



Programa de Pós-graduação *Latu Sensu* em Gestão Ambiental

Campus Nilópolis

Antonia Carolina Silva

**USO DA RESPIROMETRIA DE BARTHA NA AVALIAÇÃO DE
BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM DIESEL B5**

Nilópolis – RJ

2013

Antonia Carolina Silva

**USO DA RESPIROMETRIA DE BARTHA NA AVALIAÇÃO DE
BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM DIESEL B5**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Programa de Pós-graduação em Gestão Ambiental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Especialista em Gestão Ambiental.

Orientadora: Prof^a Cristina Carneiro – IFF/Nilópolis

Co-orientadora: Ms. Graciane Silva – Estre Ambiental

Nilópolis

2013

S586u Silva, Antonia Carolina

Uso da respirometria de Bartha na avaliação de biorremediação de solo contaminado com diesel B5 / Antonia Carolina Silva, Orientadora Cristina Maria Soares Teixeira Carneiro -- Nilópolis, RJ, 2013.

50 f., il; 30 cm

Trabalho de conclusão de curso (pós-graduação) - Instituto Federal Rio de Janeiro - IFRJ, Programa de Pós-Graduação – Gestão Ambiental.

Antonia Carolina Silva

**USO DA RESPIROMETRIA DE BARTHA NA AVALIAÇÃO DE
BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM DIESEL B5**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Programa de Pós-graduação em Gestão Ambiental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Especialista em Gestão Ambiental.

Data de Aprovação: 13/04/2013

Prof^a Cristina Carneiro (orientadora)

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro –Campus Nilópolis

Prof^a Denise Martins

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro –Campus Nilópolis

Prof^a Danielle Bisaggio

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro –Campus Nilópolis

Nilópolis-Rio
2013

*A todos os amigos de classe com os quais
compartilhei esse período de aprendizagem.*

AGRADECIMENTOS

Tenho profunda gratidão a Deus por ter permitido o meu ingresso em uma pós-graduação com ensino de qualidade oferecido por este programa. Meus sinceros agradecimentos aos meus mestres, que compartilharam suas experiências profissionais e se dispuseram a lecionar em um horário um tanto que inusitado, a fim de oferecer oportunidade de ensino de pós-graduação a um grupo heterogêneo de profissionais.

Aos meus colegas de classe pela companhia, companheirismo e motivação.

Às queridas amigas conquistadas Viviane Perdomo, Vanessa Moreira, Vanessa Almeida e ao Antonio Carlos. Sou muito feliz por ter compartilhado grandes momentos com vocês.

À minha orientadora Cristina Carneiro, que se dispôs sem dúvidas a me orientar nesse trabalho de conclusão de curso.

À co-orientadora Graciane Silva por ter idealizado o projeto e tornado possível a realização dos experimentos e por ter me orientado com tanto zelo e dedicação.

Ao querido Mestre Prof. Marco Aurelio, por ter lançado um desafio ao nos lecionar e ter nos transmitido disciplina, profissionalismo e amor ao trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização e conclusão desse trabalho.

Feliz é o homem capaz de agregar a sua vida as grandes virtudes daqueles que compartilharam os pequenos momentos.

SILVA, A. C. Uso da Respirimetria de Bartha na Biorremediação de Solo Contaminado com Diesel B5. 49p. Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização em Gestão Ambiental. Programa de Pós-graduação em Gestão Ambiental, Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Nilópolis, Nilópolis, Rio de Janeiro, 2013.

RESUMO

A tecnologia de biorremediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos do petróleo vem sendo largamente pesquisada em todo mundo, em virtude da elevação dos acidentes ambientais ocorridos em escala mundial e à necessidade do desenvolvimento de tecnologias com baixo custo e alta eficiência de remoção. A ciência das condições ideais para remoção de contaminantes do meio é de fundamental importância para a eficiência da tecnologia. O presente trabalho teve por objetivo central otimizar as condições ambientais (pH e umidade) para a metabolização do óleo diesel B5 presente no solo coletado no Parque Natural do Gericinó, utilizando para tal o teste de respirometria de Bartha preconizado pela NBR 14283. Foram coletadas quatro amostras de solo do Parque, sendo realizada a caracterização físico-química e biológica, seguida da Respirometria durante 15 dias no solo que apresentou as condições mais favoráveis para o processo. Observou-se que a composição vegetal heterogênea do Parque possui forte influência sobre as condições físico-químicas e biológicas do solo. Dentre as amostras analisadas, o P2 apresentou as melhores condições para a biorremediação, no que diz respeito o pH do meio, umidade, granulometria, textura das partículas do solo e população microbiana. Através do Planejamento Fatorial 2² foi possível concluir que o processo ocorreu mais rapidamente em 60% da capacidade de campo e pH= 6,5. Para ratificar os resultados encontrados na respirometria, recomenda-se a análise de óleos e graxas do solo após os 15 dias de experimentos, a fim de quantificar o óleo residual.

Palavras-chave: biorremediação, contaminação, solo, micro-organismos.

SILVA, A. C. Uso da Respirimetria de Bartha na Biorremediação de Solo Contaminado com Diesel B5. 49p. Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização em Gestão Ambiental. Programa de Pós-graduação em Gestão Ambiental, Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Nilópolis, Nilópolis, Rio de Janeiro, 2013.

ABSTRACT

The technology of bioremediation of contaminated by petroleum hydrocarbons has been widely researched in the world, due to the rising environmental accidents occurring on a global scale and the need to develop technologies with low cost and high removal efficiency. The science of ideal conditions for the removal of contaminants from the environment is of fundamental importance for the efficiency of the technology. This study aimed to optimize central environmental conditions (pH and moisture) for the metabolism of diesel B5 present in soil collected in the Natural Park of Gericinó there of using the Respirimetry Test Bartha advocated by NBR 14283. Four samples were collected from soil Park, and performed the physical-chemical and biological Respirimetry followed by 15 days in soil showed the most favorable conditions for the process. It was observed that the composition of vegetable heterogeneous Park has a strong influence on the physico-chemical and biological soil properties. Among the samples, P2 had the best conditions for the bioremediation, as regards the pH, moisture content, grain size, texture of soil particles and the microbial population. Through the Planning Factor 2^2 was possible to conclude that the process occurred more rapidly in 60% of field capacity and pH = 6.5. To confirm the results found in respirometry, we recommend the analysis of oils and greases soil after 15 days of experiments in order to quantify the residual oil.

Keywords: bioremediation, pollution, soil micro-organisms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 Etapas do processo de formação do solo. Rocha et al (2004) <i>apud</i> Millioli.....	16
Figura 3.2 Localização geográfica do Parque Natural do Gericinó-Mendanha. Fonte: Google Maps (2012).....	26
Figura 3.3 (P1) Área do horto, com plantio de mudas e com solo exposto.....	27
Figura 3.4 (P2) Área coberta por gramíneas.....	27
Figura 3.5 (P3) Área com incidência de vegetação arbustiva e presença de manilhas e resíduos de construção civil.....	28
Figura 3.6 (P4) Área com intensa cobertura vegetal e alta incidência de raízes na camada superficial.....	28
Figura 3.7 Fluxograma dos parâmetros físicos, químicos e microbiológicos avaliados no solo <i>in natura</i> (sem contaminação).....	29
Figura 3.8 Esquema do respirômetro de Bartha preconizado na NBR 14283. Fonte: ABNT (1999).....	34
Figura 4.9 Curva de neutralização de pH, massa de Ca (OH) ₂ <i>versus</i> pH.....	40
Figura 4.10 Representação gráfica do teste de respirometria de Bartha.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Densidade das populações microbianas presentes na superfície do solo por m ²	17
Tabela 2.2 Tecnologias empregadas no processo de biorremediação atualmente. Fontes: Boopathy, Vidali, Accioly e Siqueira (2000); Sepúlveda e Trejo (2002).....	22
Tabela 3.3 Meio de cultura para contagem de microrganismos heterotróficos totais.....	32
Tabela 3.4 Valores utilizados no Planejamento Experimental Fatorial.....	35
Tabela 3.5 Delineamento dos tratamentos empregados no teste respirométricos.....	37
Tabela 4.6 Caracterização química do óleo diesel puro e do diesel B5 quanto os hidrocarbonetos de petróleo.....	41
Tabela 4.7 Caracterização física, química e biológica em solo <i>in natura</i>	42
Tabela 4.8 Quantidade de CO ₂ gerada para cada condição experimental ao longo de 15 dias....	49

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	OBJETIVOS.....	14
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	SOLO.....	15
2.1.1	A participação dos micro-organismos na degradação dos hidrocarbonetos.....	16
2.1.2	Efeitos ambientais na degradação dos hidrocarbonetos.....	18
2.2	ÓLEO DIESEL.....	19
2.3	TECNOLOGIA DE BIORREMEDIAÇÃO.....	20
3.	METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	26
3.1	SOLO DE ESTUDO.....	26
3.2	CARACTERIZAÇÃO DO SOLO.....	29
3.3	DIESEL B5 USADO NOS EXPERIMENTOS.....	32
3.4	PREPARAÇÃO E CONTAMINAÇÃO DO SOLO.....	33
3.5	DESCRIÇÃO DO RESPIRÔMETRO DE BARTHA.....	34
3.6	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	35
3.7	MONTAGEM DOS RESPIRÔMETROS DE BARTHA.....	35
3.8	MONITORAMENTO DO ENSAIO RESPIROMÉTRICO.....	37
3.9	QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CO ₂	38
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1	CURVA DE NEUTRALIZAÇÃO.....	40
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO DIESEL B5.....	40
4.3	CARACTERIZAÇÃO DO SOLO <i>IN NATURA</i>	41
4.4	TESTES DE RESPIROMETRIA DE BARTHA.....	43
	CONCLUSÕES.....	45
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
	APÊNDICE.....	49

1. INTRODUÇÃO

O crescente desenvolvimento econômico observado, sobretudo, a partir da década de 70 no Brasil, estimulou toda cadeia produtiva de petróleo e seus derivados, desde a prospecção desse combustível fóssil, passando pela exploração, refino e comercialização. Junto ao desenvolvimento econômico, chegaram também as preocupações com o potencial de contaminação de solo e água subterrânea, por vazamento em tubulações de dutos e tanques de combustíveis.

Os postos de abastecimento são significativos pontos de contaminação de solo e água, sobretudo pelo processo de oxidação. Em decorrência da poluição provocada por esses combustíveis, a legislação visando a qualidade do solo nas áreas de influência dos postos evoluiu, a exemplo da Resolução CONAMA 273, que dispõe sobre operação e instalação de postos de abastecimento. Existe uma obrigatoriedade por parte dos órgãos fiscalizadores, do licenciamento de postos de abastecimento.

A contaminação por hidrocarbonetos do petróleo e seus derivados tornou-se crescente nos dias atuais, alvo de estudos em Universidades e Centros de Pesquisas direcionados a saneamento ambiental e recuperação de áreas contaminadas.

Uma vez atingindo o solo, o combustível pode estabelecer-se em diferentes estados físicos no ambiente. Dependendo do constituinte do hidrocarboneto, esse poderá ser solúvel em água, possuir capacidade de aderência em partículas do solo ou ser liberado para atmosfera em forma de gás. Alguns contaminantes podem interagir com componentes do solo, resultando em alterações de suas características e modificando o seu comportamento no ambiente (MILLIOLLI *et al* 2008).

