



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

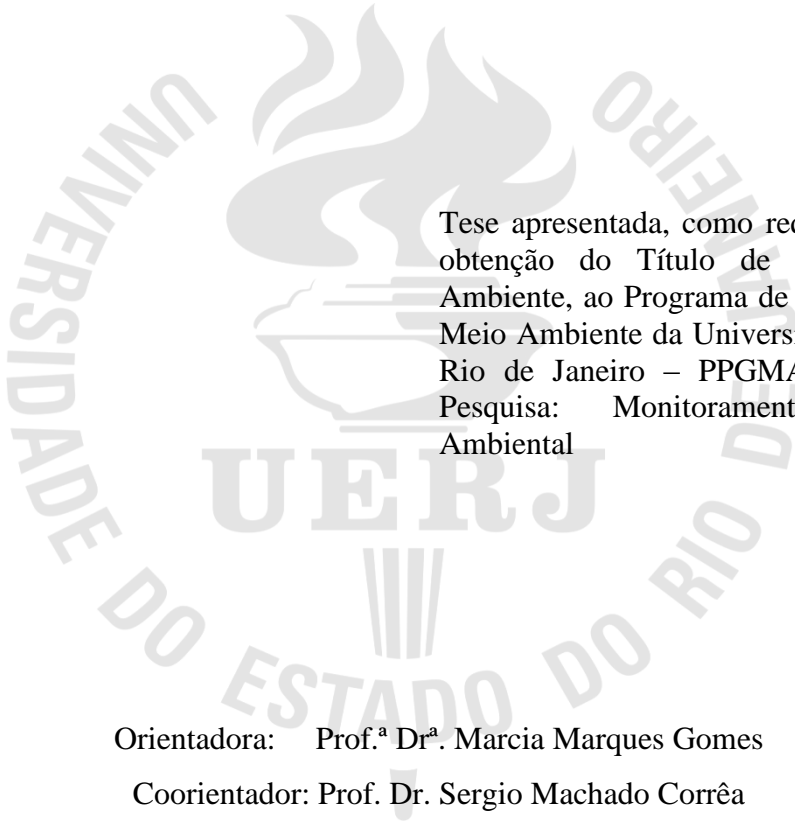
Jorge Antônio Lopes

**Estudo em Escala Piloto de Parâmetros de Monitoramento e Operação de
Biopilhas no Tratamento de Solos Contaminados por Hidrocarbonetos de
Petróleo**

Rio de Janeiro
2012

Jorge Antônio Lopes

**Estudo em Escala Piloto de Parâmetros de Monitoramento e Operação de Biopilhas no
Tratamento de Solos Contaminados por Hidrocarbonetos de Petróleo**



Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do Título de Doutor em Meio
Ambiente, ao Programa de Pós-Graduação em
Meio Ambiente da Universidade do Estado do
Rio de Janeiro – PPGMA/UERJ. Linha de
Pesquisa: Monitoramento e Controle
Ambiental

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marcia Marques Gomes

Coorientador: Prof. Dr. Sergio Machado Corrêa

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / Biblioteca CTC-A

L864 Lopes, Jorge Antônio.
 Estudo em escala piloto de parâmetros de monitoramento e operação
 de biopilhas no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de
 petróleo / Jorge Antônio Lopes. – 2012.
 243 f.
 Orientadora: Marcia Marques Gomes
 Co-Orientador: Sergio Machado Corrêa
 Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
 Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente.

1. Biorremediação – Teses. 2. Solos – Remediações – Teses. 3.
Solos – Contaminação por petróleo – Teses.. I. Gomes, Marcia
Marques. II. Corrêa, Sergio Machado. III. Univerisidade do Estado do
Rio de Janeiro. IV. Título.

CDU 628.5

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
tese.

Assinatura

Data

Jorge Antônio Lopes

Estudo em Escala Piloto de Parâmetros de Monitoramento e Operação de Biopilhas no Tratamento de Solos Contaminados por Hidrocarbonetos de Petróleo

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – PPGMA/UERJ. Linha de Pesquisa: Monitoramento e Controle Ambiental.

Aprovado em 12 de dezembro de 2012.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Marcia Marques Gomes (Orientadora)
Faculdade de Engenharia - UERJ

Prof. Dr. Daniel Vidal Pérez
Embrapa-Solos

Prof^a. Dra. Simone Lorena Quitério
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Claudio Fernando Mahler
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^a. Dra. Denise G. G. A. Rodrigues
Faculdade de Tecnologia - UERJ

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

À minha amada esposa Jovina Lopes, cujo valor muito excede ao de rubis;
Às minhas abençoadas filhas Joyce e Juliana, herança do Senhor;
Aos meus honrados pais Expedito Lopes e Edina C. Lopes, fontes de
inspiração.

AGRADECIMENTOS

Ao Nosso Senhor, que até aqui nos ajudou, que me fortalece e em quem tudo posso;

À Professora Dra. Marcia Marques pela orientação, inestimáveis ensinamentos, paciência, tranquilidade, inspiração, exemplo de abnegação e entusiasmo;

Ao Professor Dr. Sérgio Machado pela confiança, orientação, disponibilidade e sábios conselhos;

À minha amada esposa Jovina, pela compreensão, amor, carinho, companheirismo e incansável dedicação;

Às minhas queridas filhas Joyce e Juliana pelo incentivo e não raras reprimendas (“*Yes, You Can*”);

Aos meus amorosos pais Expedito e Edna, pelas orações e palavras de encorajamento;

À Eng^a. Graciane Silva pelas longas jornadas laboratoriais noite adentro, pelos trabalhos em fins de semana à base de sopa e cafeína, pelos incontáveis esclarecimentos e explicações, pelas profícuas discussões, observações sensatas, palavras de incentivo, carinho, indispensável ajuda técnica e amizade;

À Bióloga Sanye Soroldoni, que tantas vezes me ajudou com esclarecimentos, sugestões, artigos, fotos, etc.

Aos colegas pesquisadores do LABIFI, Alessandra, André, Antônia, Cloer, Francisca, Greyce, Tadeu, pela simpatia carinho, atenção e disposição em sempre ajudar;

Aos companheiros, amigos e conselheiros Dr. Flávio Ferline, Eng^a Cláudia Algemima, Eng^o Lúcio Cunha, Adm. Ricardo Santiago, Eng^o Sinval Andrade e Geol. Marcelo Alarsa pelo apoio;

Às empresas Estre Ambiental e Foz do Brasil pelo indispensável suporte às pesquisas;

À Petrobras Transporte – Transpetro, na pessoa do Gerente Geral de Segurança, Meio Ambiente e Saúde, Eng. Jorge Ibirajara pela oportunidade a mim concedida.

Feliz é o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire entendimento.

(Provérbios 3, 13)

RESUMO

Lopes, Jorge Antônio. **Estudo em escala piloto de parâmetros de monitoramento e operação de biopilhas no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo**. 2012. 244 f. Tese (Doutorado em Meio Ambiente) - Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

O objetivo do trabalho foi identificar ferramentas e indicadores adequados ao monitoramento e à otimização de processos de biorremediação, incluindo parâmetros físicos, químicos e microbiológicos definidos em estudos de tratabilidade de solos contaminados por óleo cru em escala de laboratório e comparar estratégias de biorremediação, tais como bioestímulo e bioaumento conduzidas em simulações de biopilhas dinâmicas ou estáticas. Quando três métodos de extração de hidrocarbonetos de petróleo de solo arenoso e franco-argiloso para análise cromatográfica (Soxhlet-SOX, microondas-MARS e extração acelerada por solvente-ASE) foram comparados entre si, concluiu-se que a técnica que promove a melhor recuperação depende da fração de interesse (n-alcanos, HRP, MCNR, HPA), das características texturais do solo (teores de areia, silte e argila) e da idade da contaminação. Dentre os indicadores de densidade populacional microbiana (microrganismos heterotróficos totais-PHT, população de fungos-PF e população microbiana degradadora de óleo (PDO) passíveis de utilização para indicar a taxa de degradação de compostos orgânicos presentes no solo tais como os hidrocarbonetos de petróleo, o PDO mostrou-se o mais adequado em conjunto com a produção de CO₂ aferida pelo método respirométrico. Quando a estratégia de biorremediação de solo franco-argiloso contaminado com óleo cru a 3% (m m⁻¹) utilizando bioestímulo (ajuste de pH, umidade e taxa C:N:P) foi comparada ao bioaumento (bioestímulo e adição de inóculo de microrganismos extraídos, enriquecidos e aclimatizados ao óleo cru como fonte de carbono), em sistemas de bancada simulando biopilha dinâmica (microcosmo M) e biopilha estática com aeração forçada (reator B), o tratamento que apresentou melhor remoção (32%) de HTP após 121 dias foi o bioaumento em biopilha estática. Para HPA, o tratamento que alcançou a melhor remoção (33%) foi com bioestímulo também em biopilha estática. A avaliação da taxa de mortalidade (%) de *Eisenia andrei* exposta tanto a solos recém-contaminados por óleo cru e preparados para bioestímulo (BIOS) e bioaumento (BIOA) a serem tratados em biopilhas dinâmicas e estáticas em escala de laboratório mostrou que após 56 dias de exposição da *E. andrei*, todos os solos produziram letalidade de 100%, quer fossem os solos recém-contaminados e preparados para os diferentes tratamentos (BIOS M, BIOS B, BIOA M, BIOA B) ou após 121 dias de tratamento. Tal resultado confirma que a biorremediação foi incipiente também do ponto de vista de remoção da ecotoxicidade. Em linhas gerais, a biorremediação de solo franco-argiloso contaminado por óleo cru, contendo tanto contaminação antiga quanto recente, reúne os maiores desafios à biorremediação, tanto do ponto de vista da composição textural do solo quanto da natureza do contaminante. Os processos são aparentemente lentos e requerem ferramentas auxiliares para aceleração dos mesmos. Recomenda-se no futuro, condução de experimentos com o uso de diferentes surfactantes, com ênfase em biosurfactantes.

Palavras-chave: Solo franco-argiloso. Óleo cru. Biorremediação. Bioestímulo. Bioaumento.

Biopilha dinâmica. Biopilha estática

ABSTRACT

Lopes, Jorge Antonio. **Operational parameters of biopiles systems for the treatment of soils contaminated by petroleum hydrocarbons**. 2012. 268 f. Tese (Doutorado em Meio Ambiente) - Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, São Paulo, 2012.

The objective of this investigation was to identify tools and indicators suitable for monitoring and optimizing bioremediation processes, including physical, chemical and microbiological variables defined in treatability studies of crude oil contaminated clayey soils in lab-scale and to compare bioremediation strategies, such as biostimulation and bioaugmentation carried out in lab scale dynamics and static biopiles. When three methods for extraction of petroleum hydrocarbon for chromatography analysis (Soxhlet-SOX, microwaves-MARS and accelerated solvent extraction-ASE) were compared, it was concluded that the most appropriate extraction method depends on the hydrocarbon fraction of interest (n-alkanes, RPH, UCM or PAH), the textural soil characteristics (sand, silt and clay content) and the contamination age. Among the microbiological indicators investigated (total heterotrophic microorganisms-PHT, fungi population-PF and; oil-degrading microorganism population-PDO, the last one was the best indicator for degradation of organic carbon compounds such as petroleum hydrocarbon, together with CO₂ generation measured through respirometric method. Bioremediation strategies for oil-contaminated clayey soil (3% m m⁻¹) were compared, including biostimulation (adjustment of pH, C:N:P rate and moisture) and bioaugmentation (biostimulation plus a consortium inoculum extracted from the original aged-contaminated soil, enriched and acclimatized with the crude oil as carbon source) in lab scale system simulating dynamic (microcosms) and static (bioreactors with forced aeration). The treatment which presented the highest TPH removal (32%) after 121 days was the bioaugmented static biopile (BIOA B). For PAH, the most efficient treatment method that removed 33% of PAH was the biostimulated static biopile (BIOS B). The mortality rate (%) for *Eisenia andrei* exposed to newly contaminated soil prepared for biostimulation (BIOS) and bioaugmentation (BIOA) treatments at day 0 as well as the treated soil in static and dynamic biopiles at different treatment times (after 24, 59 and 121 days) revealed that after 56 of *E. andrei*'s exposition, all soils produced mortality of 100%, no matter if newly contaminated or treated (BIOS M, BIOS B, BIOA M, BIOA B). The ecotoxicity tests confirmed that bioremediation as such was incipient also from the toxicity removal viewpoint. In general terms, bioremediation of clayey soils with a complex contaminant such as crude oil raise considerable challenges, both from the soil characteristics as well as the nature of the contaminant. The processes are apparently slow and require auxiliary tools to speed up the process. In the future, it is recommended to test the use of different surfactants, particularly bio-surfactants.

