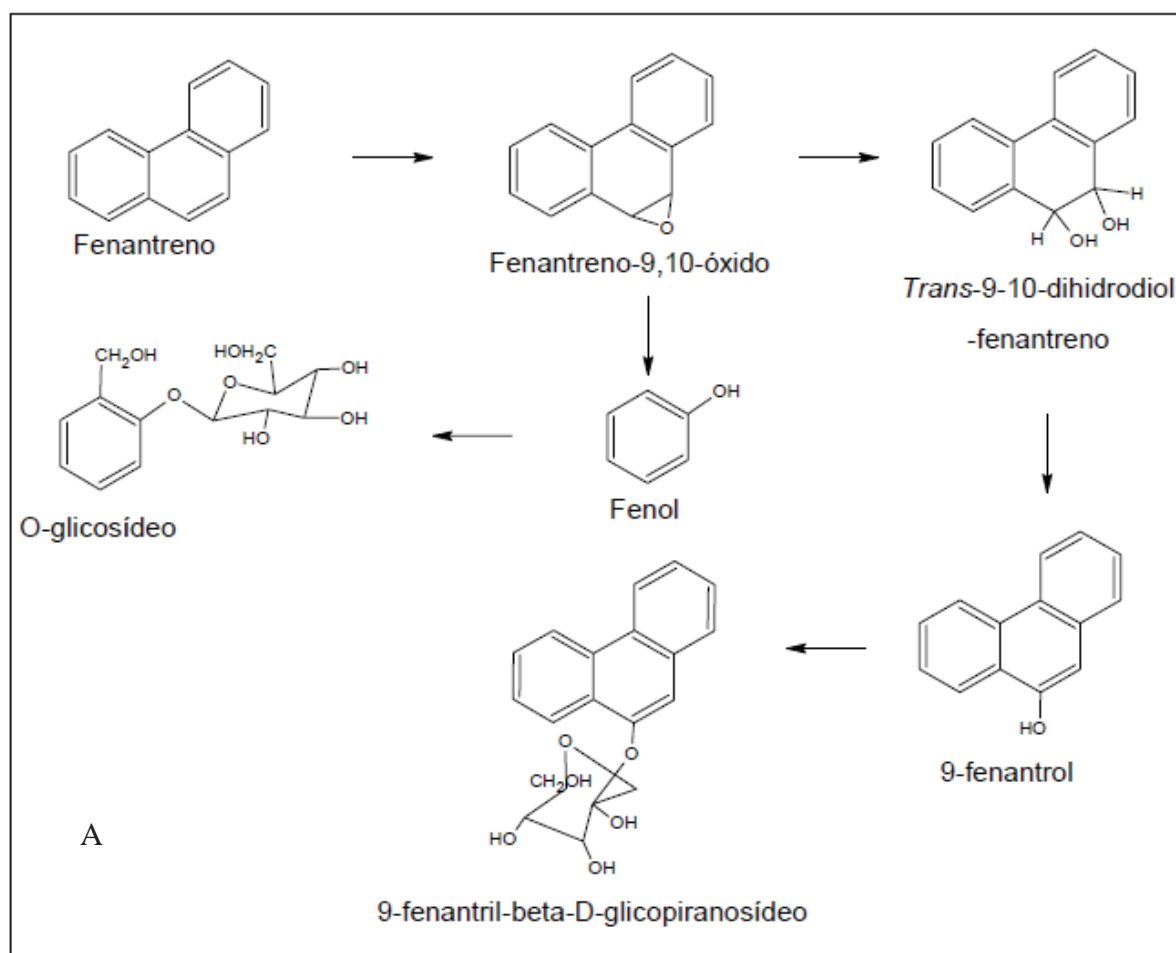
Figura 4: Processo de degradação do naftaleno pelas bactérias

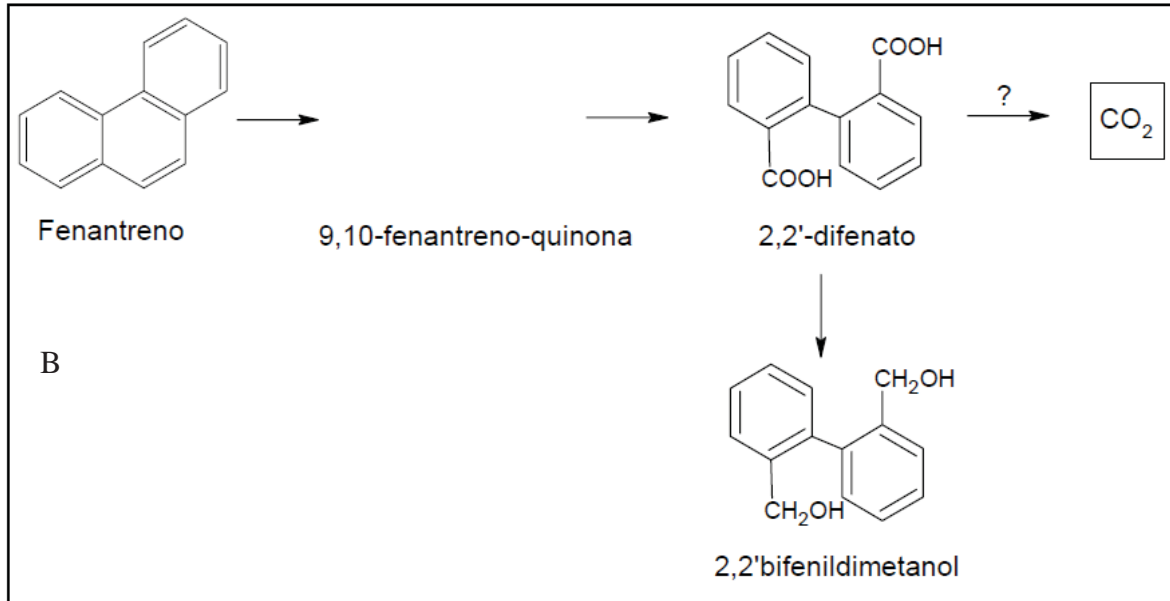
Os fungos também podem metabolizar os HPAs. São duas as principais vias descritas na literatura: a primeira está relacionada aos fungos não-lignolíticos e a segunda aos fungos lignolíticos (BAMFORTH e SINGLETON, 2005).

Para exemplificá-las utilizar-se-á as vias de degradação do fenantreno (Figura 5). O metabolismo dos HPAs do *Cunninghamella elegans* é bastante estudado entre os fungos não lignolíticos. Assim como em seres humanos, o citocromo P450 realiza a monoxigenação inicial do fenantreno em óxidos arenos (epóxidos), que, através das enzimas epóxido hidrolases, são transformados em trans-diidrodióis, ou um dos anéis pode ser rearranjado não enzimaticamente a fenol e ser conjugado, originando compostos como oglicosídeos e o-glicoronídeos. Os trans-diidrodióis são transformados por desidratação em fenantróis, que

podem então ser convertidos em 9-fenantrilbeta-D-glicopiranosídeo, que se acredita ser um dos produtos finais da via de degradação dos fungos não-lignolíticos (JACQUES, 2007a).

A lignina contém uma variedade de estruturas aromáticas, sendo que os fungos lignolíticos oxidam este polímero extracelularmente pela ação de lignina peroxidases, peroxidases dependentes de manganês e lacases. Estas são enzimas não específicas que podem oxidar HPAs (JOHNSEN et al., 2005). O *Pleurotus ostreatus* é um fungo lignolítico que tem o metabolismo dos HPAs bem estudado. Este fungo oxida o fenantreno transformando-o em 9,10-fenantreno-quinona e por clivagem deste anel, em 2,2'-difenato. A partir deste metabólito, pode ser formado 2,2'bifenildimetanol ou CO₂, este último por uma via bioquímica ainda não elucidada (JACQUES et al., 2007a).





Fonte: Jacques et al., 2007a

Figura 5: Degradação do fenantreno por fungos não-lignolíticos (A) e lignolíticos (B)

Apesar do menor número de estudos, o metabolismo anaeróbico dos HPAs é pesquisado há bastante tempo. Os hidrocarbonetos também contaminam ambientes anaeróbicos, como os sedimentos e as águas subterrâneas, devido ao escoamento superficial de partículas de solos contaminadas, aos derrames de petróleo e a liberação indiscriminada de resíduos industriais no ambiente (BAMFORTH e SINGLETON, 2005).

A baixa taxa de degradação de um poluente no ambiente pode ser resultado do reduzido ou do inexistente número de microrganismos com habilidade de degradação do composto. Isto é particularmente importante quando este ambiente recebe os HPAs pela primeira vez e não há populações microbianas capazes de degradar eficientemente este composto. Nestes casos, a inoculação do local contaminado com microrganismos de alto potencial de degradação dos contaminantes é uma prática recomendada (BENTO et al., 2005).

2.6 Contaminantes em solos

Vários são os contaminantes que entram em contato com o solo e que muitas vezes chegam a atingir o lençol freático. Os combustíveis em função dos diferentes tipos e seu grande uso, nas atividades diárias da população, passam a ser uma grande fonte de contaminação. Os vazamentos no transporte terrestre de combustível além da contaminação pelos tanques de armazenamento, têm salientado a importância do seu estudo tanto pela

dificuldade na identificação e monitoramento de locais contaminados, como também pelo entendimento da sua interação com o ecossistema, fortemente correlacionado com o tipo de solo, e particularmente com as diferenças nas propriedades dos combustíveis como pressão de vapor, solubilidade em água, misturas e aditivos. As diferenças nas propriedades do solo, atribuídas ao tipo, quantidade de argila, textura, atividade biológica, capacidade de retenção de água e matéria orgânica, em conjunto com as propriedades dos combustíveis, implicam em efeitos peculiares que conduzem as substâncias contaminantes para diferentes distribuições e liberação no solo, na atmosfera e água (FINE et al., 1997).

Segundo Mariano (2006a), quando um combustível atinge o solo, seus componentes separam-se em três fases: dissolvida, líquida e gasosa. Uma pequena fração dos componentes da mistura se dissolve na água do lençol freático, uma segunda porção é retida nos espaços porosos do solo na sua forma líquida pura como saturação residual e outra parte dos contaminantes passíveis de evaporação dão origem à contaminação atmosférica (NADIM et al., 1999). Portanto, uma vez estabelecida a contaminação, esta poderá atuar em três níveis diferentes: solo, água subterrânea e atmosfera. Assim, a tarefa de avaliação da extensão, dinâmica, concentração das contaminações, análise de riscos e possíveis estratégias de remediação torna-se complexa.

Segundo Costa et al. (1999), os vazamentos de combustíveis se manifestam em cinco fases de contaminação no solo, que podem ser descritas da seguinte forma:

a) Fase adsorvida – caracteriza-se por uma fina película de hidrocarbonetos envolvendo grumos de solo ou discontinuidades existentes na rocha, sendo mais importante para os produtos mais viscosos como o diesel;

b) Fase livre – Se constitui de um véu não miscível sobre o topo do freático livre e que pode ser mais espesso em casos onde o sistema freático é pouco dinâmico (várzeas);

c) Fase dissolvida – constitui em contaminação por dissolução de aditivos polares e por uma fração emulsionada de hidrocarbonetos que possui maior mobilidade e dissipa-se abaixo do nível freático livre, sendo mais importante para fluidos menos viscosos como a gasolina;

d) Fase vaporizada – constituem uma fase gasosa dos componentes voláteis dos combustíveis e que ocupa vazios do solo ou rocha, sendo mais importante para os hidrocarbonetos de menor ponto de vaporização, como aqueles que compõem a gasolina;

e) Fase condensada – aparece mais tipicamente em áreas urbanas onde a pavimentação do solo é intensa e pouco permeável, caracterizando-se pela acumulação de produtos condensados sob os pavimentos.

Segundo Lee et al., 1988 um dos grupos de componentes mais importantes na composição dos combustíveis são os hidrocarbonetos.

A alta concentração de aromáticos principalmente no óleo diesel é decorrente do seu processo de produção. Este é destilado (no caso o diesel) em uma faixa de temperatura similar àquela em que são destilados os hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) e os derivados alquílicos (de 160 a 410 °C). A gasolina, por exemplo, é deionizada na faixa de 80 a 120 °C, apresentando uma menor fração de HPAs quando comparado ao diesel.

2.6.1 Biodiesel

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

O biodiesel compõe, junto com o etanol, importante oferta para o segmento de combustíveis. Ambos são denominados de biocombustíveis por serem derivados de biomassa (matéria orgânica de origem vegetal ou animal que pode ser utilizada para a produção de energia), menos poluentes e renováveis.

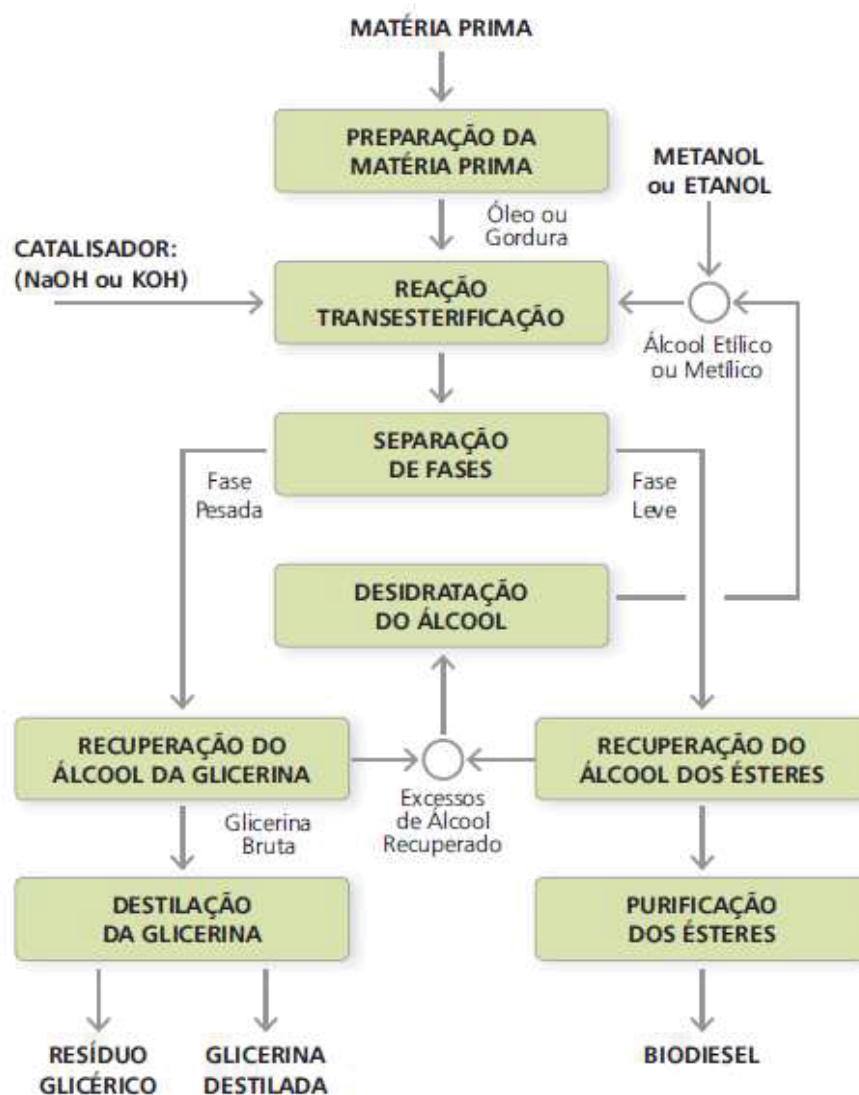
A definição para biodiesel adotada na Lei nº 11.097, de 13 de setembro de 2005, que introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira é: "Biodiesel: biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil."

A ideia inicial segundo a Lei nº 11.097/05 era de 2% entre 2008 a 2012 e de 5% a partir de 2013, mas hoje isso foi modificado pela Resolução nº 6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), em que ficou obrigatório o uso de 5% de biodiesel junto ao diesel, desde 1 de janeiro de 2010. Ainda se tem a previsão que se chegue até um B20 em um futuro próximo.

Existem duas tecnologias que podem ser aplicadas para a obtenção de biodiesel a partir de óleos vegetais (puros ou de cocção) e sebo animal: a tecnologia de transesterificação e a

tecnologia de craqueamento, sendo que a predominante é a transesterificação (SEBRAE, 2006).

A transesterificação é o processo de separação do glicerol do óleo vegetal. Cerca de 20% de uma molécula de óleo vegetal é formada por glicerina. A molécula de óleo vegetal é formada por três ésteres ligados a uma molécula de glicerina, o que faz dele um triglicídio. A glicerina torna o óleo mais denso e viscoso. Durante o processo de transesterificação, a glicerina é removida do óleo vegetal, deixando o óleo mais fino e reduzindo sua viscosidade (SEBRAE, 2006). A Figura 6 demonstra um esquema do processo de transesterificação.



Fonte: SEBRAE, 2006.

Figura 6: Processo de produção de biodiesel

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

O quadro 2 apresenta algumas características complementares usualmente atribuídas ao biodiesel (obtido de óleo de fritura) em comparação com o diesel convencional.

Quadro 2: Propriedades complementares atribuídas ao biodiesel em comparação ao óleo diesel comercial

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

Fonte: Neto et al., 1999.

2.6.2 Óleo diesel

Segundo a PETROBRAS (2010) o óleo diesel é considerado um combustível derivado do petróleo, constituído basicamente por hidrocarbonetos, o óleo diesel é um composto formado principalmente por átomos de carbono, hidrogênio e em baixas concentrações por enxofre, nitrogênio e oxigênio e selecionados de acordo com as características de ignição e de escoamento adequadas ao funcionamento dos motores diesel. É um produto inflamável, medianamente tóxico, volátil, límpido, isento de material em suspensão e com odor forte e característico.

É um combustível obtido através da mistura de diversas correntes como gasóleos, nafta pesada, diesel leve e diesel pesado, provenientes das diversas etapas de processamento do petróleo bruto (REFAP, 2010).

Esse combustível contém de 2000 a 4000 hidrocarbonetos, uma mistura complexa de alcanos ramificados e cíclicos, e compostos aromáticos obtidos da fração meio destilada durante a separação do petróleo (GALLEGO et al., 2001).

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

A Agência Nacional do Petróleo e Gás (ANP) apresenta as principais características físico-químicas do óleo diesel (Tabela 4), comercializado nos postos de combustíveis do Brasil.

Tabela 4: Características físico-químicas do óleo diesel comercial (tipo c).

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

Fonte: ANP, 2010.

2.6.2.1 Hidrocarbonetos

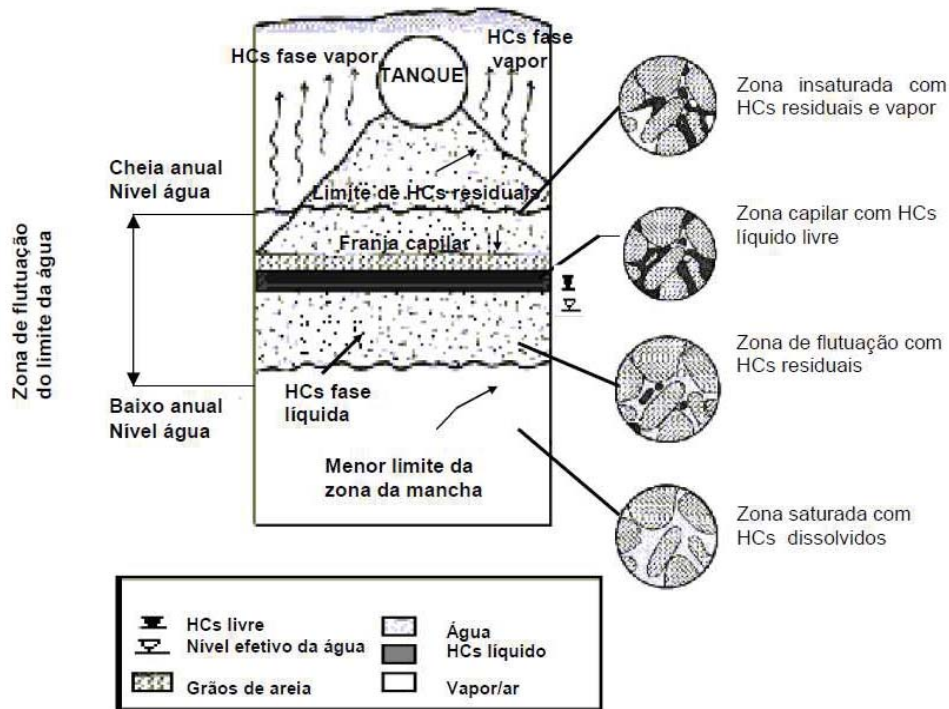
Os HPAs formam, provavelmente, o grupo de contaminantes ambientais mais comum no nosso planeta e vem merecendo redobrada atenção. Segundo Pereira et al., (2000) e Mesquita (2004), a relação entre a incidência de câncer, nos últimos 3 séculos, pode ser relacionada com a exposição de seres humanos a HPAs (JAQUES et al, 2007).

Os hidrocarbonetos são compostos de baixa densidade e a maioria dos seus componentes consiste em uma fase não solúvel em água, ou pelo menos possuem dificuldade em solubilizar seus componentes no aquífero ou solo, quando em seu estado original (VAN HAMME et al., 2003). Além disso os hidrocarbonetos aromáticos são estáveis quimicamente e essa estabilidade é atribuída a uma disposição particular das nuvens eletrônicas e das formas de ressonância do anel benzênico. Essa característica implica na participação preferencial desses compostos em reações de substituição, podendo então persistir no ambiente (PINE, 1987).

Em condições naturais, sua solubilidade efetiva no ambiente depende da transferência facilitada por um composto mais miscível, através de um processo chamado “efeito de co-solvência”. Esse efeito permite que, mesmo com baixa solubilidade, os aromáticos possam ser lixiviados junto a um composto químico que age como solvente. A combinação de álcool com compostos aromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) da gasolina é um exemplo clássico da elevação de risco de contaminação ambiental (CORDAZZO et al., 1999).

Os hidrocarbonetos de petróleo constituem uma mistura complexa, de compostos que pode ser simplificada em: saturados, aromáticos, resinas (N, S, O) e asfaltenos (BALBA, 1998). Andrade et al. (2010) cita que os 10 principais hidrocarbonetos presentes nos combustíveis são: antraceno, benzo(*a*)antraceno, benzo(*k*)fluoranteno, benzo(*g,h,i*)perileno, benzo(*a*)pireno, criseno, dibenzo(*a,h*)antraceno, fenantreno, indeno(1,2,3-*c,d*)pireno e naftaleno.

Segundo Spinelli (2007) as diferentes frações dos hidrocarbonetos do petróleo quando livres no solo superficial e subsuperficial, podem se apresentar de quatro maneiras: (i) as mais leves podem se distribuir na fase de vapor subsuperficial (no gás do solo); (ii) as mais densas, no meio residual (sorvido em partículas do solo, incluindo a matéria orgânica), (iii) no meio aquoso (dissolvido na água) ou (iv) individualizadas (hidrocarbonetos líquidos). A Figura 7 demonstra a distribuição dos diferentes hidrocarbonetos no solo, no caso de uma contaminação por derramamento em um tanque de armazenamento.