O tratamento de solos contaminados inclui processos químicos, físicos e biológicos. Durante décadas, algumas tecnologias foram testadas com a finalidade de obter uma técnica com menor custo e maior potencial de descontaminação. Vários métodos podem ser empregados para remoção dos hidrocarbonetos do ambiente, conforme verificado na literatura, tais como extração por vapor, bombeamento e biorremediação. Essa última é definida como uma tecnologia para tratamento de áreas contaminadas utilizando agentes microbiológicos, os quais, por meio do seu próprio metabolismo, conseguem transformar o contaminante em componentes menos tóxicos ou sem risco para o meio ambiente (GAYLARDE *et al.*, 2005). A sua principal vantagem é o fato de apresentar baixo custo quando comparado aos tratamentos convencionais.

A atividade microbiana tem sido alvo de diversos estudos que visam melhorar as condições de degradação do contaminante, utilizando manipulação dos parâmetros físico-químicos do ambiente. A otimização das variáveis envolvidas nos processos microbianos torna a biorremediação mais eficiente em menor período, reduzindo custos.

Para o monitoramento da atividade microbiana, podem ser utilizadas metodologias tais como a respirometria, a qual possibilita o acompanhamento do processo de biodegradação por meio de um sistema aeróbico, onde quanto maior a quantidade de dióxido de carbono produzido e oxigênio consumido, maior é a degradação do constituinte orgânico pelos micro-organismos do solo. No presente trabalho foi utilizado como ferramenta para avaliação de solo contaminado com Biodiesel B5 o método de Respirometria de Bartha, recomendado pela NBR 14283 (ABNT, 1999) para determinação da biodegradação.

1.1 Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo utilizar a Respirometria de Bartha para avaliação das condições ótimas para a biorremediação de solo contaminado artificialmente por diesel B5. Para tal, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

Realizar a caracterização do solo coletado na área de estudo a fim de alcançar os melhores resultados na biorremediação;

Avaliar e otimizar as taxas nutricionais (pH e umidade) através do método respirométrico de Bartha, padronizado pela Norma NBR 14283;

Monitorar a atividade microbiana por meio da respiração aeróbica dos micro-organismos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Solo

Trata-se de um compartimento do ambiente, resultante do processo de intemperismo da rocha matriz, o qual é diferenciado por horizontes de constituintes minerais e orgânicos, de profundidade variável, podendo diferir em propriedades físicas e constituição, propriedades químicas e composição e características biológicas (MEURER, 2000).

O solo é constituído por uma fase sólida, com partículas minerais, líquida, onde se pode observar a presença de água adsorvida e interpartícula, e a fase gasosa, onde seus principais constituintes são CO₂ e O₂. De uma forma geral, a proporção de constituintes do solo varia de acordo com a profundidade e localização geográfica (JENNY, 1941).

Os principais fatores que influenciam as propriedades qualitativas do solo são: o tipo de rocha-mãe, responsável pelo conteúdo mineral e as proporções relativas das frações de areia, silte e argila; o ajuste geomorfológico, que tem relação direta sobre a distribuição do tamanho do grão; o tempo, interferindo no período de exposição ao intemperismo; os organismos, que influenciam na fertilidade do solo e ciclagem de nutrientes; e ações antrópicas (ASWATHANARAYANA, 1995 *apud* CHAGAS-SPINELLI, 2007).

Em suma, o solo é uma mistura complexa de constituintes orgânicos e inorgânicos, sendo os principais responsáveis pelas atividades químicas existentes, incluindo a capacidade do solo em aprisionar os contaminantes. Segundo HARAYAMA (1997), as frações do solo capazes de tornar os contaminantes não disponíveis à biodegradação são a superfície mineral e a matéria orgânica.

A fração mineral do solo apresenta-se em uma escala de tamanho denominada granulometria, podendo variar desde partículas grosseiras, como os cascalhos, até partículas extremamente pequenas, como é o caso dos argilominerais. Esses últimos, em sua maioria, possuem superfície eletronegativa, conferindo uma diferença de carga que permite a troca iônica, conseqüentemente, o aprisionamento de compostos. Dessa forma, quanto mais argiloso é o solo, maior será a capacidade conferida para adsorver compostos e torná-lo indisponível à degradação.

A matéria orgânica presente no solo, por sua vez, é um fator que influencia diretamente na degradação do contaminante, uma vez que apresenta elevada afinidade com este. Essa corresponde às partículas produzidas pela decomposição de restos de plantas e animais, constituídos por grupos funcionais complexos como anéis aromáticos, insaturados, carboxil, hidroxil fenólico, dentre outros. Esse grupos funcionais possibilitam a troca iônica do solo (JENNY, 1941).

O processo de formação do solo foi descrito por ROCHA et al (2004) e apresentada na figura 2.1.



2.1.1 A participação dos micro-organismos na degradação de hidrocarbonetos

O solo possui uma grande diversidade de micro-organismos, tais como bactérias, fungos, microalgas e protozoários (tabela 2.1). A presença e distribuição desses variam de acordo com o tipo e profundidade do solo.

Dentre a população microbiana, as bactérias estão envolvidas em quase todas as biotransformações que ocorrem no solo, incluindo o metabolismo de compostos orgânicos e inorgânicos. De acordo com a sua prevalência e diversidade sobre os demais micro-organismos, também como sua elevada taxa de crescimento e adaptabilidade, esses micro-organismos apresentam uma capacidade quase ilimitada na degradação de compostos naturais, além de xenobióticos recalcitrante. Por outro lado, os fungos filamentosos e leveduras são

importantes componentes na degradação de compostos complexos e em processos de decomposição de material orgânico sob condições de estresse ambiental, como, por exemplo, pH ácido, que comumente limita o crescimento bacteriano (PEPPER et al., 2006). Em muitos casos, os fungos tornam-se mais eficientes que as bactérias nos processos de degradação de contaminantes, por obter uma capacidade de sobreviver sob condições ambientais adversas (LEMOS et al., 2008).

Durante o metabolismo aeróbico, as bactérias utilizam o oxigênio como receptor de elétrons, processo no qual toda molécula de carbono é oxidada até dióxido de carbono, concomitante à produção de adenosina trifosfato (ATP). Por outro lado, existe uma parcela menor desses micro-organismos capazes de obter energia por outra via metabólica denominada respiração anaeróbica, um processo de fosforilação oxidativa utilizando como aceptores de elétrons moléculas de NO_3^- e SO_4^{2-} (CAMPBELL e LEWIS, 1967). A obtenção de energia por redução é menos eficiente quando compara àquela obtida utilizando oxigênio. Entretanto, o processo representa uma alternativa que pode permitir a sobrevivência do micro-organismo quando a disponibilidade de oxigênio no ambiente é reduzida. Segundo DIAZ (2004), a degradação microbiana do petróleo e seus produtos refinados é muito mais rápida em condições aeróbicas quando comparado às condições anaeróbicas.

Tabela 2.1 Densidade das populações microbianas presentes na superfície do solo por m^2 .

Microrganismos	População (nº células/g de solo)
Bactérias	$10^8 - 10^9$
Fungos	$10^5 - 10^6$
Algas	$10^4 - 10^5$

Fonte: TRINDADE (2002).

Em relação aos componentes do petróleo, a maior parte é biodegradável. A presença de hidrocarbonetos em toda a biosfera é um dos fatores que justifica a capacidade de muitos micro-organismos em utilizar esses compostos como matriz para crescimento (TONINI et al. 2010).

A molécula de hidrocarboneto é quebrada resultando em um composto mais simples, intermediário na via metabólica. A suscetibilidade dessas moléculas à degradação vai variar de acordo com a concentração do poluente e com o tamanho da molécula de hidrocarboneto (CHOSSON et al. 1991 *apud* TONINI et al. 2010).

2.1.2 Efeitos ambientais na degradação de hidrocarbonetos

É consenso entre os autores que a biodegradação do contaminante no solo dar-se, sobretudo, por meio das vias metabólicas de bactéria e fungos. Características como variabilidade genética, crescimento rápido e facilidade de aclimatação em diversos ambientes fazem desses seres alvos de estudos de biorremediação.

A otimização de parâmetros tais como pH, nutrientes, oxigênio, umidade e temperatura possibilita o maior desempenho desses micro-organismos. A máxima eficiência na degradação levará à formação de CO₂ e água.

❖ Disponibilidade de oxigênio

Em condições aeróbicas, a biorremediação ocorre com maior velocidade. Diferentes tipos e estratos do solo apresentam variação na disponibilidade desse gás, o que influencia diretamente no processo.

❖ Presença de matéria orgânica

A presença de matéria orgânica no solo possui duas vertentes que influenciam na degradação do contaminante. Primeiramente, a ocorrência de cometabolismo, fenômeno no qual o micro-organismo utiliza componentes da aderidos na matéria orgânica como fonte alternativa de substrato, que dá suporte ao crescimento da população microbiana.

❖ Disponibilidade de nitrogênio e fósforo

Bactérias heterotróficas e fungos utilizam carbono como principal fonte para obtenção de energia. Entretanto, é fundamental a presença de macronutrientes como nitrogênio e fósforo. A ausência dessas moléculas no ambiente pode resultar na redução do crescimento microbiano, conforme relatado em ATLAS e BARTHA (1972) *apud* PEREIRA *et al.* (1996).

❖ Temperatura

A temperatura varia de acordo com o ambiente e sazonalidade e esse fator influencia na velocidade catalítica das enzimas durante as reações metabólicas. Em geral, temperaturas ótimas para a degradação estão na faixa entre 20 e 35°C.

❖ pH

De uma forma geral, a faixa ótima de potencial hidrogeniônico para degradação está entre 6,0 e 8,0, sendo que os fungos são mais tolerantes a ambientes ácidos.

❖ Umidade

Na ausência de água as reações metabólicas tornam-se inviáveis. O teor de umidade é conhecido em % ou pF (logaritmo da altura da coluna de água em cm, que representa a pressão). Ao contrário do que se pensa, umidade ótima no solo nem sempre corresponde às condições ideais para o desenvolvimento dos micro-organismos, indicando que vários fatores interagem para fornecer a umidade adequada, sendo o extremo prejudicial à atividade microbiana.

❖ Gases

A aeração e a umidade são inversamente proporcionais no solo, devido ao movimento da água e substituição do espaço nos poros. A concentração do dióxido de carbono é de 10 a 100 vezes maior na atmosfera do solo, em consequência da respiração das raízes e micro-organismos, que consomem o oxigênio e produzem CO₂. Na medida em que se aprofunda nos extratos do solo, a tendência é haver a diminuição do oxigênio e aumento do CO₂.

É importante ressaltar que o processo de transformação e degradação de compostos orgânicos no solo depende tanto das características do solo quanto das características físico-químicas do contaminante, pois esses podem apresentar moléculas de peso molecular elevado ou elementos que contenham alogênios ou anéis aromáticos que são mais persistentes à degradação (MILLIOLI *et al*, 2008).

2.2 Óleo Diesel

O óleo diesel é um combustível utilizado em motores de combustão interna e ignição por compressão (PETROBRÁS, 2004). Ele é constituído por uma mistura de hidrocarbonetos, parafínicos, naftênicos e aromáticos, que são os principais componentes do óleo cru.