Keywords: French clayey soil. Crude oil. Bioremediation. Biostimulation. Bioaugmentation. Dynamic biopile. Static biopile.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação entre tamanho da partícula do solo.....	27
Tabela 2 - Constituição da matéria orgânica do solo.....	30
Tabela 3 - Distribuição da água no solo.....	31
Tabela 4 - Caracterização físico-química e biológica do solo utilizado <i>in natura</i>	90
Tabela 5 - Valores utilizados no DCCR para três fatores.....	96
Tabela 6 - Valores codificados do Planejamento Experimental.....	97
Tabela 7- Intervalos amostrais e parâmetros avaliados no primeiro experimento.....	104
Tabela 8 - Delineamento dos tratamentos de biotratabilidade.....	106
Tabela 9 - Composição do meio mineral Bushnell Hass.....	108
Tabela 10 - Intervalos amostrais e parâmetros avaliados ao longo do 3º experimento.....	114
Tabela 11- Composição do meio de cultivo soído Ágar-Ágar.....	120
Tabela 12 - Composição do meio de cultivo Bushnell-Hass líquido.....	122
Tabela 13 - Condições de extração.....	132
Tabela 14 - Matriz do Planejamento experimental.....	135
Tabela 15 - Médias e desvio padrão para n-alcanos, HRP, MCNR e HTP – solo argiloso....	141
Tabela 16 - Médias e desvio padrão n-alcanos, HRP, MCNR e HTP solo arenoso.....	143
Tabela 17 - Médias e desvio padrão dos HPA extraídos do solo argiloso.....	144
Tabela 18 - Médias e desvio padrão de HPA extraídos de solo arenoso.....	145
Tabela 19 - Classificação das variáveis (valor x peso) escolha da melhor técnica.....	147
Tabela 20 - Caracterização do solo original utilizado no experimento.....	149
Tabela 21 - HPA em mg kg ⁻¹ solo original e valores orientadores órgãos ambientais.....	151
Tabela 22 - Caracterização do solo recém-contaminado no início do experimento.....	152
Tabela 23 - PHT (UFC g solo ⁻¹) - CONT, BIOS e BIOA aos 0, 24º, 59º e 121º dias.....	153
Tabela 24 - PF (UFC g solo ⁻¹) - CONT, BIOS e BIOA aos 0, 24º, 59º e 121º dias.....	154
Tabela 25 - PDO (NMP g solo ⁻¹) - CONT, BIOS e BIOA aos 0, 24º, 59º e 121º dia.....	152

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Componentes da zona insaturada do solo.....	26
Figura 2 - Proporção das fases líquida, sólida e gasosa do solo.....	27
Figura 3 - Molécula de ácido húmico.....	30
Figura 4 - Triângulo das classes texturais do solo.....	33
Figura 5 - Perfil do Solo.....	35
Figura 6 - Estruturas químicas de alguns compostos encontrados no petróleo.....	40
Figura 7 - Oleoduto em construção.....	42
Figura 8 - Esquema de um Separador de Água de Óleo – SAO.....	43
Figura 9 - Separador de Água de Óleo – SAO.....	43
Figura 10 - Áreas contaminadas do Estado de São Paulo.....	44
Figura 11 - Geração de resíduos.....	45
Figura 12 - Trado/Ensecadeira-cabeça de injeção.....	46
Figura 13 - Sistema típico Vitrificação In Situ.....	47
Figura 14 - Incinerador de Resíduos.....	48
Figura 15 - Esquema típico de uma instalação de Dessorção Térmica.....	50
Figura 16 - Ilustração de Unidade Móvel de Dessorção Térmica.....	50
Figura 17 - Produção de clínquer.....	51
Figura 18 - Forno rotativo com queimador.....	52
Figura 19 - Sistema de Plasma Térmico.....	53
Figura 20 - O gás parcialmente ionizado do sistema de plasma térmico.....	54
Figura 21 - Solo Contaminado por petróleo submetido ao tratamento por plasma.....	55
Figura 22 - Processo típico Extração Química.....	57
Figura 23 - Reações de oxidação de tolueno.....	60
Figura 24 - Tratamento com biopilhas.....	64
Figura 25 - Escavação do solo contaminado.....	65
Figura 26 - Aeração - Biopilha dinâmica.....	65
Figura 27 - Sistema de aeração – Biopilha estática.....	65
Figura 28 - Sistema de Cobertura.....	68
Figura 29 - Solução de Engenharia para o Controle da Temperatura.....	69
Figura 30 - Processo típico Biorreator.....	72
Figura 31 - Pseudomonas.....	73

Figura 32 - Fitorremediação In Situ	74
Figura 33 - Fauna do solo	78
Figura 34 - Efeitos dos contaminantes em sementes de alface.....	82
Figura 35 - Solo tratado por diferentes técnicas de remediação em empresa no Brasil	84
Figura 36 - Custo médio (R\$) por tonelada de solo remediado e tecnologia	85
Figura 37 - Fluxograma com resumo das atividades e etapas experimentais.....	87
Figura 38 - Fluxograma dos parâmetros físicos, químicos e microbiológicos avaliados.....	89
Figura 39 - Tamanhos relativos da areia, silte e argila.....	91
Figura 40 - Indicação das texturas: 41% areia, 29% silt, 30% argila	91
Figura 41 - Foto ilustrativa do procedimento de recontaminação de solo.....	94
Figura 42 - Fluxograma das etapas em estudo do primeiro experimento.....	98
Figura 43 - Esquema de respirômetro de Bartha preconizado.....	98
Figura 44 - Montagem dos respirômetros	100
Figura 45 - Processo de aclimatização das culturas microbianas.....	108
Figura 46 - Biorreatores utilizados durante o experimento.	109
Figura 47 - Detalhe do espaço para coleta de lixiviados nos biorreatores	110
Figura 48 - Detalhe do cartucho de carvão ativado nos biorreatores	111
Figura 49 - Detalhe do sistema de aeração dos biorreatores	112
Figura 50 - Rotâmetro de marcar Dwyer utilizado para controlar a vazão de ar na.....	112
Figura 51 - Aspecto geral dos microcosmos	113
Figura 52 - Amostrador tubular	115
Figura 53 - Montagem, aeração, umidificação e amostragem.....	116
Figura 54 - Método padrão de diluição e contagem em placas	119
Figura 55 - Aspecto das unidades formadoras de.....	121
Figura 56 - Esquema de utilização de Placas de Número Mais Provável	122
Figura 57 - Eisenia andrei.....	123
Figura 58 - Digestão para determinação de N total(A) e mudança	126
Figura 59 - Formação do borato de amônio	127
Figura 60 - Fluxograma da análise de fósforo assimilável.....	129
Figura 61 – Extratores do tipo Soxhlet.....	130
Figura 62 - Extrator do tipo micro-ondas	131
Figura 63 - Produção de CO ₂ em 70 dias em respirômetros de Bartha	134
Figura 64 - Variáveis 1 (pH); 2 (C:N:P) e; 3 (PME). A linha tracejada:.....	136
Figura 65 - Superfície de resposta: (PME) versus taxa	137

Figura 66: Superfície de resposta: Taxa Nutricional (C:N:P) versus pH.	137
Figura 67 - MHT nos diferentes tratamentos, no início e ao final do	138
Figura 68 - População de fungos nos diferentes tratamentos: início e final dos	139
Figura 69 - Monitoramento da população de MDP nas condições testadas.....	140
Figura 70 - EB(%) versus quantificação de microrganismos degradadores.....	140
Figura 71 – Média e desvio padrão dos teores extraídos do solo argiloso.....	140
Figura 72 – Valores extraídos do solo arenoso	140
Figura 73 - Médias e desvios padrão dos teores de HPA Extraídos de Solo Argiloso.....	146
Figura 74 - População de PHT em diferentes fases do experimento.....	154
Figura 75 - Quantificação de fungos (UFC g solo-1) ao longo do tratamento.....	155
Figura 76 - Microrganismos degradadores de óleo (PDO) em NMP	156
Figura 77 - Teores de HTP nos microcosmos e nos reatores ao longo do experimento.....	157
Figura 78 - Teores de HPA nos microcosmos e reatores ao longo do experimento.....	158
Figura 79 - Taxa de mortalidade (%) de E. andrei	127

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ASTM	American Society For Testing And Materials
BATNEEC	Best Available Techniques Not Exceeding Excessive Costs
BPEO	Best Practicable Environmental Option
C	Carbono
CENPES	Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo A. Miguez de Mello
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CG	Cromatógrafo Gasoso
CTC	Capacidade de Troca Catiônica
DCM	Diclorometano
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
EB	Eficiência de Biodegradação
EC50	Concentração Efetiva Mediana
P	Fósforo
FID	Fire Ionization Detector (Detetor por Ionização de Chama)
FRTR	Federal Remediation Technologies Roundtable
GLP	Gás Liquefeito de Petróleo
GCWMCP	Guidelines on Co-processing Waste Materials in Cement Production
HRP	Hidrocarbonetos Resolvidos de Petróleo
ISV	In Situ Vitrification
LABIFI	Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias
LD	Limite de Detecção
LOEC	Mais Baixa Concentração Efetiva Observada
MBP	Microrganismos Biodegradadores de Petróleo
MCNR	Mistura Complexa Não Resolvida
MSRS	Museu De Solos Do Rio Grande Do Sul
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MO	Matéria Orgânica

N	Nitrogênio
NBR	Norma Brasileira
NMP	Número Mais Provável
NOEC	Concentração Efetiva Não Observada
NRCS	Natural Resources Conservation Service
PAH	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
PME	Percentual de Material Estruturante
PF	População de Fungos
PHT	População Heterotrófica Total
PMDO	População de Microrganismos Degradadores de Óleo
PPM	Partes Por Milhão
PVC	Poly Vinyl Chloride (Policloreto de Vinila)
SAO	Separador Água e Óleo
SiBCS	Sistema Brasileiro de Classificação de Solos
TPH	Total Petroleum Hydrocarbons (Hidrocarbonetos Totais de Petróleo)
Transpetro	Petrobras Transporte S/A
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UNEP	United Nations Environment Programme
U.S.EPA	United States Environmental Protection Agency
VOC	Volatile Organic Compound (Compostos Orgânicos Voláteis)

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	22
1	OBJETIVOS	24
1.1	Objetivo geral	25
1.2	Objetivos específicos	24
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1	Solo	25
2.1.1	<u>Definição e aspectos gerais</u>	25
2.1.2	<u>Componentes do solo</u>	25
2.1.2.1	Fase sólida	27
2.1.2.1.1	Fração inorgânica	27
2.1.2.1.2	Fração orgânica.....	29
2.1.2.2	Fase líquida.....	30
2.1.2.3	Fase gasosa	31
2.1.3	<u>Frações texturais do solo</u>	32
2.1.4	<u>Classificação do solo</u>	34
2.1.5	<u>O papel dos microrganismos no solo</u>	36
2.2	Petróleo	39
2.2.1	<u>Origem e aspectos gerais</u>	39
2.2.2	<u>Composição química</u>	39
2.3	Atividades potencialmente poluidoras de solo	42
2.4	Processos de tratamentos em áreas contaminadas	46
2.4.1	<u>Processos físicos</u>	46
2.4.1.1	Estabilização / solidificação	46
2.4.1.2	Incineração.....	48
2.4.1.3	Dessorção térmica.....	49
2.4.1.4	Coprocessamento.....	50
2.4.1.5	Pirólise	53
2.4.1.6	Plasma térmico	53
2.4.2	<u>Processos químicos</u>	56
2.4.2.1	Extração química	56
2.4.3	<u>Processos biológicos</u>	58

2.4.3.1	Biorremediação.....	58
2.4.3.1.1	Biopilhas.....	64
a)	Fatores que afetam o desempenho de biopilhas	66
2.4.3.1.2	Biorreatores	71
2.4.3.1.3	Fitorremediação	72
2.4.3.2	Ecotoxicidade	77
2.4.3.2.1	Testes com minhocas.....	77
2.4.3.3	Fitotoxicidade	80
2.5	Estudo de caso	83
2.5.1	<u>Custos de tecnologias de tratamento</u>	83
2.5.1.1	Aspectos do uso da Tecnologia de Biopilhas	83
3	MATERIAL E MÉTODOS	86
3.1	Atividades preliminares	88
3.1.1	<u>Obtenção e caracterização do solo em estudo.</u>	88
3.1.2	<u>Caracterização do petróleo.</u>	93
3.1.3	<u>Métodos de extração em solo argiloso</u>	93
3.1.4	<u>Recontaminação do solo</u>	94
3.2	Otimização dos parâmetros	95
3.2.1	<u>Planejamento experimental</u>	95
3.2.2	<u>Descrição dos respirômetros de Bartha</u>	98
3.2.2.1	Montagem dos respirômetros	99
3.2.2.2	Monitoramento dos ensaios respirométricos	101
3.2.2.3	Quantificação da produção de CO ₂	102
3.2.2.4	Quantificação da produção de CO ₂ por biodegradação	103
3.2.2.5	Quantificação de carbono biodegradado	103
3.2.2.6	Eficiência da biodegradação a partir da produção de CO ₂	104
3.2.2.7	Monitoramento das variáveis.....	104
3.2.3	<u>Ajuste de pH do solo</u>	105
3.2.4	<u>Ajuste de nutrientes</u>	105
3.2.5	<u>Adição de material estruturante</u>	106
3.3	Ensaio de biodegradação em microcosmos e biorreatores	106
3.3.1	<u>Extração da cultura microbiana do solo</u>	107
3.3.2	<u>Aclimatização da cultura microbiana EXP11</u>	108
3.3.3	<u>Montagem dos biorreatores</u>	109

3.3.4	<u>Montagem dos microcosmos</u>	113
3.3.5	<u>Monitoramento dos ensaios de biodegradação</u>	113
3.3.5.1	Amostragem nos microcosmos e biorreatores.....	115
3.3.5.2	Parâmetros físicos.....	116
3.3.5.2.1	Temperatura.....	116
3.3.5.2.2	Umidade	116
3.3.5.2.3	Densidade de partículas	117
3.3.5.2.4	Densidade aparente.....	118
3.3.5.2.5	Porosidade	118
3.3.5.3	Parâmetros biológicos	118
3.3.5.3.1	Extração da cultura microbiana	119
3.3.5.3.2	População heterotrófica total	120
3.3.5.3.3	População de fungos.....	120
3.3.5.3.4	População de microrganismos degradadores de óleo cru.....	121
3.3.5.3.5	Teste de ecotoxicidade (teste de reprodução de minhocas).....	122
3.3.5.4	Parâmetros químicos	124
3.3.5.4.1	Medição de pH	124
3.3.5.4.2	Quantificação de carbono orgânico total	124
3.3.5.4.3	Quantificação de nitrogênio total	125
3.3.5.4.4	Quantificação de fósforo assimilável	128
a)	Extração	130
b)	Extração com Soxhlet.....	130
c)	Extração por micro-ondas.....	131
d)	Extração acelerada por solvente	132
3.3.5.4.5	Análises cromatográficas.....	132
3.3.5.4.6	Variáveis adicionais na comparação dos métodos	133
3.3.5.4.7	Análises estatísticas	133
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	134
4.1	Indicadores microbianos e avaliação do processo	134
4.1.1	<u>Quantificação da geração de CO₂</u>	134
4.1.2	<u>Quantificação de MHT</u>	137
4.1.3	<u>Quantificação da população de fungos</u>	138
4.1.4	<u>Quantificação de MBP</u>	139
4.1.5	<u>Discussão</u>	141

4.2	Estudo comparativo de técnicas de extração de HTP e HPA	141
4.2.1	<u>Extração de HTP por Soxhlet, MARS e ASE</u>	141
4.2.1.1	Solo argiloso: extração de HTP	141
4.2.1.2	Solo arenoso: extração de HTP	142
4.2.1.3	Conclusão sobre extração de HTP	144
4.2.2	<u>Extração de HPA com Soxhlet, MARS e ASE</u>	144
4.2.2.1	Solo argiloso: extração de HPA	144
4.2.2.2	Solo arenoso :extração de HPA	145
4.2.2.3	Variáveis adicionais consideradas	146
4.2.2.4	Discussão	148
4.3	Biorremediação de solo argiloso	148
4.3.1	<u>Caracterização do solo em estudo</u>	148
4.3.2	<u>Indicadores microbiológicos ao longo dos tratamentos</u>	153
4.3.3	<u>Avaliação do decaimento de HTP e HPA</u>	156
4.3.4	<u>Avaliação da toxicidade aguda sobre <i>E. andrei</i></u>	159
4.3.5	<u>Discussão</u>	160
	CONCLUSÕES GERAIS	162
	REFERÊNCIAS	164
	APÊNDICE A - Manuscrito 1	188
	APÊNDICE B - Manuscrito 2	200
	APÊNDICE C - Manuscrito 3	221

INTRODUÇÃO

Alguns setores industriais, como a indústria petrolífera, se caracterizam por um elevado potencial de degradação ambiental, quando comparado a outras atividades. Nela, o potencial impacto ambiental está presente em todo o processo. Em cada segmento da indústria do petróleo são numerosas as oportunidades de introdução de hidrocarbonetos no meio ambiente. No transporte de petróleo e derivados, uma atividade vital para o setor, por exemplo, são geradas enormes quantidades de resíduos sólidos: diversos materiais contaminados por petróleo (estopas; pigs, que são instrumentos para limpeza e inspeção interna de dutos); etc.), borras oleosas de fundo de tanques de armazenamento e de navios petroleiros, borras oleosas de limpeza de caixas de separação água e óleo (SAO) e os solos contaminados por vazamentos de petróleo, principalmente em oleodutos, devido à corrosão, falha estrutural ou operacional e ação de terceiros. A deposição das borras oleosas no solo era, há poucas décadas, prática comum e tolerada pelos próprios órgãos ambientais.