Fonte: USEPA, 2004.

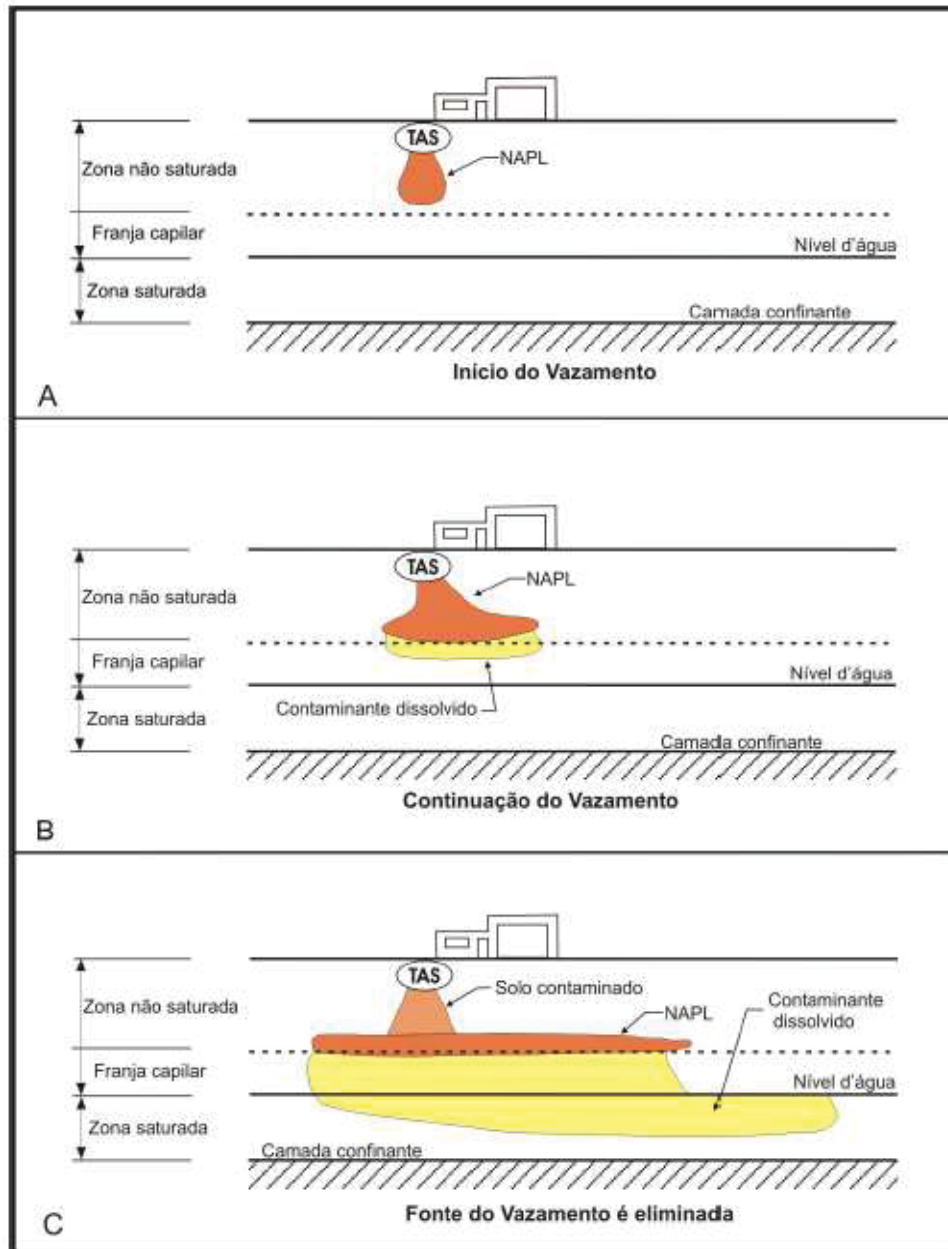
Figura 7: Distribuição vertical dos diferentes hidrocarbonetos no solo.

Os hidrocarbonetos leves estando na fase de vapor subsuperficial são muito mais móveis. De maneira geral, as velocidades e as distâncias de alcance de difusão e de advecção do vapor no solo podem ser influenciadas por vários fatores: gradientes de concentração química, permeabilidade do solo, conteúdo de umidade, gradientes de pressão, temperatura, gravidade e pelas propriedades físico-químicas dos HCs (USEPA, 1993). Além disso, podem migrar por distâncias relativamente grandes, quando próximos a trajetórias preferenciais, como: fraturas, camadas de areia e linha de canalização do serviço público ou podem volatilizar para o ambiente (USEPA, 2004).

No caso específico do óleo diesel, quando este é derramado no solo, os componentes voláteis também são removidos rapidamente (CUNNINGHAM et al., 2004). No entanto, boa parte das frações de HPAs, que são por natureza semivoláteis e hidrofóbicos, tende a permanecer no meio sólido.

Quando liberados no ambiente subsuperficial, como a partir de tanques de armazenamento em postos de combustíveis, os hidrocarbonetos líquidos tendem a migrar para baixo sob a influência de forças de gravidade e capilar. O efeito da gravidade é mais pronunciado em líquidos com densidade mais elevada. O efeito das forças capilares é similar a um líquido extraído de uma esponja seca: quando a fonte libera líquidos do petróleo, o solo

subjacente se torna saturado e a borda principal do líquido migra mais profundamente, deixando um nível residual de hidrocarbonetos imóvel no solo e acima da origem do derrame (USEPA, 2004). A Figura 8 apresenta o caminho percorrido por um combustível liberado de um tanque subterrâneo e a formação da pluma de contaminação.



Fonte: USEPA, 2004

Figura 8: Evolução da pluma de contaminação por combustíveis em subsuperfície

Caso o volume dos hidrocarbonetos do petróleo liberado na superfície seja pequeno, relativo à capacidade da retenção do solo, então os hidrocarbonetos tenderão a sorver em partículas deste e a massa inteira fica imobilizada. Para que os hidrocarbonetos do petróleo se acumulem como produto livre no meio, um volume da liberação deve ser suficiente para

superar a capacidade de retenção do solo, entre o ponto de derrame e o nível do lençol freático (USEPA, 2004b). No caso de solos argilosos, que possuem predominantemente uma alta capacidade de sorver compostos, os petroderivados tendem a ficar imobilizados. Isso também decorre da própria particularidade dos compostos orgânicos hidrofóbicos (COHs), como é o caso dos HPAs dos combustíveis, que quando no meio ambiente, por serem frequentemente imiscíveis em água, ficam presentes como uma fase líquida não aquosa (NAPL, Non-Aqueous Phase Liquids), com maior dificuldade de percolação.

Assim, vários são os fatores que influenciam o comportamento e o destino do contaminante no ambiente. Estes fatores podem ser físicos, químicos ou biológicos e são vários os processos envolvidos, entre eles: advecção, difusão, adsorção, dessorção, volatilização e degradação química ou biológica. A importância de cada processo depende do local, tipo e características do solo, do contaminante e das interações entre estes.

A Tabela 5 apresenta valores típicos de saturação residual para o óleo diesel observados na zona insaturada em diferentes tipos de solos. Esse valor é obtido a partir de um valor específico para cada tipo de solo, multiplicado pelo fator de correção da viscosidade do hidrocarboneto em questão. No caso de produtos de baixa viscosidade, como a gasolina, o fator de correção é 0,5; para compostos mais viscosos como querosene e óleo diesel é de 1,0 e 2,0, respectivamente (OLIVEIRA, 1992).

Tabela 5: Valores típicos de saturação residual do óleo diesel da zona insaturada em diferentes frações granulométricas do solo.

Frações Granulométricas do solo	Capacidade de Retenção de óleo (L.m⁻³)
Cascalho grosseiro	5
Cascalho, areia grossa	8
Areia grossa a média	15
Areia média a fina	25
Areia fina a silte	40
Argila	60

Fonte: Oliveira, 1992.

2.7 Biorremediação de resíduos oleosos

A forma como os contaminantes oleosos interagem com o fluxo freático, com os argilo-minerais e com a matéria orgânica (MO) presente no solo é complexa do ponto de vista físico e químico, no entanto, sendo considerados produtos orgânicos, as ações biológicas são consideradas significativas e alteram o comportamento do contaminante ao longo do tempo (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

A biodegradação de resíduos oleosos exige uma via metabólica complexa que nem sempre é encontrada em uma única espécie de microrganismos. Em uma cultura em comum, os produtos metabólicos de uma espécie podem ser degradados por outro presente na cultura, e assim sucessivamente, levando à completa degradação do substrato, apesar da falta de um tipo específico de microrganismo na comunidade capaz de degradar sozinho (MORAES e TORNISIELO, 2009)

As condições químicas e a matéria orgânica do solo são importantes para atividade dos microrganismos no solo, assim como para a população microbiana co-metabolizante, que também atua na biodegradação de certos componentes do petróleo e de outros resíduos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

Segundo a USEPA (1991) apud Mariano (2006a), um plano típico de remediação possui quatro fases principais:

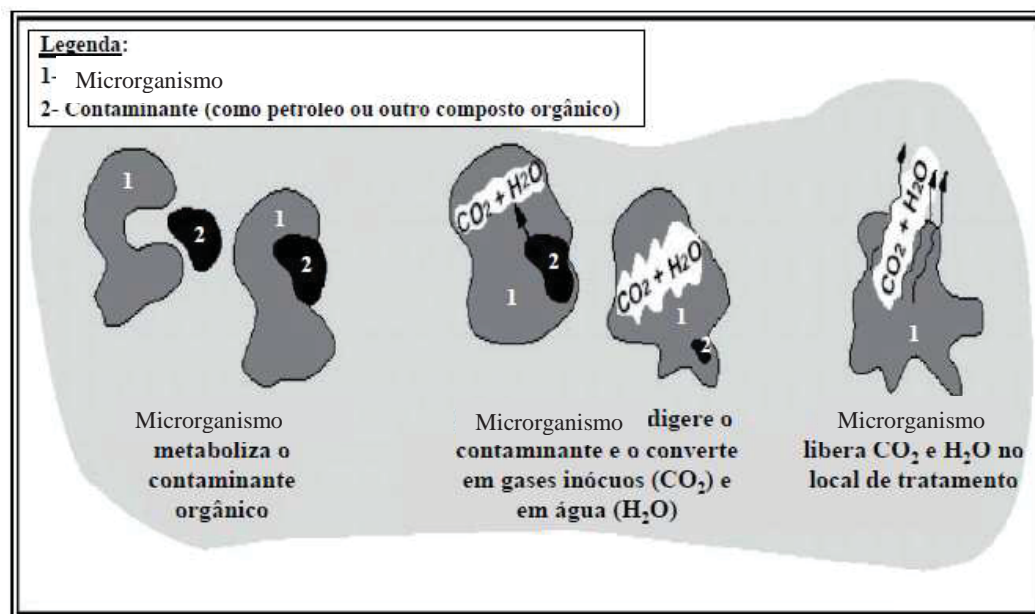
- a)- Contenção do produto livre e produto dissolvido;
- b)- Remoção do produto livre;
- c)- Remoção do produto dissolvido;
- d)- Remoção do produto adsorvido

A biorremediação é um processo de tratamento ativo que usa microrganismos para degradar e transformar em químicos orgânicos os contaminantes do solo, sedimentos e resíduos. Conforme Moreira e Siqueira (2002), a bioremediação é fundamentada nos processos de degradação microbiana e reações químicas combinadas com processos de engenharia, criando condições para maximizar as transformações dos contaminantes orgânicos do solo. Essas transformações no solo sob influência dos microrganismos vão da simples remoção de um único átomo da molécula à mineralização completa da substância orgânica.

A biorremediação, segundo Martins et. al., (2003), “[...] é o processo de tratamento que utiliza a ocorrência natural de microrganismos para degradar substâncias toxicamente perigosas, transformando-as em substâncias menos ou não tóxicas”.

Este processo de degradação baseia-se em três aspectos principais: a existência de microrganismos com capacidade catabólica para degradar o contaminante; a disponibilidade do contaminante ao ataque microbiano ou enzimático e condições ambientais adequadas para o crescimento e atividade do agente bioremediador. (PEREIRA e LEMOS, 2004 ; MENEGHETI, 2007).

A biorremediação também pode ser considerada como fonte de controle e prevenção de poluição, reduzindo a toxicidade dos orgânicos e o potencial de migração de perigosos constituintes do solo. Baseia-se no processo de degradação microbiana e reações químicas combinadas com processos de engenharia, a fim de que os contaminantes sejam transformados, não oferecendo riscos ao ambiente. A Figura 9 apresenta um esquema geral de um processo de biorremediação.



Fonte: Adaptado de Andrade et al, 2010.

Figura 9: Processo esquemático da degradação de petróleo

Uma das maiores vantagens da biorremediação para o tratamento de compostos oleosos é a sua relação custo-eficácia, comparada á algumas técnicas físicas, que são caras e necessitarão de um acompanhamento contínuo para atingir resultados bem sucedidos (BAPTISTA et al., 2005). Além do custo, a biorremediação tem vantagens distintas sobre

métodos de correção físico-químicos, pois pode atingir a completa degradação dos poluentes orgânicos, sem muita interferência na flora e fauna do local, utilizando quantidades muito menores de substâncias químicas (ANG et al., 2005; MROZIK e SEGET, 2010).

A biorremediação emergiu como uma boa técnica para o tratamento ambiental de compostos orgânicos, tais como hidrocarbonetos de petróleo e demais compostos oleosos, devido à sua flexibilidade e adaptabilidade em locais diferentes (BAPTISTA et al., 2005).

Os microrganismos são considerados biodegradadores eficientes devido a sua abundância, a diversidade de espécies, e sua versatilidade catabólica e anabólica, bem como a sua capacidade de adaptação a condições ambientais adversas (MORAES e TORNISIELO, 2009).

A biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo por populações naturais de microrganismos representa um dos principais mecanismos através dos quais estes compostos poluentes podem ser eliminados do ambiente (ROSETO, 1997).

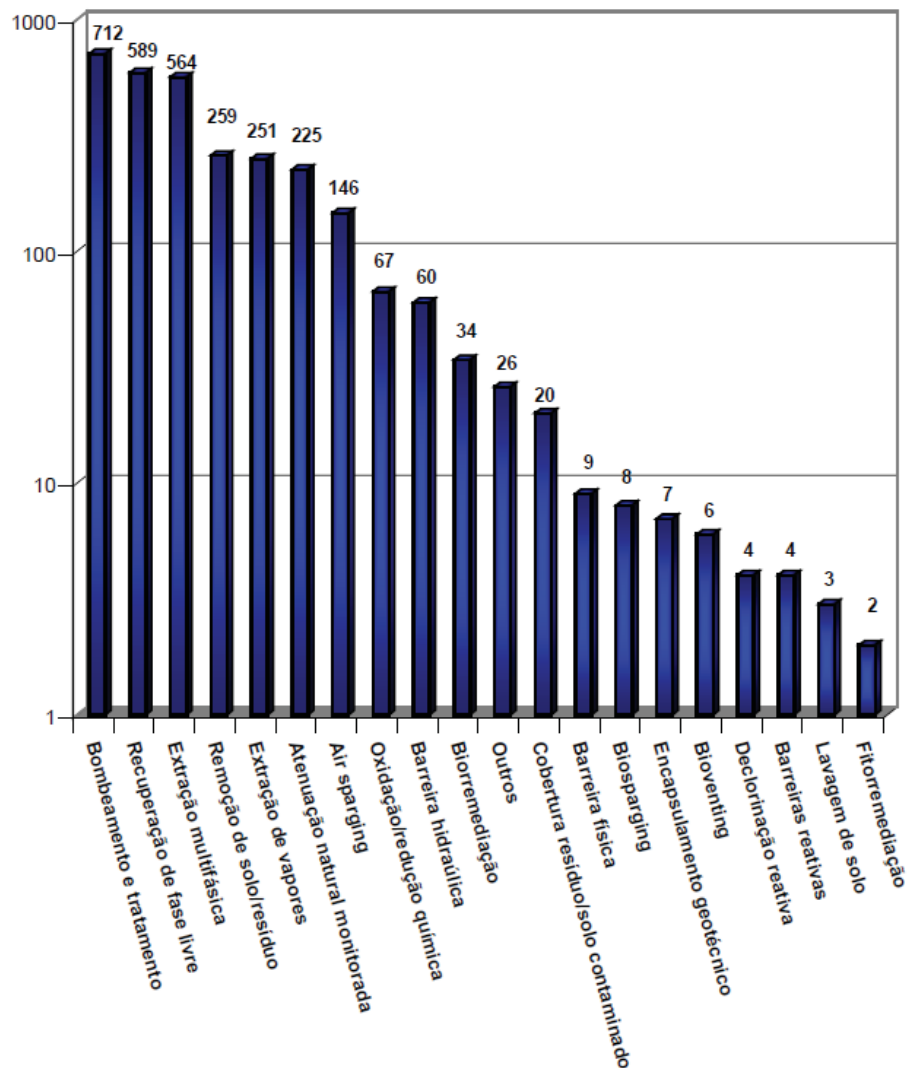
A Tabela 6 apresenta as principais técnicas físico-químicas e biológicas para remediação de áreas contaminadas com compostos orgânicos e seus custos estimados.

Tabela 6: Diferentes técnicas para remediação de áreas contaminadas

TECNOLOGIAS	TIPO	PROCESSO	FASES	CUSTO (US\$)
Biorremediação de Solo	<i>In Situ</i>	B	Todas	30 a 100 /m ³
Biorremediação Superficial	<i>In Situ</i>	B	Adsorvida Condensada	30 a 70/m ³
Bioventilação	<i>In Situ</i>	B	Adsorvida Livre	10 a 70/ m ³
Extração de Vapor	<i>In Situ</i>	F	Adsorvida Livre	65 a 130/ m ³
Atenuação Natural	<i>In Situ</i>	BFQ	Todas	NC
<i>Landfarming</i>	<i>Ex Situ</i>	B	Adsorvida, Vapor condensado	135 a 270/m ³
Biopilha	<i>Ex Situ</i>	B	Adsorvida, Vapor condensado	40 a 200/ton
Bio-reator	<i>Ex Situ</i>	B (Adsorvida)	Vapor condensado	130 a 200/m ³
Incineração	<i>Ex Situ</i>	T	Adsorvida Vapor condensado	200 a 1000/ton
Aterro de Cobertura	<i>Ex Situ</i>	D	Adsorvida Vapor condensado	25 a 30/ m ²
Injeção em poços profundos	<i>Ex Situ</i>	D	Adsorvida Vapor condensado	Não citado
Solidificação / Estabilização	<i>Ex Situ</i> <i>In Situ</i>	QF	Todas	170 a 340/m ³
Biorremediação de aquíferos	<i>In Situ</i>	B	Livre Dissolvida	10 a 20/m ³
<i>Air Sparging</i>	<i>In Situ</i>	F	Todas	100 a 160/m ³
<i>Bioslurping</i>	<i>In Situ</i>	B	Todas, exceto Dissolvida	225.000/m ³
Fitorremediação	<i>In Situ</i>	B	Todas	30 a 50/m ³
Paredes de Lama (Barreiras)	<i>In Situ</i>	F	Livre Dissolvida	450 a 750/m ²
Extração de fases (Bombeamento)	<i>In Situ</i> <i>Ex Situ</i>	BQ	Livre Dissolvida	85.000 a 500.000/m ³
Lavagem do solo	<i>In Situ</i> <i>Ex Situ</i>	F	Vapor condensado	100 a 160/m ³

Fonte: Mesquita, 2004; Spinelli, 2007

De acordo com a CETESB (2011a), inúmeros processos físicos, químicos e biológicos têm sido utilizados para descontaminação de 2996 áreas impactadas no estado de São Paulo, como solos e águas subterrâneas, sendo a biorremediação ainda uma ferramenta pouco utilizada no Brasil, em que dentre as utilizadas se destaca a atenuação natural e a bioventilação. A Figura 10 apresenta as técnicas utilizadas para remediação de áreas contaminadas no estado de São Paulo para o ano de 2010.



Fonte: CETESB, 2011b

Figura 10: Processos de remediação utilizados em São Paulo no ano de 2010

Dentre as varias técnicas de biorremediação que podem ser realizadas para remediação de solos contaminados as mais utilizadas são a atenuação natural, a bioaugmentação e a bioestimulação (MENEGETI, 2007; MARTINS 2003; BENTO et al., 2003; LIN et al., 2010).

Os microrganismos desenvolvem naturalmente a atenuação natural, ou podem ser estimulados para uma biodegradação controlada do contaminante. Em situações onde se detecta a presença de poluentes persistentes, faz-se necessário a utilização de microrganismos específicos, capazes de reduzir a toxicidade do poluente no meio, ou ainda estimular a microbiota já existente no local para que ocorra a degradação (MARIANO, 2006a; JACQUES et al., 2007b; MROZIK e SEGET, 2010).

2.7.1 Atenuação natural

A atenuação natural é a reposta de sistemas hidrogeológicos à contaminação envolvendo processos químicos, físicos e biológicos que, sob condições favoráveis, agem sem intervenção humana, reduzindo massa, toxicidade, mobilidade, volume ou concentração de contaminantes no solo com o tempo (BOSCOV e GIMENEZ, 2008). Segundo Jacques et al, 2007a a atenuação natural é a técnica que utiliza processos naturais para degradação e redução das concentrações de contaminantes para níveis aceitáveis. Esses processos, que são de natureza física, química e biológica, constituem: diluição, volatilização, biodegradação, adsorção e reações químicas.

A avaliação da remediação por este método requer uma ação conjunta de acompanhamento e monitoramento. Além disso, se fazem necessários estudos efetivos capazes de avaliar a taxa de degradação ou decaimento do contaminante para diagnosticar a eficiência da remediação (MENEGHETI, 2007).

A técnica de remediação por atenuação natural requer um tempo elevado para tratamento visto que, os microrganismos degradadores do contaminante em estudo encontram-se em número reduzido e/ou inexistentes, dependendo do local contaminado.

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.

2.7.2 Bioestimulação

A bioestimulação consiste na adição de nutrientes como o nitrogênio, fósforo e potássio (N, P, K) para os microrganismos, junto à área contaminada. A aeração ou a adição de compostos ricos em nutrientes, como por exemplo adição de esterco, também são consideradas técnicas de bioestimulação (LIN et. al, 2010). Os microrganismos se nutrem dos múltiplos compostos orgânicos para o desenvolvimento de seu metabolismo de manutenção e reprodução culminado na remoção do contaminante (ALVAREZ e ILLMAN, 2006; MARIANO et al., 2008).

Liu et al. (2010) estudaram a biorremediação de um solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo, através da 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%.