Os tipos de óleo diesel variam de acordo com o número de carbono existente na cadeia do hidrocarboneto. A classe diesel 1, por exemplo, é de C8 a C17, com a maioria na escala C10 a C14. O diesel 2 possui um número de carbono que varia de C8 a C26, com maioria na escala de C10 a C20. Os componentes principais do óleo diesel são similares aos presentes no óleo cru, sendo constituído, em sua maioria, por hidrocarbonetos alifáticos contendo de 9 a 28 carbonos em sua cadeia.

Uma das principais características das frações do diesel combustível é o seu alto teor de enxofre que, segundo BAIRD (2002), está associada, dentre outros fatores, ao seu processo de produção. Em geral, o teor de enxofre das frações do petróleo aumenta com o ponto de ebulição. Como o diesel é destilado em uma faixa de temperatura superior a de outros combustíveis como, por exemplo, a gasolina, o mesmo, normalmente, apresenta maior porcentagem desse elemento. A presença elevada de enxofre, no entanto, representa um dos principais problemas ambientais relacionados à exaustão dos motores a diesel. Isso se deve ao fato do motor promover a oxidação do enxofre, convertendo-o em óxidos de enxofre (SO_x) e sulfato, os quais contribuem não só para a formação de chuvas ácidas como também para a contaminação fotoquímica, mais conhecida como efeito *smog* (BAIRD, 2002; BRAUN *et al*, 2003).

A especificidade da contaminação do solo por óleo diesel reside no fato desse combustível incluir na sua composição total de hidrocarbonetos, compostos de elevada toxicidade, como os monoaromáticos, mais conhecidos pela sigla BTEX (benzeno, tolueno, etileno e xilenos), e os

policíclicos aromáticos (HPAs). Muitos desses, além de serem tóxicos a plantas e animais, podem também reagir com moléculas biológicas, tornando-se potenciais agentes carcinogênicos e eficientes mutagênicos. Ressalta-se que, embora a presença de BTEX seja mais relevante na gasolina, estudos recentes a cerca do derramamento de óleo diesel no país, mostram a presença de monoaromáticos neste combustível (KAIPPER; 2003; MAZZUCO, 2004; PALUDO, 2007).

2.3 A tecnologia da biorremediação

Nas últimas duas décadas, a técnica de biorremediação começou a ser mais utilizada com a finalidade de tratar solos e águas subterrâneas, por se tratar de uma tecnologia inovadora, viável e eficaz na remediação de ambientes contaminados com compostos orgânicos de difícil degradação (OLIVEIRA et al., 2007). Ela pode ser considerada uma tecnologia atrativa por conduzir a biotransformação parcial ou completa de muitos contaminantes orgânicos à biomassa microbiana e ao produto final inócuo estável (HARITASH e KAUSHIK, 2009). Essa tecnologia também tem sido considerada ambientalmente mais segura, menos onerosa e agressiva, e mais adequada para manter o equilíbrio ecológico quando comparada aos processos de tratamentos físico-químicos (SEMPLE *et al.*, 2001; GAYLARDE *et al.*, 2005). A biorremediação utiliza da capacidade dos organismos vivos presentes no solo - bactérias, fungos, algas, vírus e protozoários - em colonizar com sucesso vários nichos ecológicos (OLIVEIRA et al., 2008). Segundo CANHOS et al (1998), os micro-organismos do solo desempenham funções essenciais para o bom funcionamento e a manutenção dos ecossistemas, participando da ciclagem de nutrientes e fluxo de energia, da decomposição da matéria orgânica, da formação e estruturação do solo e da formação de gases componentes da atmosfera terrestre. O processo metabólico do micro-organismo na degradação de contaminantes foi descrito no item 2.1.1.

A biorremediação consiste em uma técnica que engloba tecnologias bastante versáteis (tabela 2.2) e, em alguns casos, estratégias diferentes visando à otimização do processo de degradação dos poluentes (DUA et al., 2002; DONLON e BAUDER, 2008). As tecnologias de biorremediação podem ser aplicadas sem que haja a necessidade de remoção ou transporte do solo contaminado (*in situ*) que inclui “bioventing”, “biosparging”, bioaumentação e atenuação natural (SEPÚLVEDA e TREJO, 2002; SPARKS, 2003). Segundo Rizzo et al., (2006), esses processos são fundamentados no bioestímulo natural do contaminante na subsuperfície do solo através da adição de nutrientes, oxigênio e, em alguns casos, bioaumentação (adição de micro-organismos). Existem, ainda, tecnologias de biorremediação que requerem primeiramente a remoção do material contaminado (*ex situ*) por escavação, drenagem ou qualquer outro

processo, para posterior tratamento do mesmo, que pode ser no próprio local contaminado (*on-situ*) - tecnologia landfarming - ou fora do local (*off-situ*) - biopilhas estáticas e biorreatores (BOOPATHY, 2000; SPARKS, 2003).

A escolha da aplicabilidade, *ex situ* ou *in situ*, depende da tecnologia a ser empregada, podendo ter custos mais elevados devido aos gastos com transporte e disposição final do solo removido (SEPÚLVEDA e TREJO, 2002). No entanto, em alguns casos, a remoção pode ser necessária, sobretudo pela natureza e concentração do contaminante, e possibilidade de contaminação de pessoas e do ambiente ao redor durante o processo de biorremediação (JACQUES et al., 2007). As aplicações *ex situ* são comumente mais investigadas devido à facilidade de serem avaliadas em escalas menores, todavia, são as aplicações *in situ* as mais adotadas em tratamentos de recuperação de áreas impactadas, por ser de baixo custo, apresentar menor risco de exposição ao contaminante e melhor aplicabilidade nos casos reais (USEPA, 2007). A decisão normalmente cabe ao responsável pela remediação, que atua no contexto financeiro e se baseia em recomendações de uma equipe de consultores. Estes especialistas apresentam as técnicas disponíveis para solucionar a contaminação em um curto período de tempo e da maneira mais econômica, sob uma supervisão de uma autoridade, que tende a ser neutra e sujeita às questões políticas (STIER, 2004). A tabela 2.2 reuni as principais tecnologias utilizadas no processo de remediação.

Tabela 2.2 Tecnologias empregadas no processo de biorremediação atualmente. Fontes: Boopathy, Vidali, Accioly e Siqueira (2000); Sepúlveda e Trejo (2002).

Tecnologia	Princípio	Aplicabilidade
Bioventing (in situ)	Introduzir ar e nutrientes na zona insaturada do solo de modo estimular a atividade biodegradadora dos microrganismos.	Compostos orgânicos biodegradáveis semi voláteis e não voláteis; Compostos orgânicos semi voláteis e não voláteis.
Biosparging (in situ)	Semelhante ao Bioventing, porém com duas diferenças: o ar é introduzido na zona saturada (lençol freático) com o objetivo de suprir as necessidade de oxigênio e transferir os poluentes voláteis para a zona insaturada para a degradação dos microrganismos.	
Air sparging (in situ)	Injetar ar na zona saturada do solo para volatilização dos contaminantes e remoção dos mesmos em sistemas coletor de gases.	Compostos orgânicos voláteis, dissolvidos (VOCs); solventes clorados e hidrocarbonetos do petróleo
Atenuação natural monitorada (in situ)	Consistir na degradação intrínseca ou natural pelos microrganismos autóctones do solo, sendo apenas monitorada e avaliada periodicamente.	Áreas contaminadas por vazamentos de tanques subterrâneos; benzeno tolueno,etilbenzeno e xileno - BTEX
Fitorremediação (in situ)	Empregar plantas para remover, transformar ou imobilizar os contaminantes.	Benzeno, tolueno, xileno, etilbenzeno e xileno, etilbenzeno, HPA, metais, pesticidas e herbicidas
Landfarming (ex situ)	Aplicação e incorporação dos contaminantes na superfície de um solo, onde se encontra grande parte dos microrganismos. O solo é arado e condições físico-químicas (água, nutriente e aeração) são ajustadas.	Petróleo e seus derivados
Compostagem (ex situ)	Usar microrganismos aeróbios termofílicos para degradar o material contaminado através do empilhamento estático ou aerado.	Gasolina, HPA, pentaclorofenol, hidrocarbonetos totais (HTP).
Biopilhas (ex situ)	Versão mais refinada do Landfarming que permite controlar a perda física dos contaminantes por lixiviação e volatilização.	Superfícies contaminadas em hidrocarbonetos de petróleo.
Biorreatores (ex situ)	Consiste em biodegradar o solo contaminado (fase sólida) e/ou fase aquosa (lama) em um sistema de contenção (reator) contendo vários aparatos com agitação e aeração para a atividade microbiana.	Hidrocarbonetos de petróleo; águas bombeadas de plumas de contaminação.

As principais vantagens da biorremediação *in situ* são: a não necessidade de remoção do solo ou da água subterrânea; custo-benefício superior aos tratamentos convencionais; destruição efetiva e não apenas remoção ou imobilização dos contaminantes (solução permanente). A biorremediação *ex situ* tem a vantagem de permitir maior intervenção e controle das variáveis de processo, ser mais rápida e menos dependente de alta condutividade hidráulica. Entretanto, tem como desvantagem a necessidade de escavação/ remoção do solo e/ou água (SEPÚLVEDA e TREJO, 2002; SPARKS, 2003).

A eficiência da biorremediação depende de um conjunto de fatores, tais como: condições ambientais (pH, temperatura, teor de umidade, nutrientes e oxigênio); biodegradabilidade do contaminante (propriedades físico-químicas, distribuição, contenção); disponibilidade de nutrientes; propriedades físico-químicas do substrato; concentração da biomassa e diversidade populacional da biota (BOOPATHY, 2000; PEPPER et al., 2006). Dentre esses, as condições ambientais (taxa nutricional e percentagem de oxigênio), a biodegradabilidade do contaminante, concentração de biomassa e diversidade populacional são fatores que influenciam fortemente no processo de biodegradação. Todavia, algumas estratégias de biorremediação foram desenvolvidas a fim de aperfeiçoar o processo de degradação dos contaminantes. Hoje, as mais usadas são: adição de surfactantes, de micro-organismos modificados geneticamente, de material estruturante, bioestímulo e bioaumento (ACCIOLY e SIQUEIRA, 2001; RIZZO et al., 2006).

A adição de surfactantes consiste em promover a metabolização dos contaminantes, principalmente de hidrocarbonetos, facilitando o transporte dos mesmos para o interior da célula ou diminuindo as interações superficiais com fração do solo (argila). Os surfactantes são constituídos por duas porções, uma hidrofóbica e outra hidrofílica, o que aumenta a solubilidade dos compostos presentes nos no óleo hidrocarbonetos, tornando-os disponíveis aos micro-organismos e facilitando a biodegradação dos mesmos (PIEPER e REINEKE, 2000; RIZZO et al., 2008).

Os organismos geneticamente modificados (OGMs) são organismos cujo seu material genético foi modificado em laboratório através de técnicas avançadas, que permitem alterar sua estrutura genética pela introdução de um gene modificado ou de um gene pertencente a uma outra variedade ou espécie, obtendo características específicas (SUZUKI, 2006). O uso de organismos geneticamente modificados tem por objetivo aumentar a taxa de degradação dos contaminantes, uma das principais limitações do processo de biorremediação (PAUL et al., 2005). Muitas rotas catabólicas de compostos complexos estão localizadas no genoma plasmidial e os processos de intercâmbio genético ocorrem através da transferência de plasmídeos (que pode ocorrer entre bactérias de uma espécie ou mesmo espécies diferentes), favorecendo a disseminação das enzimas relacionadas à biodegradação dos compostos recalcitrante (GAYLARDE et al., 2005). No entanto, esta estratégia deve ser bem avaliada,

uma vez que o conhecimento sobre os impactos da introdução destes organismos em áreas contaminadas é pouco conhecido (RIZZO et al., 2006).