Hoje, as atividades de recuperação desses sítios por meio da escavação e remoção dos solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, constituem-se uma importante fonte de resíduos, os quais devem ser adequadamente tratados.

Devido aos grandes volumes de hidrocarbonetos produzidos, usados e dispostos em bases globais, não causa surpresa o fato de que grande parte das contaminações superficiais e subsuperficiais atualmente sejam causadas por estes produtos.

Uma vez introduzidos no meio ambiente, os hidrocarbonetos imediatamente começam a interagir com a matriz através da qual está migrando. As interações e o grau com que ocorrem são funções das características físico-químicas dos hidrocarbonetos e da matriz do entorno.

Após um derramamento, a migração é controlada pela heterogeneidade geológica e a capilaridade do meio produz uma complexa arquitetura de aprisionamento do contaminante que contém, tanto fase residual, quanto zonas de alta saturação. Essas zonas de saturação permanecem aprisionadas em subsuperfície e agem como fontes secundárias de contaminação da água subterrânea por longos períodos.

As grandes quantidades de resíduos de petróleo e derivados, inadequadamente depositados, que têm sido encontrados, fornecem uma clara evidência que compostos orgânicos podem permanecer num sítio por longos períodos de tempo. Desta forma, há uma

enorme demanda por tecnologias inovadoras envolvendo a remediação ambiental de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo.

O tratamento de solos contaminados inclui processos físicos, químicos e biológicos.

O encaminhamento dos resíduos oriundos da escavação dos solos contaminados para aterros industriais é um exemplo de método físico de tratamento. Tal prática, todavia, é vista com reservas por alguns empreendedores em razão dos custos e principalmente do vínculo que se estabelece entre o aterro industrial, o que pode configurar responsabilidade solidária em eventuais demandas relativas aos demais resíduos ali depositados.

Os métodos físicos incluem também os processos térmicos de incineração, dessorção térmica e coprocessamento em fábricas de cimento. Tais processos são onerosos e, no caso da incineração, podem se constituir em fonte de poluição do ar, com a transferência de contaminantes para a atmosfera. Essas tecnologias podem ser eficientes na redução da concentração de uma grande variedade de contaminantes, mas têm algumas desvantagens, tendo em conta a sua complexidade técnica, o custo para a aplicação a problemas de pequena escala e às questões ligadas ao seu licenciamento (VIDALI, 2001 *apud* DIPLOCK, 2009).

Atualmente, a aplicação de processos biológicos no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo tem despertado um grande interesse da comunidade técnica e científica. Tais processos têm sido considerados uma importante alternativa para solucionar ou, ao menos, atenuar os problemas das áreas contaminadas, especialmente no Brasil, onde a diversidade microbiana e as condições meteorológicas são bastante favoráveis (ANDRADE *et al.*, 2010). Entre as suas principais vantagens está o baixo custo de tratamento, comparando-se com os processos convencionais, razão pela qual é um dos principais mecanismos de eliminação do petróleo e outros hidrocarbonetos do meio ambiente.

A otimização das variáveis envolvidas nos processos biológicos torna a remediação de resíduos perigosos, mais eficiente e rápida, o que conduz a uma redução das atividades de manutenção e dos custos. Para uma dessas variáveis, a proporção C:N:P nos nutrientes, há várias indicações dos valores ótimos para as várias condições. Assim, é essencial conhecer essa proporção para as condições, as quais se apresentam bastante favoráveis para a biorremediação em função principalmente do clima. Ressalta-se que, embora no Brasil haja diversas experiências comerciais bem sucedidas de remediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo utilizando a tecnologia de biopilhas, os dados referentes à proporção C:N:P, muitas vezes obtidos de maneira empírica, permanecem sob sigilo industrial das empresas. É importante ressaltar também a importância da avaliação qualitativa

e quantitativa das emissões atmosféricas decorrentes do processo de remediação por biorreatores.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi identificar ferramentas e indicadores adequados ao monitoramento e à otimização de processos incluindo os principais parâmetros físicos, químicos e microbiológicos definidos em estudos de tratabilidade de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo como subsídio para projetos de biorremediação em escala de campo.

1.2 Objetivos Específicos

- Analisar comparativamente, diferentes métodos de extração de hidrocarbonetos de petróleo de solo argiloso e solo arenoso;
- Avaliar comparativamente, diferentes indicadores microbiológicos da biodegradação de hidrocarbonetos em solo argiloso contaminado por óleo cru;
- Comparar a eficiência de diferentes estratégias de biorremediação de solo argiloso contaminado por óleo cru;
- Comparar a eficiência de biopilhas dinâmicas e biopilhas estáticas de aeração forçada na biorremediação de solo argiloso contaminado com óleo cru, através da simulação em escala de laboratório utilizando microcosmos (biopilhas dinâmicas) e reatores de bancada (biopilhas estáticas);
- Verificar a eficácia dos tratamentos de biorremediação através de testes de ecotoxicidade com um bioindicador de qualidade do solo selecionado (*Eisenia andrei*);

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Solo

2.1.1 Definição e aspectos gerais

O solo é um corpo natural, diferenciado em horizontes de constituintes minerais e orgânicos, normalmente inconsolidados, de profundidade variável, o qual difere de material original inferior na morfologia, propriedades físicas e constituição, propriedades químicas e composição, e características biológicas (MEURER, 2000). É o que torna o solo um sistema complexo, heterogêneo e dinâmico, proveniente da ação conjunta do intemperismo da biosfera (litosfera, atmosfera e hidrosfera).

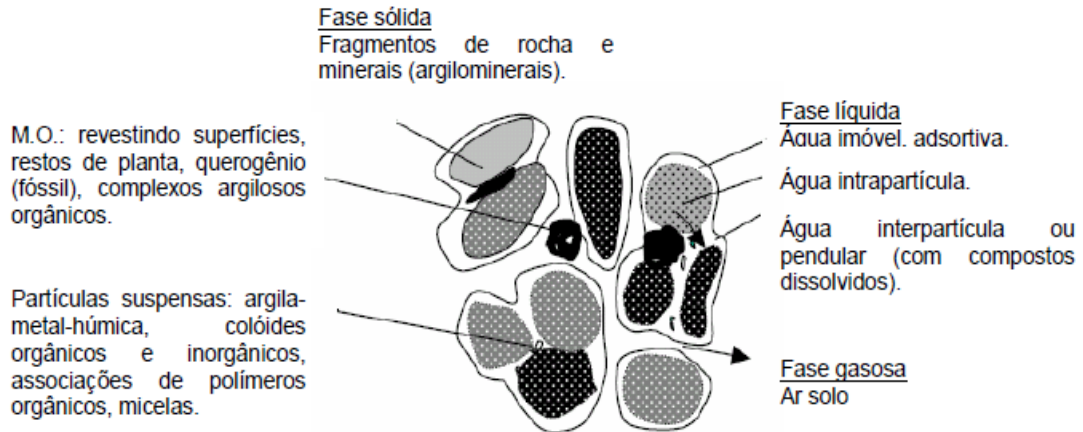
Existem diversas definições apresentadas por especialistas de diversas áreas, que corroboram para afirmação de que não há consenso quanto à definição de solo (LUCHESE *et al.*, 2001; JENNY, 1994). A Norma Brasileira - NBR 6502 define solo como material proveniente da decomposição das rochas pela ação de agentes físicos ou químicos, podendo ou não conter matéria orgânica. As concepções de solo estão intimamente relacionadas às atividades de que a formulam (MEURER, 2000) e por isto não existe uma definição universal sobre o tema.

No entanto, Beck *et al* (2000) apresentam a definição que “o solo é um corpo natural da superfície terrestre, constituído de materiais minerais e orgânicos resultantes das interações dos fatores de formação (clima, organismos vivos, material de origem e relevo) através do tempo, contendo matéria viva e em parte modificada pela ação humana, capaz de sustentar plantas, de reter água, de armazenar e transformar resíduos, e suportar edificações”, que é um conceito mais adequado e abrangente para a atualidade.

2.1.2 Componentes do solo

As partículas de rochas que constituem o solo apresentam-se em diferentes estágios de degradação e o seu espaço intersticial é preenchido pelo ar e pela água (JENNY, 1994). Portanto o solo geralmente se apresenta em três constituintes principais: a fase sólida - partículas minerais e matéria orgânica, a fase líquida - água e solutos e a fase gasosa - nitrogênio, oxigênio, dióxido de carbono, metano, entre outros. (ALEXANDER, 1997 *apud* SEABRA, 2005) (Figura 1).

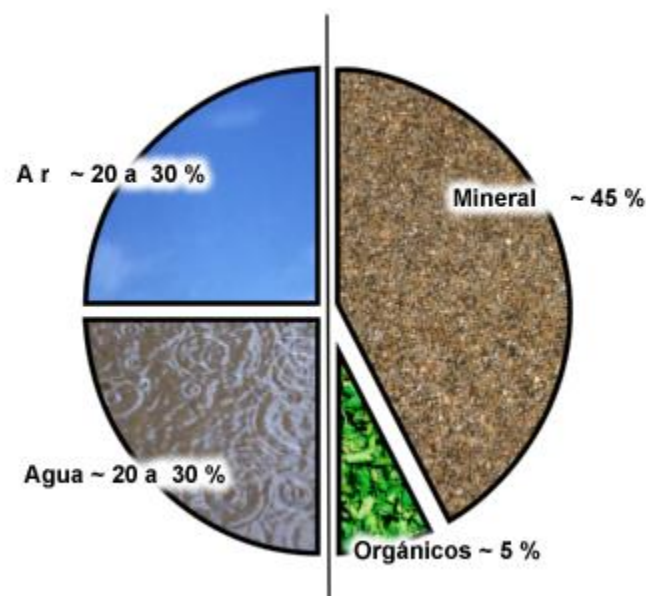
Figura 1 - Componentes da zona insaturada do solo



Fonte: Adaptada de Grathwohi, 1998

A fase sólida apresenta proporções relativamente fixas que ocupa em média 50% da composição do solo, aproximadamente 45% representam à fração inorgânica (partícula mineral) e 5% a fração orgânica (matéria orgânica) (SEABRA, 2005; LEPSCH, 1993). A outra metade da quantidade do solo é ocupada por 25% de meio líquido e 25% de meio gasoso (TRINDADE, 2002) (Figura 2).

Figura 2 - Proporção das fases líquida, sólida e gasosa do solo.



Fonte: Adaptação de MEURER, 2000.

2.1.2.1 Fase sólida

A fase sólida do solo é composta por uma fração mineral do solo, originada da desintegração das rochas, corresponde a menos de 50% do volume do solo e contribui, juntamente com a fração orgânica, constituída por matéria orgânica para a formação de agregados e a estruturação do solo. Essa fração tem grande importância na disponibilidade de nutrientes, na aeração, na retenção e movimento da água (LEPSCH, 1993).

2.1.2.1.1 Fração inorgânica

A fração inorgânica constitui a fase mineral do solo, geralmente é utilizada como sinônimo de textura do solo e são divididas basicamente, em três frações texturais (argila, silte e areia). A classificação textural do solo é realizada com base em uma proporção relativa de diferentes tamanhos de partículas, conforme apresentado na Tabela 1 (MEURER, 2000; MILLIOLI, 2009).

Tabela 1 - Relação entre tamanho da partícula do solo

TIPO DE SOLO	TAMANHO DA PARTÍCULA (mm)
Arenoso	2,00 – 0,05
Silte	0,05 – 0,002
Argiloso	< 0,002

Fonte: Adaptação PREVEDELLO, 1996 *apud* MILLIOLI, 2009.

A fração mineral apresenta propriedades químicas variáveis de acordo com o tamanho das partículas. Segundo a NBR 6502, as argilas apresentam granulação fina, e por ser constituídas por partículas menores que 0,002 mm, apresentam coesão e plasticidade. Dentre as matérias que constituem as partículas minerais do solo, as argilas apresentam maior reatividade, já que possuem maior relação superfície volume (CENPES, 2002).

A argila é essencialmente constituída por silicatos de alumínio hidratados, com magnésio ou ferro substituindo parcialmente o alumínio em alguns minerais e que, em alguns casos, incluem elementos alcalinos ou alcalino-terrosos. A textura argilosa tem como característica apresentar propriedades coloidais, com predomínio de cargas eletrostáticas negativas. São formadas por minerais secundários do grupo montmorolonita, ilita, caolinita, entre outros (ESPOSITO, 1999 *apud* CENPES, 2002). Os componentes da argila. Já a areia e as outras partículas minerais são formadas por quartzo, feldspato, micas e outros silicatos, e a

sua atividade química é quase nula, porém se decompõem lentamente liberando seus elementos constituintes (LEPSCH, 1993).

Em geral, solos com elevado teor de material orgânico e argila possuem reduzida toxicidade para microrganismos quanto a elementos-traço (metais potencialmente tóxicos), uma vez que apresentam maior capacidade de troca iônica que solos arenosos (CAPUTO, 1988 *apud* CENPES, 2002). Contudo, como mencionado anteriormente, um alto teor de argila no solo afeta negativamente o processo de biodegradação, o que torna interessante a adição de material biodegradável para impedir a compactação do solo.

A compactação do solo é um processo artificial de aumento da massa específica de um solo, por redução do seu volume de vazios, por meio da aplicação de energia mecânica (NBR 6502, 1995). Ensaio conduzidos pelo Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo A. Miguez de Mello (CENPES) demonstraram a necessidade imperiosa da utilização de material estruturante em solos argilosos.