Bento et al. (2003), avaliaram a degradação de hidrocarboneto de petróleo em solos contaminados com óleo diesel através da atenuação natural, bioaugmentação e bioestimulação, para remediação de uma área contaminada com óleo diesel. Os melhores resultados foram obtidos para o bioaumento com degradação de 75 % do poluente após duas semanas de incubação com um consorcio de bactérias (*Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus pumilus*, *Acinetobacter junii* e *Pseudomonas* sp) no solo contaminado.

Abdulsalam e Omale (2009) analisaram a biorremediação de um solo contaminado artificialmente com óleo de motor, utilizando as técnicas de bioestimulação com N:P:K (20:10:10) e bioaugmentação, com o fungo *Bacillus subtilis* além de um misto das duas técnicas, por um período de 42 dias. Os resultados demonstraram que a técnica de bioestimulação foi a que apresentou a maior taxa de remoção do contaminante, chegando a 69,3% de remoção.

2.7.2.1 Bioventilação

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

É uma tecnologia promissora que aumenta a biodegradação dos contaminantes mediante fornecimento de oxigênio aos microrganismos existentes no solo. Este processo utiliza baixas vazões de ar, suficientes apenas para manter a atividade microbiana. Na maioria dos casos, o oxigênio é fornecido pela injeção direta de ar na massa de solo contaminado, onde ocorre também a biodegradação de compostos orgânicos voláteis, que se movem lentamente através do solo biologicamente ativado.

A bioventilação provou ser muito eficaz na remediação de resíduos de petróleo, incluindo gasolina, combustíveis de aviação, querosene e óleo diesel. Bioventing é frequentemente mais utilizado em contaminantes com peso médio de produtos petrolíferos (combustíveis, ou seja, diesel e querosene de aviação), porque produtos mais leves tendem a volatilizar facilmente e podem ser removidos mais rapidamente com SVE (sistema de

extração de vapores), ou seja produtos mais pesados (por exemplo, óleos lubrificantes) geralmente levam mais tempo para biodegradar do que os produtos mais leves (USEPA, 1994).

A disponibilidade de oxigênio determina o tipo de metabolismo que irá ocorrer no solo. O metabolismo aeróbico é mais vantajoso, pois resulta na mineralização da matéria orgânica e na geração de maior quantidade de energia. No entanto, considerando a baixa disponibilidade de oxigênio no solo, o metabolismo anaeróbico poderá ser o mais recorrente (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006). Neste caso, haverá predomínio dos microrganismos anaeróbios e facultativos se desenvolvendo em condição de anaerobiose, cujo metabolismo é mais lento, e pode levar à formação de compostos nocivos como gás sulfídrico, nitrito, etc.

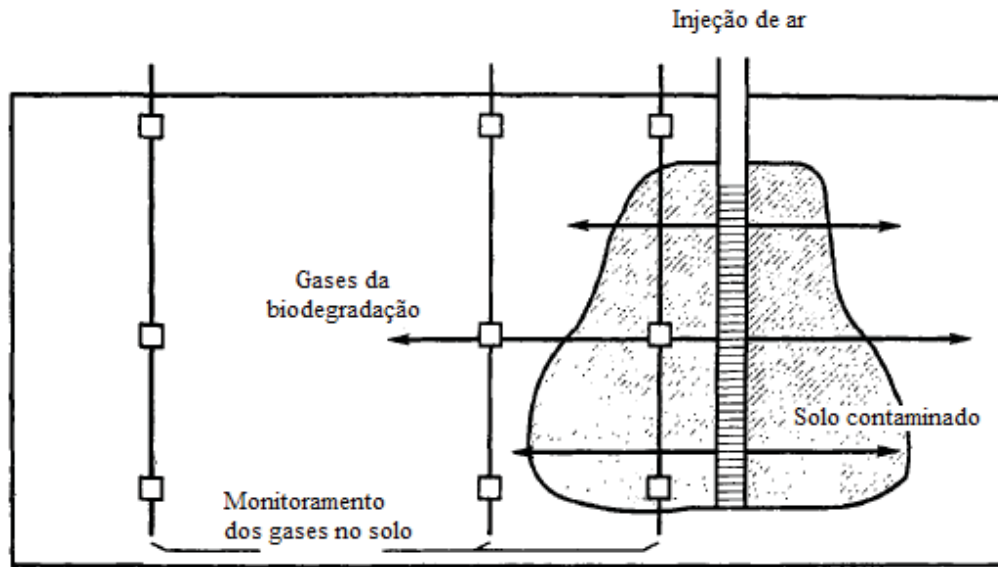
De acordo com Borden et al. (1995), quase todos os hidrocarbonetos de petróleo são biodegradáveis sob condições aeróbicas. O oxigênio é um co-substrato que pode iniciar o mecanismo de biodegradação e, depois de iniciado o metabolismo, pode também funcionar como acceptor de elétrons para a geração de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

A tecnologia de Bioventilação é um importante meio de remoção, através de volatilização, da massa do contaminante e sua destruição “in situ”. A aplicação de ar e/ou oxigênio puro na camada de subsuperfície, estimula o crescimento da população existente, resultando na redução, via potencial oxidativo da microbiota dos contaminantes do local (FERNADES e ALCÂNTARA, 2002).

De acordo com Alvarez e Ilmam (2006), as principais vantagens da técnica de bioventilação são:

- a) Utiliza equipamentos de fácil instalação;
- b) Cria mínimas perturbações no local e pode ser utilizada junto com outras técnicas;
- c) Pode ser usado para limpeza de áreas inacessíveis;
- d) Requer um curto tempo de tratamento (entre 6 meses a 1 ano em condições ótimas).

A Figura 11 apresenta um exemplo de um sistema de bioventilação *in situ*.



Fonte: Adaptado USEPA, 1995a

Figura 11: Esquema de um sistema típico de bioventilação de solo

Segundo USEPA, (1994), as características do solo a ser remediado juntamente com as características do contaminante são extremamente importantes e devem ser avaliados antes da aplicação da técnica. A Tabela 8 apresenta os fatores chave do solo e do contaminante a serem avaliados

Tabela 7: Parâmetros chave para avaliar aplicação do bioventing

Características do local	Características do contaminante
Permeabilidade	Estrutura Química
Estrutura do solo e estratificação	Concentração e toxicidade
Presença dos microrganismos	Pressão de vapor
pH	Composição do produto e ponto de ebulição
Umidade	Constante de Henry
Temperatura	
Nutrientes	
Profundidade das águas subterrâneas	

Fonte: Adaptado de USEPA, 1994.

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

biorreator teve como consequência uma elevação nas eficiências de biodegradação dos poluentes.

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, para se chegar na relação C:N:P de 100:10:1 e capacidade de campo de 60%. As amostras de solo foram moldadas em um reator 500 mm de altura e 250 mm de diâmetro. Foram montados dois reatores, sendo que um foi utilizado como controle. A análise da degradação foi feita através de cromatografia gasosa. Os autores concluíram que a degradação foi mais rápida durante os primeiros 7 dias depois ele diminuiu e parecia se estabilizar após 10 dias. 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 e 18 cm/s (que corresponde as respectivas vazões de 1049, 1415 e 1900 mL/min)

Byun et al. (2005) realizaram o monitoramento de um solo arenoso contaminado artificialmente por diesel, através da técnica de bioestimulação com oxigênio, analisando três diferentes vazões de ar que foram de 5, 10 e 20 mL/ min de forma contínua durante 180 dias. As amostras de solo foram contaminadas com 10000 mg 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 os autores para a degradação abiótica dos TPH foi de 5 mL/min. A degradação do compostos foi melhor avaliada através de contagem microbológica e atividade da desidrogenase.

Cunha et al. (2004), estudaram a remediação de um solo residual de gnaiss (areno siltoso), contaminado com gasolina e etanol, com o uso de bioventing, observando o crescimento dos microrganismos no solo. Foram utilizadas diferentes amostras de solo para experimentos controle, com o uso do bioventing e sem o uso do bioventing. Um fluxo constante de 2 psi 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 dias de contaminação.

Hwang et al. (2006) estudaram a degradação de óleo diesel em um solo arenoso, verificando a influencia de três tempos de aeração de 1h de aeração/1h de descanso, 1h de aeração/3 h de descanso e 1h de aeração/7 h de descanso, utilizando uma taxa de aeração de 100 mL/min, sendo os resultados comparados com um experimento de aeração contínua. Foram utilizados a evolução de CO₂ e cromatografia gasosa para analisar a degradação do

contaminante. Os autores concluíram que a melhor condição de aeração foi a intermitente com 1h de aeração/ 3 h de descanso, sendo que a análise estatística não indicou diferenças significativas de degradação entre este valor de aeração intermitente e o experimento com aeração contínua, sendo portanto preferível a utilização de processos intermitentes pelo menor consumo de energia.

Troquet et al. (2003) testaram através de bioreatores, os principais fatores limitantes para degradação de hidrocarbonetos em diferentes solos. Em 5 reatores de coluna foram adicionados fluxo constante de ar e regulado constantemente a umidade. Foram utilizados 3 tipos de bioreatores, um maior com um fluxo de ar de 100 mL/min e outros 3 menores com fluxo de ar de 50 mL/min, sendo um destes com agitação do solo contaminado e os demais fixos. Após 200 dias de experimento, os autores verificaram uma degradação máxima de 54,7% para o reator fixo 3. Os autores concluem que a aeração do solo é um importante fator limitante na biorremediação e que bioreatores com leito fixo são melhores do que os rotacionais, pois o oxigênio passa melhor pelas camadas do solo.

O Quadro 3 apresenta um resumo das diferentes condições experimentais usadas na bioventilação, realizadas em experimentos por diferentes autores.

Quadro 3: Condições experimentais em diferentes processos de bioventilação

Contaminante	Tipo de solo	Vazão de ar	Tempo entre as aplicações	Fonte
Petróleo	Areno-argiloso	20 L/min	1h diária	Raimundo e Rizzo (2003)
Óleo diesel	Silto-arenoso	1,05 L/min 1,41 L/min 1,90 L/min	Contínua	Arrar et al. (2007)
Óleo diesel	Arenoso	0,005 L/min 0,010 L/min 0,020 L/min	Contínua	Byun et al. (2005)
Óleo diesel	Arenoso	0,1 L/min	1 h a cada 1h 1 h a cada 3 h 1 h a cada 7 h	Hwang et al. (2006)
Hidrocarbonetos	Diversos	0,1 L/min 0,05 L/min	Contínua	Troquet et al., (2003)

2.8 Degradação de biodiesel e misturas

Pasqualino et al. (2006) estudaram a biodegradabilidade do biodiesel, juntamente com misturas com diesel de origem fóssil e gasolina, utilizando o teste de evolução de CO₂ para o estudo da biodegradabilidade em frascos com meio mineral e com lodo de estação de tratamento. Como resultados obtiveram que a biodegradabilidade do biodiesel foi superior a 98% após 28 dias, enquanto no gásóleo e gasolina era de 50% e 56%, respectivamente. Em todos os casos, a biodegradabilidade aumentou com a adição de biodiesel. Para avaliar a efeito sinérgico, os resultados experimentais obtidos para as misturas foram comparados com uma combinação linear dos valores de biodegradabilidade do compostos puros. O efeito sinérgico foi positivo em todos os casos, demonstrando que o biodiesel aumenta a biodegradabilidade dos agentes degradadores, por meio de cometabolismo.

Em seu estudo Owsianiak et al. (2009) também verificaram que houve um aumento de 26% na eficiência na biodegradação quando a fonte de carbono foi alterada de óleo diesel puro para mistura com biodiesel. Também as pesquisas realizadas pelo Zhang et al. (1998) indicaram que a biodegradação foi facilitada para misturas de hidrocarbonetos com alto teor de biodiesel.

Schleicher et al. (2009) analisaram a biodegradação do éster metílico de óleo de colza, puro e em misturas com o diesel. Os autores concluíram que o crescimento maior dos microrganismos ocorreram nas misturas com maior conteúdo de óleo diesel, sendo este de 35% para o B100, 55% para o B20 e 80% para o B5, estes para condições de crescimento aeróbias. O maior crescimento dos microrganismos no B100 ocorreu em condições anaeróbias.

De Mello et al. (2007) avaliaram o comportamento do biodiesel e das misturas diesel/biodiesel em ambiente marinho. Foram criados diferentes microcosmos a partir da mistura de água do mar com diesel fóssil (B0), B8, B25 e B100. Os resultados revelaram que os FAME (ésteres metílicos de ácidos graxos) foram degradados a uma taxa, aproximadamente igual a dos n-alcenos e mais rapidamente que os outros hidrocarbonetos do combustível fóssil. Segundo estes experimentos, a presença dos FAME até poderia reduzir a biodegradação inicial dos n-alcenos do diesel fóssil, mas esta diferença só foi observada na primeira semana de experimentação. Desta forma, acredita-se que, após um curto período de tempo, amostras de uma área contaminada com a mistura diesel/biodiesel se tornariam indistinguíveis das amostras de uma área contaminada com diesel fóssil.

Prince et al. (2008) também realizaram experimentos de laboratório e, assim como De Mello et al. (2007), observaram que os FAMES foram degradados, aproximadamente, à mesma taxa que os n-alcenos do petróleo. Os resultados mostraram que os hidrocarbonetos do diesel e os ésteres do biodiesel são rapidamente degradados em sistemas aquáticos quando o diesel está presente em relativamente baixos níveis (de 100 a 400 mg/L) e na presença de baixos níveis de nitrogênio e fósforo biologicamente disponíveis.

Em seu trabalho, Gomes (2008) observou que a presença do biodiesel de soja influenciou negativamente a degradação dos hidrocarbonetos monoaromáticos do grupo BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos), principais compostos constituintes dos produtos derivados de petróleo. Para um período de incubação de 34 dias, na ausência do biodiesel, houve uma remoção de 90%, 100%, 80% e 70% dos compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, respectivamente.

Já na presença do biodiesel, essa remoção foi de 35% para o benzeno, 100% para o tolueno e 60% para o etilbenzeno e para os xilenos, durante o mesmo período de incubação. No caso específico do tolueno, Gomes (2008) observou que a sua completa degradação foi mais rápida na ausência do biodiesel de soja (25 dias) do que na presença do mesmo (34 dias).

Lapinskiene et al. (2006), estudaram a toxicidade do diesel e biodiesel em amostras de solo, contaminados artificialmente, analisando a degradação dos contaminantes pela atividade de deshydrogenase e evolução de CO₂. Os autores concluíram que o diesel é mais tóxico aos microrganismos, que o biodiesel, sendo que valores acima de 3% para o diesel (w/w), já afetam a atividade dos microrganismos, sendo que para o biodiesel isto se manifesta acima dos 12% (w/w). Ainda os autores afirmam que o biodiesel é mais facilmente degradado que o diesel.

Mariano et al. (2008) estudaram a degradação de diesel e três misturas com biodiesel (B0, B5 e B20) em um solo areno em laboratório, utilizando o teste de evolução de CO₂ e um indicador redox DCPIP, para avaliar a degradação das misturas. Os autores concluem que o biodiesel é mais facilmente biodegradado que diesel, mas que apenas a maior concentração de biodiesel na mistura (B20) apresentou uma degradação mais significativa, comparada as demais. Eles ainda afirmam que pequenas quantidades de biodiesel junto ao diesel (B2 e B5) não apresentam ganho significativo em relação a biodegradabilidade.

Bucker et al. (2011) analisaram o efeito da adição de diferentes teores de biodiesel de soja, junto ao diesel, analisando a degradação das misturas por fungos e leveduras. Foram testadas 5 diferentes misturas: B0, B5, B10, B20, e B100. Os autores concluíram que a adição dos ácidos graxos (FAMES) aumentou a degradação da mistura com o diesel.

Junir et al.,(2009) avaliaram a biodegradação de diferentes misturas de diesel e biodiesel (B0, B2, B5, B20 e B100) em solo arenoso bioaumentado com a levedura *Candida viswanathii*. A avaliação da biodegradação foi feita pelo teste de indicador redox (2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP) e evolução de CO₂. Os autores concluíram que o biodiesel e as misturas contendo biodiesel foram mais facilmente biodegradadas pela levedura estudada com um aumento de até 50% na degradação, quando comparada com a amostra de diesel puro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de estudo e solo

A pesquisa foi executada no Laboratório de Geotecnia Ambiental, junto ao Centro de Tecnologia (CETEC) na Universidade de Passo Fundo, na cidade de Passo Fundo, RS.

Para montagem dos experimentos foi utilizado um solo argiloso, proveniente do campus experimental de Geotecnia da Universidade de Passo Fundo (coordenadas $28^{\circ}13'35.72''S$ e $52^{\circ}23'13.04''O$). As amostras foram coletadas do horizonte B, através de uma vala aberta no solo, sendo coletadas amostras deformadas, para montagem dos biorreatores. A Figura 12 apresenta o local de coleta do solo.



Figura 12: Vala de coleta do solo deformado para o experimento

Para a caracterização física e geotécnica, foram analisados, granulometria, limites de consistência (limite de liquidez, limite de plasticidade), massa específica, grau de saturação índice de vazios, densidade dos grãos, porosidade e condutividade hidráulica, seguindo a metodologia das normas NBR 6457/1986; 6459/1984; 7180/1984; 7181/1984 e 6508/1984.

A caracterização química foi feita a análise completa segundo Tedesco et al. (2005), envolvendo pH em H_2O ; Índice SMP; teor de Matéria-Orgânica (%); Macronutrientes (N, P, K, S, Ca, Mg); Cátions trocáveis (Al, Na) e Acidez potencial (H+Al), CTC (Capacidade de troca de cátions), Micronutrientes (Mn, Zn, Cu, Fe, Mo, B, Cl), Saturação por bases, saturação por Alumínio e saturação por K.

3.2 Contaminante

Para moldagem dos biorreatores o solo foi contaminado em laboratório com uma mistura de dois combustíveis; o diesel e o biodiesel. O contaminante utilizado na pesquisa foi o B20, ou seja uma mistura de 80% de diesel e 20% de biodiesel (biodiesel de soja).

3.3 Delineamento da pesquisa

As variáveis fixas foram o tipo de solo (argiloso) com suas características naturais, o contaminante (B20), e a técnica de biorremediação a ser usada (bioventilação). As variáveis de controle foram a vazão de ar adicionada aos corpos de prova (2, 4 e 6 L/min) e o intervalo de tempo entre uma injeção de ar e outra, considerando para todos o tempo de aplicação fixo (1 h) com diferentes tempos de descanso, sendo 1h a cada 24h, 1h a cada 36h e 1h a cada 48 horas. A bioventilação foi realizada durante 6 dias semanais. As variáveis de resposta foram a degradação quantitativa e qualitativa do contaminante, o crescimento microbiano no solo contaminado e a atividade enzimática medidas nos tempos de 15d, 30d, 60d e 120d.

Os experimentos foram realizados utilizando-se um Planejamento Fatorial Completo 3^2 (Quadro 4), sendo 2 fatores investigados em 3 níveis cada fator. Um ensaio controle foi realizado através de atenuação natural (ensaio 12). Os ensaios 7 e 10 foram realizados como réplicas do ponto central (2), a fim de estimar o erro experimental.

Quadro 4: Valores codificados e reais do Planejamento Fatorial Completo 3^2 e definição do experimento controle

Ensaio	Vazão de ar (L/min)	Tempo de descanso (h)
1	(+1) 6	(-1) 24
2	(0) 4	(0) 36
3	(+1) 6	(+1) 48
4	(0) 4	(-1) 24
5	(0) 4	(+1) 48
6	(-1) 2	(-1) 24
7	(0) 4	(0) 36
8	(-1) 2	(0) 36
9	(+1) 6	(0) 36
10	(0) 4	(0) 36
11	(-1) 2	(+1) 48
12	Atenuação natural	Atenuação natural

Para cada ensaio do planejamento experimental (Quadro 4) e para o controle foram montados 4 experimentos, a fim de avaliar-se as respostas nos tempos de 15 d, 30 d, 60 d e 120 dias, gerando assim um total de 48 corpos de prova montados. O Quadro 5 apresenta o número de ensaios e análises realizadas.

Quadro 5: Delineamento da pesquisa

EQUIPAMENTOS / AMOSTRAS / ENSAIOS	QUANTIDADE
Vazões de ar para testadas	4
Tempo de aplicação de ar diário (H)	1
Tempos de coleta de amostras para análise da degradação	4
Repetições nos pontos centrais para análise do erro	2
Total de corpos de prova	48
Análises de degradação	48
Ensaio microbiológicos	48

A metodologia de pesquisa está demonstrada no fluxograma da Figura 13.

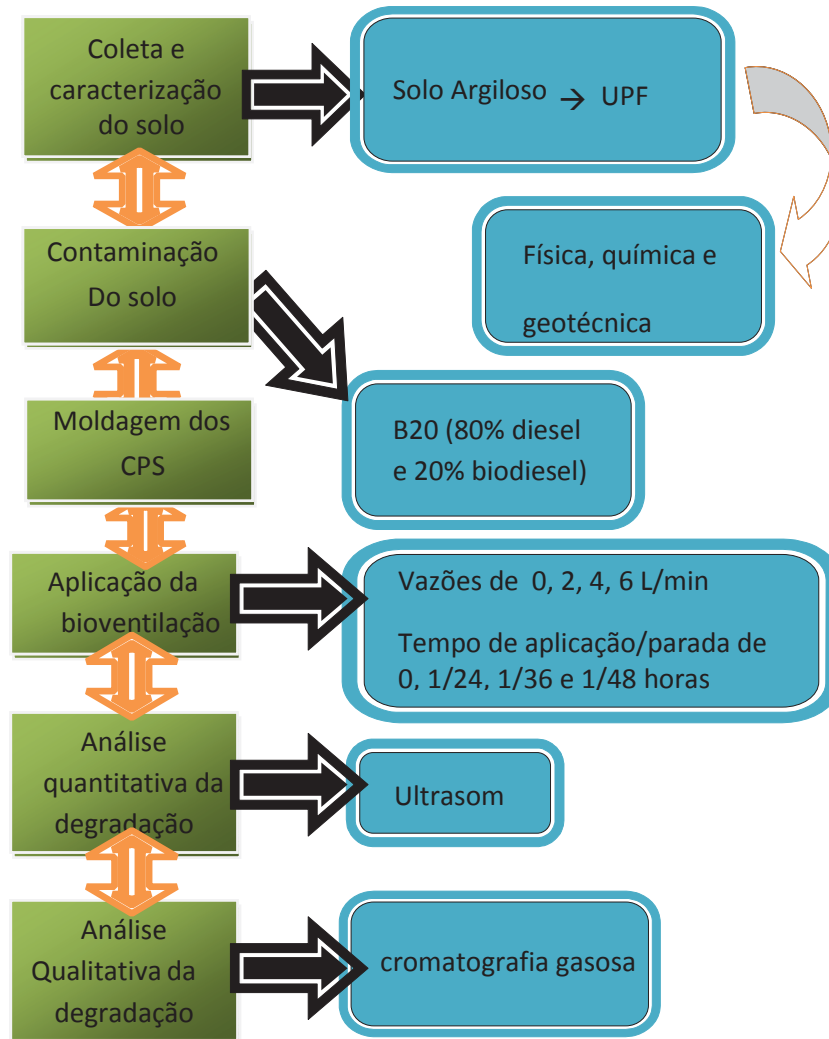


Figura 13: Fluxograma do processo experimental

3.4 Montagem do experimento

3.4.1 Preparação do solo

O solo coletado de forma deformada foi inicialmente espalhado em bandejas para que perdesse parte da umidade, corrigindo a mesma para um valor de 30%. O restante da umidade perdida foi adicionada posteriormente na forma de contaminante (4% em relação a massa de solo seco), ficando o solo novamente com um valor de 34% correspondente ao teor de umidade natural de campo.