A adição de material estruturante tem por finalidade reduzir a densidade do solo, aumentando a sua porosidade e facilitando a difusão de oxigênio entre as partículas sólidas, conseqüentemente, pode ocorrer alteração na capacidade de retenção de água do solo. Esses fatores aumentam a aeração do sistema solo-contaminante durante o processo de biorremediação. Dentre os materiais estruturantes podem-se empregar os materiais de origem orgânica ou inorgânica. Os materiais de origem orgânica incluem resíduos sólidos como casca de coco, palha, cavaco de madeira, serragem e farelo de trigo, sendo esses os mais citados na literatura em processos de biorremediação de solo contaminado com petróleo. Por outro lado, os materiais de origem inorgânica utilizados são a argila calcinada, a vermiculita, areia, perlita e cascalho (RIZZO et al., 2006).

O bioestímulo consiste de fontes de nutrientes adicionais para aumentar a atividade microbiana, tornando o processo eficaz. Geralmente, os micro-organismos necessitam de fontes de nutrientes inorgânicos em seus processos fisiológicos e bioquímicos. Para que a mineração ocorra é necessário que as relações nutricionais estejam dentro de uma faixa ótima (RIZZO et al., 2006). Mesmo em situações em que os micro-organismos não tenham como alvo os hidrocarbonetos como fonte de carbono, esses serão biodegradados mais rapidamente quando comparado ao processo de degradação natural, devido à elevação da população de micro-organismos causada pelo aumento dos níveis de nutrientes (SARKAR et al., 2005). A incorporação de nutrientes pode ser realizada na forma de fertilizantes orgânicos (biossólidos) e/ou inorgânicos (nitrogênio, fósforo e potássio), e oxigênio através da aeração do meio e/ou da adição de agentes oxidantes tais como peróxido de hidrogênio (SARKAR et al., 2005; RIZZO et al., 2006).

O bioaumento ou bioenriquecimento, como denominado por alguns autores, consiste na adição de micro-organismos ao sistema empregado para aumentar a biodegradação do solo contaminado e redução do período de adaptação dos micro-organismos presentes no sítio contaminado (SEABRA, 2005). O bioaumento pode ser realizado pela introdução de culturas puras de micro-organismos exógenos e /ou de um consórcio microbiano previamente selecionado para degradação de contaminante (endógeno ou exógeno) (SEABRA, 2005; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

O bioaumento apresenta um diferencial quando aplicado com a finalidade de biodegradar contaminantes ambientais complexos, particularmente os hidrocarbonetos de petróleo, devido ao emprego de consórcio microbiano que apresenta a possibilidade de aumentar a taxa de biodegradação dos contaminantes uma vez que diferentes micro-organismos degradam diferentes substâncias e alguns sobrevivem em condições ambientais adversas. No entanto, alguns autores (SEABRA, 2005; RIZZO et al., 2006, CIANNELLA, 2010) ressaltam que a

estratégia de bioaumento não supera significativamente a biodegradação em solo contaminado quando comparado à estratégia de simples ajuste de fatores ambientais (nutrientes, água, pH, entre outros).

3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1 Solo de estudo

O solo escolhido para esse estudo foi coletado no Parque Municipal de Gericinó (figura 2.2), localizado no município de Nilópolis, Rio de Janeiro. Trata-se de uma área pertencente à Área de Proteção Ambiental (APA) Gericinó-Mendanha, abrangendo as Serras do Marapicú, Mendanha e Madureira, com 105 km² de Serra, florestas remanescentes de Mata Atlântica, sistemas geohidrológicos, estruturas vulcânicas e nascentes de recursos hídricos contribuintes do rio Guandú.

A vegetação original da APA do Gericino-Mendanha é composta pela Mata Atlântica, classificada como Floresta Ombrófila Densa Montana e Submontana, que, ao longo dos anos, foi sendo devastada pelo intenso processo de ocupação humana, através da expansão das atividades rurais e urbanas, que foram modificando a sua paisagem.

As áreas florestais mais preservadas localizam-se nos vales profundos das cabeceiras dos rios e em outros locais de difícil acesso, como nas cotas altimétricas mais elevadas, onde ainda podem ser encontradas florestas em estado primitivo ou clímax. Esta condição confere ao maciço grande importância local, podendo ser considerado região prioritária para a preservação da biodiversidade e dos mananciais hídricos.

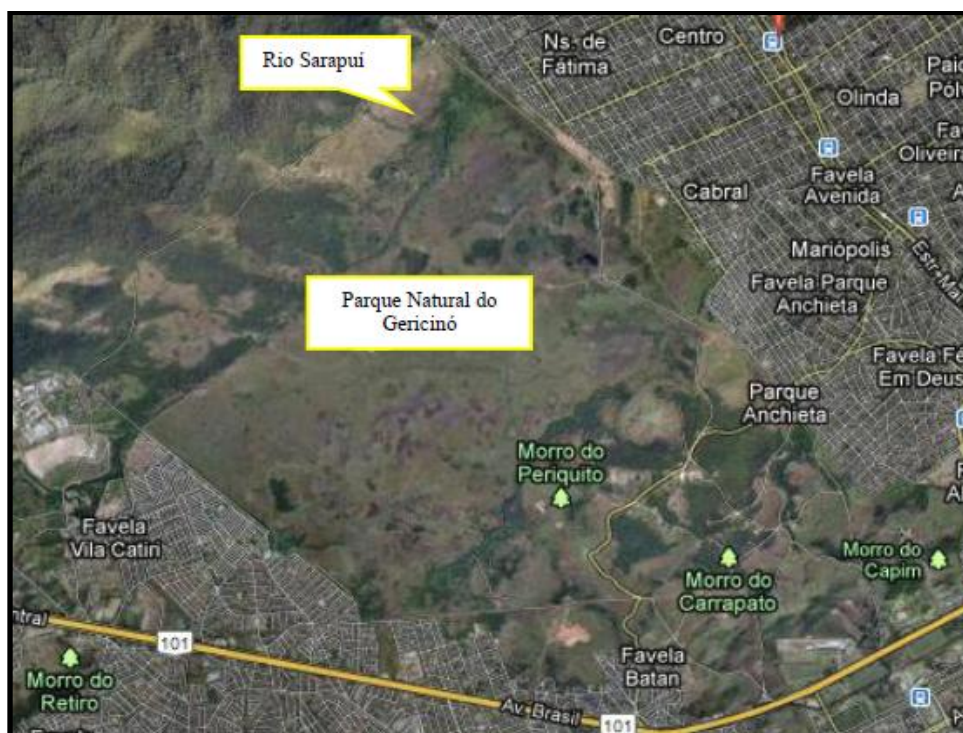


Figura 3.2 Localização geográfica do Parque Natural do Gericinó-Mendanha. Fonte: Google Maps (2012).

A parcela do parque utilizada nesse estudo possui área consideravelmente impactada, com forte presença de animais domésticos, depósito de resíduos, pressão urbana, poluição por esgoto doméstico, dentre outros.

As coletas foram realizadas em 03/12/2011, em quatro pontos do Parque, com diferentes tipos de vegetação e composição do solo, conforme apresentado a seguir.



Figura 3.3 (P1) Área do horto, com plantio de mudas e com solo exposto.



Figura 3.4 (P2) Área coberta por gramíneas.



Figura 3.5 (P3) Área com incidência de vegetação arbustiva e presença de manilhas e resíduos de construção civil.



Figura 3.6 (P4) Área com intensa cobertura vegetal e alta incidência de raízes na camada superficial.

Como primeiro passo fez-se a remoção da serapilheira (restos de vegetação e animais, em diferentes estágios de decomposição, que forma uma camada ou cobertura sobre o solo) contida na superfície do solo. A amostragem foi realizada com auxílio de uma pá, removendo solo da superfície até a profundidade de 20 cm. As quatro amostras foram acondicionadas em sacos plásticos limpos e transportadas ao Laboratório de Microbiologia do IFRJ - Campus Nilópolis,

onde foram pesados e armazenados até serem conduzidos à análise. Posteriormente, as amostras foram levadas ao Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, sendo distribuídas sobre bancadas, onde permaneceu por cerca de uma semana a temperatura ambiente para secagem. Após o período de secagem, todo o solo foi peneirado, em malha de 2,0 mm de abertura (Peneira Granutest ABNT 10; Tyler 9).

3.2 Caracterização do solo

O solo peneirado foi fracionado em duas partes, em proporções diferentes. A primeira parte foi destinada à caracterização física, química e biológica, conforme a figura 3.7 A segunda foi acondicionada em sacos plásticos e armazenada sob refrigeração de 4°C até a realização do experimento (LEE et al., 2007; MELO e AZEVEDO, 2008).

As amostras foram caracterizadas quanto ao pH, capacidade de campo, porosidade, textura e bactérias heterotróficas totais e fungos, a fim de selecionar o solo mais favorável ao processo de biorremediação.

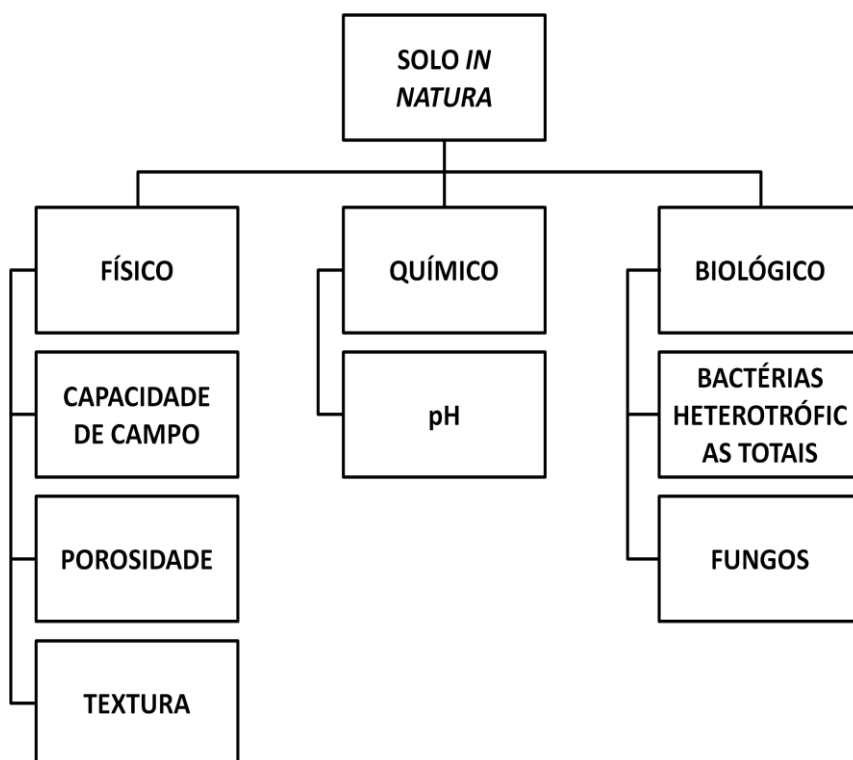


Figura 3.7 Fluxograma dos parâmetros físicos, químicos e microbiológicos avaliados no solo *in natura* (sem contaminação).