Um cuidado especial deve ser observado quando da utilização de cavacos, já que a madeira utilizada pode ter recebido tratamento contra insetos, o que fatalmente comprometerá o desenvolvimento dos microrganismos envolvidos no abatimento dos contaminantes orgânicos.

2.1.2.1.2 Fração orgânica

A fração orgânica ou matéria orgânica do solo (MO) é produzida principalmente pelos vegetais, por meio da transformação de dióxido de carbono (CO_2) atmosférico em compostos constituído de carbono orgânico, durante a realização do processo de fotossíntese (MEURER, 2000). Porém durante a degradação parcial de resíduos orgânicos formados por restos de tecidos de animais e plantas, a matéria orgânica é decomposta por uma intensa atividade microbiana e/ou por reações químicas, incorporando a biomassa do solo os produtos resultado das reações. Durante esta degradação os microrganismos produzem enzimas (amilase, desaminase, fosfatase e sulfatase) que são responsáveis pela liberação de carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, respectivamente, a partir de moléculas orgânicas (DRAGUN, 1998 *apud* CENPES, 2002; LUCHESE *et al.*, 2001; MILLIOLI, 2009).

A matéria orgânica é fortemente decomposta por meio dos processos bioquímicos o que resulta na formação de duas substâncias importantes na interação solo-contaminante: (i) as substâncias não húmicas, constituídas por proteínas, aminoácidos e polissacarídeos e (ii) as substâncias húmicas, que são moléculas constituídas por diversos grupos funcionais

(carbonilas, carboxilas, etc.). Tais substâncias de degradação são apresentadas como ácidos fúlvicos (solúvel), ácidos húmicos (solúvel em $\text{pH} > 2$) e humina (insolúvel) que conforme Bossert e Bartha (1984) *apud* Almeida (2011) possivelmente contribuem para a formação de resíduos persistentes nos solos e são resistentes ao processo microbiano. Na Tabela 2 estão descritos alguns constituintes da matéria orgânica do solo.

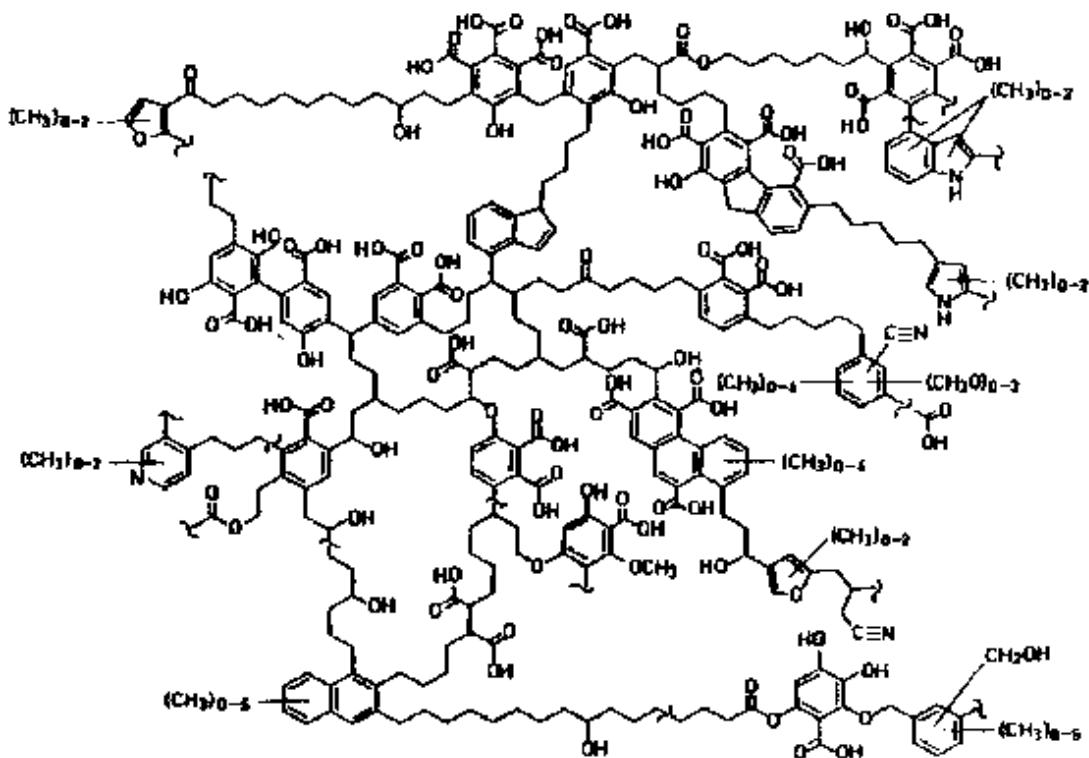
Tabela 2 - Constituição da matéria orgânica do solo

MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO	
Viva: Raramente > 4% de Carbono Orgânico	Morta: Aproximadamente 98% do Carbono Orgânico
Microrganismos (60-80%) <ul style="list-style-type: none"> ✗ Fungos ✗ Bactérias 	Matéria Macro-orgânico <ul style="list-style-type: none"> ✗ Resíduos vegetais
Macrorganismos (15-30%) <ul style="list-style-type: none"> ✗ Protozoários ✗ Nematoides Mesofauna <ul style="list-style-type: none"> ✗ Ácaros Macrofauna <ul style="list-style-type: none"> ✗ Minhocas ✗ Térmitas 	Húmus (80-90%) Substâncias húmicas -70%: <ul style="list-style-type: none"> ✗ Ácidos húmicos ✗ Ácidos fúlvicos Substâncias não-húmicas (huminas) – 30% <ul style="list-style-type: none"> ✗ Lipídeos ✗ Ácidos orgânicos ✗ Proteínas; ✗ Pigmentos
Raízes (5-10%)	

Fonte: BATISTA ,2007, *apud* MILLIOLI , 2009.

Durante a degradação da matéria orgânica é de fundamental importância os processos de mineralização e humificação (LUCHESE *et al.*, 2001), onde se destacam a atuação das bactérias, actinomicetos e fungos. A mineralização é um processo de degradação completa da molécula em formas inorgânicas como CO_2 , H_2O , NH_3 , Cl^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , Br^- e outros (MOREIRA, 2006). Já a humificação corresponde à polimerização de compostos orgânicos formando estrutura de até 50.000 u (u = unidade de massa atômica). Após a humificação, os ácidos húmicos produzidos apresentam grupos de estrutura aromática complexa e variável (Figura 3) caracterizando a matéria orgânica do solo (LUCHESE *et al.*, 2001).

Figura 3 - Molécula de ácido húmico



Fonte: Petroni *et al.*, 2000.

2.1.2.2 Fase líquida

A fase líquida do solo disputa o mesmo espaço interstícios que a fase gasosa, além dos vazios entre as partículas do solo, constituídos pelos micro e macroporos, estas duas fases se alternam proporcionalmente, porém em condições normais, a fase líquida ocupa os microporos, e a fase gasosa os macroporos do solo (MILLIOLI, 2009).

A fase líquida é constituída de água, de minerais e de compostos orgânicos nela dissolvidos, formando a solução do solo (MEURER, 2000). A solução do solo é constituída por íons dissolvidos, tidos como os macronutrientes ($H_2PO_4^-$, SO_4^{2-} , NO_3^- , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , H^+ , NH_4^+ , Mg^{2+} , Al^{3+}) e micronutrientes (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , BO_3^{3-} , Cl^- , MnO_4^-) que são necessários à atividade metabólica dos microrganismos (PREVEDELLO, 1996 *apud* MILLIOLI, 2009).

A disponibilidade da água é um parâmetro físico-químico do solo que interfere no metabolismo da população microbiana, a atividade da água (a_w) pode ser definida como a relação entre a pressão de vapor de ar em equilíbrio com a solução e a pressão de vapor de

água pura (PALA, 2002). De acordo com a distribuição da água reconhecem-se quatro tipos de água no solo, conforme citado na Tabela 3.

Tabela 3 - Distribuição da água no solo

Tipo de água	Distribuição da água no solo
Gravitacional	Água drenada do solo por efeito da gravidade, e que está disponível para todos os organismos e é importante no transporte de materiais.
Capilar	Água que fica retida no espaço poroso e cumpre um papel similar à água gravitacional.
Osmótica	A água que fica retida nas partículas de argila e húmus, e está pouco disponível para os microrganismos e raízes.
Higroscópica	Água que está fortemente retida nas partículas, formando uma película ao seu redor, e é a menos disponível.

Fonte: Pala, 2002.

Parte da água da fase líquida é mantida mecanicamente dentro de uma massa de solo e submetida apenas à ação da gravidade, chamada de água absorvida. As propriedades físicas desta água são praticamente iguais às de água corrente nas mesmas condições de temperatura e pressão. Já a água adsorvida é aquela mantida na superfície dos grãos de um solo por esforços de atração molecular, sendo que os dipolos H₂O orientam-se perpendicularmente à superfície dos grãos. As propriedades físicas desta água são sensivelmente diferentes da água “absorvida ou livre” nas mesmas condições de temperatura e pressão

2.1.2.3 Fase gasosa

A fase gasosa é caracterizada pela porosidade de aeração do solo ou porosidade livre de água constituída pelos gases CO_2 , O_2 , NH_3 , CH_4 , H_2S , SO_x , NO_x , compostos voláteis (por exemplo, ácidos orgânicos de cadeias curtas, aldeídos, álcoois, ésteres e hidrocarbonetos) e vapor de água. A presença de compostos voláteis na fase gasosa do solo pode ter caráter de um substrato ou um inibidor para a população microbiana. Como já foi dito, o ar e a água se

alternam em um mesmo espaço no solo, portanto a composição gasosa é facilmente manipulada com a alteração da proporção de água (PREVEDELLO, 1996 *apud* PALA, 2002; MILLIOLI, 2009).

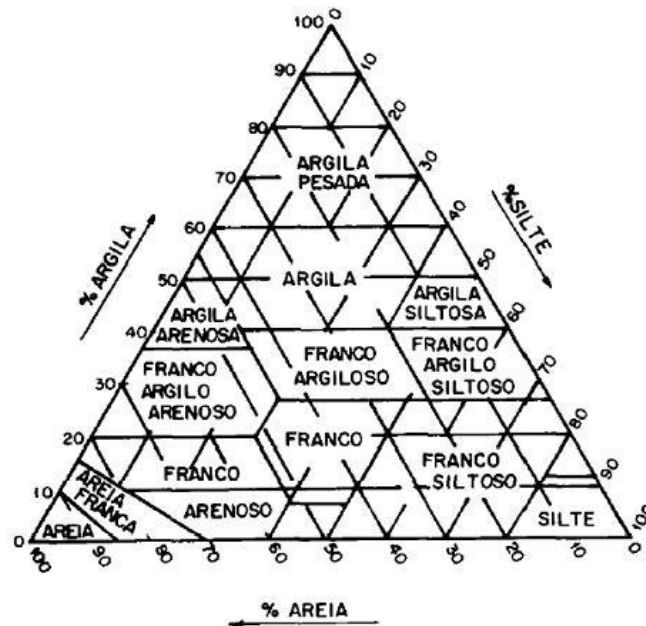
A presença do ar é de extrema importância por tornar disponível o oxigênio indispensável para o processo de respiração da biota do solo, o que favorece a mineralização da matéria orgânica presente no solo. O solo que apresenta quantidades elevadas de substâncias biodegradáveis apresenta um maior consumo de O₂ para oxidar a matéria orgânica, e conseqüentemente há elevada liberação de CO₂, produto final da mineralização da matéria orgânica do solo (MILLIOLI, 2009).

2.1.3 Frações texturais do solo

As partículas sólidas minerais do solo são divididas em três frações texturais: areia, silte e argila. Algumas partículas são suficientemente grandes para serem vistas a olho nu, enquanto outras são extremamente pequenas a ponto de apresentarem propriedades coloidais, isto é, num sistema físico-químico de duas fases, uma delas, chamada de dispersa, está extremamente subdividida e imersa na outra, a fase dispersora.

Solos com diferentes proporções de areia, silte e argila resultam em diferentes classes texturais. A Figura 4 é um diagrama ternário o qual descreve as misturas de areia, silte e argila e seus respectivos nomes.

Figura 4 - Triângulo das classes texturais do solo



Fonte: ABNT, 1989.

As propriedades do solo são um dos mais importantes fatores para explicar os diferentes resultados de toxicidade em diferentes solos. A fração poro-água do solo é a maior rota de exposição a substâncias químicas para diversos organismos presentes no solo, o que implica que a biodisponibilidade dos contaminantes dependerá principalmente do equilíbrio de sorção entre o solo e os poros de água (DOMENE, 2010; SMIT, 1998).

O tamanho da partícula, bem como o índice de vazios afeta a condutividade hidráulica, uma importante característica do solo. Quanto menor a partícula, menor a dimensões dos canais de fluxo e conseqüentemente a condutividade hidráulica. Dessa maneira, solos constituídos por areias finas apresentam baixa permeabilidade. Cabe ressaltar, que o grau de saturação do solo exerce influência direta na condutividade hidráulica (ALONSO, 2005).

A estrutura do solo é a chave para o seu funcionamento (MCKENZIE e DEXTER, 1996). Os solos urbanos, altamente perturbados pelas atividades humanas, consistem na mistura de diversos horizontes e de materiais não pertencentes ao solo natural. Assim, tais solos apresentam propriedades hidrogeológicas diferentes daquelas dos solos naturais (CRAUL, 1990, *apud* POZDNYAKOVA, 2001). O rearranjo das partículas por agregação, por exemplo, induz a um aumento aparente da capacidade de difusão térmica se comparado ao material homogeneizado (HORN, 1994). Segundo os autores, a formação de agregado também afeta a aeração e a composição gasosa do espaço poroso do intra-agregado.

Dependendo do tipo e intensidade da agregação, os poros intra-agregados podem apresentar-se completamente anóxicos, enquanto os poros inter-agregados permanecem completamente aerados.

As argilas e o complexo argila-húmus retêm íons de carga contrária, geralmente cátions que ficam em equilíbrio na solução do solo, onde pode ocorrer o intercâmbio de cargas. Quando a concentração de um cátion aumenta na solução (com a adição de fertilizante, por exemplo) o cátion agregado libera uma parte dos outros cátions retidos no coloide, que passam para a solução. A quantidade de cátions, que um solo pode repor constitui a sua capacidade de intercâmbio catiônico que é expressa em miliequivalentes por 100 gramas de solo. A capacidade de intercâmbio varia com o tipo e a quantidade de argila, matéria orgânica e de óxidos metálicos presentes (CENPES, 2002).