O valor da contaminação de 4% provem de um estudo anterior sobre a quantidade de contaminante oleoso retido no solo de estudo (MENEGHETTI, 2005).

Após parcialmente seco o solo foi peneirado com uma peneira número 4 (4,76mm) e analisada a umidade. Sequencialmente o solo foi armazenado em sacos plásticos, para que mantivesse a umidade medida até a montagem dos corpos de prova. A Figura 14 apresenta a armazenagem do solo.



Figura 14: Armazenagem do solo

3.4.2 Contaminação do solo e moldagem dos corpos de prova

Para a moldagem dos corpos de prova considerou-se a densidade do solo de campo de 1600 kg/m^3 . O solo depois de peneirado e seco continha uma umidade de 22,4%, sendo necessário adicionar água até atingir a umidade de 30% e mais os 4% de contaminante, ficando com um total de 34%.

A contaminação do solo foi realizada com o B20, que corresponde a uma mistura de 80% de diesel e 20% de biodiesel. A Figura 15 apresenta o aspecto visual da mistura.

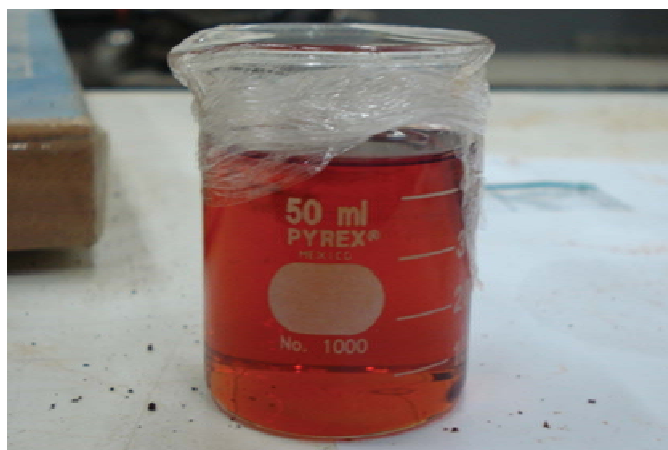


Figura 15: Aspecto visual do contaminante (B20)

Os corpos de prova foram moldados em um cilindro de PVC, com 10 cm de altura e 6,6 cm de diâmetro interno.

Inicialmente foi pesada a massa de solo parcialmente seco (umidade de 22,4%), adicionado o restante de água, homogeneizado, adicionado o contaminante e feita novamente a homogeneização do material. As Figuras 16, 17 e 18 demonstram o processo de pesagem e homogeneização dos materiais.



Figura 16: Pesagem do solo



Figura 17: Adição de água (umidade)



Figura 18: Adição do contaminante

Após feita a homogeneização da umidade e o contaminante, o solo era posto no tubo de PVC e feita a compactação com uma prensa hidráulica. A Figura 19 demonstra a compactação do solo e o corpo de prova (CP) finalizado.



Figura 19: Confeção do corpo de prova

Todos os corpos de prova foram moldados em um mesmo dia, mas para evitar a perda de umidade, entre o tempo de moldagem do 1º até o 48º corpo de prova e posterior montagem

do experimento, os mesmos foram enrolados em filme plástico, como apresentado na Figura 20.



Figura 20: Corpos de prova finalizados

3.4.3 Montagem dos biorreatores e do sistema de bioventilação

Após moldados os CPs, os mesmos eram colocados em tubos de PVC de 100mm, e o espaço interno do tubo preenchido com gesso, para evitar que durante a aplicação do ar, o mesmo abrisse caminho preferencial pela parede do tubo. O gesso sendo composto de sulfato de cálcio semihidratado pode fornecer alguns nutrientes para os microrganismos, porém como em todas as amostras foram envoltas em gesso, esse fator não interfere no processo de biodegradação.

As Figuras 21 e 22 demonstram o envolvimento dos corpos de provas (CPs) pelo gesso e os mesmos finalizados.

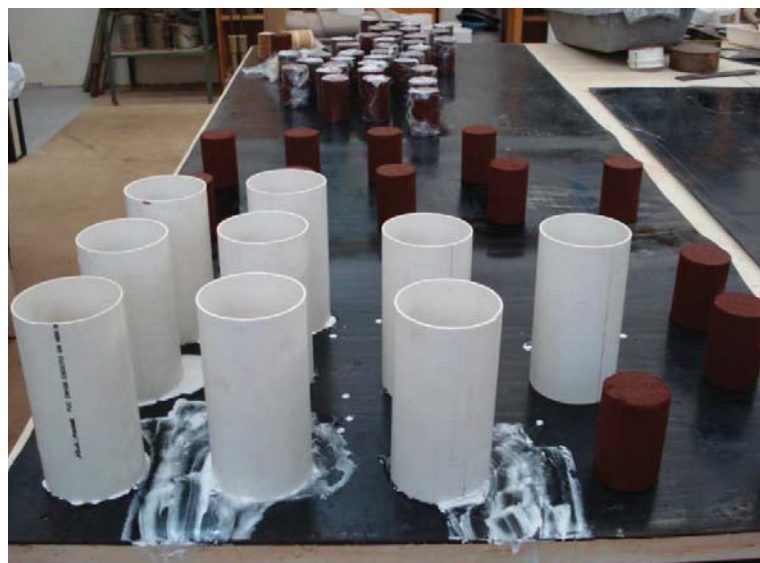


Figura 21: Corpos de prova sendo envolvidos pelo gesso



Figura 22: Corpos de prova após o envolvimento com o gesso

Após seco o gesso, foram colocados os caps perfurados na parte inferior dos tubos, visto que a passagem do ar era de forma ascendente. Para evitar que ocorresse o entupimento da saída de ar foi colocado um filtro de geotêxtil e ainda uma pequena camada de areia, para que o ar chegasse de forma mais homogênea no corpo de prova. Além disso a camada de areia serve como um filtro para impurezas que possam vir junto com o ar do compressor. A Figura 23 apresenta detalhes da colocação do filtro de geotêxtil e da camada de areia aos caps.



Figura 23: Filtro de geotêxtil e camada de areia

Para impedir que o ar saísse pela borda do cap, foi colocado silicone, forçando assim o ar a passar pelo corpo de prova. A Figura 24 demonstra a vedação do cap ao tubo.



Figura 24: Vedação do cap ao tubo

A Figura 25 apresenta todos os corpos de prova montados, para a aplicação da bioventilação. Vale ressaltar que o cap superior do tubo foi colocado apenas para impedir a entrada de sujeira ou algum eventual contaminante externo, não sendo este vedado.



Figura 25: Corpos de prova montados para a aplicação da bioventilação

3.4.4 Aplicação da bioventilação

Para a aplicação da ventilação foi utilizado o mesmo tipo de equipamento desenvolvido por Meneghetti (2007). A Figura 26 apresenta um esquema do equipamento de bioventilação utilizado no experimento, e a Figura 27 representa a passagem do ar pelo corpo de prova.

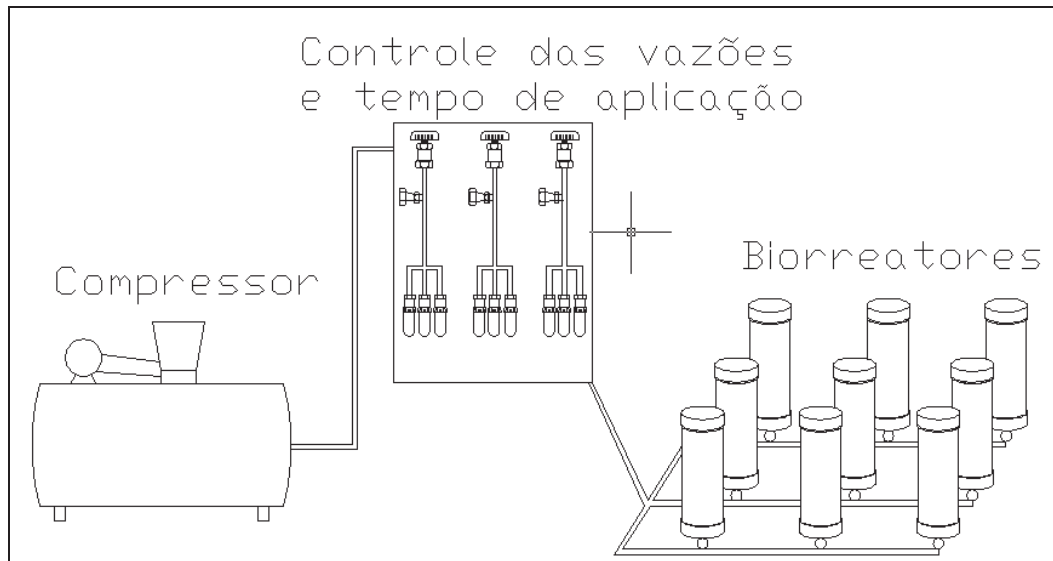


Figura 26: Equipamento de bioventilação utilizado no experimento

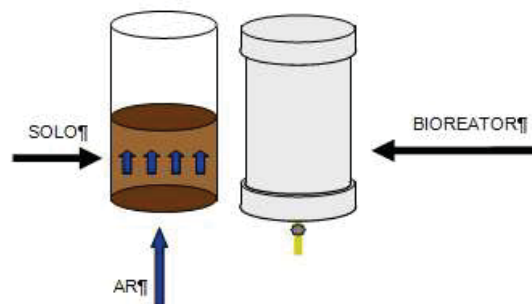


Figura 27: Esquema interno do biorreator

Para controlar a aplicação do ar foram utilizadas válvulas controladoras de pressão, controlando o fluxo da bioventilação, testando três diferentes vazões de ar, que são de 2, 4 e 6 L/min, em diferentes corpos de prova, sendo estas calculadas em função da pressão aplicada, sendo assim foram aplicadas pressões de 0,36 kPa, 0,82 kPa e 1,4 kPa.

A aplicação do ar foi aplicada por fluxo ascendente, durante 1 hora diária (de acordo com o delineamento experimental). O ar mandado pelo compressor passava pelos reguladores de pressão e pelas válvulas de fechamento, de acordo com o intervalo de aplicação e então encaminhados para os biorreatores. A Figura 28 apresenta o sistema de controle das diferentes vazões e tempos de aplicação.

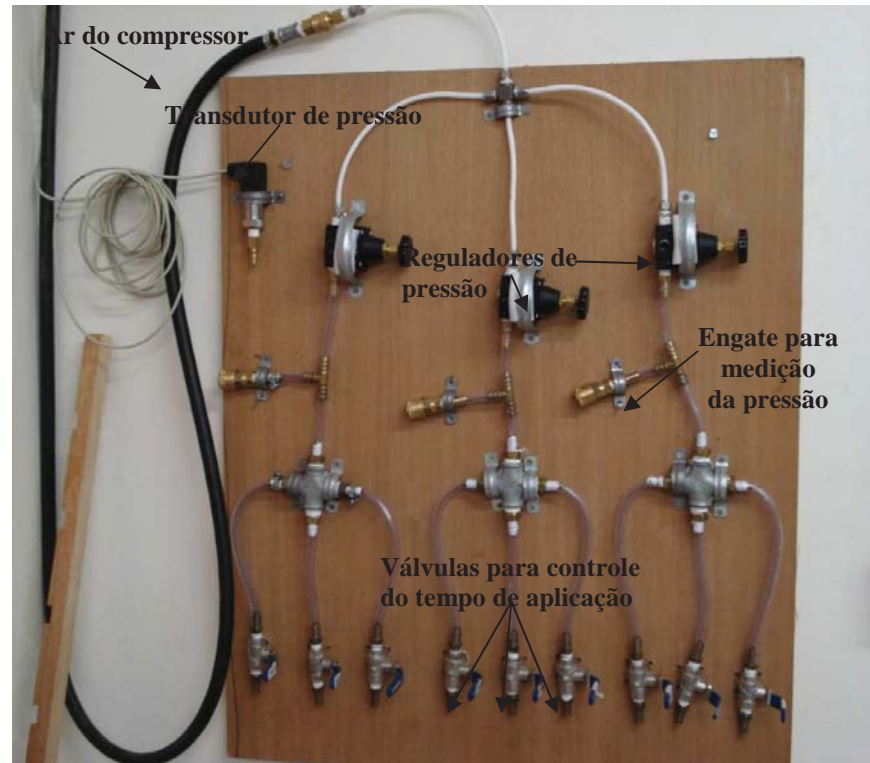


Figura 28: Controle da vazão e tempo de aplicação de ar na bioventilação

3.4.5 Avaliação da biodegradação

Foram realizadas análises da degradação do contaminante em intervalos de 15, 30, 60 e 120 dias após o início do experimento. Para cada vazão de ar aplicada e em cada tempo de aplicação foi retirado o corpo de prova, desestruturado e encaminhado para o laboratório para serem feitas as análises. Deste material foi feita a análise quantitativa da degradação do B20, através da extração por Ultrassom e posterior análise da degradação qualitativa dos contaminantes degradados, através da Cromatografia gasosa, por ionização de chama, além da atividade microbiana pela técnica de contagem em placas e atividade enzimática pelo método do FDA.

3.4.5.1 Análise de óleos e graxas

A análise de óleos e graxas, pelo ultrassom, fez a remoção de substâncias voláteis e semi-voláteis do solo, podendo esta ser quantificada. A análise gravimétrica de óleos e graxas foi realizada seguindo a metodologia de extração por ultrassom da USEPA 3550B (1996). O cálculo do teor residual e da porcentagem de degradação foi feito conforme equação 1.

$$Teor\ residual(\%) = \frac{P_2 - P_1}{P_0} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

Po = Quantidade de amostra de solo em peso seco utilizada na análise (g)

P1 = Peso do béquer (g)

P2 = Peso do béquer mais a mistura B20 extraída do solo contaminado (g)

O resultado foi obtido em base seca, já que foi utilizado o valor da amostra descontado o valor da umidade. Para o resultado na forma de degradação utilizou-se a equação 2.

$$Degradação(\%) = \frac{V_{inicial} - V_{final}}{V_{Inicial}} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

V_{inicial} = Valor inicial da mistura (B20) adicionada ao solo (%).

V_{final} = Valor extraído do solo em cada tempo de análise (%).

3.4.5.2 Cromatografia gasosa

A análise qualitativa da degradação foi realizada através da degradação das cadeias carbônicas, identificadas pela cromatografia gasosa, sendo que as condições gerais empregadas nas análises foram:

Cromatógrafo Gasoso marca Varian; modelo STAR 3400cx

Coluna PE-WAX (polietilenoglicol)

Temperatura da coluna: 35° (5min) sobe 5°C/min até 245°C (20min)

Temperatura do injetor: 250 °C

Temperatura do detector: 300°C

Tipo de injeção:split 1:50

Fase móvel: Hidrogênio UP

Fluxo: 1,0 mL/min

Volume injetado: 0,5uL

A identificação dos carbonos foi feita por padronização externa, a partir de uma mistura padrão comercial contendo uma faixa de carbonos do C15 ao C30. A partir dos

resultados de concentração do composto nos diferentes tempos de amostragem calculou-se a eficiência de remoção de cada composto através da equação 3:

$$Degradação(\%) = \frac{C_{inicial} - C_{final}}{C_{Inicial}} \times 100 \quad (3):$$

Onde:

$C_{inicial}$ = Valor inicial da área do carbono analisado.

C_{final} = Valor final da área do carbono ao final de cada tempo de análise.

3.4.5.3 Atividade enzimática

A atividade microbiana foi avaliada de acordo com a técnica de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) no qual este substrato é clivado principalmente por esterases, lipases e desidrogenases (Schnürer e Rosswall, 1982). Foi utilizada a metodologia proposta por Adam e Duncam (2001) para a realização dos experimentos.

3.4.5.4 Contagem em placas

A contagem total do microrganismos, presentes no solo contaminado, foi feito pelo método de plaqueamento em superfície, seguindo a metodologia proposta por Tortora et al, 2005.

3.5 Análise estatística

Os resultados foram analisados a partir da análise de variância (ANOVA) e pelo teste t de Tukey, com nível de confiança de 95% ($P < 0,05$), para comparar as médias entre os tratamentos, sendo utilizado o software Statistica 5.5.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do solo

O solo utilizado na pesquisa é 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. A caracterização geotécnica e física do solo está apresentado na Tabela 8, e na Figura 29 é apresentada a curva granulométrica característica do material de estudo.

Tabela 8: Caracterização Geotécnica e física do solo de estudo

Parâmetro	Valor
Argila (%)	68
Silte (%)	5
Areia (%)	27
Limite de Liquidez (%)	53,0
Limite de Plasticidade (%)	42,0
Peso específico real dos grãos (kN/m ³)	26,7
Umidade Natural (%)	34
Peso específico natural (kN/m ³)	16,3
Índice de Vazios	1,19
Grau de Saturação (%)	75,7
Porosidade (%)	54
pH	5,4
Matéria Orgânica (%)	< 0,8
Condutividade hidráulica (cm/s)	1,39x10 ⁻³

Fonte: Prietto et al, (2010)

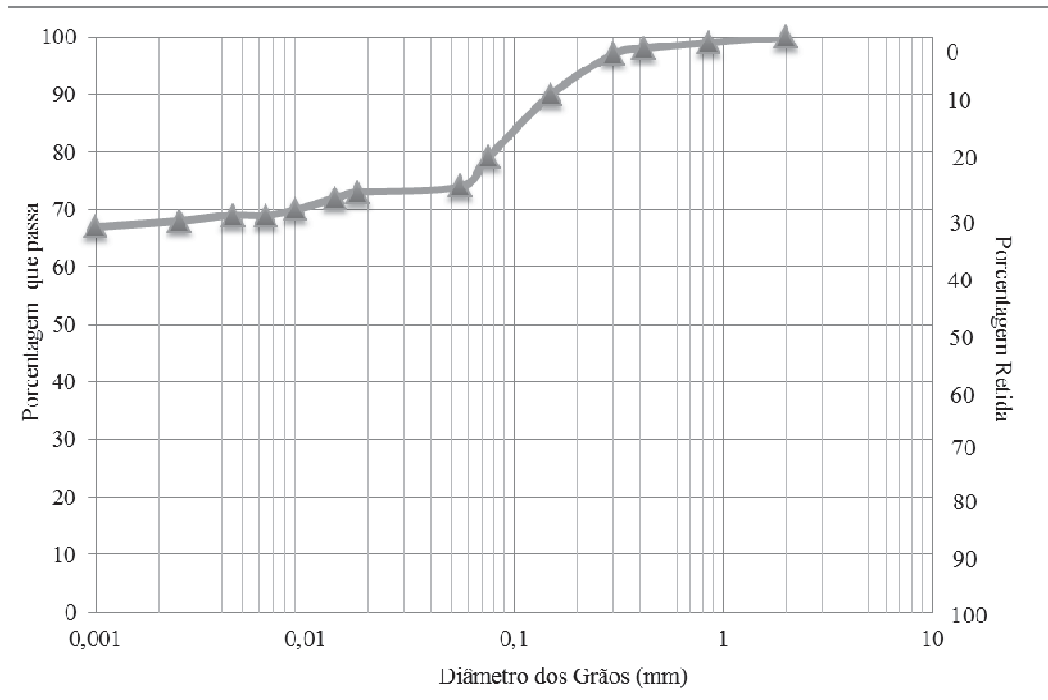


Figura 29: Perfil granulométrico do solo de estudo

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).

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

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

Os solos argilosos possuem baixa permeabilidade, porém em Latossolos, que apresentam uma boa estruturação como o solo de estudo, a quantidade de macroporos é suficiente para que haja uma permeabilidade relativamente rápida de água e ar.

A caracterização química do solo é apresentada na Tabela 9.

Tabela 9: Caracterização química do solo

Análise	Valor	
P (mg/dm ³)	4,8	
K (mg/dm ³)	4	
MO (%)	<0,8	
Al (cmol _c /dm ³)	2,1	
Ca (cmol _c /dm ³)	7,0	
Mg (cmol _c /dm ³)	1,4	
H+Al (cmol _c /dm ³)	8,7	
CTC (cmol _c /dm ³)	8,6	
	Bases	49
Saturação (%)	Al	20
	K	0,1
Enxofre (mg/dm ³)	10	
Boro (mg/dm ³)	0,5	
Manganês (mg/dm ³)	15,6	
Zinco (mg/dm ³)	0,52	
Cobre (mg/dm ³)	0,73	

A acidez do solo é determinada principalmente pela concentração de Hidrogênio + Alumínio, presentes no solo. Os solos com pH ácido disponibilizam mais metais no solo. O aumento da acidez do solo é um processo natural, mas que pode ser acelerado pelas ações humanas. No que concerne aos processos de biorremediação, as bactérias são os microrganismos mais tolerantes a acidez (STRECK, et al.,2008).

Com relação à matéria orgânica (MO) seu percentual decresce com aumento da profundidade em solos residuais (MOREIRA E SIQUEIRA, 2002). Isto, associado ao maior grau de empacotamento das partículas do solo, faz com que a tendência seja a diminuição na porosidade total do solo (AZEVEDO e DALMOLIN, 2004).

Os micronutrientes encontrados no solo (Tabela 9) são considerados característicos para um Latossolo. A quantidade de contaminantes inorgânicos (Zinco e Cobre) está dentro dos padrões de referência determinados pela Lista Holandesa de Valores da qualidade do solo (CETESB, 2006) e Resolução CONAMA (2009). O teor de alumínio foi considerado alto; o de cálcio foi considerado bom para a profundidade; já os teores de magnésio, enxofre, boro,

manganês e cobre foram considerados de médios a baixos. Os micronutrientes são necessários em pequenas concentrações, mas são fundamentais nos processos de biorremediação.

Em geral estes micronutrientes são cofatores enzimáticos necessários aos processos metabólicos. No entanto, a relação de CNPK está diretamente relacionada a este processo. As quantidades de fósforo (P) e potássio (K) encontradas no solo utilizado foram consideradas baixas. De acordo com Rizzo et al, (2008), a relação CNPK ideal para a biorremediação é 100:10:1:1, desta forma, para a obtenção de melhores resultados na biorremediação faz-se necessário a bioestimulação com concentrações maiores de nitrogênio, fósforo e potássio.

A Capacidade de Troca Catiônica (CTC) mede a capacidade que o solo tem de trocar (adsorver e desorver) cátions. Funciona como um reservatório de nutrientes, evitando a lixiviação dos elementos químicos.