Capacidade de campo

A capacidade de campo (CC) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Trindade (2002). Com auxílio de uma proveta de 50 mL, de massa conhecida, pesou-se 50 g do solo de estudo úmido (m_{su}), formando uma pequena coluna. Adicionou-se água destilada gota a gota, até a condição de saturação. O sistema proveta + solo foi pesado (m_{ssa}) e levado à secagem em estufa a 110 °C, por 24 h. Ao final desse período, o sistema foi novamente pesado (m_{sse}) e a capacidade de campo determinada conforme as Equações 2 e 3.

$$m_{(ar)} = m_{(ssa)} - m_{(sse)} \quad (2)$$

$$C.C.(%) = \frac{m_{(ar)}}{m_{(su)}} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

m_{ar} = massa de água retida

m_{ssa} = massa do sistema saturado

m_{sse} = massa do solo seco

m_{su} = massa de solo úmido

CC = Capacidade de campo

Porosidade

Porosidade é o volume de poros totais do solo ocupado pelo ar ou pela água. Para calcular esse parâmetro, utilizam-se medidas de densidade de partícula (relação entre massa da amostra de solo e o volume ocupado pelas partículas) e densidade aparente (relação entre massa de uma amostra de solo seco a 110C e a soma dos volumes ocupados pelas partículas e pelos poros).

Para o cálculo da densidade de partícula foi utilizado o Método do Balão Volumétrico descrito no Manual de Métodos de Análise do Solo (EMBRAPA, 1997).

Textura

A textura do solo refere-se à proporção relativa em que se encontram os diferentes tamanhos de partículas, argila, areia e silte. Esse fator possui influência direta na taxa de infiltração de água, na aeração, capacidade de retenção da água, nutrição bem como na força de coesão das partículas do solo.

As análises textuais das amostras P1, P2, P3 e P4 foram efetuadas pelo Método da Pipeta, que é especialmente indicado para determinação da argila, podendo determinar também a fração de

silte. É um método de sedimentação, utilizando pipeta para retirar uma alíquota a profundidade e tempo determinado.

Determinação de pH

A determinação do pH da amostra de solo contaminado foi realizada de acordo com a metodologia descrita na *seção 3.4*. Adicionou-se a um becker de 10mL, 25mL de solução salina e 10mL de solo. A mistura foi homogeneizada e medido o pH das quatro amostras.

Quantificação dos micro-organismos heterotróficos totais

A quantificação da população microbiana heterotrófica total foi realizada pelo método padrão de diluição e contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) em placas de Petri. Consiste no plaqueamento de alíquotas da suspensão microbiana diluída sucessivamente, com a incubação das placas em estufa e posterior contagem direta do número de colônias (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Foi realizada a extração dos micro-organismos do solo adicionando 10 g desses em um frasco erlenmeyer de 250 mL, com 100 mL de solução salina 0,85%, mantendo sob agitação de 150 min⁻¹ em *shaker* por 30 min, a temperatura de 30 °C ± 1°, de acordo com os procedimentos adotados por LIMA (2004) e TRINDADE (2002). Após agitação foram realizadas diluições decimais seriadas da suspensão do solo, na faixa de 10⁻¹ a 10⁻⁸. A partir de diluições previamente escolhidas, prosseguiu-se o plaqueamento das mesmas em meio de cultivo sólido, através da técnica *pour plate*. Após solidificação do meio, as placas foram incubadas em estufa microbiológica a 30 °C ± 1°C, por 72 h.

Após o período de incubação foi quantificada a população heterotrófica total presente nas placas, utilizando um contador eletrônico de colônias. Para tal, utilizou-se a metodologia do Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento (MAPA, 2003), considerando-se o intervalo de precisão e repetibilidade de 30 a 300 colônias (placas com contagem de 30 a 300 colônias). Os resultados foram expressos em UFC g⁻¹ de solo.

Todo material e vidraria utilizados nas análises microbiológicas bem como o meio de cultura e a solução salina foram previamente esterilizados em autoclave a 121° C por 15 min. A tabela 3.3 apresenta os componentes utilizados no preparo do meio de cultura nos experimentos para bactérias. Em relação a fungos, foi utilizado o meio de cultura Agar rosa bengala, de forma a garantir a seletividade.

Tabela 3.3 Meio de cultura para contagem de micro-organismos heterotróficos totais.

Componentes	Quantidade (g/L)
glicose e/ou melão	10
extrato de levedura	2,5
Triptona	5
agar-agar	15

3.3 Diesel B5 usado nos experimentos

O óleo diesel B5 utilizado como contaminante nos experimentos respirométricos foi o mesmo utilizado por CIANNELLA (2010), sendo este preparado a partir de amostras de óleo diesel de referência e biodiesel de soja. A mistura foi preparada por pesagem dos respectivos percentuais de diesel/biodiesel adotado: 95/5 (g/g). Cabe ressaltar que, o diesel de referência é o diesel utilizado em ensaios de consumo de combustível e emissões veiculares para homologação de veículos automotores ciclo diesel (ANP, 2007).

Não foi possível obter a caracterização físico-química dos combustíveis, com exceção da densidade do óleo diesel, que era de 0,83 g cm⁻³. Entretanto, o óleo diesel de referência e o diesel B5 preparado foram caracterizados pelo Laboratório Analytical Solutions - RJ, quanto ao teor de hidrocarbonetos totais por cromatografia de fase gasosa com detector de ionização em chama (CG-FID).

O óleo diesel recebido foi armazenado até o uso sob refrigeração a 4 °C (CHAGAS-SPINELLI, 2007) e ao abrigo da luz, sendo o frasco, neste último caso, envolto em folha de papel alumínio. O biodiesel foi armazenado a temperatura de 20-25 °C, também ao abrigo da luz, de modo a evitar sua solidificação, perda de fluidez e fotoxidação (LOBÔ; FERREIRA; CRUZ, 2009).

3.4 Preparação e contaminação do solo (Ajuste de pH, contaminação do solo)

Ajuste do pH

O pH do solo *in natura* escolhido para o teste de respirometria foi ajustado para um valor próximo da neutralidade (7,0) e dentro da faixa de 6,5 a 7,5, considerada adequada à atividade da maioria dos micro-organismos (SARKAR et al., 2005). O ajuste foi efetuado pela adição de hidróxido de cálcio, Ca(OH)_2 , cuja quantidade foi determinada através de uma curva de neutralização, elaborada conforme metodologia de LIMA (2004) e apresentada no capítulo de resultados do presente trabalho.

Foram pesados $20 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ do solo de estudo e adicionados em um erlenmeyers com as seguintes quantidades de Ca(OH)_2 para cada ponto da curva: 0 (controle); 0,001 g; 0,006 g; 0,010 g; 0,015 g; 0,030 g; 0,050 g; 0,100 g; 0,300 g; 0,500 g. Cada sistema (erlenmeyer) foi homogeneizado e deixado em repouso por 24 h. Em seguida, foram adicionados, a cada um deles, 50 mL de água destilada. Os sistemas foram mantidos sob agitação de 150 min^{-1} em *shaker* por 1 h. Após agitação, os frascos foram deixados em repouso por mais 1 h para posterior medição dos valores de pH. Seguidamente, foi efetuada a construção da curva de neutralização de pH x massa de Ca(OH)_2 , apresentada no capítulo seguinte. Esta curva foi construída para orientar a quantidade necessária de Ca(OH)_2 a ser adicionado a massa de solo, de modo a promover o ajuste de pH do solo.

Para verificação do pH do solo adotou-se a metodologia descrita no Manual de Métodos de Análise de Solo (EMBRAPA, 1997), utilizando solução salina. Adicionou-se 10 mL em um becker de 10 mL e 25 mL da solução de KCl – 1N. O sistema solo + água foi agitado utilizando um tubo Falcon de 50 mL. A medição do pH foi realizada no líquido sobrenadante com auxílio de peagâmetro, previamente calibrado com soluções padrão de pH 4,0 e 7,0, e eletrodo combinado de vidro.

Contaminação

A partir da caracterização físico-química e biológica, foi escolhida a amostra de solo que apresentou as propriedades mais favoráveis à degradação do contaminante pelos micro-organismos autóctones.

A contaminação do solo foi realizada em recipientes plásticos aos quais foram adicionados o solo de estudo com pH ajustado e o Diesel B5, o que correspondeu a um percentual de contaminação de 5% (m.m^{-1} seco). Esse percentual teve como referência os experimentos realizados por CIANNELLA (2010), onde foi utilizado como contaminante o mesmo hidrocarboneto. A homogeneização foi realizada misturando-se manualmente o contaminante ao

solo, seguido de transferência para sacos plásticos escuros e acondicionados sob refrigeração de 4°C, durante 15 dias, até a realização do experimento.

3.5 Descrição do respirômetro de Bartha

No presente estudo foram utilizados respirômetros de Bartha preconizados pela norma NBR 14283 (ABNT, 1999) com algumas adaptações. Trata-se de um sistema fechado, constituído de duas câmaras interligadas (Figura 3.8 - Letra G e Figura 3.8- Letra D).

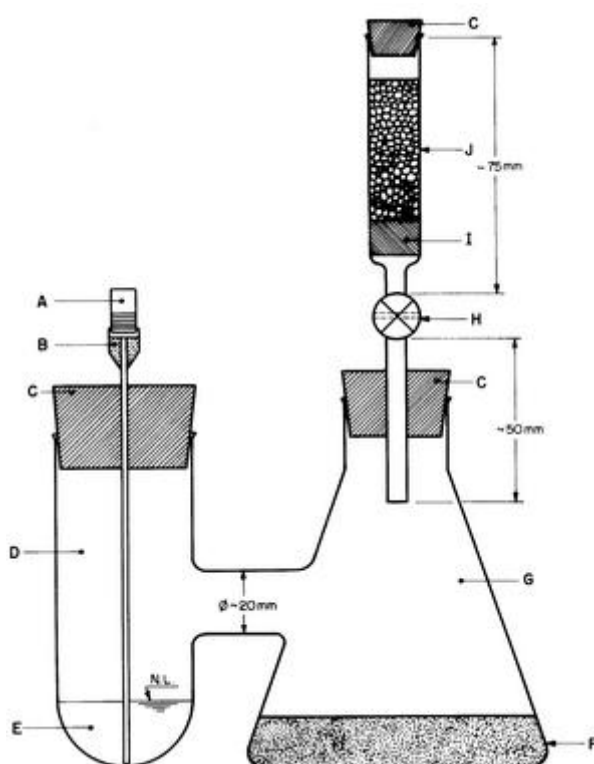


Figura 3.8 Esquema do respirômetro de Bartha preconizado na NBR 14283. Fonte: ABNT (1999).