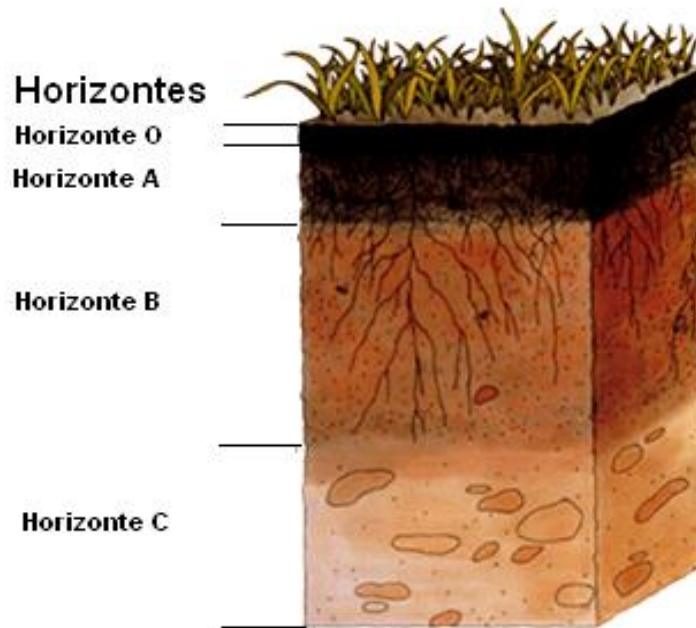
2.1.4 Classificação do solo

O solo possui, além da camada superficial, de poucos centímetros, outras camadas horizontais distintas entre si quanto à sua morfologia (MEURER, 2000). De acordo com o autor, o conjunto dessas camadas, chamadas de horizontes e identificadas a partir do corte vertical do solo, é chamado “Perfil do Solo”. Indica ainda o autor que o “Perfil do Solo” é ferramenta para o estudo de campo dos solos.

Os horizontes do solo diferem em um número de características morfológicas e físicas facilmente visíveis tais como cor, textura, estrutura e espessura, sendo que outras propriedades tais como composição química e mineral, consistência, entre outros, necessitam de análises laboratoriais (NRCS, 2011). Segundo MEURER (2000), a cor é uma das características mais perceptíveis quando se analisa um perfil de solo, citando que, como resultado da gênese e pedogênese do solo, encontram-se solos escuros, cinzentos, amarelados, brumados com diversas tonalidades. De acordo com a NRCS (2011), todas as propriedades acima mencionadas são usadas para definir os tipos de horizontes do solo.

Conforme Meurer (2000), as letras maiúsculas A, B e C são usadas para representar os principais horizontes do solo e as letras O e R designam um horizonte orgânico em solos minerais, com matéria orgânica fresca ou em decomposição, e a rocha inalterada, respectivamente (Figura 5). Ainda segundo o autor, a rocha inalterada que compõe o horizonte R poderá ou não ter sido a rocha matriz que originou o solo.

Figura 5 - Perfil do Solo



Fonte: Adaptação de Natural Resources Conservation Service, NRCS, 2011.

A maioria dos solos tem três grandes horizontes: o horizonte superficial A, o subsolo B e o substrato C, sendo que alguns solos apresentam o horizonte orgânico O na superfície ou subsuperfície (NRCS, 2011). Os solos que têm uma perda significativa de minerais, chamada de eluviação, são designados pela letra E (NRCS, 2011) e, segundo Meurer (2000), apresentam uma camada de cores claras com menor teor de argila abaixo do horizonte A. Ainda segundo o autor o horizonte B caracteriza-se pela pouca quantidade de matéria orgânica e pelo acúmulo de argila, ferro e alumínico, sendo denominado de horizonte de acúmulo iluvial. A respeito desse horizonte, afirma o autor que o mesmo é o Horizonte Diagnóstico do solo. Os horizontes A e B juntos formam o *solum*, que é a parte do solo que sofre a influência dos animais e das plantas (MEURER, 2000) e conseqüentemente são horizontes suscetíveis a ser mais rapidamente contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, caso aconteça um acidente com óleo cru ou derivados.

No Brasil, a classificação taxonômica dos solos é apresentada pelo Sistema Brasileiro de Classificação de Solos – SiBCS, cujo desenvolvimento é fruto do trabalho de especialistas de diversas instituições de pesquisa e universidades brasileiras, coordenado pelo Centro Nacional de Pesquisa de Solos - CNPS, órgão da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. (EMBRAPA, 2006).

O Sistema Brasileiro de Classificação de Solos é estruturado em seis níveis categóricos definidos com base em características e propriedades relacionadas com o uso e manejo dos solos. A classificação de um solo é obtida a partir de dados morfológicos, físicos, químicos e mineralógicos.

A mais recente versão do SiBCS, publicada em 1999, apresenta os seguintes níveis categóricos:

Classes do 1º nível categórico (Ordens)

Classes do 2º nível categórico (Subordens)

Classes do 3º nível categórico (Grandes Grupos)

Classes do 4º nível categórico (Subgrupos)

4º nível categórico (Famílias)

4º nível categórico (Séries)

As treze ordens (Classes do 1º nível categórico) do sistema (após revisão no ano de 2005) são: Argissolos, Cambissolos, Chernossolos, Espodossolos, Gleissolos, Latossolos, Luvissolos, Neossolos, Nitossolos, Organossolos, Planossolos, Plintossolos e Vertissolos.

2.1.5 O papel dos microrganismos no solo

O solo contém uma grande população de bactérias, fungos, algas, protozoários, nematoides e vírus. A microbiota do solo está distribuída em todos os tipos de solo com ligeiras modificações. A distribuição dos microrganismos apresenta variações de acordo com o tipo de solo e profundidade. Nesse *habitat* heterogêneo, ocorrem interações biológicas intensas e processos bioquímicos associados à degradação da matéria orgânica, além de ocorrerem transformações de elementos minerais, importantes para a nutrição das plantas como N, P, S, Fe e Mn (EWEIS *et al.*, 1998).

As bactérias formam o grupo de microrganismos mais abundantes nos solos. São seres unicelulares, procariontes e possuem parede celular. Ainda são os organismos mais comuns no planeta e presentes em todas as regiões e, como já mencionado, são os mais importantes do ponto de vista da biorremediação (EWEIS *et al.*, 1998).

As bactérias possuem tamanhos variados, podendo ser menores que 1 μm , mas a faixa mais comum de tamanho está entre 1 e 3 μm . Devido ao tamanho reduzido, esses seres apresentam uma grande área superficial exposta ao solo. Considerando que uma única bactéria possui 1 μm de comprimento e 0,5 μm de espessura e assumindo que um grama de solo contém um bilhão de células bacterianas, a área superficial da bactéria no solo é de cerca de 460 acres nas primeiras polegadas de solo (DRAGUN, 1998 *apud* CENPES, 2002).

Dentro do grande grupo das bactérias, podem-se destacar os actinomicetos que apresentam importante papel na biodegradação de petróleo e derivados. Esses microrganismos são bactérias gram-positivas que crescem formando filamentos ramificados, originando micélios semelhantes aos fungos filamentosos. Apesar de também serem encontrados em ambientes aquáticos, os actinomicetos são, caracteristicamente, organismos do solo.

Sob o ponto de vista nutricional, são microrganismos pouco exigentes e capazes de utilizar uma grande variedade de substâncias como fonte de carbono, inclusive hidrocarbonetos aromáticos (MADIGAN *et al.*, 2000 *apud* CENPES, 2002). Os fungos são, juntamente com as bactérias, os principais responsáveis pela biodegradação de hidrocarbonetos no solo. Os seres pertencentes a esse grupo são eucariontes e podem ser unicelulares (leveduras) ou pluricelulares (fungos filamentosos e cogumelos). Os fungos filamentosos são encontrados com mais frequência no solo, já havendo sido identificados mais de 700 espécies e 170 gêneros diferentes no solo (DRAGUN, 1998 *apud* CENPES, 2002).

Comunidades microbianas pertencentes a ecossistemas contaminados apresentam pouca diversidade quando comparadas àquelas presentes em ambientes não contaminados. Esse comportamento pode ser explicado pelo predomínio das espécies capazes de degradar o contaminante ou, pelo menos, sobreviver em sua presença (MACNAUGHTON *et al.*, 1999 *apud* CENPES, 2002). Também a diversidade pode ser influenciada pela complexidade da mistura de poluentes e pelo tempo de exposição ao mesmo.

Além dos fatores físico-químicos, as interações entre os microrganismos (simbiose, protocooperação, comensalismo, competição, amensalismo, predação e parasitismo) podem influenciar o seu crescimento e sobrevivência no solo.

As análises de caracterização microbiológica consistem na quantificação de microrganismos heterotróficos totais, quantificação de fungos e da quantificação da população degradadora de óleo (hidrocarbonoclástica). Fahnestock *et al.* (1998) indica uma densidade $\geq 1.000 \text{ UFCg}^{-1}$ em solo seco, para que ocorra a biodegradação dos hidrocarbonetos.

2.2 Petróleo

2.2.1 Origem e aspectos gerais

Há diversas teorias sobre o surgimento do petróleo e a mais aceita é que este é resultado da transformação da matéria orgânica oriundas de animais e vegetais depositados no fundo de oceanos e mares a qual, submetida à pressão das camadas de sedimentos que foram se depositando e formando rochas sedimentares, passou por transformações químicas ao longo de milhares de anos (RIBEIRO, 2010). Na antiguidade, o petróleo era usado para fins medicinais ou para lubrificação e era conhecido com os nomes de óleo de pedra, óleo mineral e óleo de nafta (VALE, 2009).

No estado bruto o petróleo tem valor mineral, mas a partir de seu refino são gerados combustíveis líquidos, solventes, lubrificantes e diversos outros produtos de alto valor (OROPEZA, 2007).

Constituído ou derivado de uma mistura de compostos orgânicos líquidos ou semissólidos, podendo conter compostos de enxofre, nitrogênio, oxigênio, entre outros, a composição do petróleo é de difícil determinação (FARIA *et al.*, 2009). A alta proporção de carbono e hidrogênio existente no petróleo mostra que os hidrocarbonetos são seus principais constituintes, podendo chegar a mais de 90% de sua composição (ZÍLIO e PINTO, 2002).

Segundo Faria *et al.*(2009), a despeito de existirem diversas técnicas para a avaliação qualitativa desses compostos, a determinação quantitativa do petróleo, que separado do gás é também chamado de óleo, constitui uma tarefa desafiadora. Em função dessa dificuldade quanto à determinação dos diversos tipos de compostos de petróleo, na indústria petrolífera normalmente é feita à medição de suas propriedades físico-químicas e, a partir destas, é estimado qual o tipo de composto predominante naquela mistura ou óleo (ZÍLIO e PINTO 2002; OROPEZA, 2007).

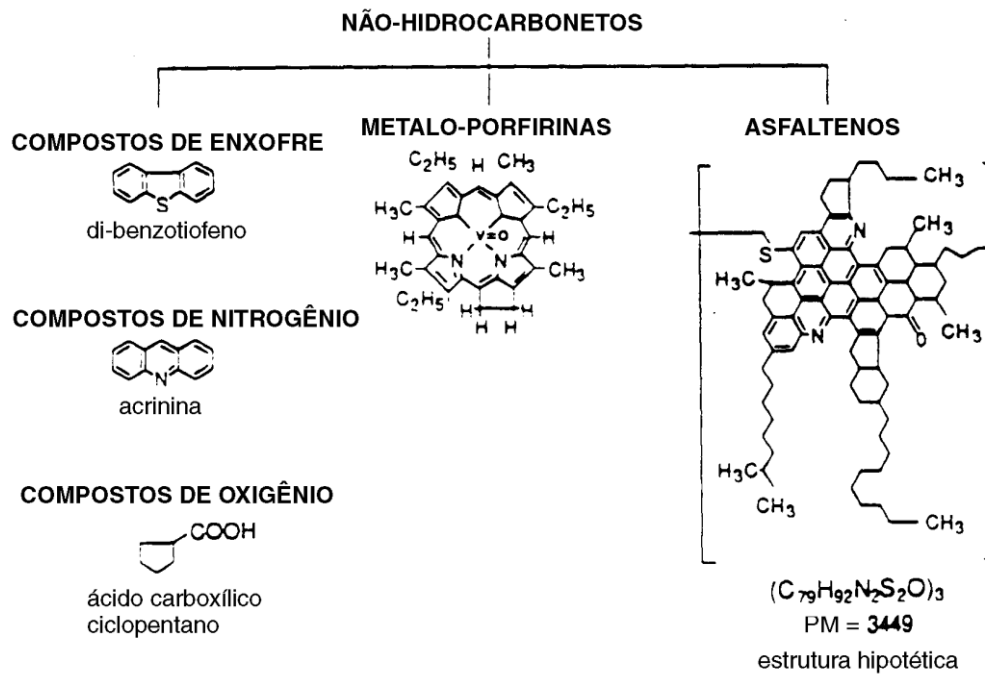
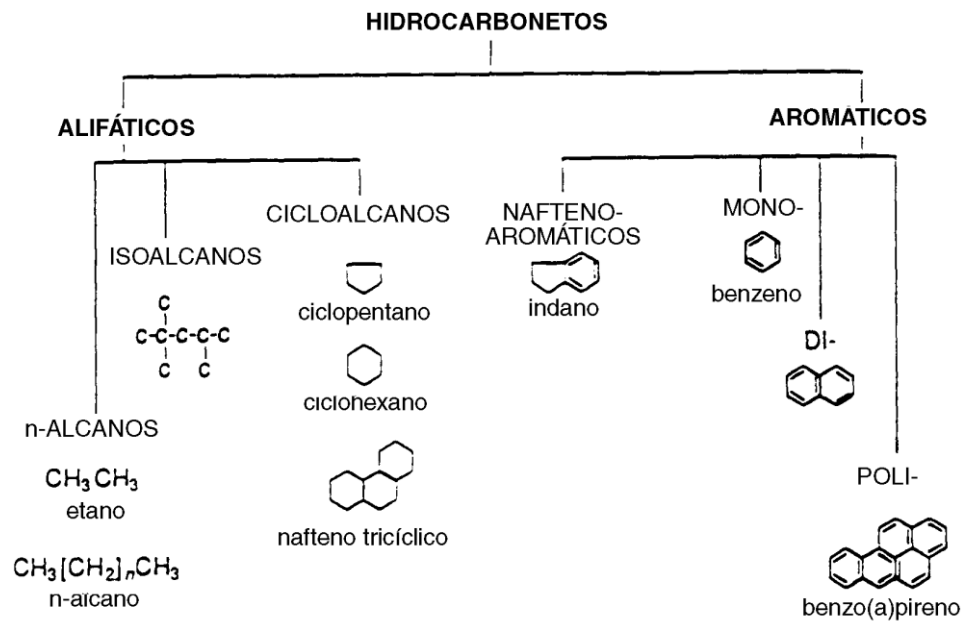
2.2.2 Composição química

De acordo com Zílio e Pinto (2002), a composição global do petróleo pode ser definida quanto ao teor de hidrocarbonetos e de não hidrocarbonetos. A Figura 6 apresenta os hidrocarbonetos alifáticos (n-alcenos, isoalcenos e cicloalcenos) e os aromáticos (naftenoaromáticos, mono e poli aromáticos). Os não hidrocarbonetos são as resinas e asfaltenos (fenóis, ácidos graxos, cetanos, ésteres, etc.).