4.2 Variação da umidade

O experimento continha uma umidade inicial de 34% (com o contaminante) em todos os biorreatores, sendo o monitoramento desta variável importante para observação de sua influencia na degradação dos contaminantes. A Tabela 10 e a Figura 30 apresentam os dados do monitoramento da umidade durante o experimento.

Tabela 10: Monitoramento da umidade durante o experimento

Amostra	Tempo de análise (d)			
	15	30	60	120
V1 - 1/24	30,40	27,71	24,69	25,18
V1 - 1/36	31,92	26,99	29,19	25,10
V1 - 1/48	31,38	27,49	28,87	25,52
V2 - 1/24	31,10	27,65	26,32	-
V2 - 1/36	30,06	28,72	24,68	25,46
V2 - 1/48	31,41	29,07	28,66	24,70
V3 - 1/24	27,25	25,93	25,11	23,74
V3 - 1/36	30,97	28,24	25,20	25,08
V3 - 1/48	30,91	28,55	24,98	25,10
At. Natural	31,88	29,93	26,01	25,38

Obs: V1 = 2L/min; V2 = 4L/min e V3 = 6L/min

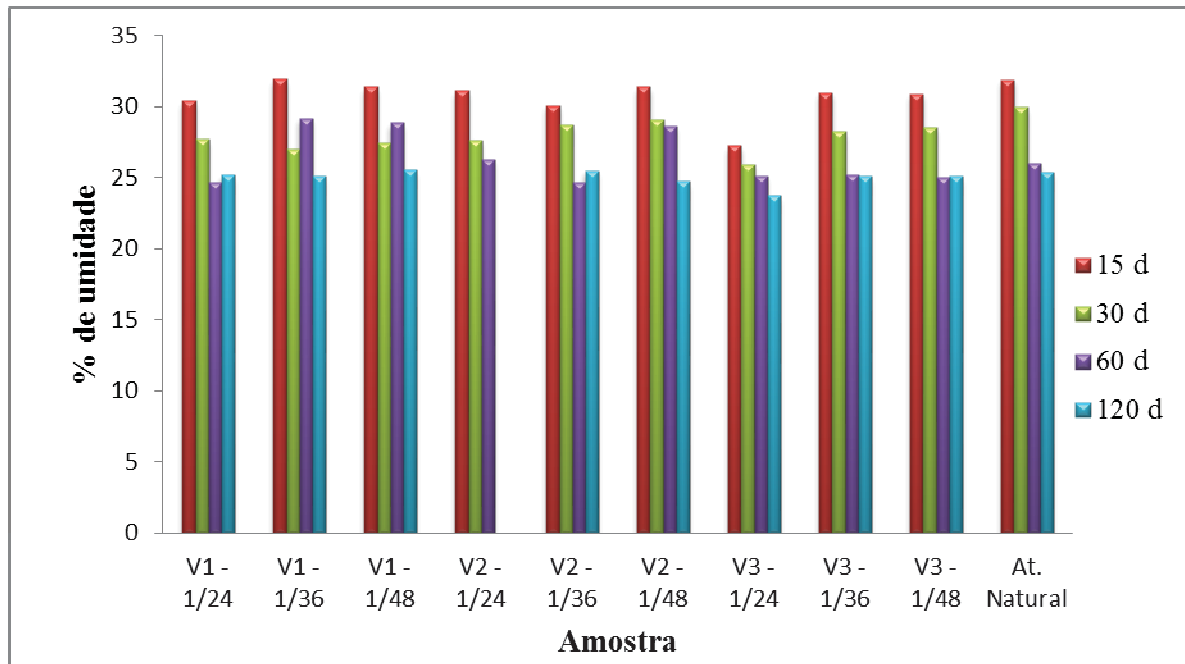


Figura 30: Monitoramento da umidade de forma gráfica

A umidade não teve grande variação durante o experimento, ficando entre 23% e 25% (Grau de saturação entre 51% e 56% respectivamente), após 120 dias de ensaio

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. Além disso a solubilização do oxigênio é um dos pontos críticos, no caso dos solos mais úmidos, pois a solubilidade dos gases em água geralmente é baixa e depende do tipo de gás, da temperatura, da concentração de sais e da pressão local (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Ainda segundo Borresen e Rike (2007) a umidade é essencial para o crescimento e multiplicação dos microrganismos e afeta a degradação de contaminantes orgânicos, influenciando na difusão de ar e mobilidade do contaminante e microrganismos. Segundo o mesmo autor a atividade microbiana em espaços porosos mostram um grau de saturação ótimo de 60%. A medida que esse teor de água aumenta acima disso a difusão de oxigênio é muito baixa criando condições anaeróbicas no meio (LINN e DORAN, 1984)

Assim todas as amostras ficaram com teores de umidade aceitáveis para a atividade dos microrganismos no solo

4.3 Avaliação quantitativa da degradação do contaminante (ultrassom)

O percentual residual do contaminante expressa a quantidade da mistura que ainda está presente no solo em cada tempo de análise após o processo de biorremediação. A partir deste valor calculou-se a eficiência da técnica de bioventilação comparada com a Atenuação natural. A Tabela 11 apresenta o teor residual do contaminante em cada tempo de análise.

Tabela 11: Valor residual do contaminante (%) durante o processo de biorremediação

Amostra	Tempo de análise (d)			
	15	30	60	120
V1 - 1/24	1,84	1,58	0,82	0,55
V1 - 1/36	1,88	1,36	0,72	0,79
V1 - 1/48	1,76	1,63	0,90	0,75
V2 - 1/24	1,67	1,37	0,79	0,79
V2 - 1/36	2,04	1,42	0,82	0,61
V2 - 1/48	1,58	1,18	0,88	0,49
V3 - 1/24	1,99	0,93	0,54	0,75
V3 - 1/36	1,96	0,91	0,59	0,77
V3 - 1/48	1,67	1,15	0,62	0,68
At. Natural	2,20	1,72	1,45	1,14

Com os valores do teor residual calculou-se a porcentagem de degradação de cada uma das amostras nos 4 tempos analisados, apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Percentual de degradação da mistura B20

Amostra	Tempo de análise (d)			
	15	30	60	120
V1 - 1/24	53,99 A	60,56 AB	79,62 A	86,3 A
V1 - 1/36	53,08 A	66,02 AB	82,02 A	80,14 A
V1 - 1/48	55,98 A	59,15 AB	77,4 A	81,2 A
V2 - 1/24	58,15 A	65,84 AB	80,14 A	80,37 A
V2 - 1/36	50,36 A	66,6 AB	79,51 A	84,87 A
V2 - 1/48	60,51 A	70,6 AB	78,08 A	87,72 A
V3 - 1/24	50,36 A	76,76 A	86,47 A	81,15 A
V3 - 1/36	50,91 A	77,29 A	85,27 A	80,81 A
V3 - 1/48	58,15 A	71,23 AB	84,59 A	82,98 A
At. Natural	44,93 A	57,04 B	63,86 B	71,54 B

Obs: Letras iguais representam valores de degradação estatisticamente iguais entre as colunas.

Observou-se através da Tabela 12 que houve uma grande variação nos percentuais de degradação ao longo dos tempos de análise, ou seja, a biorremediação tornou-se mais eficiente à medida que o tempo passava, quase se estabilizando aos 60 dias. Em alguns ensaios este comportamento não foi observado, como nas amostras (V1 – 1/36); (V3 – 1/24), (V3 – 1/36) e (V3 – 1/48), nos quais os percentuais de degradação após 60 d do início do ensaio foram maiores que no tempo final de 120 d. Isso se deve ao fato de que os corpos de prova de cada tempo de análise eram independentes, logo pode ter ocorrido uma má distribuição do ar pelo corpo de prova na última análise, se comparada a de 60 d.

A Figura 31 apresenta os valores de degradação de todas as amostras, e as Figuras 32, 33 e 34 apresentam os percentuais de degradação para cada uma das três vazões em cada tempo de coleta comparando com a atenuação natural.

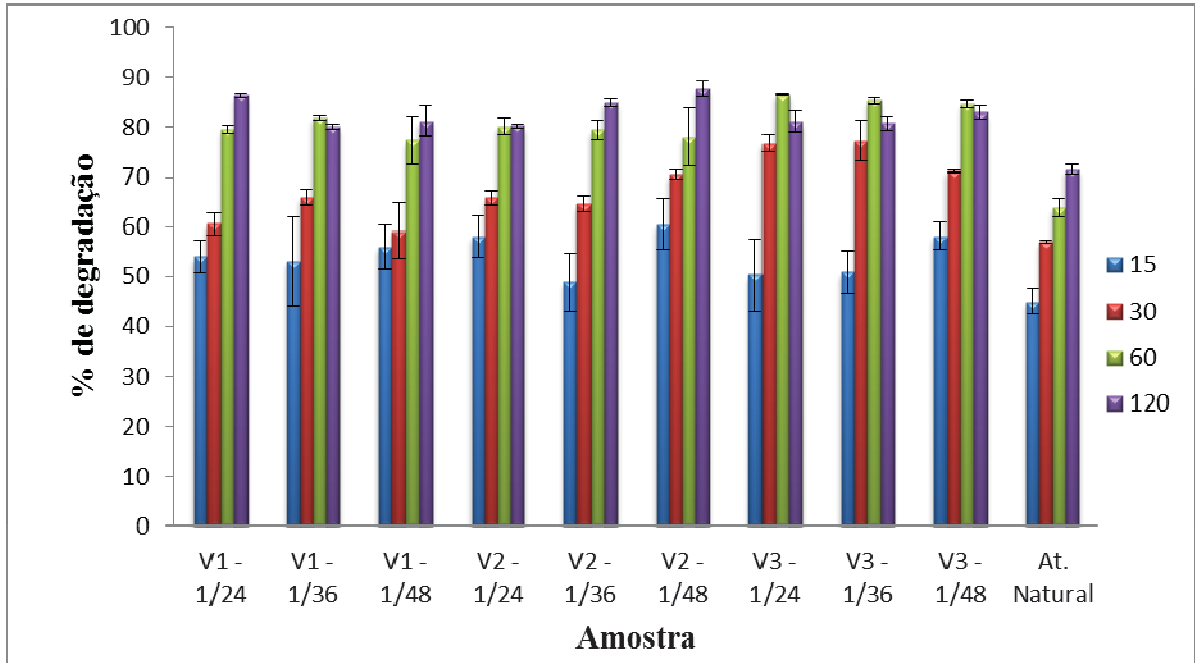


Figura 31: Porcentagem de degradação das amostras em todos os tempos analisados

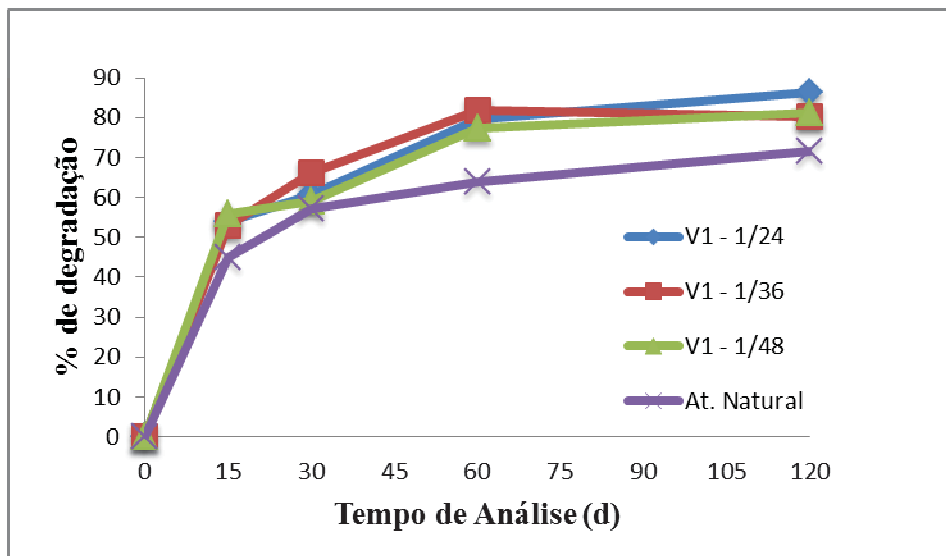


Figura 32: Porcentagem de degradação das amostra com V1 e atenuação natural

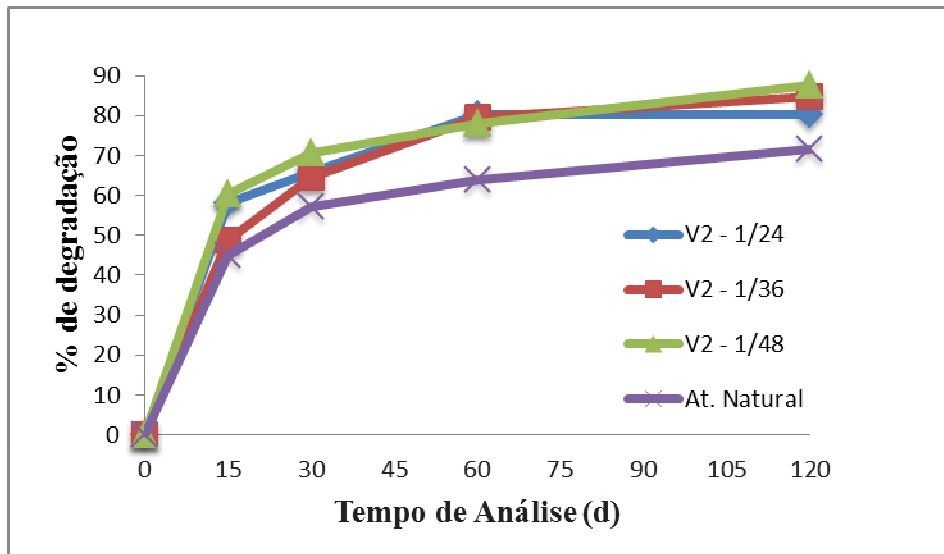


Figura 33: Porcentagem de degradação das amostras V2 e atenuação natural

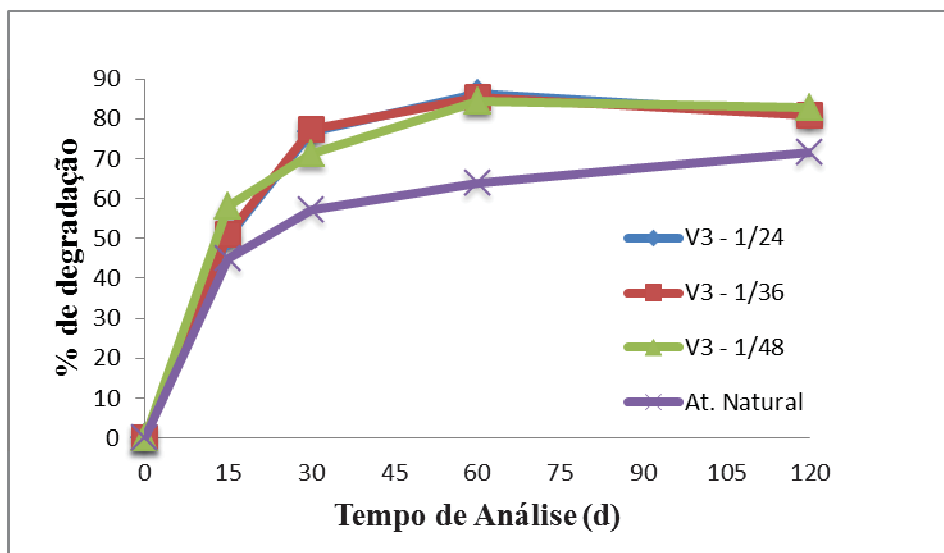


Figura 34: Porcentagem de degradação das amostras V3 e atenuação natural

As Figuras 31 a 34 demonstram que os ensaios com bioventilação apresentaram percentuais de degradação maiores que a atenuação natural, ficando isso mais evidente nos tempos de 60 e 120 dias.

A análise estatística dos percentuais de degradação mostrada na Tabela 12, demonstrou haver diferenças significativas para a interação entre o intervalo de tempo entre as aplicações e a vazão de ar com $p < 0,5$. (considerando a vazão e intervalo de tempo de 0 a atenuação natural)

Pelo teste de Tukey podemos ver em quais combinações de tempo e vazão, estão essas diferenças em função do tempo de análise. Na Tabela 12 se observa que após 15 dias de

ensaio não se observou diferenças significativas entre as amostras. No tempo de 30 dias se observou apenas diferenças significativas entre as amostras V3-1/24 e V3-1/36 e a atenuação natural, todas as demais amostras não apresentam diferenças significativas entre si.

Já nos tempos de 60 e 120 dias se observa diferença significativa apenas para a vazão e intervalo de tempo entre as aplicações 0 (atenuação natural), comparado com as demais amostras. Entre os diferentes intervalos de tempo entre as aplicações de ar e as outras 3 vazões não se apresentaram diferenças significativas para nenhum dos tempos analisados.

Pelo dados da Tabela 12 não se consegue ver qual das duas variáveis de controle (vazão e tempo) é que mais influência na degradação, dessa forma a Tabela 13 apresenta o nível de significância de cada uma das duas variáveis separadas e a interação entre as duas, para cada tempo de análise. A análise de significância da tabela 13 levou em consideração apenas os valores de degradação de cada ensaio, sem considerar a atenuação natural (controle), conforme planejamento experimental apresentado no quadro 4.

Tabela 13: Nível de significância para cada fator estudado

Variáveis controláveis	Nível de significância (p)			
	15 d	30 d	60 d	120 d
Média	0,000	0,000	0,000	0,000
Vazão de ar	0,895	0,512	0,0016	0,459
Intervalo de tempo	0,724	0,218	0,0025	0,424
Interação vazão e intervalo de tempo	0,505	0,971	0,0056	0,263

Aos 15 e aos 30 dias de ensaio nos valores de degradação não se observou diferenças significativas em nem uma das duas variáveis (vazão e intervalo de tempo) e nem na interação entre as duas. No tempo de 60 dias observou-se diferenças significativas em todas as variáveis. Já no tempo final de 120 dias não se observou diferenças significativas para nem um dos dois fatores e nem para a interação entre os dois.

Aos 60 dias já se obtinha bons resultados de degradação e poderia se parar o processo de biorremediação. Como nesse tempo se observou os melhores níveis de significância de cada fator, foi construída a superfície de resposta para demonstrar quais o nível de intervalo de tempo e vazão de ar que tem maior influencia na degradação do contaminante.

A Figura 35 apresenta a superfície de resposta entre o intervalo de tempo entre as aplicações e vazão de ar, para o tempo de 60 dias. Se observa na superfície que os melhores valores de degradação estão no intervalo de tempo entre as aplicações de 1h para cada 48h e melhor vazão entre 4 e 6 L/min. Assim considerando um menor custo na aplicação de ar o melhor valor é a vazão de 4 L/min sendo aplicado 1h a cada 48h.

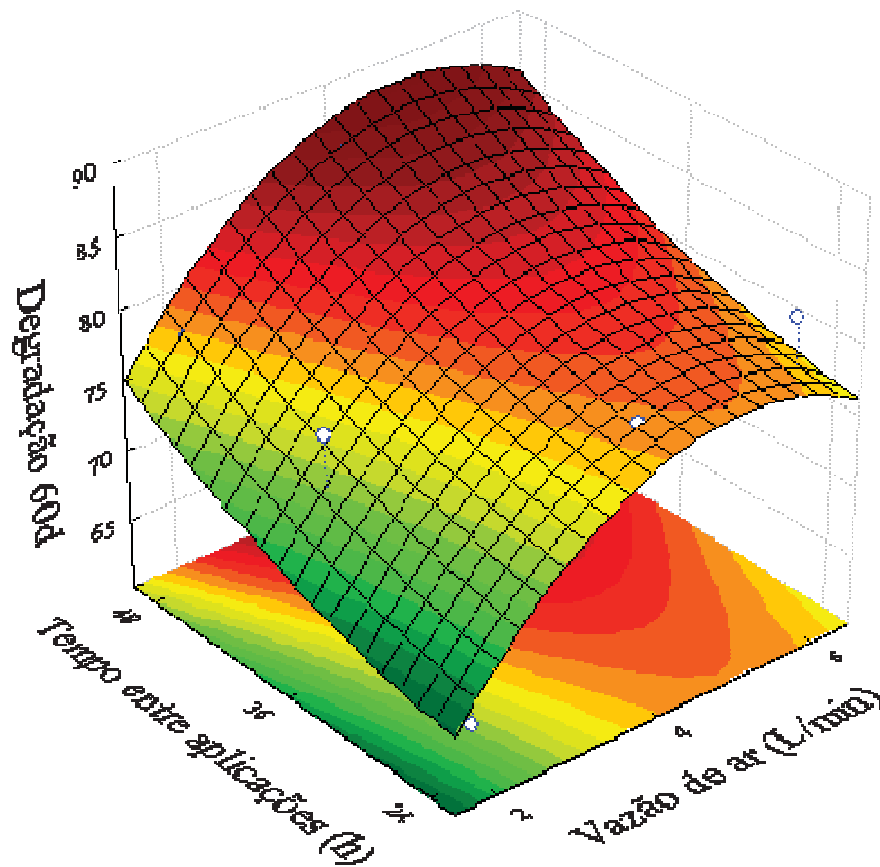


Figura 35: Superfície de resposta da degradação aos 60 dias de ensaio

O coeficiente de regressão quadrático (R^2) também pode ser utilizada para verificar a qualidade do modelo (TENG e XU, 2008;. KAUSHIK et al, 2006). Assim o valor de R^2 do modelo de 74,1 indica uma boa concordância entre os valores experimentais e os previstos, ou seja apenas 26% do total da variação dos dados não pode ser explicado pelo modelo.

Segundo Byun et al. (2005) vazões baixas de ar são suficientes para bioestimular os microrganismos do solo, resultando em uma eficiente degradação. Hwang et al. (2006) também estudaram diferentes tempos entre as aplicações de ar e os resultados mostraram que para vazões próximas não se teve diferenças significativas entre os resultados, mas que a técnica de bioventilação apresentou bom resultados de degradação.

Os bons resultados de degradação tem grande influência pela presença do biodiesel nas amostras. Inicialmente os microrganismos utilizaram fontes de carbono mais lábeis como a fração biodiesel e hidrocarbonetos alifáticos, assim provavelmente conseguiram estabelecer uma estrutura populacional significativa após um período de adaptação e também puderam exibir um suporte enzimático, a fim de biodisponibilizar uma quantidade significativa de carbono de fácil obtenção para produção de energia pela célula - o que possivelmente

contribuiu para a degradação das frações mais recalcitrantes da mistura, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Vários autores reforçam que a biodegradação das frações pesadas de derivados do petróleo pode ser tanto estimulada quanto aumentada, devido ao fenômeno do cometabolismo microbiano (Zhang et al., 1998; Pasqualino et al., 2006). Esse fenômeno vem sendo bastante discutido e estudado, principalmente para misturas de diesel/biodiesel (Pasqualino et al., 2006; Owsianiak et al., 2009).