O princípio do teste baseia-se na captura e quantificação do CO₂ gerado durante o processo de respiração aeróbia, o qual ocorre na câmara principal (Figura 3.8 - Letra G) onde se encontra a amostra de solo. O gás produzido é dissolvido em uma solução alcalina de hidróxido de potássio (KOH), colocada na câmara secundária (Figura 3.8 - Letra D). A quantificação do CO₂ é feita em instantes de tempo regulares, através da titulação da alcalinidade residual da solução de KOH com uma solução de ácido clorídrico (HCl), na presença de cloreto de bário (BaCl₂). Uma vez que a respiração representa a oxidação da matéria orgânica pelos micro-organismos

aeróbios presentes no solo, pode-se estimar, através da evolução do CO₂, a quantidade de carbono biodegradado durante o processo de mineralização do contaminante (ANDREO, 1999; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

3.6 Planejamento experimental

O planejamento experimental é empregado para se obter as melhores condições operacionais de um sistema sob estudo, realizando-se um número menor de experimentos quando comparado ao processo univariado. O planejamento fatorial determina quais fatores têm efeitos relevantes nas respostas e como um efeito de um fator varia com os níveis dos outros fatores.

Foram percorridas algumas etapas para otimização do processo. Primeiramente, as condições descritas na literatura como ótimas para biorremediação de solos foram estudadas (faixas de pH, umidade). As variáveis independentes consideradas mais relevantes e escolhidas para o presente estudo foram: pH e umidade. A variável dependente ou resposta selecionada para medir indiretamente a eficiência de biodegradação foi à evolução de geração de CO₂ (indicador da respiração do solo) quantificada durante o experimento, através do método respirométrico de Bartha (ABNT, 1999). Por tratar-se de dois fatores ou variáveis independentes, optou-se pela utilização do Planejamento Fatorial Completo (2²) com ponto central (tabela 3.4). Para esse planejamento foram necessários 11 ensaios, sendo 9 ensaios fatoriais representados pelo vértice do cubo, 3 ensaios repetidos (duplicata) na condição central. Esse foi necessário para verificar a tendência de linearidade e cálculo do erro experimental

Tabela 3.4 Valores utilizados no Planejamento Experimental Fatorial.

Variáveis	Código	-1	0	+1
pH	x ₁	6,5	7,0	7,5
Umidade*	x ₂	40%	50%	60%

*Calculado com base em 50% da capacidade de campo.

3.7 Montagem dos respirômetros de Bartha

A partir do solo contaminado, foi realizada a montagem dos sistemas de tratamento para cada condição experimental descrita na tabela 3.5, a fim de obterem-se as melhores condições experimentais para o processo de degradação do hidrocarboneto. O tratamento Controle

(controle - solo sem contaminação) foi realizado com o objetivo de quantificar a produção de CO₂ proveniente apenas da atividade microbiana do solo sem a influência do contaminante.

A umidade foi corrigida pela adição de água destilada. O volume total de água a ser adicionado foi calculado a partir da Equação 1:

$$m_{\text{água ajuste}} = m_{\text{água 30\%CC}} - m_{\text{água umidade}} \quad (1)$$

Onde:

$m_{\text{água ajuste}}$ = massa de água necessária para o ajuste;

$m_{\text{água 30\%CC}}$ = massa de água correspondente a 30% da capacidade de campo do solo;

$m_{\text{água umidade}}$ = massa de água correspondente ao teor de umidade do solo, determinada previamente à contaminação do solo.

Após a introdução do solo em cada sistema procedeu-se a preparação do sistema de absorção de CO₂ que consistiu na adição de 10 mL de uma solução de KOH 0,2 mol L⁻¹ na câmara secundária do respirômetro (Figura 3.8 – Letra D) (ABNT, 1999).

A montagem de cada sistema de tratamento foi iniciada pela adição de uma alíquota de 50 g de solo contaminado a 5 % (m.m⁻¹) de óleo diesel B5.

Tabela 3.5 Delineamento dos tratamentos empregados no teste respirométrico.

Respirômetros	Condições experimentais
CONTROLE	Solo sem contaminação + sem ajuste de pH+ sem ajuste de umidade
1 e 2	Solo com contaminação + 40%CC + pH= 7,5
3 e 4	Solo com contaminação + 40%CC + pH= 6,5
5 e 6	Solo com contaminação + 60%CC + pH= 7,5
7 e 8	Solo com contaminação + 60%CC + pH= 6,5
9, 10 e 11 PONTO CENTRAL	Solo com contaminação + 50%CC + pH=7,0

3.8 Monitoramento do ensaio respirométrico

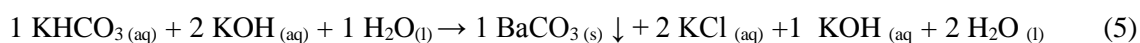
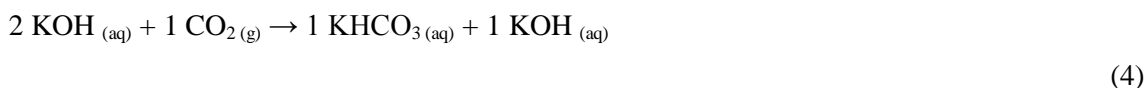
Após a montagem, os respirômetros foram conduzidos à estufa, a temperatura de $28\text{ C} \pm 2\text{ C}$, onde permaneceram por 30 dias. A quantidade de CO_2 produzida em cada respirômetro foi determinada em intervalos regulares de 24 horas, pelo método titulométrico preconizado na NBR 14283 (ABNT, 1999). A cada 24 horas, durante o procedimento de titulação, o filtro de ascarita (Figura 3.8 – Letra J) permaneceu aberto por cerca de 90 segundos para aeração do sistema.

A partir da produção diária de CO_2 , acumulada ao longo dos 30 dias de experimento, estimou-se a quantidade total de carbono biodegradado em cada tratamento. O cálculo para tal determinação encontra-se descrito na seção seguinte.

3.9 Quantificação da produção de CO₂

A determinação da quantidade de CO₂ produzida foi realizada através da titulação da alcalinidade residual da solução de KOH 0,2 mol L⁻¹, contendo o CO₂ dissolvido, com solução de HCl 0,1 mol L⁻¹. A solução de KOH foi retirada do respirômetro de Bartha utilizando-se uma seringa de 10 mL, e conduzida para um frasco erlenmeyer de 250 mL. Durante esse procedimento a válvula do filtro da ascarita (Figura 3.8 - Letra H) permaneceu aberta com objetivo de viabilizar a aeração e a substituição de outra alíquota de 10 mL de KOH isenta de CO₂ no braço secundário do respirômetro (Figura 3.8 - Letra D), de forma a dar continuidade à captura do CO₂ produzido pela mineralização proveniente da biodegradabilidade de hidrocarbonetos. Antes de realizar a troca de KOH no braço secundário foram feitas três lavagens com água descarboxilada no braço, utilizando a seringa de 10 mL e água de lavagem foi adicionada aos 10 mL de KOH contendo CO₂ dissolvido, 2 gotas de fenolftaleína e 1 mL de solução de BaCl₂ para precipitar o carbonato presente na solução e, em seguida, foi realizado a titulação com a solução de ácido clorídrico.

As principais reações que ocorrem no ensaio respirométrico estão representadas nas Equações 4, 5 e 6.



Para cada dia de ensaio, as soluções de KOH e HCl foram previamente padronizadas, de acordo com os procedimentos descritos na NBR 14283 (ABNT, 1999). Um controle branco constituído por 10 mL da solução de KOH 0,2 mol L⁻¹, 2 gotas de fenolftaleína, 1 mL da solução de BaCl₂ 0,5 mol L⁻¹ e 30 mL de água destilada isenta de CO₂ também era conduzido. Ressalta-se que a água isenta de CO₂ era produzida diariamente.

A produção diária de CO₂ em cada respirômetro foi calculada a partir da Equação 7:

$$\text{CO}_2(\text{mg}) = (A - B) \times 50 \times 0,044 \times f_{\text{HCl}} \quad (7)$$

Onde:

CO_2 (mg) = μmol de gás carbônico produzido durante a respiração do solo contaminado.

A = A média do volume gasto de HCl 0,1M durante a titulação do teste em branco.

B = A média do volume gasto de HCl 0,1M durante a titulação do ensaio respirométrico com solo.

50 = Fator para transformar equivalente em mol de CO_2

0,044 = fator para transformar $\mu\text{mol}_{\text{CO}_2 \text{ SU}}$ em $\text{mg}_{\text{CO}_2 \text{ SU}}$

f_{HCl} = fator de correção da normalidade do HCl

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Curva de neutralização

A curva de neutralização encontrada para ajuste do pH do solo por meio da adição de hidróxido de cálcio está apresentada na figura 4.9. Baseado na equação representada no gráfico abaixo, para ajuste do pH= 6,5 ; 7,0 e 7,5 para cada 20g de solo, foi adicionado 0,00171g; 0,0285g e 0,046g de hidróxido de cálcio, respectivamente.

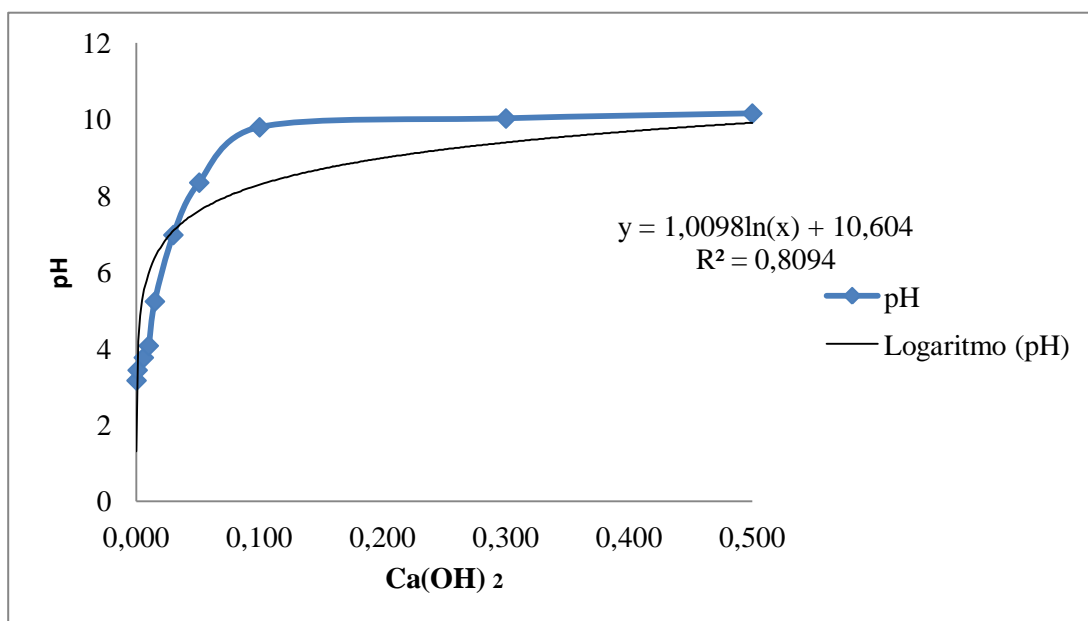


Figura 4.9 Curva de neutralização de pH, massa de Ca(OH)_2 versus pH.

4.2 Caracterização do Diesel B5

Na tabela 4.6 está representada a quantificação dos HTP e suas frações, assim como dos 16 HPAs prioritários presentes no óleo diesel puro e no óleo diesel B5. Pode-se observar uma quantidade considerável de HPAs no óleo diesel (tabela 4.6), fato documentado por vários autores (MAZZUCO, 2004; PALUDO, 2007).