Os hidrocarbonetos saturados compreendem os alcanos de cadeia normal e ramificada (parafínicos), e cicloalcanos (naftênicos). Já os hidrocarbonetos aromáticos, abrangem moléculas aromáticas puras, cicloalcanos-aromáticos (naftenoaromáticos) e normalmente compostos cíclicos de enxofre. As resinas e asfaltenos são componentes policíclicos, de alto peso molecular, abrangendo átomos de nitrogênio, enxofre e oxigênio. Os asfaltenos são insolúveis em alcanos leves e, desta maneira, precipitam com n-hexano. As resinas são mais solúveis, mas também são muito polares e fortemente retidas por sílica gel quando é realizada uma cromatografia líquida, a não ser que um solvente polar seja usado como fase móvel.

Entre os hidrocarbonetos alifáticos, os alcanos são encontrados no petróleo na faixa de 5 até 40 átomos de carbono. O gás natural associado ao petróleo contém os alcanos mais voláteis, isto é, aqueles com baixos pesos moleculares - metano em sua maioria, e quantidades progressivamente menores de etano, propano e butano. Os hidrocarbonetos de petróleo são classificados como alcanos (normal e iso), ciclo-alcanos, aromáticos, asfaltenos e resinas. Os ciclo-alcanos presentes são conhecidos também por naftênicos. Os alcenos (chamados também de olefinas) são raros no petróleo cru, mas podem estar presentes em pequenas quantidades nos derivados de petróleo devido ao processo de craqueamento (EWEIS *et al.*, 1998; SEABRA, 2005).

Figura 6 - Estruturas químicas de alguns compostos encontrados no petróleo



Fonte: SEABRA, 2005.

2.3 Atividades potencialmente poluidoras de solo

Neste século XXI o desafio que as empresas de energia enfrentam é gigantesco e complexo: disponibilizar a uma população de mais de um bilhão de pessoas que ainda vivem à margem do sistema, fontes modernas de energia para se locomover, cozinhar, conservar alimentos, iluminar casas, escolas e hospitais. Assim, é necessário que haja oferta de energia abundante e acessível a todos (BRANCO, 2008). Recurso esgotável, o petróleo ainda é a principal fonte de energia no mundo (RAMOS *et al.*, 2008).

No Brasil, a primeira bacia sedimentar onde foi encontrado petróleo para exploração comercial foi a do Campo de Lobato, no Recôncavo baiano. Posteriormente, a partir dos anos 1953 a exploração passou a ser realizada em todas as bacias sedimentares do Brasil. Com as dificuldades de acesso em terra, experimentadas entre os anos 1930 e 1960, a exploração de petróleo passou a ser buscada ao longo do litoral e dos rios, como o Amazonas. Em terra e em mar, as bacias sedimentares brasileiras possuem um grande potencial para a exploração de petróleo, considerando a similaridade das condições geológicas no mundo (CHAMBRIARD *et al.*, 2008).

Segundo o anuário 2011 da revista Análise Energia, a participação brasileira na produção mundial de petróleo em 2009 foi de 2,7%, com dois milhões de barris por dia. A descoberta de grandes depósitos de hidrocarbonetos abaixo da camada de sal ao longo de quase toda costa brasileira mudou o papel do Brasil no contexto da indústria petrolífera. Esta mudança se deu devido ao fato de que o país se tornou uma das maiores fronteiras exploratórias para uma *commodity* quase rara atualmente no mundo. Assim, em decorrência da exploração destes depósitos, o Brasil se tornará em breve um dos países produtores de petróleo mais relevantes no cenário mundial (ESTRELLA, 2009).

As estimativas mais conservadoras indicam que as reservas do país estão entre as dez maiores do mundo (REVISTA ANÁLISE ENERGIA, 2011).

Quando comparada a outras atividades, a indústria do petróleo se caracteriza por um elevado potencial de degradação ambiental (MARTINI *et al.*, 2003). Nela, o potencial impacto ambiental está presente em todo o processo. Em cada segmento da indústria do petróleo, são numerosas as oportunidades de introdução de hidrocarbonetos no meio ambiente. No transporte de petróleo e derivados, uma atividade vital para o setor, por exemplo, são geradas enormes quantidades de resíduos sólidos: diversos materiais contaminados por petróleo (estopas, pigs etc.), borras oleosas de fundo de tanques de armazenamento e de navios petroleiros, as borras oleosas de limpeza de caixas de separação

água e óleo - SAO e os solos contaminados por vazamentos de petróleo, principalmente em oleodutos (Figura 9), devido à corrosão, falha estrutural ou operacional e ação de terceiros (LOPES, 2007).

Oleodutos são sistemas constituídos de tubulações e estações de bombeamento, destinados a conduzir petróleo ou seus derivados líquidos. As tubulações, normalmente enterradas, são utilizadas para o transporte de petróleo e seus derivados entre terminais, entre terminais e refinarias e terminais e monobóias ou quadros de boias (Figura 7).

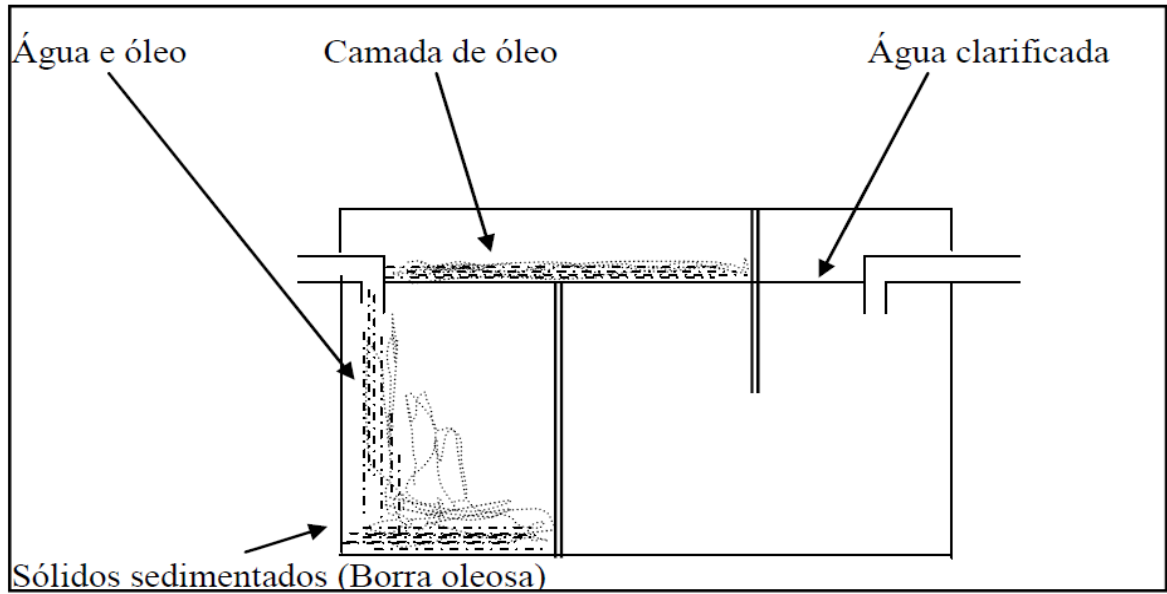
Figura 7 - Oleoduto em construção



Fonte: Petrobras, 2011.

Como o próprio nome sugere o SAO (Figuras 8 e 9) é um equipamento destinado a separar o óleo da água a ser descartada, quando o teor de óleo nessa água for maior que o recomendado pela legislação, normalmente de 15 ppm a 20 ppm.

Figura 8 - Esquema de um Separador de Água de Óleo – SAO



Fonte: Secron, 2010

Figura 9 - Separador de Água de Óleo – SAO



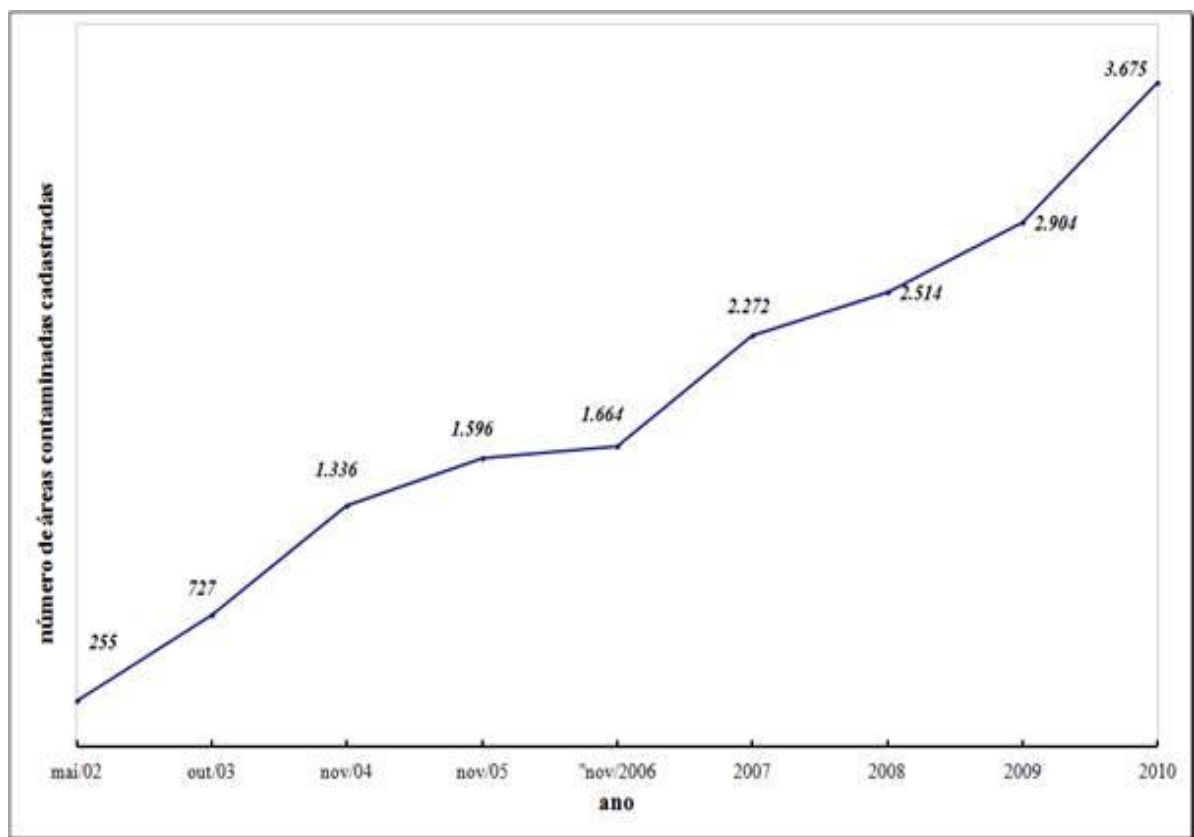
Foto: Jorge Antônio Lopes.

Dados da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP (2012) afirmam que no Brasil há mais de 101 terminais e mais de 25 mil quilômetros de dutos

para o armazenamento, transferência e transporte de petróleo e derivados, gás liquefeito de petróleo - GLP, álcool em sua grande maioria.

Os fatos citados e o vertiginoso incremento no número de áreas contaminadas registradas pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB nos últimos anos (Figura 10) são um claro indicativo do aparelhamento técnico e administrativo dos órgãos ambientais, que por sua vez reflete a maior cobrança da sociedade com relação ao tema, indicam a relevância dos processos de tratamento de áreas contaminadas.

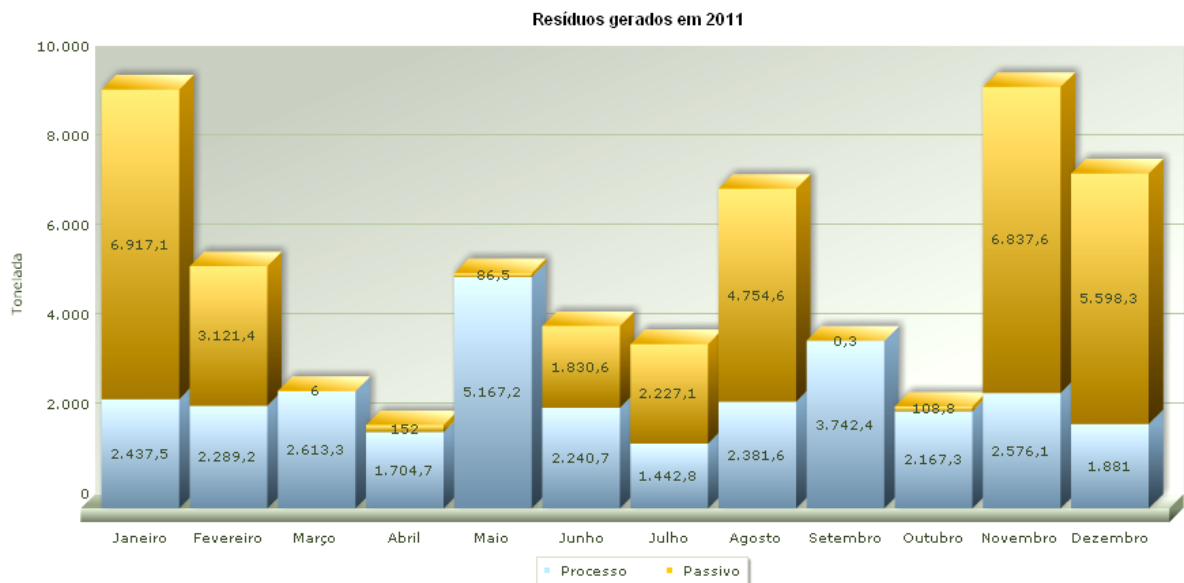
Figura 10 - Áreas contaminadas do Estado de São Paulo



Fonte: CETESB, 2012.

Corroborar esta situação os dados referentes a uma empresa de armazenamento de petróleo e derivados no Brasil, que indicam que a geração de resíduos oriundos das atividades de recuperação de sítios contaminados por hidrocarbonetos de petróleo (passivo), ultrapassou a cifra de 32 mil toneladas, somente no ano de 2011 (Figura 11).