4.4 Atividade enzimática (FDA)

Para avaliar a atividade microbiana, foi utilizada a técnica de hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA), pois é considerado um método simples e rápido para estudos comparativos. A Tabela 14 apresenta os resultados de hidrólise do diacetato de fluoresceína, juntamente com a análise de variância.

Tabela 14: Hidrólise do diacetato de fluoresceína (mg de fluoresceína/Kg de solo.h)

Amostra	Tempo de análise (d)			
	15	30	60	120
V1 - 1/24	0,133 A	0,182 BCD	0,782 B	1,033 B
V1 - 1/36	0,115 A	0,151 CD	0,683 C	1,530 A
V1 - 1/48	0,112 A	0,182 BCD	0,749 BC	0,657 BCD
V2 - 1/24	0,125 A	0,130 D	0,562 D	0,273 D
V2 - 1/36	0,139 A	0,217 B	0,690 C	0,703 BC
V2 - 1/48	0,083 A	0,168 CD	0,369 F	0,875 BC
V3 - 1/24	0,119 A	0,161 CD	0,485 DE	0,732 BCD
V3 - 1/36	0,110 A	0,162 CD	0,402 EF	0,509 CD
V3 - 1/48	0,108 A	0,195 BC	0,405 EF	0,710 BCD
At. natural	0,153 A	0,464 A	0,937 A	1,670 A

* Valores com mesmas letras não apresentam diferenças significativas entre si em uma mesma coluna

A Figura 36 apresenta os dados da atividade enzimática pela hidrólise do diacetato de fluoresceína nos diferentes tempos de análise, para todas as amostras.

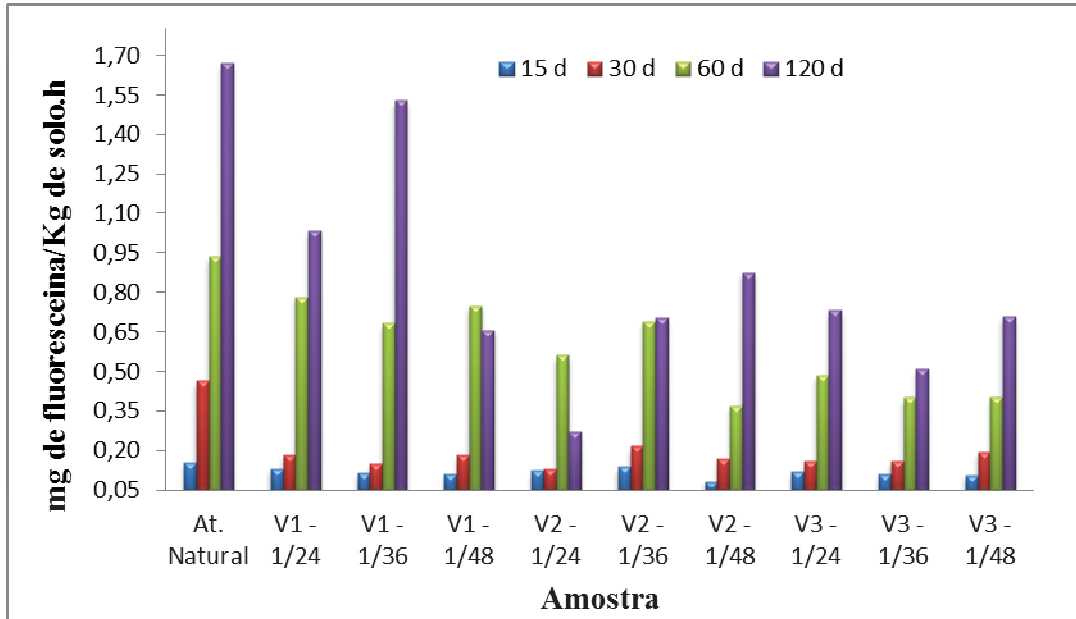


Figura 36: Valores de hidrólise do diacetato de fluoresceína em todas as amostras

Os dados apresentaram grandes diferenças entre a atividade microbiana nos tempos de análise. Com exceção das amostras V1-1/48 e V2-1/24, todas as demais apresentam maior atividade aos 120 dias. Como se trata de amostras de solo sem histórico de contaminação, os microrganismos autóctones avaliados foram submetidos a um intenso processo de adaptação e, provavelmente, uma intensa reorganização da estrutura e composição da população microbiana, em virtude do contaminante. Isto também ocorre nos experimentos realizados por Meyer (2011) para um solo argiloso, em que em algumas amostras no tempo final de análise demonstrou a maior atividade. As Figuras 37, 38 e 39 apresentam a atividade enzimática no solo em função da vazão comparadas com a atenuação natural, para melhor visualização dos dados.

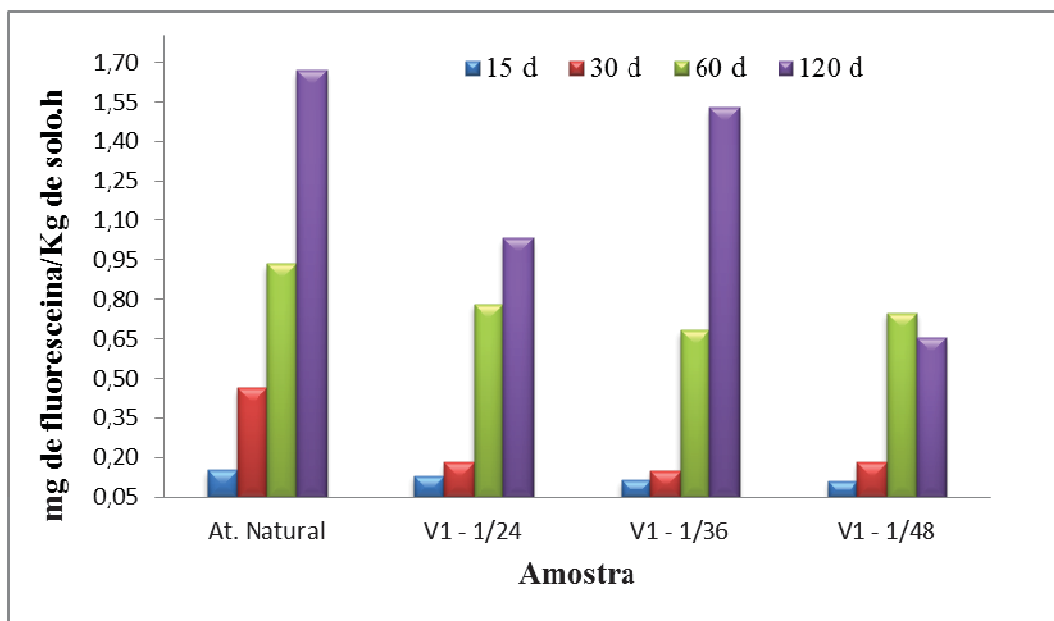


Figura 37: Valores de FDA das amostras V1 e Atenuação natural

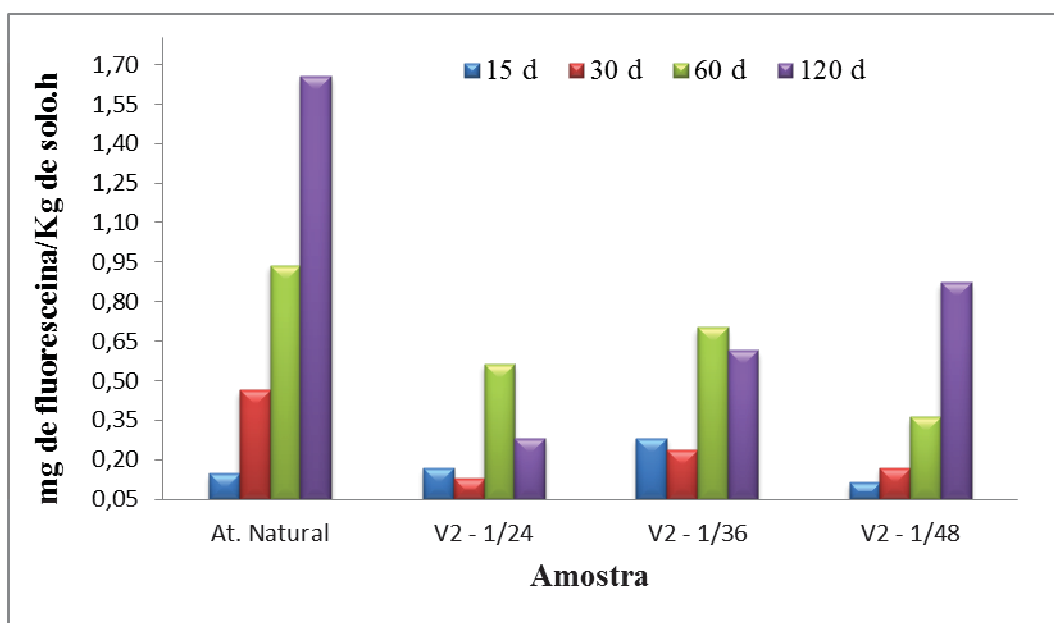


Figura 38: Valores de FDA das amostras V2 e Atenuação natural

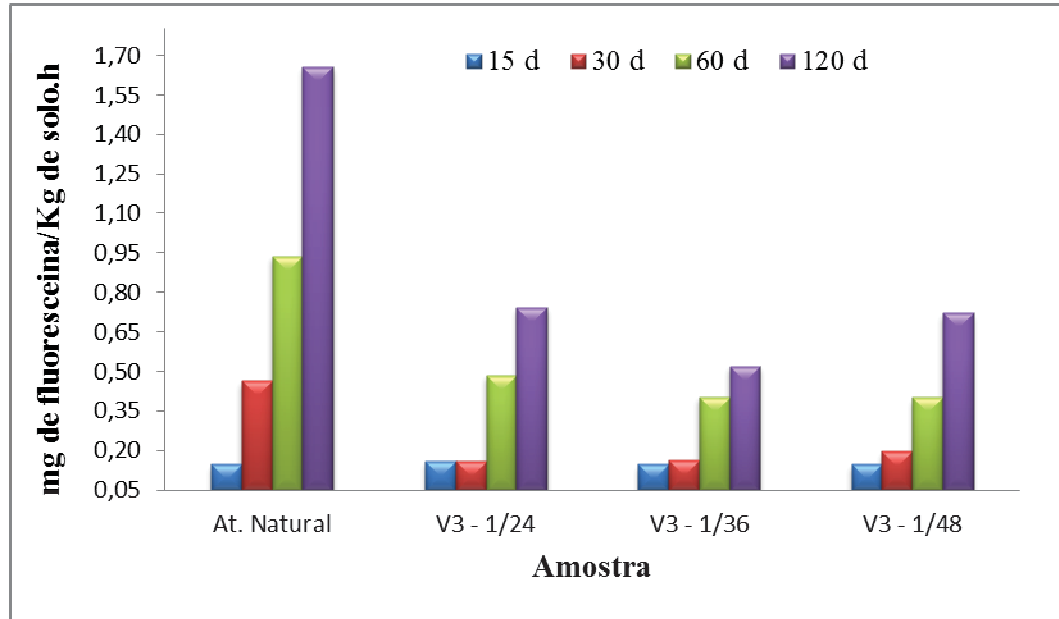


Figura 39: Valores de FDA das amostras V3 e Atenuação natural

O menor valor de FDA ocorre no tempo de 120 dias para a amostra V2-1/24. Os dados de FDA apresentam diferenças significativas entre as vazões de ar aplicadas e os diferentes intervalos de tempo entre as aplicações ($P < 0,05$). O teste de Tukey demonstra em quais amostras se apresentam essas diferenças.

No tempo de 15 dias não se apresentaram diferenças significativas entre as amostras. Para os tempos de 30 dias e 60 dias houve diferença significativa entre a atenuação natural e as demais amostras. E para o tempo de 120 dias ocorreram diferenças significativas entre a atenuação natural e a V1-1/36 comparadas com as demais amostras.

4.5 Contagem microbiana no solo

A quantificação microbiana foi realizada para os heterotróficos totais presentes no solo em todos os tempos de análise e está apresentada na Tabela 15.

Tabela 15: Contagem em placas (Log UFC/g de solo)

Amostra	Tempo de análise (d)			
	15	30	60	120
V1 - 1/24	5,539 A	5,481 AB	5,422 A	5,561 AB
V1 - 1/36	5,483 A	5,037 B	5,161 A	5,561 AB
V1 - 1/48	5,388 A	5,547 A	5,367 A	5,503 AB
V2 - 1/24	5,514 A	5,382 AB	5,179 A	5,361 BC
V2 - 1/36	5,43 A	5,448 AB	5,317 A	5,364 BC
V2 - 1/48	5,549 A	5,533 A	5,461 A	5,439 AB
V3 - 1/24	5,31 A	5,764 A	5,298 A	5,217 C
V3 - 1/36	5,051 A	5,622 A	5,4009 A	5,375 ABC
V3 - 1/48	5,045 A	5,549 A	5,372 A	5,513 AB
At. natural	5,58 A	5,674 A	5,317 A	5,587 A

Os resultados em Unidades Formadoras de Colônias mostram um valor inicial no solo de $1,51 \times 10^3$ UFC/g de solo (valor logarítmico de 3,1799). Esse valor está muito próximo do valor citado por Meneghetti (2007) com valor de $1,93 \times 10^3$ UFC/g de solo, para o mesmo solo de estudo. A Figura 40 apresenta os valores totais de contagem para todas as amostras .

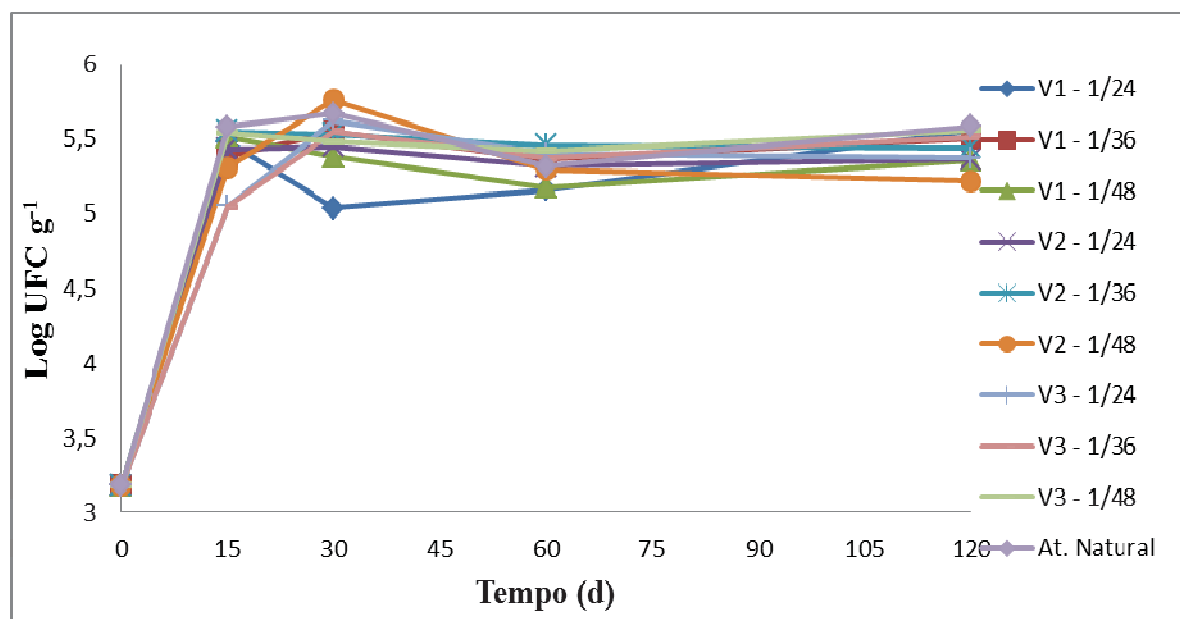


Figura 40: Contagem de microrganismos

Não se observa na curva de crescimento a fase de de adaptação dos microrganismos indígenas ao contaminante (fase lag).. Como a primeira análise foi realizada aos 15 dias de

ensaio, esta fase foi rápida e em um tempo menor que o primeiro analisado. A curva de crescimento mostra ainda a fase de crescimento exponencial (fase log) até os 15 d e posterior a fase de estabilização ou estacionária, em que a fonte de nutrientes ou energia (contaminante) está ficando mais escassa, porem ainda consegue manter uma grande população microbiana. (MADIGAN et al., 2003).

Assim os microrganismos presentes no solo contaminado apresentaram um pequeno período de adaptação ao contaminante, um rápido crescimento, sendo que ainda não estabilizaram a sua atividade. As Figuras 41, 42 e 43 apresentam respectivamente as amostras V1, V2 e V3 comparando com a atenuação natural.

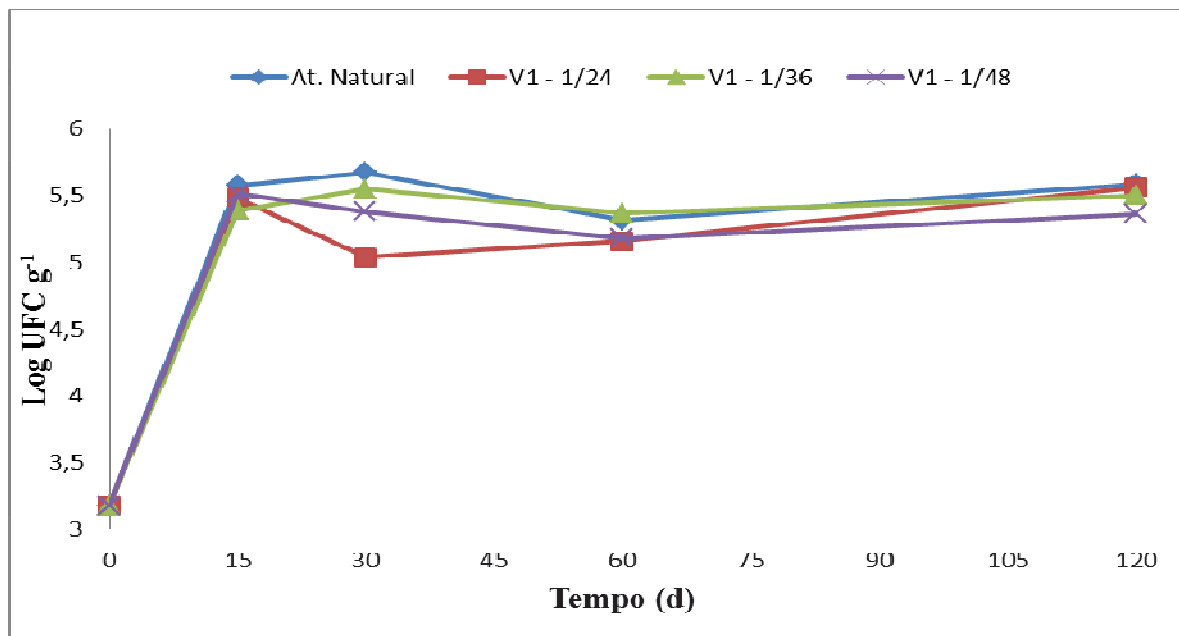


Figura 41: Contagem de microrganismos comparando a V1 com atenuação natural

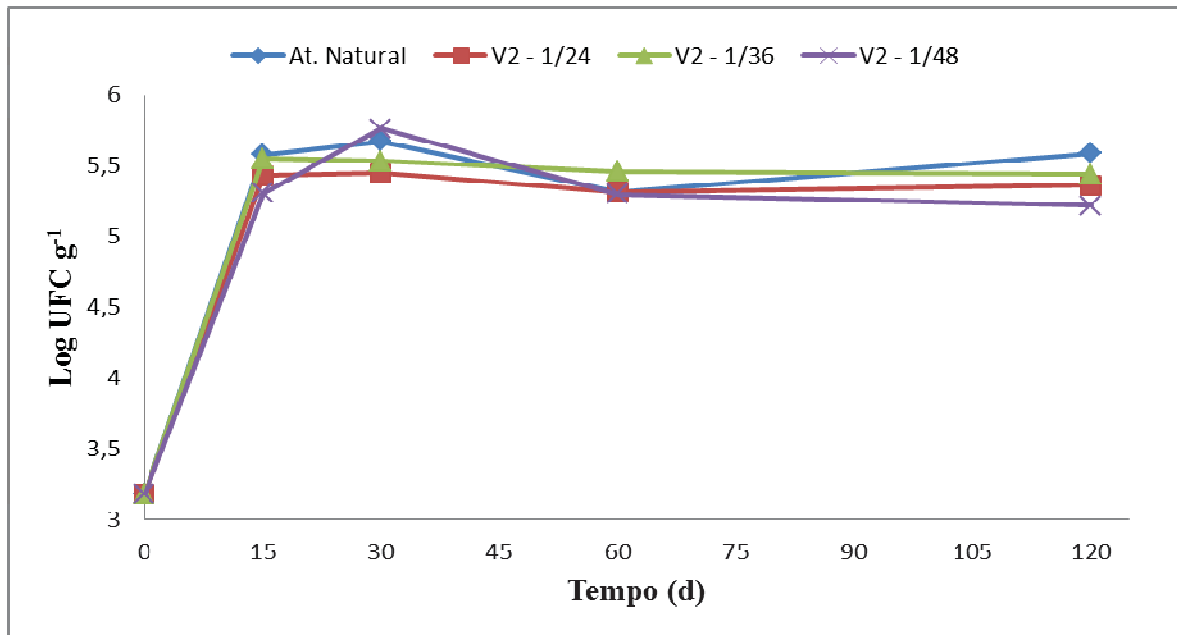


Figura 42: Contagem de microrganismos comparando a V2 com atenuação natural

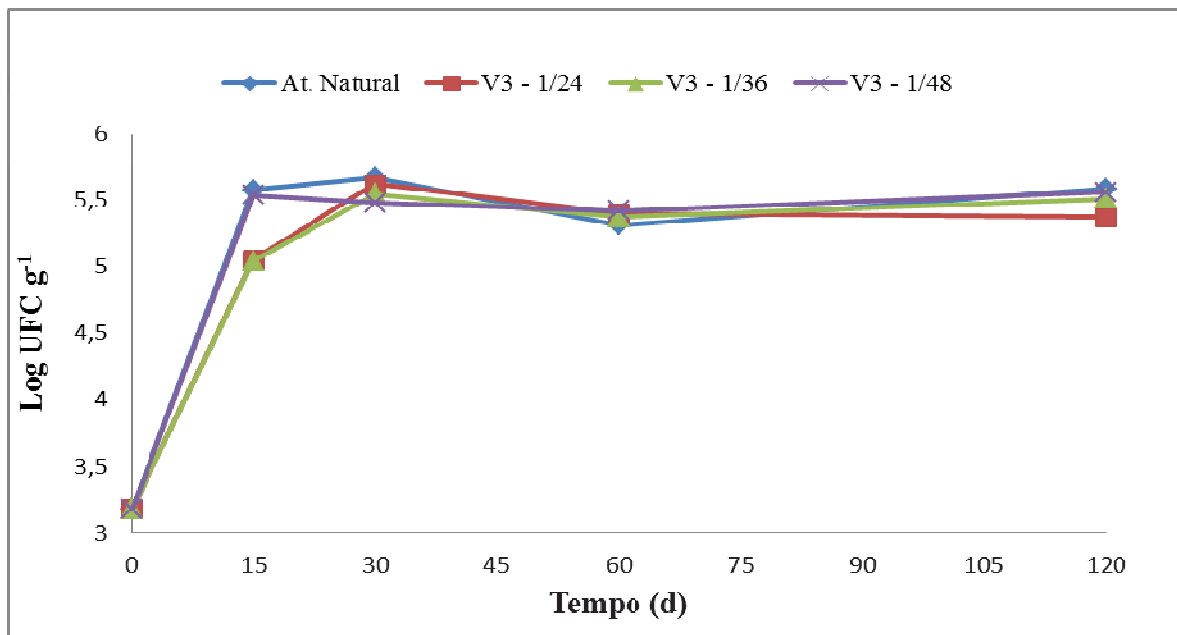


Figura 43: Contagem de microrganismos comparando a V3 com atenuação natural

A técnica de bioventilação diferencia-se da atenuação natural pela adição de ar comprimido como estimulante na degradação dos contaminantes. Em todas as amostras estudadas se observa um grande crescimento dos microrganismos até os 30 dias de ensaio e depois disso uma parcial estabilização na quantidade de microrganismos presentes isso independente da amostra analisada, não se observando um decréscimo da população. No

entanto ao comparar os dados das duas técnicas (bioventilação e atenuação natural) observa-se que praticamente em todos os tempos analisados a população de microrganismos na atenuação natural foi ligeiramente maior que na técnica de bioventilação, mesmo não apresentando diferenças estatísticas entre as amostras.