Tabela 4.6 Caracterização química do óleo diesel puro e do diesel B5 quanto os hidrocarbonetos de petróleo.

Parâmetros	Óleo diesel	Diesel B5
	mg Kg⁻¹	
<i>n</i> -alcanos	85138,49	97386,10
HRP	228716,98	28906,06
UCM	451584,47	487130,91
HTP	680301,44	776194,97
HPAs		
Naftaleno	254,596	243,158
Acenaftileno	9,993	12,243
Acenafteno	50,796	50,924
Fluoreno	48,106	40,288
Fenantreno	126,203	152,491
Antraceno	12,353	17,985
Fluoranteno	2,132	9,547
Pireno	33,551	37,438
Benzo[a]antraceno	3,967	4,927
Criseno	2,776	1,924
Benzo[b]fluoranteno	0,493	0,708
Benzo[k]fluoranteno	0,201	0,561
Benzo[a]pireno	0,408	0,435
Indenol[1,2,3-cd]pireno	0,067	0,081
Dibenzo[a,h]antraceno	0,026	0,026
Benzo[g,h,i]perileno	0,233	0,281
2-metil-naftaleno	494,855	404,210
1-metil-naftaleno	335,412	348,809
Total de HPAs	1376,18	1426,04

*Nota: HRP = hidrocarbonetos resolvidos do petróleo; UCM = mistura complexa não resolvida; HTP = hidrocarbonetos totais de petróleo.

4.3 Caracterização do solo *in natura*

Foi realizada a caracterização físico-química e biológica do solo das quatro amostras coletadas no Parque Natural do Gericinó (P1, P2, P3 e P4), os quais estão apresentados na tabela 4.7.

Em relação à capacidade de campo, o solo correspondente ao P3 apresentou o menor resultado (21,9%), o que evidencia que a quantidade de água capaz de ser retida nesse solo é inferior aos demais solos analisados. Por outro lado, a capacidade de campo do solo P2 (35,7%) mostrou-se superior, atribuindo uma maior retenção de umidade no solo (tabela 4.7).

De todas as amostras de solo analisadas, o P2 apresentou maior teor de areia (77,5%), seguido do P1 (72,91) (tabela 4.7). Solos com teores de areia superiores a 70% e de argila inferior a 15% são classificados como leves permeáveis e de baixo teor de matéria orgânica. A textura do solo possui aspectos relevantes que interferem na atividade química e microbiológica do solo.

A porosidade do solo é constituída pelo espaço poroso após o arranjo de componentes da parte sólida do solo ocupada por água e ar. No caso dos solos analisados, o P2 apresentou porosidade total de 89,2%, seguido do P1 com 83,7%, P3 com 77% e o P4 com 72,3% (tabela 4.7).

Tabela 4.7 Caracterização física, química e biológica em solo *in natura*.

Parâmetros/Pontos de amostragem	P1	P2	P3	P4
Capacidade de Campo %	22,33	35,7	21,9	32,2
Teor _{areia} %	72,91	77,5	61,11	59,1
Teor _{argila} %	8	6,9	8,6	10
Teor _{silte} %	19,09	15,6	30,29	30,9
Porosidade total %	83,7	89,2	77	72,3
pH	3,5	3,16	5,91	3,55
Bactéria heterotrófica Total (UFC)	50 X 10 ³	54 X 10 ³	41 X 10 ³	37 X 10 ³
Fungos (UFC)	230 X 10 ³	257 X 10 ³	98 X 10 ³	101 X 10 ³

SCHEFFER et al, (1998) e KIEHL et al, (1979) relataram em seus estudos que, tanto a textura quanto a porosidade do solo influenciam diretamente na densidade e permeabilidade deste, atingindo a distribuição de gases e água, de forma que, quanto maior a densidade do solo mais compacto será e menor será a porosidade. Nesse sentido, entende-se que solos com maior teor de argila possuem maior resistência ao tratamento de biorremediação quando comparados às frações mais arenosas. Além disso, os autores ressaltam que a textura influencia diretamente na capacidade de retenção do contaminante, de forma que, solos mais argilosos retêm com mais facilidade uma quantidade maior do contaminante, impedindo que esses estejam disponíveis à degradação por micro-organismos.

A capacidade de campo juntamente com a textura e porosidade são fundamentais no processo de biorremediação de solos contaminados, conforme observado por BAPTISTA, 2003; SEABRA, 2005 e CHAGAS-SPINELLI, 2007. Os resultados encontrados no presente trabalho corroboram com o descrito pela literatura. Teores ideais de água no solo para atividade microbiana estão na faixa de 12% a 30% (m/m), correspondendo a 40% - 85% da capacidade de campo (SILVA, 2004).

O parâmetro pH foi medido e analisado em todas as amostras de solo. Com extrema influência sobre o metabolismo dos micro-organismos, esse parâmetro apresentou-se relativamente o mesmo para todos os pontos, com exceção do P3, onde foi medido pH= 5,91. Segundo a literatura, a faixa ótima para atividade da maioria dos micro-organismos está entre 6,5 e 8,5

(SARKAR et al, 2005). Nesse contexto, optou-se em um segundo momento pelo ajuste de pH para otimização do processo.

Os micro-organismos, por meio de seu metabolismo, são capazes de promover a degradação de contaminantes presentes no solo. Uma vez que a maior parte dos hidrocarbonetos do petróleo é biodegradável, grupos diferentes de organismos atuam na degradação desses componentes. Fungos e bactérias atuam na degradação de substratos semelhantes, fazendo com que os dois grupos sejam competitivos. Entretanto, os fungos são menos influenciados pela umidade e pH do meio, atribuindo uma vantagem competitiva em relação às bactérias (PEREIRA, 2009).

Por outro lado, para a melhor eficiência na mineralização da matéria orgânica por fungos ou bactérias, deve-se considerar não apenas as condições ambientais bem como o tipo de solo, complexidade e toxicidade do contaminante e agente competitivo. SONG et al. (1986), por exemplo, observaram que em solo arenoso sem histórico de contaminação, 82% de n-hexadecano foi mineralizado por bactérias, enquanto que fungos mineralizaram 13% desse hidrocarboneto. De forma similar, em outros trabalhos, bactérias foram evidenciadas como mais eficientes degradadoras do que fungos leveduriformes. Complementarmente, poucos trabalhos reportam que espécies de leveduras sejam melhores degradadoras que espécies bacterianas (IJAH, 1998).

Nesse trabalho foi realizada a quantificação dos micro-organismos presentes nas amostras, utilizando, para isso, meios de cultura seletivos, avaliando a quantidade de fungos e bactérias em cada amostra. Foi constada presença de micro-organismos em todos os solos analisados, entretanto, uma proporção superior foi encontrada no solo P2. Vale ressaltar que, embora todas as amostras tenham sido coletadas no Parque Natural do Gericinó, esse possui características de vegetação diferentes, o que atribui propriedades biológicas diferenciadas. No caso do P2, nessa área foi observada formação arbustiva e intensa cobertura de gramíneas no solo, o que pode ter influência sob a população microbiana. Segundo JENNY (1941), a vegetação natural não pode ser vista como um fator independente, tendo forte influência sobre as características do solo.

Com base na caracterização dos solos em questão, optou pela utilização da amostra P2 para os testes respirométricos, uma vez que esse solo apresentou condições físico-químicas e biológicas mais favoráveis para a biorremediação. Ressalta-se que a otimização do processo pode ser feita utilizando todos, ou alguns parâmetros ambientais, caracterizando um tratamento por bioestímulo.

4.4 Testes de Respirometria de Bartha

Baseado no solo controle, sem contaminação, é possível observar a evolução na geração de CO₂ durante o processo de biorremediação, sendo possível avaliar os perfis de degradação de acordo com as condições físico-químicas testadas (figura 4.10).

O teste de respirometria ocorreu ao longo de 15 dias, conforme o gráfico da figura 4.10. Nele estão representadas as quatro condições testadas, a fim de obter-se a melhor condição física e química para o processo de remediação do solo contaminado por óleo diesel B5. Observa-se que, para todas as condições testadas, a geração de CO₂ foi crescente até o dia 7 de experimento. A partir desse período, foi constatada a estabilidade na produção desse gás, indicando que a matéria orgânica presente no solo foi metabolizada pelos micro-organismos endógenos.

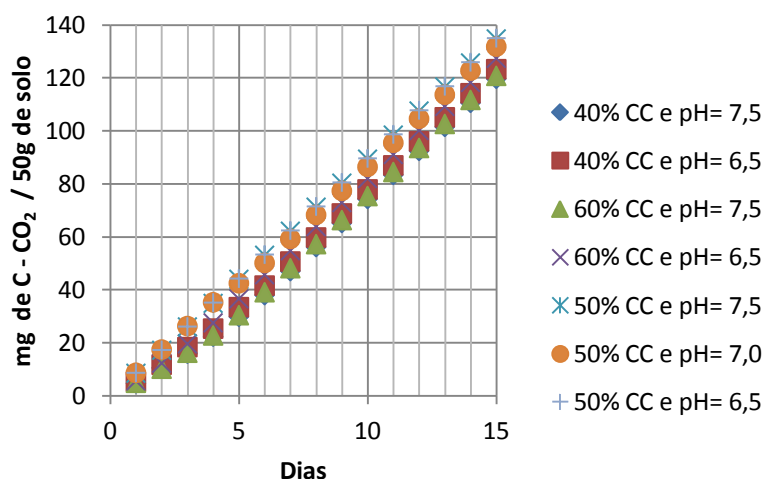


Figura 4.10 Representação gráfica da quantidade de C-CO₂ (mg/50g de solo) gerada para cada condição experimento testada por meio da Respirometria de Bartha.

Embora todos os tratamento tenham atingido a degradação do óleo diesel até o final do experimento, a condição 60% CC e pH= 6,5 foi a que apresentou uma degradação mais rápida, com geração de 5,64 mg C-CO₂ em 50g de solo, ainda no dia 1. A degradação manteve-se superior aos demais tratamentos ao longo de todo período do teste, atingindo o ápice no dia 5 (9,08 mg C-CO₂). Por outro lado, em 40% CC e pH= 7,5 os micro-organismos apresentaram eficiência de degradação inferior (4,72 mg C-CO₂), indicando que a queda na umidade do solo em conjunto com a elevação de pH foram desfavoráveis à metabolização do substrato (Apêndice – tabela 8).

A geração de CO₂ logo no primeiro dia de experimento para todos os tratamentos sugere que os micro-organismos do solo não necessitaram de um período de adaptação, uma vez que não foi utilizada a técnica de bioaumento neste experimento.

De acordo com SARKAR et al (2005), os micro-organismos podem ou não, inicialmente, ter como alvo os hidrocarbonetos como fonte de carbono. Entretanto, os hidrocarbonetos são degradados mais rapidamente quando comparado ao processo de degradação natural, devido à elevação da população de micro-organismos, causado pelo ajuste nas condições ambientais. Ressalta-se a importância da análise do teor de óleo ao final do processo de biorremediação, a fim de verificar a degradação total ou parcial do hidrocarboneto, corroborando com os resultados encontrados no teste respirométrico.

CONCLUSÕES

Por meio da caracterização físico-química e biológica dos solos coletados no Parque Natural de Gericinó, observou-se que a composição heterogênea da vegetação do Parque possui forte influência sobre as condições ambientais do solo e, conseqüentemente, sobre a população microbiana.