Figura 11 - Geração de resíduos



Fonte: Banco de Dados Empresa de Armazenamento, 2012

2.4 Processos de tratamentos em áreas contaminadas

A norma N-2622 C (PETROBRAS, 2010), cujo objetivo é o estabelecimento de critérios básicos para o gerenciamento de resíduos e a disposição de resíduos no âmbito do sistema Petrobras, indica algumas tecnologias de tratamento de resíduos, ressaltando que a escolha deve considerar, entre outros, o menor impacto ambiental, com redução do uso de recursos naturais e a avaliação do custo do transporte e os impactos no custo final. Com efeito, conforme Moura (2000), os conceitos BPEO - *Best Practicable Environmental Option* (melhor opção ambiental prática) e BATNEEC – *Best Available Techniques Not Exceeding Excessive Costs*, ou seja, Melhor Técnica Disponível Sem Incurrir em Custos Excessivos devem ser aplicados quando da escolha da tecnologia.

Entre outros, a norma mencionada apresenta processos e tecnologias para tratamento de resíduos.

2.4.1 Processos Físicos

2.4.1.1 Estabilização / solidificação

O processo de Estabilização/Solidificação – S/S consiste em agrupar ou confinar fisicamente os contaminantes dentro de uma massa estabilizada (solidificação) ou induzir reações químicas entre o agente estabilizador e os contaminantes de maneira a reduzir a sua mobilidade no meio ambiente (estabilização). Diferentemente de outras tecnologias de remediação, o processo de Estabilização/Solidificação procura aprisionar os contaminantes dentro da sua mídia “hospedeira” (solo, areia, etc.), ao invés de removê-los por meio de tratamentos químicos ou físicos (Federal Remediation Technologies Roundtable, 2012).

Os sistemas trado/ensecadeira e os sistemas cabeça de injeção são técnicas usadas para estabilização/solidificação no solo. Esses sistemas aplicam agentes para confinar ou imobilizar os contaminantes (Figura 12).

Barreiras horizontais subsuperficiais (barreiras de fundo) podem ser usadas para prevenir a migração vertical dos contaminantes, criando uma superfície de material impermeável abaixo do material contaminado. A implementação desta tecnologia é altamente dependente das propriedades físicas do solo (Federal Remediation Technologies Roundtable, 2012).

Figura 12 - Trado/Ensecadeira-cabeça de injeção

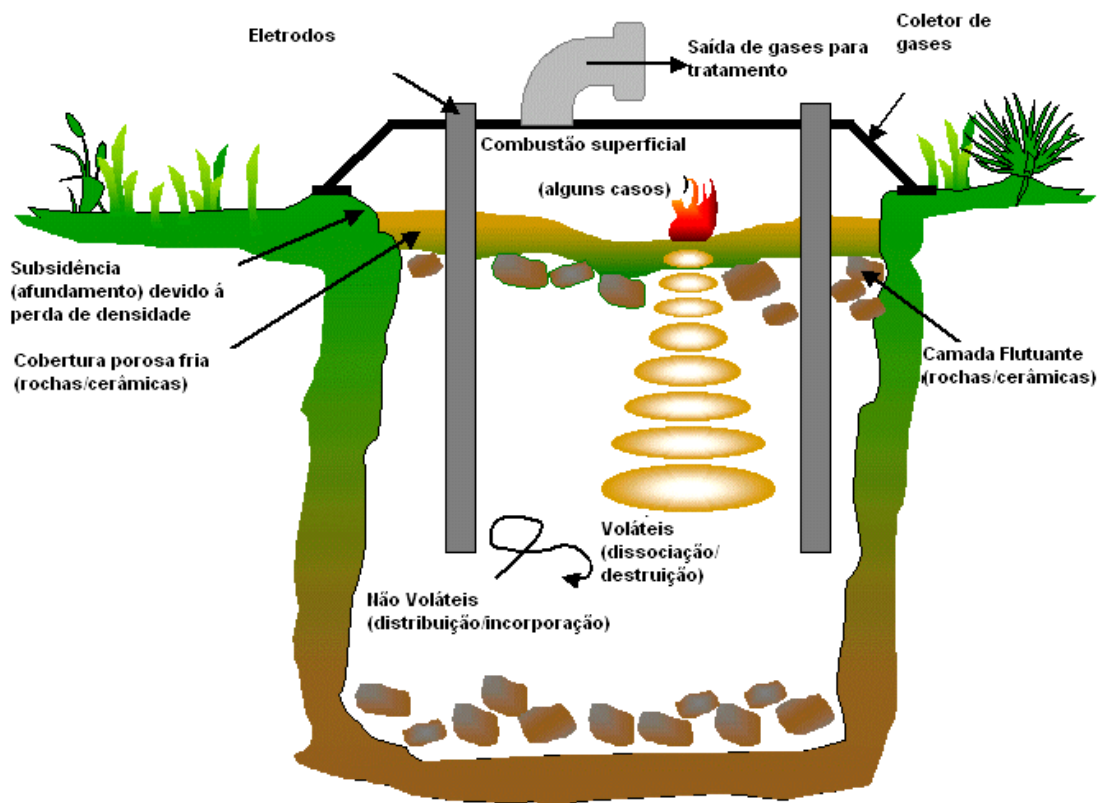


Fonte: Adaptado de FRTR, 2012.

Outro sistema de Estabilização/Solidificação – S/S é a Vitrificação *In Situ* – ISV (Figura 13), a qual utiliza uma corrente elétrica para derreter o solo por meio de altas temperaturas (de 1.600 a 2.000 °C) e assim imobilizar a maior parte dos contaminantes inorgânicos e destruir os orgânicos por meio de pirólise. Os poluentes inorgânicos são incorporados a uma massa vitrificada.

O vapor d'água e os produtos da combustão da pirólise orgânica são capturados e encaminhados para um sistema de tratamento de gases, o qual remove os particulados e outros poluentes do gás. O produto da vitrificação é um material vítreo, quimicamente estável e resistente à lixiviação, similar à obsidiana (pedra vulcânica negra) ou basalto. O processo destrói ou remove os materiais orgânicos. Os radionuclídeos e elementos-traço (metais potencialmente tóxicos) são retidos dentro do solo fundido.

Figura 13 - Sistema típico Vitrificação In Situ



Fonte: Adaptado de FRTR, 2012

2.4.1.2 Incineração

A tecnologia de incineração (Figura 14) utiliza o processo combustão com chama controlada para destruir e volatilizar os contaminantes orgânicos. A planta de incineração

inclui um forno rotativo, o qual pode ser usado para tratar uma grande variedade de formas de resíduos, tais como sólidos, líquidos, pastosas, calça e outros.

Um sistema de controle da poluição do ar é usado para tratar as emissões atmosféricas oriundas do processo. Inclui um ou mais dos seguintes componentes: ciclones, filtro-manga, sistemas de condicionamento de gás, depurador e sistema de eliminação de névoa (U.S. EPA, 2000).

Segundo Formosinho *et al* (2000), as policlorodibenzo-para-dioxinas, as quais formam uma família de compostos mais conhecidos como dioxinas, são consideradas produtos químicos mais tóxicos produzidos artificialmente. Ainda segundo os autores, estes compostos caracterizam-se pela sua natureza sintética, persistência no meio ambiente e nos tecidos animais, especialmente os gordurosos, onde se acumulam. A formação de dioxinas tem sido fortemente associada à incineração; contudo, a dioxina é um subproduto da combustão incompleta (Environmental Science Engineering, 2006). Assim, operação dos incineradores deve ser feita dentro de critérios técnicos rígidos, como forma de evitar a liberação de tais contaminantes (FORMOSINHO, 2000; MILARÉ, 2001). Entretanto, a nova geração de incineradores, projetados para ter um tempo de residência alto (acima de 2 segundos) a 1000°C na câmara secundária (ou após o queimador) e uma mistura de ar adequada, têm uma baixa emissão de dioxinas (Environmental Science Engineering, 2006).

Figura 14 - Incinerador de Resíduos



Fonte: Lumina Engenharia Ambiental, 2006.

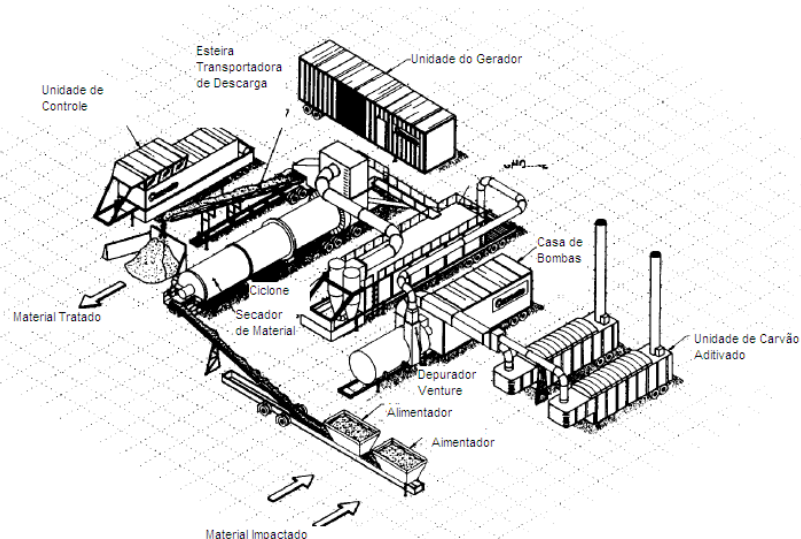
2.4.1.3 Dessorção térmica

Adsorção é mecanismo pelo quais as moléculas se juntam ou aderem à superfície de um adsorvente sólido, devido a forças químicas ou físicas (FAHNESTOCK *et al.*, 1998). Segundo Silva (2004), contaminantes orgânicos são fortemente sorvidos ao solo.

Já a dessorção térmica consiste na liberação de um estado de adsorção ou de absorção. A dessorção térmica é usada para tratar solos contaminados pelo aquecimento do solo (direta ou indiretamente) a uma temperatura alvo de maneira a volatilizar e separar os contaminantes orgânicos do solo. Nesse processo, os compostos orgânicos são separados da matriz, mas não destruídos, embora alguma destruição térmica possa ocorrer (U.S. EPA, 2001). Os sistemas que vaporizam e queimam os contaminantes são considerados incineradores.

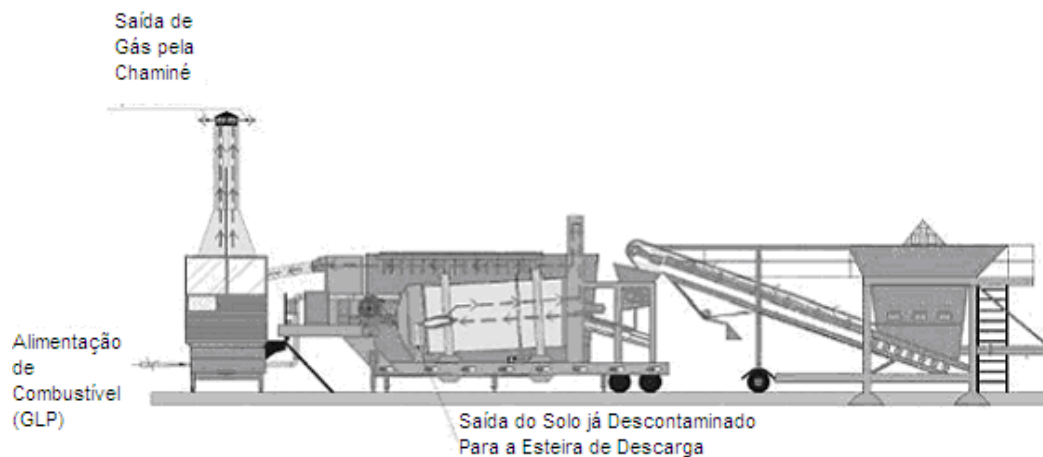
Após a separação, o ar, gases da combustão ou um gás inerte (como o nitrogênio, o qual pode ser introduzido para impedir a combustão) são introduzidos na corrente dos resíduos para carrear os contaminantes volatilizados. Os contaminantes volatilizados (vapores) são coletados e geralmente tratados por um ou mais tecnologias de tratamento de emissões atmosféricas, incluindo filtração, depuração úmida, adsorção da fase vapor por filtro de carbono e oxidação térmica (U.S. EPA, 2001). Depois da limpeza, os vapores são descarregados para a atmosfera. A dessorção térmica pode também causar a quebra parcial de alguns compostos acarretando a formação de novos, os quais podem formar novos contaminantes - dioxinas e furanos. Além de plantas fixas (Figura 15), existem também unidades móveis (Figura 16), as quais possibilitam o tratamento *On Site*.

Figura 15 - Esquema típico de uma instalação de Dessorção Térmica



Fonte: Essencis-Ambiterra, 2006

Figura 16 - Ilustração de Unidade Móvel de Dessorção Térmica



Fonte: Essencis-Ambiterra, 2006

2.4.1.4 Coprocessamento

De acordo com o documento *Compilation of comments received from Parties and others on the draft Guidelines on Best Available Techniques and provisional Guidance on Best Environmental Practices* (UNEP, 2005), modernas plantas de incineração e aterros seguros demandam um alto investimento e elevado custo de operação, além da necessidade de pessoal especializado. Dessa maneira, a utilização dos fornos de cimenteiras é uma alternativa ambientalmente adequada para a destruição de uma grande variedade de resíduos.