Os óleos e graxas do contaminante fornecem grandes quantidades de energia para os microrganismos em relação a outras fontes de carbono. O biodiesel é degradado provavelmente nos tempos iniciais e o diesel é mais degradado nos tempos finais, o que pode explicar um grande crescimento inicial e uma estabilização após os 30 dias e não decaimento da população até o tempo final de análise. Isso porque ainda existe fonte de carbono disponível, mesmo está sendo baixa.

De acordo com Moreira e Siqueira (2002), a uma profundidade de 135-145 cm as bactérias aeróbias são encontradas em maior quantidade em relação as bactéria anaeróbias, assim a bioestimulação com ar é eficiente mesmo com a maior quantidade de microrganismos ter sido encontrada na amostra de atenuação natural.

4.6 Análise qualitativa de degradação (cromatografia gasosa)

A análise cromatográfica demonstra quais carbonos foram mais degradados durante a biorremediação da mistura B20. Através do perfil cromatográfico já se observa diferenças entre os picos de retenção em alguns carbonos, o que representa a degradação. A Figura 44 apresenta o perfil do padrão dos carbonos utilizado para a análise. Na Figura 45 é apresentado o perfil da mistura B20 inicial e na Figura 46 é apresentado o perfil cromatográfico para a amostra V3-1/48 após 120 dias de ensaio..

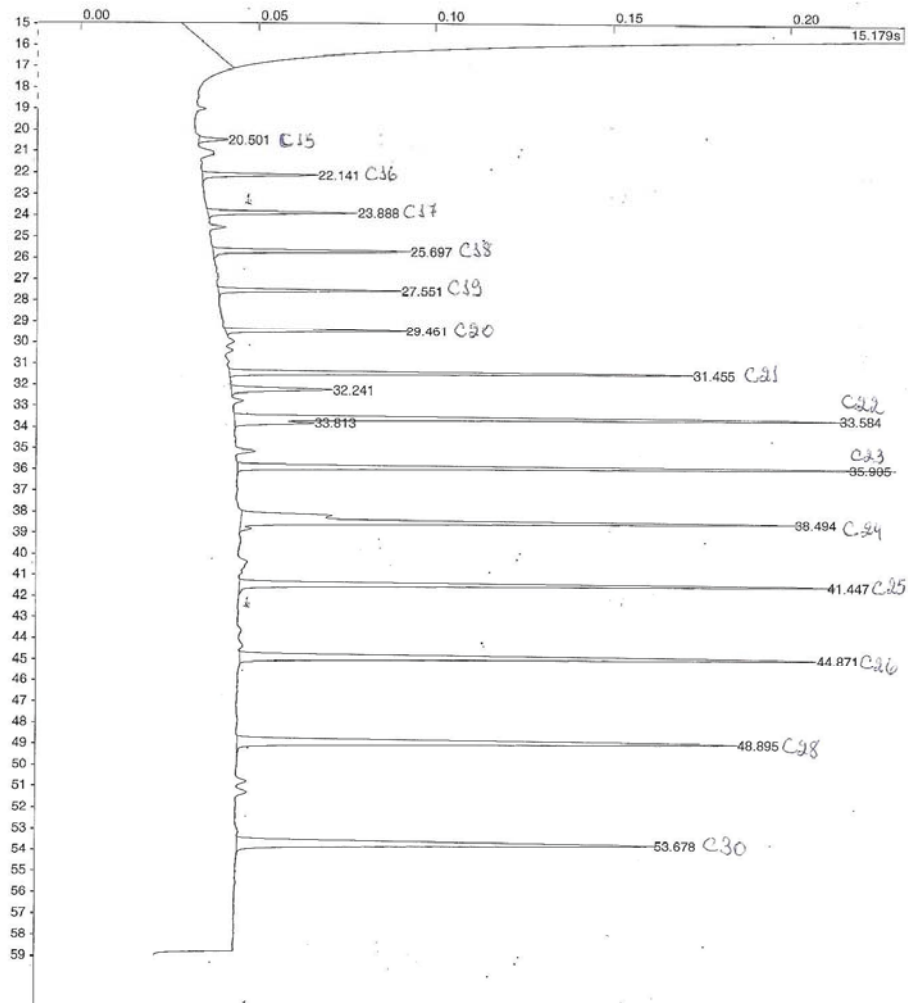


Figura 44: Perfil cromatográfico padrão (C15 a C30)

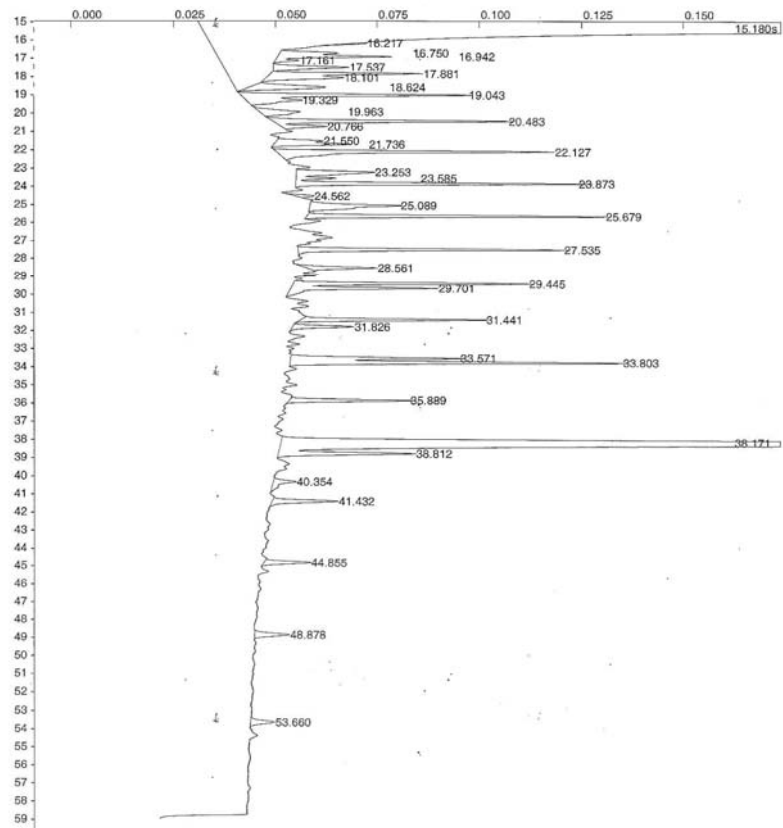


Figura 45: Perfil cromatográfico inicial da mistura B20

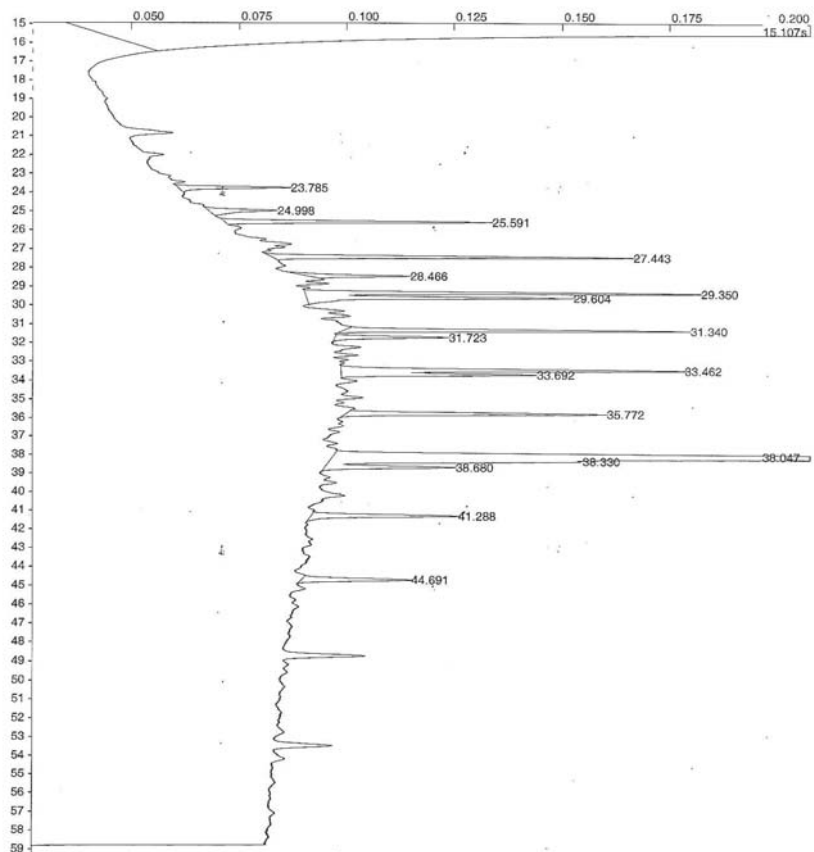


Figura 46: Perfil cromatográfico da amostra V3-1/48 aos 120 dias

Apenas visualmente já se observa que para o exemplo da amostra V3-/48 ocorreram mudanças quando se compara a amostra inicial do contaminante e após 120 dias de ensaio. Na amostra inicial aparecem muito mais picos que após 120 dias, porém o que realmente degradou em cada carbono se avalia comparando a porcentagem de cada um dos carbonos analisados inicialmente e nas amostras finais. Esses valores de degradação estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16: Porcentagem de degradação dos carbonos C15 ao C30

Amostra	tempo(d)	Hidrocarbonetos (C15-C30)														
		C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26	C28	C30	
At. natural	15	94,97	96,96	86,56	67,89	32,43	21,03	-39,55	3,14	17,66	42,30	13,63	11,92	21,17	20,96	
	30	81,15	96,45	56,56	100,00	96,02	62,72	-4,22	-178,64	-79,58	85,34	-117,96	-136,06	-106,40	-94,82	
	60	100,00	100,00	57,49	100,00	67,43	22,81	-28,21	-62,10	-81,64	87,15	-97,22	-100,14	100,00	100,00	
	120	93,68	97,03	95,44	69,58	92,44	88,49	-20,14	27,64	71,73	68,60	47,03	97,62	100,00	100,00	
V1-1/24	15	97,81	90,09	49,38	8,95	-4,02	-18,67	-65,87	-27,63	-47,60	91,26	-26,19	-26,23	-28,76	-26,15	
	30	86,00	98,07	79,22	87,29	47,38	21,09	-89,09	-35,92	16,80	89,20	-173,23	-136,64	-48,67	1,44	
	60	100,00	100,00	77,59	100,00	89,13	70,76	42,39	20,43	4,09	92,80	-12,25	-18,04	-21,85	-25,31	
	120	100,00	98,72	94,88	88,61	79,39	66,96	46,66	47,76	40,10	96,65	49,03	45,51	42,29	38,06	
V1-1/36	15	91,04	96,21	97,42	66,00	74,56	65,71	39,28	63,67	52,04	33,44	70,40	83,44	12,60	19,49	
	30	95,97	91,87	65,69	44,77	37,33	25,00	-12,25	-62,21	0,08	93,67	7,80	5,83	-2,31	-5,53	
	60	89,42	99,13	86,11	96,64	85,28	70,13	20,11	29,30	-7,48	95,19	35,00	32,08	36,69	35,94	
	120	98,51	97,74	92,30	81,62	69,34	48,23	4,55	21,89	30,74	95,88	36,13	16,91	27,53	29,01	
V1-1/48	15	97,64	99,01	83,91	71,13	56,78	78,39	37,87	37,66	26,06	44,80	36,75	33,56	37,39	34,85	
	30	81,14	89,28	65,02	96,36	68,91	25,86	-32,56	-151,69	-57,40	89,64	-51,17	-54,54	-64,35	-68,46	
	60	100,00	100,00	63,98	100,00	100,00	100,00	22,13	-57,35	-5,88	91,02	-39,30	-46,37	100,00	100,00	
	120	100,00	100,00	100,00	83,31	66,39	50,24	38,31	30,43	24,88	94,83	18,80	19,43	12,18	12,49	
V2-1/24	15	97,19	96,97	91,44	83,78	67,04	52,23	29,85	37,34	22,82	49,30	33,60	34,72	32,71	39,40	
	30	95,37	95,19	97,24	95,64	94,83	42,35	-2,97	7,69	90,56	62,22	20,79	83,84	7,95	5,73	
	60	91,60	98,55	83,78	97,74	87,89	73,72	26,19	15,90	-14,71	93,92	12,81	3,96	16,77	18,66	
	120	100,00	100,00	89,19	73,80	58,02	44,06	35,32	30,75	24,53	95,59	21,98	19,29	19,04	100,00	
V2-1/36	15	100,00	96,40	73,67	60,49	48,31	39,67	36,56	31,48	29,62	37,87	30,01	26,28	27,89	100,00	
	30	93,93	96,71	82,07	98,18	84,53	62,06	32,93	26,93	9,56	55,88	15,68	-8,94	1,70	2,42	
	60	93,69	99,24	98,75	99,41	94,90	81,17	62,93	50,55	71,38	82,30	-43,55	20,17	46,02	43,00	
	120	97,60	98,77	96,56	94,21	85,04	74,94	32,95	49,79	1,06	96,17	9,34	26,24	61,25	61,35	
V2-1/48	15	87,54	94,08	81,21	65,75	23,67	6,21	-102,05	-33,19	-77,50	91,83	-22,82	-7,46	7,71	8,87	
	30	93,11	97,20	93,11	98,72	83,87	50,17	-26,81	-13,64	-72,78	93,36	-92,67	-107,89	-31,09	-0,11	
	60	100,00	100,00	86,61	62,64	46,21	38,08	36,62	-17,83	33,99	95,41	29,60	28,12	100,00	100,00	
	120	100,00	100,00	93,36	81,60	70,94	64,13	57,52	54,13	49,66	97,56	46,75	44,64	100,00	100,00	
V3-1/24	15	98,07	98,32	90,03	74,09	46,56	36,71	-32,96	-0,89	-17,07	48,96	26,95	21,54	31,06	29,65	
	30	91,64	99,01	86,11	97,54	86,48	71,80	21,38	-15,33	-17,03	93,64	-63,23	-42,97	10,94	38,40	
	60	90,46	98,26	85,08	92,21	85,99	90,35	65,65	56,62	41,15	96,56	-1,57	7,62	19,64	55,05	
	120	98,75	92,72	73,18	61,00	52,78	58,56	22,45	41,01	41,72	97,38	62,93	58,29	63,03	65,42	
V3-1/36	15	93,43	96,95	60,84	37,04	3,35	-20,56	-83,90	-56,11	-87,16	88,91	-60,43	-69,39	-73,07	-71,52	
	30	92,92	89,49	97,96	98,82	74,06	86,69	42,90	1,27	-24,13	93,82	-36,04	-201,20	17,45	86,02	
	60	100,00	100,00	81,22	100,00	100,00	81,07	67,97	0,91	37,00	94,73	21,05	14,69	5,69	100,00	
	120	96,89	98,57	88,42	77,45	63,26	59,30	11,03	43,77	18,47	96,16	18,18	9,12	47,26	63,40	
V3-1/48	15	100,00	96,85	67,39	39,23	13,99	-9,37	-58,89	-23,57	-49,06	90,68	-34,99	-39,68	-49,85	-54,74	
	30	100,00	100,00	58,69	80,29	37,74	-3,67	-26,59	-45,84	-56,45	88,83	-80,75	-78,02	-90,49	-82,95	
	60	100,00	100,00	78,00	100,00	100,00	85,79	70,34	11,55	37,86	94,73	12,80	1,45	-2,81	-3,25	
	120	100,00	100,00	86,19	69,06	54,66	42,30	36,93	62,14	26,52	97,85	23,93	18,19	100,00	100,00	

Os valores da Tabela 16 demonstram que alguns carbonos apresentam valores negativos, isso representa que esse carbono aumentou sua área comparado a área inicial da amostra B20.

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 pesada foi onde ocorreu o maior aumento nas áreas dos carbonos em relação aos valores iniciais. Os carbonos C21 ao C24 apresentam as maiores porcentagens de área entre todos os carbonos, sendo que o C21, C22 e C23 apresentaram as menores degradações independentes da amostra analisada.

Já para a fração leve os carbonos C15 ao C18 foram os que apresentaram as maiores degradações. Outros autores também reportam que a fração leve dos hidrocarbonetos foram mais facilmente degradado do que a fração pesada. (BENTO, et al., 2003 e BENTO et al., 2005). Ainda segundo Kauppi et al.,(2011), alguns carbonos da fração leve dos hidrocarbonetos além de serem mais facilmente biodegradados, podem ser também mais facilmente perdidos por evaporação pela bioventilação forçada do solo.

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

5 CONCLUSÕES

→ A técnica de bioventilação apresentou bons resultados de degradação quando comparado com a técnica de atenuação natural, alcançando uma degradação de 87%, sendo que a atenuação natural chegou a valores de 71% ao final de 120 dias de experimento.

→ Para a técnica de bioventilação em um solo argiloso contaminado com uma mistura B20, 60 dias de ensaio são suficientes para que os microrganismos façam uma degradação aceitável do contaminante, não sendo viável economicamente continuar o processo de biorremediação até os 120 dias, pela baixa diferença observada entre esses tempos.

→ Não ocorreu grandes variações da umidade ao final dos 120 dias, entre as diferentes amostras estudadas, ficando a mesma na faixa entre 23% e 25%.

→ Quanto ao uso das diferentes vazões e intervalos de tempo entre as aplicações os melhores resultados de degradação mostram que uma vazão de 4L/min, juntamente com um intervalo entre as aplicações de 1 hora a cada 48 horas é suficiente para se ter bons resultados de degradação para um solo argiloso contaminado com uma mistura B20.

→ Os microrganismos presentes no solo possuem uma boa capacidade de adaptação ao contaminante, e mesmo após 120 dias tanto a análise de atividade enzimática e contagem ainda não estava totalmente estabilizada.

→ A análise qualitativa da degradação apresentou maior degradação da fração leve dos hidrocarbonetos, principalmente da faixa de carbonos entre C15-C18.

6 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ➔ Testar vazões de ar mais distantes entre si.
- ➔ Utilizar intervalos de tempo entre as aplicações maior que a cada 48 horas.
- ➔ Testar tempos de aplicações diferentes de 1 hora, utilizada neste estudo.
- ➔ Utilizar os melhores valores de intervalo de tempo e vazão (4 Lmin e 1h aplicada a cada 48h) para uma aplicação e campo, e com diferentes contaminantes e também outros tipos de solos.
- ➔ Melhor a forma de análise enzimática pelo método de FDA, verificando realmente se este método é adequado para a análise microbiológica em solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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]**, vol.52, n.3, P. 747-754, 2009.

ADAM, G., DUNCAN, H. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. **Soil Biology & Biochemistry**, V.33, P. 943–951, 2001

AGENCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAS E BIOCOMBUSTÍVEIS- ANP. **Óleo diesel**. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/>. Acesso em: 28/Dez/2010.

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

ALVAREZ, PEDRO J.J.; ILLMAN, WALTER A. **Bioremediation and natural attenuation: process fundamentals and mathematical models**. New Jersey: Wiley-Interscience, 609 p. 2006.

ANDRADE, A. JULIANO; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. CRISTINA S. FONTES. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus Derivados. **Eclética Química**, vol. 35, n. 3, p. 17-43, 2010.

ANG, EE LUI; HUIMIN ZHAO, JEFFREY P. OBBARD. Recent advances in the bioremediation of persistent organic pollutants via biomolecular engineering. **Enzyme and Microbial Technology**. V.37, p.487–496, 2005.

ARRAR JAZIA; NADIA CHEKIR; FATIHA BENTAHAR. Treatment of diesel fuel contaminated soil in jet–fluidized bed. **Biochemical Engineering Journal**, V. 37, V.131–138, 2007.

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

____. **NBR 6459**: Solo - Determinação do limite de liquidez. Rio de Janeiro, 1984.

____ **NBR 7180**: Solo - Determinação do limite de Plasticidade. Rio de Janeiro, 1984.

___ **NBR 7181:** Solo - Análise Granulométrica. Rio de Janeiro, 1984.

___ **NBR 6508:** Grãos de solos que passam na peneira 4.8mm – determinação de massa específica. Rio de Janeiro, 1984.

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

BAKER KATHERINE H.; DIANE S. HERSON. **Bioremediation**. McGraw-hill, 375 p. 1994.

BALBA, M.T.; N. AWADHAL-I; 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.

BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v.80, n.7, p.723-736, 2005.

BANAT I. M. Biosurfactants production and possible uses in Microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource Technology**. V.51, p.1-12, 1994

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. JOSÉ; CAMMAROTA M., CHRISTE; FREIRE D., DIAS DE CARVALHO. Production of CO₂ in crude oil bioremediation in clay soil. **Brazilian archives of biology and technology**. V.49, p. 249-255, 2005.

BENINCASA, MARIA. Rhamnolipid Produced from Agroindustrial Wastes enhances hydrocarbon Biodegradation in Contaminated Soil. **Current Microbiology**. V.20: p: 1-6. 2007.

BENTO F. MARIA.; FLÁVIO A.O. CAMARGO, BENEDICT C. OKEKE, WILLIAM T. FRANKENBERGER Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, V.96, p. 1049–1055, 2005.

BENTO, F. MARIA; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34 (Supl.1), p. 65-68, 2003.