Das quatro amostras de solo analisadas, o P2, solo presente em uma área do Parque coberta por gramíneas, apresentou melhores condições para o processo de biorremediação, sob o ponto de vista de população microbiana, pH do meio, umidade, granulometria e textura das partículas do solo.

A caracterização biológica indicou a predominância de fungos nas amostras de solo analisadas no Parque Natural do Gericinó.

Através do teste de respirometria de Bartha otimizado por meio do Planejamento Fatorial, foi possível concluir, que, para o solo em questão, contaminado com 5% de óleo diesel B5, as condições mais favoráveis para o processo de degradação por micro-organismos deu-se em 60% da capacidade de campo e pH= 6,5.

Sugere-se a análise de hidrocarbonetos ao final do experimento, a fim de confirmar a degradação total ou parcial do óleo, indicada pela produção de CO₂ no meio.

Estudos voltados para a tecnologia de biorremediação são importantes ferramentas para o gerenciamento de áreas contaminadas, devendo ser direcionados com base na composição e condições do solo, tipo de contaminante e fatores ambientais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; SCHAEFER, C. E. Tópicos em ciência do solo. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, v. 1, p. 299-352, 2000.

ANDREO, Ana Paula. Ensaio de respirometria: monitoração do CO₂ utilizando um sistema de FIA com detecção condutométrica. 1999. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil na Área de Saneamento e Ambiente) - Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

ATLAS, R. M. & BARTHA, R.(1972): Microbial Ecology: Fundamentals and Applications. Menlo Park, California. Benjamin/Cumins Publishing Company.

BAIRD, Colin. Química Ambiental. 2 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 622 p.

BAPTISTA, Sandro José. Seleção das melhores condições de biodegradação de petróleo em solo argiloso. 2003. 163 f. Dissertação (Mestrado em Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria do Petróleo e Gás Natural) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. Bioresource Technology, v. 74, n. 1, p. 63-67, Aug. 2000.

BRAUN, S.; APPEL, L. G.; SHMAL, M. A poluição gerada por máquinas de combustão interna movidas à diesel – a questão dos particulados. Estratégias atuais para redução e controle das emissões e tendências futuras. *Química Nova*, v. 27, n. 3, p. 472-482, May/June, 2003.

CANHOS, V. P.; COUTINHO, H. L. C.; VAZOLLER, R.; RUMJANEK, N.; ROSADO, A.; BARROS, E.; AZEVEDO, J. L. PELLIZARI, V.; MOREIRA, F.; SIQUEIRA, J. O.; MORAIS, G.; SCHENBERG, A. C. Estratégia nacional de diversidade biológica. Microorganismos e biodiversidade de solos. 1998. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/doc/gtt10.pdf>>. Acesso em: 24 out. 2008.

CHAGAS-SPINELLI, Alessandra Carla Oliveira. Biorremediação de solo argiloso contaminado por hidrocarbonetos poliaromáticos provenientes de derrame de óleo diesel. 2007. 174 f. Tese (Doutorado em Geociências) - Centro de Tecnologia e Geociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

CIANNELLA, Roberta Carvalho. Avaliação de diferentes estratégias de biorremediação no tratamento de solo contaminado por óleo diesel B5. 2010. Dissertação (Mestrado em Química Ambiental) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

DÍAZ, E. 2004. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology*, 7: 173-180.

DOLON D. L., BAUDER J. W., (2008). A General Essay on Bioremediation of Contaminated Soil, online at: <http://waterquality.montana.edu/docs/methane/Donlan>.

EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Solos (CNPS). Manual de métodos de análise de solo 2.a ed. Rio de Janeiro, EMBRAPA - CNPS, 1997. 212p. (EMBRAPA-CNPS. Documentos; 1).

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação. *Biotechnology Ciência & Desenvolvimento*, ano 8, n. 34, p. 36-43, jan./jun., 2005.

JACCQUES; R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 37, n. 4, p.1192-1201, jul./ago., 2007.

KAIPPER, Beatriz Inês Almeida. Influência do etanol na solubilidade de hidrocarbonetos aromáticos em aquíferos contaminados por óleo diesel. 2003. 178 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

KIEHL, E.J. Manual de edafologia. São Paulo: Agronômica Ceres, 1979.

LEE, Y. B.; LORENZ, N.; DICK, K. L.; DICK, R. P. Cold storage and pretreatment incubation effects on soil microbial properties. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 71, n. 11, p. 1299-1305, July/August, 2007.

LEMOES, J. L. S.; BARROS, C. A.; OLIVEIRA, S. D.; REICHE, A. P. Fungos filamentosos: agentes de degradação de petróleo e de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs). Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008. 58 p. (Tecnologia Ambiental, 46).

LIMA, Cristiane Andrade. Quantificação do decréscimo do risco associado à biorremediação de um solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo. 2004. 106 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

HAITASH, A.K., KAUSHIK, C.P. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review, *J. Hazard. Mater.* 169:1–15.

HARAYAMA, S., KOK, M., and NEIDLE, E.L. 1992. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 565-601.

IJAH, U.J.J. 1998. Studies on relative capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in degrading crude oil. *Waste Management* 18: 293-9.

JACCQUES; R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 37, n. 4, p.1192-1201, jul./ago., 2007.

JENNY, H. *Factors of Soil Formation*. New York, Mcgraw-Hill, 1941. 281p.

JENNY, H. 1994. Factors of Soil Formation. A System of Quantitative Pedology. New York: Dover Press, 1941.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, L. S. C.; CRUZ, R. S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.

MAZZUCO, Lilian Maria. Atenuação natural de hidrocarbonetos aromáticos em aquíferos contaminados com óleo diesel. 2004. 82f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Estratégias de isolamento de microorganismos envolvidos na degradação de xenobióticos. In:_____. Micro-biologia Ambiental. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. Cap. 9, p. 99-216.

MEURER, E. J. Fundamentos de química do solo. Porto Alegre: Editora Genesis, p. 174, 2000.

MILLIOLI, V. S.; SOBRAL, L. G. S.; SÉRVULO, E. F. C.; CARVALHO, D. D. Biorremediação de solo impactado com óleo cru: avaliação da potencialidade da utilização de surfactantes. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008. 95 p. (Tecnologia Ambiental, 50).

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Micro-biologia e bioquímica do solo. 2 ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

NORMA BRASILEIRA 14283. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Resíduos em Solos – determinação da biodegradação pelo método respirométrico, 1999.

OLIVEIRA, T. B.; COSTA, G. M.; MARQUES, M.; CORRÊA, S. M. MACEDO, J. R. Biorremediação de solos contaminados por diesel e mistura de diesel/biodiesel-B5 em biorreatores aeróbios. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 24, 2007, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: ABES, 2007.

PALUDO, Deise. *Intemperização de fontes de contaminação de óleo diesel em águas subterrâneas na presença e ausência de etanol*. 2007. 140 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

PAUL, E.A., CLARK, F.E., 1989, Soil Microbiology and Biochemistry. San Diego, Academic Press, Inc.

PAUL, D.; PANDEY, G.; PANDEY, J. M.; JAIM R. K. Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. TRENDS in Biotechnology, v. 23, n.3, p. 135-142, March., 2005.

PEPPER, I. L.; GERBA, C. P.; BRUSSEAU, M. L. Environmental and pollution science. 2 ed. San Diego, Califórnia: Academic Press, 2006, 532 p.

PEREIRA, N.; GOMES, E. B. e SOREANO, A. U. Biodegradação de Hidrocarbonetos. Séries em Biotecnologia, v.3, primeira edição, 2009.

PETROBRÁS. *Produtos automotivos*. Disponível em: <<http://www.br.com.br/wps/portal/PortalDeConteudo>>. Acesso em: 20 out. 2012.

RIZZO, A. C. L. et al. Preliminary identification of the bioremediation limiting factors of a clay bearing soil contaminated with crude oil. J. Braz. Chem. Soc.[online]. 2008, vol.19, n.1, pp. 169-174. ISSN 0103-5053.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; CARDOSO, A. A.; Introdução à química ambiental – Porto Alegre, 2004.

SARKAR, D. M.; 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, n. 1, p. 187-195, 2005.

SCHEFFER, P. Lehrbuch der Bodenkunde. 14 ed. Stuttgart: Enke, 1998.

SEMPLE, K. T.; REID, B. J.; FERMOR, T. R. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution*, v. 112, n. 2, p. 269-283, 2001.

SEPÚLVEDA, T. V.; TREJO, J. A. V. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. México: INE-SEMARNAT, 2002. 64 p.

SILVA, Edmilson Pinto. Avaliação preliminar do potencial de aplicação da tecnologia de biopilhas para a biorremediação do solo de Guamaré- RN. 2004. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, 2004.

SONG, X.; WANG, J.; HUANG, W.; LIU, L.; YAN, G.; PU, R. The delineation of agricultural management zones with high resolution remotely sensed data. *Precision Agriculture*, v. 10, p. 471-487, 2009.

SPARKS, Donald. L. *Environmental soil chemistry*. 2th ed. San Diego, California: Academic Press, 2003. 352 p.

STIER, R. F. Tests to monitor quality of deep-frying fats and oils. Article first published online: 18 novembro de 2004.

SUZUKI, Jorge Brunetti. OGM: aspectos polêmicos e a nova lei de biossegurança. *Jus Navigandi*, Teresina, ano 11, n. 997, 25 mar. 2006. Disponível em: <<http://jus.uol.com.br/revista/texto/8148>>. Acesso em: 30 jan. 2012.

TONINI, R.M.C.W.; REZENDE, C.E.; GRATIVOL, A.D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. 2010. *Oecologia Australis*, 14(4), p. 1025-1035, 2010.

TRINDADE, Pedro Veltri Ormastroni. Avaliação das técnicas de bioaugmentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo. 2002. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

TSAI, S. M.; BARAIBAR, A. V. L. e ROMANI, V. L. M. Efeitos de Fatores do Solo.

UNITED STATE ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U.S.EPA). *Treatment technologies for site cleanup: annual status report (twelfth edition)*. EPA-542-R-07-012. Washington D.C.: Office of Solid Waste and Emergency Response, 2007. Disponível em: <<http://www.clu-in.org/asr/>>. Acesso em: 12 set. 2008.

VIDALI, M. Bioremediation: an overview. *Pure Applied Chemistry*, v. 73, n. 7, p. 1163-1172, 2000.

APÊNDICE

Tabela 8. Quantidade de C-CO₂ gerada para cada condição experimental ao longo de 15 dias.

Dias	40% CC e pH= 7,5	40% CC e pH= 6,5	60% CC e pH= 7,5	60% CC e pH= 6,5	50% CC e pH= 7,5	50% CC e pH= 7,0	50% CC e pH= 6,5
1	4,72	5,28	4,9	5,64	8,5	8,68	8,68
2	5,84	6,44	5,32	6,66	8,68	8,76	8,62
3	5,36	6,66	6,04	7,32	8,84	8,88	8,84
4	6,44	6,98	6,52	7,94	8,9	8,98	9,06
5	7,5	8,1	7,66	9,08	9,08	7,2	9,08
6	8,16	8,16	8,68	9,08	9,08	7,68	9,08
7	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08
8	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08
9	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08
10	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08
11	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08
12	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08
13	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08
14	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08
15	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08	9,08