BITTON, G.; GERBA, C. P. **Ground water. Pollution Microbiology**. John Wiley & Sons. N.Y. 377p., 1984.

BRADY, N.C., WEIL, R.R., **The Nature and Properties of Soils**. 12 ed. Prentice-Hall. 1998.

BRASIL. **Decreto-Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005**. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira, altera as leis nº 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999, e 10.636, de 30 de dezembro de 2002, e dá outras providências. Diário Oficial, Brasília, v.142, n.10, p.8, 14 jan. 2005. Seção 1. Disponível em: <<http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll?f=templates&fn=default.htm&vid=anp:10.1048/enu>>. Acesso em: 28/Dez/2010.

BRASIL. **Resolução nº 06, de 16 de setembro de 2009**. Estabelece em cinco por cento, em volume, o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, de acordo com o disposto no art. 2º da Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Diário oficial da união, 26.10.2009. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/mme/menu/conselhos_comite/cnpe/resolucao_cnpe_2009.html>. Acesso em 28/Dez/2010.

BØRRESEN 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.

BOSCOV GIMENEZ, M. A. **Geotecnia Ambiental**. São Paulo, 2008, p.248.

BOOPATHY R. Anaerobic biodegradation of no. 2 diesel fuel in soil: a soil column study. **Bioresource Technology**, V.94, P.143–151, 2004.

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

BUSENELL, L. D. And HAAS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **J. Bact.**, V.41, P. 653-673, 1941.

BÜCKER FRANCIELLE; NAIARA A. SANTESTEVAN; LUIZ F. ROESCH; RODRIGO J. S. JACQUES, MARIA C. R. PERALBA; FLÁVIO A. DE OLIVEIRA C. , FÁTIMA M.

BENTO. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, V. 65, P. 172 – 178, 2011.

BYUN IM-GYU, HAE-UK NAM, SEUNG KOO SONG, IN-SEONG HWANG, TAE-HO LEE; TAE-JOO PARK. 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.

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,1992, 360p.

CAROLINA A. B. DE GUSMÃO, RAQUEL D. RUFINO, LEONIE A. SARUBBO. **Economics of Application of a Biosurfactant in Soil Contaminated With Petroleum Derivate**. In: XVII Simpósio nacional de bioprocessos. Anais... Natal RN, 2009.

CASARINI, C. P.; SPILBORGHS, M. C. F. **Biorrecuperação de locais contaminados com hidrocarbonetos**. In: first labs. Latim american biodeterioration symposium. Anais ..., 1992.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo. **Meio Ambiente**. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br> . Acesso em: 14.Jun.2011a.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo. **Relação de áreas contaminadas no Estado de São Paulo**. Disponível em : <http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/areascontaminadas/texto_explicativo_dez_10.pdf> . Acesso em 15.Jun.2011b.

CHAPELLE, FRANCIS. H. **Ground-water microbiology and geochemistry**. 2. ed. New York: John Wily & Sons, 2001. 477 p.

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

CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE-CONAMA. **Resolução conama nº 420, de 28 de dezembro de 2009**. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Diário oficial da União, 30 Dez. 2009.

CORDAZZO, J., MALISKA, C. R., CORSEUIL, H. X., 1999. **Solução numérica do problema de derramamento de gasolina acrescida de álcool no solo**. In: ENPROMER'99 - II Congresso de Engenharia de Processos do MERCOSUL. Florianópolis - Santa Catarina – Brasil, 108p.

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

CORSEUIL, H. X.; MARINS, M. D. M. Contaminação de água subterrânea por derramamento de gasolina: O problema é grave? **Engenharia Sanitária**, v. 2, p.50-54, 1997. Disponível em: <http://umbbd.ahc.umn.edu/pha2/pha2_image_map.html>.

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.

COSTA, A. F. U.; AZAMBUJA, E.; NANNI, A. S. Métodos elétricos aplicados à detecção de contaminação do subsolo provocada por combustíveis: sete casos estudados no Rio Grande do Sul, Brasil. In: **International Conference on Geofisics**. Rio de Janeiro, 1999.

COULON FRÉDÉRIC; EMILIEN PELLETIER; LÉNAICK GOURHANT; DANIEL DELILLE. Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sub-Antarctic soil. **Chemosphere**. V. 58, P. 1439-1448, 2005.

CUNNINGHAM, C.J., IVSHINA, I.B., LOZINSKY, V.I., KUYUKINA, M.S., PHILP, J.C. Bioremediation of diesel-contaminated soil by microorganisms immobilized in polyvinyl alcohol. **International Biodeterioration & Biodegradation**, V.54, P.167 a 174, 2004.

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

CUNHA PATRICIA ÖSTERREICHER; EURÍPEDES A. VARGAS, JR. JEAN R. D. GUIMARÃES; TÁCIO M. P. DE CAMPOS; CASSIANE M. F. NUNES, ARIOVALDO C.; FRANKLIN S. ANTUNES; MARIA I. P. SILVA; DENISE M. MANO. Evaluation of bioventing on a gasoline–ethanol contaminated undisturbed residual soil. **Journal of Hazardous Materials**, V. 110, P.63–76, 2004.

DEMELLO JARED A; CATHERINE A. CARMICHAEL; EMILY E. PEACOCK, ROBERT K. NELSON; J. SAMUEL AREY; CHRISTOPHER M. REDDY. Biodegradation and

environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: An initial study. **Marine Pollution Bulletin**, V.54, P. 894–904, 2007.

FATIMA M. BENTO; CAMARGO FLÁVIO A.O.; OKEKE BENEDICT C.; FRANKENBERGER WILLIAN, T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**. V. 96. p. 1049-1055. 2004.

FEPAM-RS - Fundação Estadual De Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler. **Acidentes de transporte de cargas perigosas**. Disponível em: <http://www.fepam.rs.gov.br/emergencia/rel_acidentes.asp?pagina_Atual=2&navegacao=next&ordem>. Acesso em 10/set/2010.

FERNANDES, F. M.; ALCÂNTARA, G. Z. **Biorremediação de solos – Estado da Arte**. Disponível em: < <http://pt.scribd.com/doc/56616692/Contaminacao-de-solo-bioventilacao> >. Acesso em: 25. Set. 2010.

FERNANDES, MARILDA. **Atenuação natural da contaminação de aquífero submetido a derramamento de gasolina**. Tese (Doutorado em Química) – Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

FINE, P.; GRABER, E.R.; YARON, B. Soil interactions with petroleum hydrocarbons: abiotic processes. **Soil Technology**. V.10, P.133 a 153, 1997

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.

GAYLARDE, C.CRISTINE; BELINASO, M. LURDES; MANFIO, G.PAULO. Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia ciência e desenvolvimento**. V.34, p. 36-43, 2005.

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

GOMES, ANA PAULA NOGARETI. **Biodegradação de biodiesel soja, mamona e hidrocarbonetos monoaromáticos em ambientes Aquáticos**. Dissertação (mestrado em engenharia Ambiental). Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

HWANG EUI-YOUNG, JOON-SEOK PARK, JOUNG-DAE KIM, WAN NAMKOONG. Effects of Aeration Mode on the Composting of Diesel-Contaminated Soil. **J. Ind. Eng. Chem.**, V. 12, N^o. 5, p. 694-701, 2006.

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.

JACQUES, R. J. S.; FÁTIMA M. BENTO; ZAIDA INÊS A.; FLÁVIO A. DE OLIVEIRA C. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 37, n.4, p. 1192-1201, Jul/ago de 2007.

JACQUES, R. J.S. , EDER C. S., FÁTIMA M. BENTO; MARIA C.R. PERALBA; PEDRO A. SELBACH, ENILSON L.S. SÁ; FLÁVIO A.O. CAMARGO. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp isolated from a petrochemical sludge landfarming. **International Biodeterioration and Biodegradation**, London, v.56, n.3, p.150-156, 2005b.

JACQUES, RODRIGO JOSEMAR SEMINOTI. **Biorremediação de antraceno, fenantreno e pireno em um argissolo**. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005a.

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

JACQUES, RODRIGO J. S.; BENTO, FÁTIMA M.; ANTONIOLLI, ZAIDA INÊS C.; FLÁVIO ANASTÁCIO DE O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Cienc. Rural [online]**, vol.37, n.4, p. 1192-1201, 2007.

JOHNSEN, ANDERS R.; LUKAS Y. WICK; HAUKE HARMS. Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution**, V. 133, January 2005, P. 71-84

JUNIOR J. SOARES; ADRIANO P. MARIANO; DEJANIRA DE F. DE ANGELIS. Biodegradation of biodiesel/diesel blends by *Candida viswanathii*. **African Journal of Biotechnology**, Vol. 8, n.12, p. 2774-2778, 17, 2009.

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.

KARTHIKEYAN, K.; BHANDARI, A. Anaerobic biotransformation of aromatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in soil microcosms: a review. **Journal of Hazardous Substance Research**. V.3, P. 1-19, 2001.

KAUPPI SARI, AKI SINKKONEN, MARTIN ROMANTSCHUK. Enhancing bioremediation of diesel-fuel-contaminated soil in a boreal climate: Comparison of biostimulation and bioaugmentation.. **International Biodeterioration & Biodegradation** V.65, p.359-368, 2011.

KAUSHIK, R.; SARAN, S.; ISAR, J.; SAXENA, R.K. (2006). Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. **J Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 40: 121-126

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.

LAPINSKIEN ASTA; POVILAS MARTINKUS; VILIIJA REBZDAITE. Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil. **Environmental Pollution**, V.142, P.432-437, 2006.

LEE, M. D.; THOMAS, J. M.; BORDEN, R. C.; BEDIANT, 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.

LEAHY, JOSEPH G.; COLWELL, RITA R. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. **Microbiological reviews**. V.54, P. 305 – 315, 1990

LEMONS, J.L.S.; MILLIOLI, V.S.; SANTOS, L.C.;RIZZO, A .C.L.; CUNHA, C.D.; SORIANO, A .V.;LEITE, S.; SANTOS, R. Bioremediation: assessing the addition of biosurfactants in the presence of fungi on biodegradation of clay soil impacted by petroleum **.Boletim Técnico PETROBRAS** V.34, P.56-67, 2003.

LIN TA-CHEN; PO-TSEN PAN, SHENG-SHUNG CHENG. Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, V.176, P.27–34, 2010.

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.

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

MACÊDO, J. A. B. de. Programa de bioaugmentação (bioaugmentation), uma tecnologia avançada para tratamento de efluentes de laticínios. **Revista do instituto de laticínios Cândido Tostes**, v. 55, n. 315, p. 47-52, Jul/ago de 2000.

MADIGAN MICHAEL T., JOHN M. MARTINKO, PAUL V. DUNLAP, DAVID P. CLARK. **Brock biology of microorganisms**. 12th ed., hardcover, 2003.

MARIANO P.A. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. Tese (doutorado em geociências e meio ambiente) Instituto de ciências exatas e geociências. Universidade estadual paulista 2006a . Disponível em : <http://www.anp.gov.br/CapitalHumano/Arquivos/PRH05/Adriano-Pinto-Mariano_PRH05_UNESP_D.pdf> . Acesso em 05 Abr. 2010.

MARIANO, A. P., TOMASELLA, R. C., MARCONDES DE OLIVEIRA, L., CONTIERO, J., DE ANGELIS, F. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. **African Journal of Biotechnology**. v.7, p.1323-1328, 2008.

MARIANO, A. P.; ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M.; PIRÔLLO, M. P. S.; CONTIERO, J. **Biodegradability of commercial and weathered diesel oils**. In: XXII interamerican congress of chemical engineering. Anais..., Buenos Aires, 2006b.

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

MARIN, J.A., HERNANDEZ, T., GARCIA, C. Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity. **Environmental Research**. V. 98, p.185–195, 2005.

MARTINS, A.; et al. Biorremediação. In: Fórum de Estudos contábeis, 3., 2003, Rio Claro – SP. **Anais...** Rio Claro – SP: Faculdades Integradas Claretianas, 2003.

MARTINS, A.; et. al. **Biorremediação**. In: Fórum de Estudos contábeis, **Anais...** Rio Claro, SP, 2003.

MEIRA, J.ALEXANDRE. **Produção de biosurfactantes por fermentação no estado sólido e desenvolvimento de aplicações para tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos.** Dissertação (mestrado em química)- Faculdade de química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2007.

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.

MESQUITA, A. C. **Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes.** Tese (doutorado em engenharia). Pós-graduação em Engenharia. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

MEURER, E. J., RHEINHEIMER, D.; BISSANI, C. A. In: MEURER, E.J. **Fundamentos de química do solo.** 3. ed. Porto Alegre: Evangraf, 2006. p. 73-99.

MEYER DERROSSI DANIEL. **Avaliação da biodegradabilidade de misturas de diesel e biodiesel (B0, B20 e B100) em dois solos com diferentes granulometrias.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Pós-graduação em microbiologia agrícola e do ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

MORAES, B. EDUARDO; TORNISIELO, T.M. SÂNIA. 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.

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

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo.** 2^a ed. Editora UFLA. 729p, 2006

MOURA, A. SAMARA, F. **O que são hidrocarbonetos.** Disponível em:< <http://www.Bioremediacao\hidrocarbonetos\2 Rosas O que são os Hidrocarbonetos.htm>>. Acesso em: 28/Dez/2010.

MROZIKA AGNIESZKA, SEGET ZOFIA PIOTROWSKA. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. **Microbiological Research.** V.165, p.363-375, 2010.

NADIM, F.; HOAG, G. E.; LIU, S.; CARLEY, R. J.; ZACK, P. Detection and remediation of soil and aquifer systems contaminated with petroleum products: an overview. **J. of Petrol. Sci. and Eng.**, v.26, p. 169-178, 1999.

NETO, PEDRO R. COSTA; LUCIANO F. S. ROSSI; GIULIANO F. ZAGONEL E LUIZ P. RAMOS. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, V.23, P. 531-537, 1999.

OLIVEIRA, D. S.; LEMOS, J. L. S. **Biodegradação de Petróleo de solo areno-argiloso por fungo filamentosos**. In: XIII Jornada de Iniciação Científica - CETEM, 2005, Rio de Janeiro. XIII Jornada de iniciação científica – CETEM. 2005.

OLIVEIRA, E. **Contaminação de aquíferos por hidrocarbonetos provenientes de vazamento de tanques de armazenamento subterrâneo**.1992. Dissertação (Mestrado em geociências). Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992. 112p

OWSIANIAK, MIKOLAJ; LUKASZ C. A. SZULC; J.STANIEWSKI J; ANDRZEJ O.; AGNIESZKA K. OLEJNIK S.; HERMANN J. Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. **Bioresource Technology**, V.100, P.1497–1500, 2009.

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.

PEREIRA G, MUDGE SM. Cleaning oiled shores: laboratory experiments testing the potential use of vegetable oil biodiesels. **Chemosphere**, V.54, P.297–304, 2004.

PEREIRA, LUCAS T.C.; LEMOS, JUDITH L.S. **Degradação de hidrocarbonetos de petróleo por *Aspergillus niger* e *penicillium corylophilum***. In: XII jornada de iniciação científica- CETEM/MCT, 2004.

PETROBRAS. **Óleo diesel** Disponível em:
<http://www.br.com.br/wps/portal!/ut/p/c1/04_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3hLf0N_P293QwN_fw83AyM_Tx8vQyNDAYAAykeiyHu6GhiZGri6ehibGxq4GxPQ7eeRn5uqX5AbUQ4AJaCqag!!/dl2/d1/L2dJQSEvUUt3QS9ZQnB3LzZfOU8xT05LRzEwTzBQRjAyN0tKT DNTTTAwNDc!/?WCM_GLOBAL_CONTEXT>. Acesso em: 28.Dez.2010.

PINE, S.H., **Organic Chemistry**. McGraw-Hill Book Company, New York, 1187p, 1987.

PRIETTO, P. D.; REGINATTO, C.; KORF, E. P.; THOMÉ, A.; CANSOLI, N.C. Comportamento hidráulico e reativo de uma mistura solo-cimento para barreiras de fundo em aterros de resíduos sólidos, in: **Congresso Brasileiro de Mecânica dos Solos e Engenharia Geotécnica**, 15 ed., ABMS, Gramado, RS, Brasil. "CD-ROM", 2010

PRINCE, ROGER C; CHRISTINE HAITMANEK ; CATHERINE COYLE LEE. The primary aerobic biodegradation of biodiesel B20. **Chemosphere** , V.71. P.1446–1451, 2008.

PRINCE, R.C.; DRAKE, E.N. **Transformation and fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil**. In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed.) **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA; P.89-110, 1999.

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

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.

Refinaria Alberto Pasqualini- REFAP. **Óleo diesel**. Disponível em: <http://www.refap.com.br/produtos_diesel.asp>. Acesso em 28/Dez/2010.

REGINATTO CLEOMAR, GREGORI ADRIANO, KORF E. PAVAN; CANCELLI DIANA M.; COLLA LUCIANE M. **Comparação das técnicas de Bioaumento e Atenuação Natural em Solo Contaminado com Óleo Vegetal**. In VI Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental, Anais..., Serra Negra, SP, 2008.

RIZZO, ANDRÉA C. L ; CUNHA; CLAUDIA D.; RONALDO L. C. SANTOS; RENATA M. SANTOS; HUGO M. MAGALHÃES; SELMA G. F. LEITE; ADRIANA U. SORIANO. Preliminary identification of the bioremediation limiting factors of a clay bearing soil contaminated with crude oil. **J. Braz. Chem. Soc. [online]**, vol.19, n.1, p. 169-174, 2008.

ROSATO, YOKO. B. Biodegradação do petróleo. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. **Microbiologia Ambiental**. Embrapa, São Paulo. p. 307-304, 1997.

RYAN, JOHN, R.; RAYMOND.; LOEHR, R. C. AND RUCKER, E. Bioremediation of organic contaminated soils. **Journal of Hazardous Materials**. V.28, p. 159-169, 1991.

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.

SCHLEICHER R. WERKMEISTER, W. RUSS R. MEYER-PITTROFF. Microbiological stability of biodiesel–diesel-mixtures. **Bioresource Technology**, V.100, P.724–730, 2009.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO AS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS- SEBRAE. **Biodiesel**. Disponível em: http://www.biodiesel.gov.br/docs/Cartilha_Sebrae.pdf. Acesso em:27/Dez/2010.

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

SILVA, MAICON GONÇALVES. **Biorremediação de solo contaminado por petróleo por diferentes técnicas de bioestimulação**. Disponível em: <<http://issuu.com/maicon/docs/biorremediacao>>. Acesso em 08/Nov/2010

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.

SPINELLI, ALESSANDRA CARLA, O.CHAGAS.**Biorremediação de solo argiloso contaminado por hidrocarbonetos poliaromáticos provenientes de derrame de óleo diesel**. Tese (Doutorado em geociências/ geologia sedimentar e ambiental. Centro de tecnologia e geociências, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2007.

SOHNGEN, N. L. Uber Bakterien, welche Methan als Kohlenstoffnahrung Energiequelle gebrauchen. **Zentr. Bakt. Parasitenk.**, Abt. II, V.15, P. 513-517, 1906.

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

SUTHERSAN, S. S. **Remediation Engineering**. CRC Press LLC, 2000.

SCHNURER, J., ROSSWALL, T.,. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. **Applied and Environmental Microbiology**, V.6, P.1256–1261, 1982.

SYLVIA DAVID M.; JEFFRY J. F.; PETER G. HARTEL; DAVID A. ZUBERER. **Principles and Applications of Soil Microbiology**. New Jersey. 2 Ed, Prentice Hall, 2004.

TAUK, SÂMIA MARIA. Biodegradação de resíduos orgânicos no solo. **Revista Brasileira de Geociência**, v.20, p. 299-301, 1990.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H. E VOLKWEISS, S.J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p

TENG, Y.; XU, Y. Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3900-3907, 2008.

TORTORA, GERARD J.; FUNKE, BERDELL R.; CASE, CHRISTINE L.; VAINSTEIN, MARILENE HENNING; SCHRANK, AUGUSTO (Rev.) **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2005. 894 p.

TROQUET JULIEN; CHRISTIAN LARROCHE; CLAUDE-GILLES DUSSAP. Evidence for the occurrence of an oxygen limitation during soil bioremediation by solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, V.13, P.103–112, 2003.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). **Manual Bioventing Principles and Practice: Volume I: Bioventing Principles**. 1995a. Disponível em: <<http://www.epa.gov/nrmrl/pubs/540r95534/540r95534a.pdf>> Acesso em 01 Dez.2010.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). **Manual Bioventing Principles and Practice Volume II: Bioventing Design**. 1995b. Disponível em: <<http://www.epa.gov/nrmrl/pubs/540r95534/540r95534b.pdf>>. Acesso em 01 Dez.2010

USEPA (United States Environmental Protection Agency). **How To Evaluate Alternative Cleanup Technologies For Underground Storage Tank Sites: A Guide For Corrective** USEPA (United States Environmental Protection Agency). **Chapter III Bioventing**, 1994. Disponível em <<http://www.epa.gov/oust/pubs/tums.htm>>. Acesso em 03.Jan.2011.

USEPA (United States Environmental Protection Agency),. **Behavior and determination of volatile organic compounds in soil: a literature review**. EPA/600/R-93/140. Washington, DC. 1993 Disponível em: < <http://www.epa.gov/esd/cmb/pdf/voclr.pdf> > Acesso em: 01/10/2010.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). **Chapter III: Behavior of hydrocarbons in the subsurface**, 2004. Disponível em: <http://www.epa.gov/OUST/pubs/fprg_chap3.pdf>. Acesso em: 01 Dez. 2010.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). **Method 3550B, ultrasonic extraction**, 1996.. Disponível em <www.epa.gov/sw-846/pdfs/3550b.pdf > acesso em: 02 Fev. 2011.

VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology Molecular Biology Reviews**. V.67 , p.503-549 , 2003.

VEIGA, I.G. **Avaliação da origem dos hidrocarbonetos em sedimentos de manguezais da região norte da Baía de todos os Santos/ Bahia**. Dissertação (mestrado em engenharia de reservatório e de exploração). Centro de tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense. Rio de Janeiro, 2003.

VIEIRA, T. M.; SILVA, E. P.; FILHO, N. R. A.; VIEIRA, J. D. G. Determinação e quantificação da degradação bacteriana de biodiesel de óleo de palma. In: Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, I., 2006, Brasília. Anais..., Brasília, 2006, p.218-223.

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.

WHANG LIANG-MING; LIU PAO-WEN G; CHIH-CHUNG MA, SHENG-SHUNG CHENG. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. **Journal of Hazardous Materials**. V.151, P.155–163, 2008.

YOUNG, L. Y. Anaerobic degradation of aromatic compounds. **Microbial degradation of aromatic compounds**. GIBSON, D. T. (ed.). Marcel-Dekker-Inc., New York, pp. 487-523,1984.

ZHANG X, PETERSON CL, REECE D, HAWS R, MOLLER G .Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. Trans. ASAE. V.41: P.1423-1430, 1998.