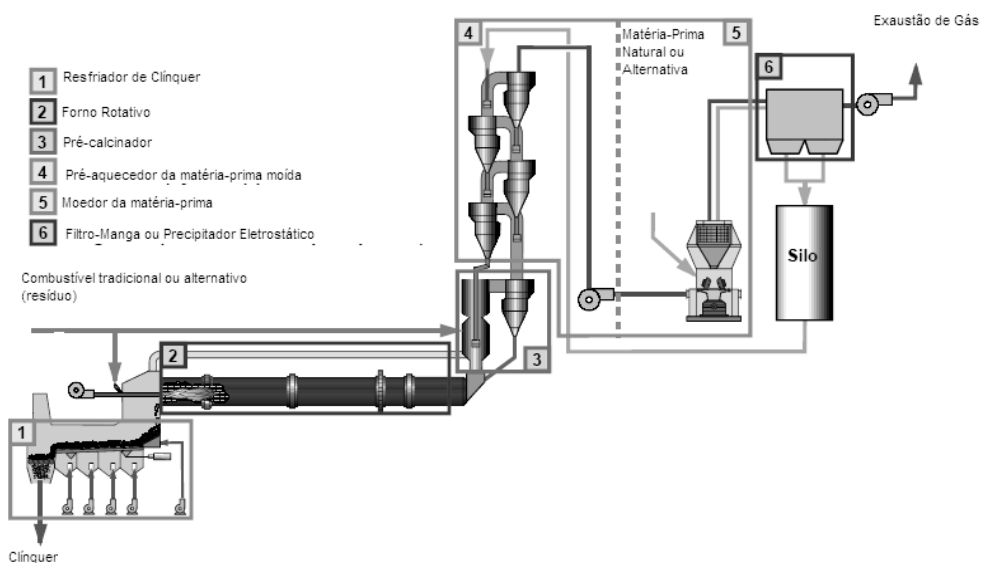
Segundo o documento, a produção de cimento é um processo que manipula materiais intensamente. Depois da mineração, moagem e homogeneização das matérias-primas, a próxima fase da manufatura do cimento é calcinação do carbonato de cálcio, seguida da sinterização (processo em que duas ou mais partículas sólidas se aglutinam pelo efeito do aquecimento a uma temperatura inferior à de fusão, mas suficientemente alta para possibilitar a difusão dos átomos das duas redes cristalinas) do óxido de cálcio resultante com sílica, alumina e óxido de ferro a altas temperaturas para formar o clínquer. Depósitos naturais de calcário são fontes de carbonato de cálcio. Sílica, óxido de ferro e alumina são encontrados

em vários minérios e minerais, como areia, xisto, argila e minério de ferro. Contudo, resíduos de processos industriais têm sido usados em substituição a matérias-primas naturais. A produção de cimento também consome muita energia. Uma grande variedade de combustíveis é usada como fonte de energia, incluindo coque, gás natural e óleo.

Coprocessamento refere-se ao uso de resíduos (terra contaminada, borra oleosa, solventes etc.) no processo industrial de cimenteiras ou outra planta de combustão (Figuras 17 e 18). Significa a substituição do combustível primário e matéria-prima pelo resíduo, recuperando energia e matéria do resíduo. Tais resíduos têm ainda que ser beneficiados antes de introduzidos na planta. Esse beneficiamento, que consiste na redução do tamanho de partículas e na produção de uma mistura mais homogênea, é feito nas plataformas de blendagem, após análises laboratoriais para avaliação quanto à possibilidade de aproveitamento no forno (Revista Meio Ambiente Industrial, 2003). O uso de resíduos como fonte de energia e matéria-prima para cimenteiras tem sido aplicado com sucesso desde o início dos anos 80 na Europa, Estados Unidos, Canadá e Japão. Ainda segundo o documento da UNEP (2005), o coprocessamento apresenta as seguintes características:

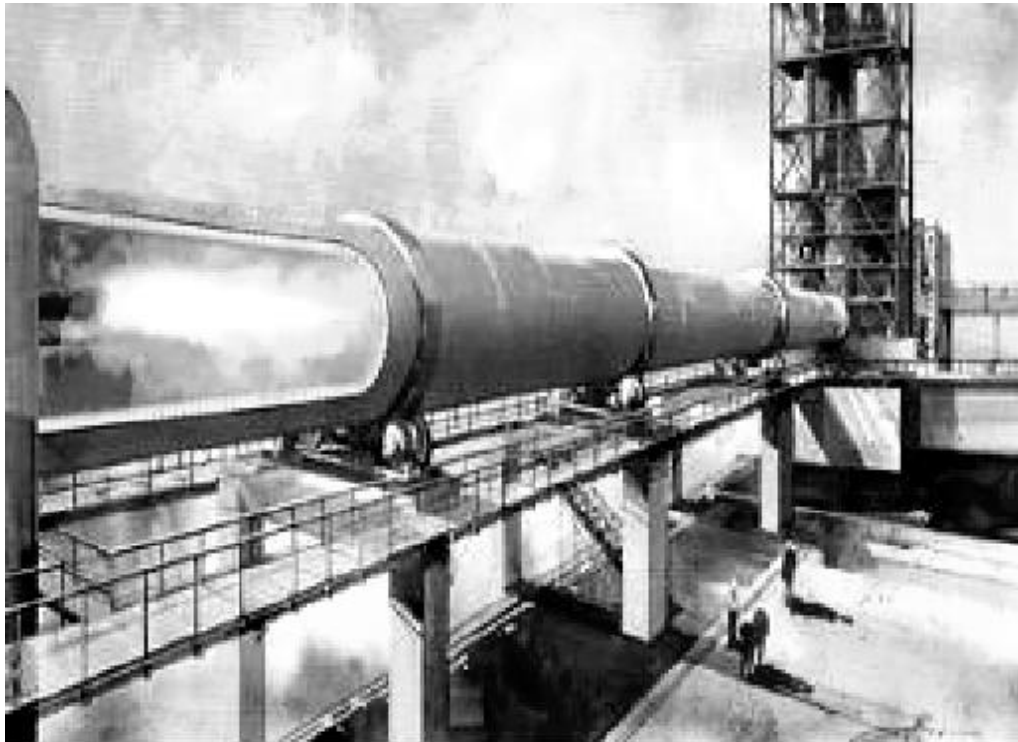
- As condições alcalinas e a intensiva mistura favorecem a adsorção dos componentes voláteis da fase gasosa. Isso resulta numa baixa emissão de gases poluentes e da maioria dos elementos-traço.
- As reações no forno a 1450°C permitem a incorporação das cinzas (escória) e, em particular, a ligação química dos metais ao clínquer.
- A substituição direta do combustível primário por resíduo com alto poder calorífico permite uma recuperação eficiente de energia.

Figura 17- Produção de clínquer



Fonte: Adaptado de GCWMCP, 2005

Figura 18 - Forno rotativo com queimador



Fonte: SILVA; ARAÚJO, 2003.

Liu *et al.* (2003) conduziram experimentos, os quais mostraram que os resíduos coprocessados em fornos rotativos não afetam a qualidade do clínquer e que as cinzas resultantes do processo podem ainda ser usadas na produção do cimento, sendo incorporadas à escória, que segundo Formosinho *et al.*, 2000, é o material fundido e vitrificado resultante do aquecimento de um sólido a temperaturas elevadas.

Segundo os autores, os elementos-traço (metais potencialmente tóxicos) oriundos dos resíduos são imobilizados e estabilizados no clínquer e no cimento. Afirmam ainda que a concentração de poluentes nas emissões atmosféricas fica abaixo dos valores permitidos na *China National Standard-Air Pollutants Emission Standard*. Todavia, segundo Francisco, J. L. *et al.* (2007), há restrições importantes para a queima de resíduos industriais em fornos de cimenteira por conta da manutenção das características de qualidade do cimento produzido, o que acarreta limitações quanto aos resíduos aceitos para serem coprocessados.

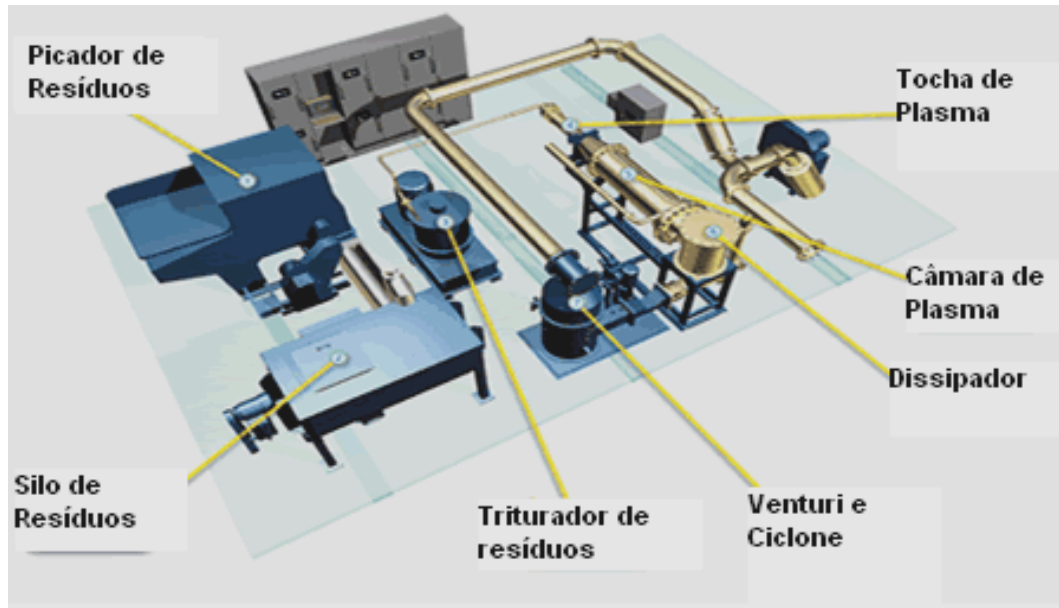
2.4.1.5 Pirólise

Como a incineração, a pirólise é um processo térmico que usa altas temperaturas para destruir os resíduos. A diferença principal é que a pirólise usa menos oxigênio que a tradicional queima de massa da incineração. A incineração e a pirólise, bem como a tecnologia de plasma, que será apresentada no próximo item, são conhecidas como Tecnologias Térmicas Avançadas ou Tecnologias de Conversão. Nessas tecnologias, os resíduos são destruídos para criar resíduos gasosos, sólidos e líquidos. Os gases podem ser queimados num segundo estágio do processo. Na pirólise os resíduos são termicamente degradados na ausência de ar (e oxigênio). O principal produto do processo de pirólise é o syngas (gás de síntese), o qual é composto principalmente de monóxido de carbono e hidrogênio (85%), com pequenas quantidades de dióxido de carbono, nitrogênio, metano e vários outros gases hidrocarbonetos. Uma das grandes vantagens da pirólise é que, por não utilizar oxigênio, menos emissões podem ser produzidas. Contudo, se os gases e óleos oriundos do processo são queimados num segundo estágio, isso pode também gerar emissões.

2.4.1.6 Plasma térmico

O plasma térmico é gerado em equipamentos chamados de Tochas de Plasma, (Figura 19) no qual um eletrodo cria um arco elétrico para aquecer um gás (argônio, nitrogênio, hidrogênio, hélio, oxigênio, etc.) e produzir o plasma, chamado o quarto estado da matéria.

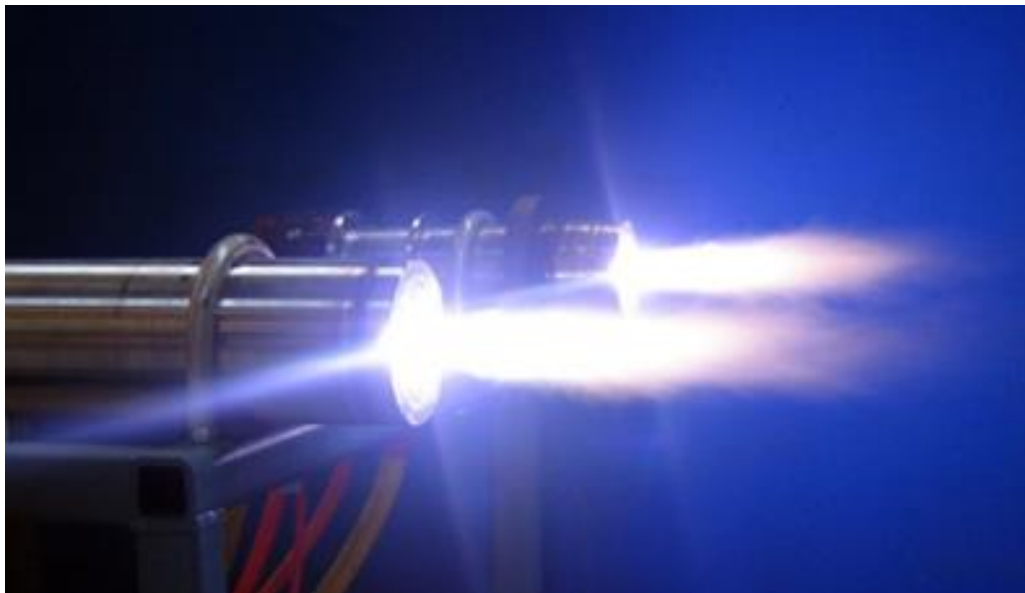
Figura 19 - Sistema de Plasma Térmico



Fonte: Adaptado de HowStuffWorks, 2011.

O gás parcialmente ionizado forma um jato com temperatura de 15.000 °C (Figura 20), tipicamente, muito superiores às alcançadas por queimadores a óleo ou gás.

Figura 20 - O gás parcialmente ionizado do sistema de plasma térmico



Fonte: HowStuffWorks, 2011.

Devido a essa alta temperatura e capacidade térmica, o plasma é capaz de promover a dissociação de quase qualquer material em sua forma molecular mais simples. Quando moléculas são submetidas a uma intensa energia, como o calor gerado por uma tocha de plasma, as ligações moleculares, que as mantêm unidas tornam-se excitadas e são quebradas.

O que resta são os componentes elementares das moléculas. No caso do cianeto, por exemplo, o que resta são átomos de carbono e nitrogênio.

Assim, o jato de plasma pode ser utilizado para o tratamento de solo contaminado, que é aquecido em ambiente controlado, evitando-se a combustão dos compostos orgânicos. As moléculas orgânicas volatilizam-se ou gaseificam-se, e esse gás sintético, se adequadamente limpo, pode ser usado como uma fonte combustível. Os compostos inorgânicos derretem e são vitrificados ou convertidos também em numa substância vítrea e dura, semelhante à obsidiana. Os metais também derretem e unem-se ao resto da matéria inorgânica (escória). O óleo contido no material é recuperado, sem emissão de gases, isentando completamente o material inicialmente contaminado. Os compostos inorgânicos são vitrificados (Figura 21).

Figura 21 - Solo Contaminado por petróleo submetido ao tratamento por plasma



Fonte: Foto Roberto N. Szente

Diferentemente de incineradores, os quais utilizam a combustão para destruir os resíduos, nesse processo não há queima ou oxidação. O calor do sistema de plasma ocasiona a pirólise, um processo no qual a matéria orgânica é quebrada e se decompõe. A tocha de plasma pode operar em vasos estanques. A combustão requer oxidação, diferentemente da pirólise (HOW STUFF WORKS, 2011).

2.4.2 Processos Químicos

Os métodos químicos abrangem a injeção de produtos químicos no solo de maneira a induzir as reações de redução ou oxidação. Têm o objetivo de reduzir a mobilidade e a toxicidade dos contaminantes. A oxidação dos contaminantes é alcançada pela aplicação de permanganato de potássio, peróxido de hidrogênio etc. As adições de metais alcalinos, dióxido de enxofre ou sulfato ferroso, promovem reações de redução. Diplock *et al.* (2009) citam como forma de decomposição química dos poluentes presentes em solos impactados por hidrocarbonetos, a oxidação por raios ultravioleta ou o emprego de peróxido de hidrogênio (Fenton).

2.4.2.1 Extração química

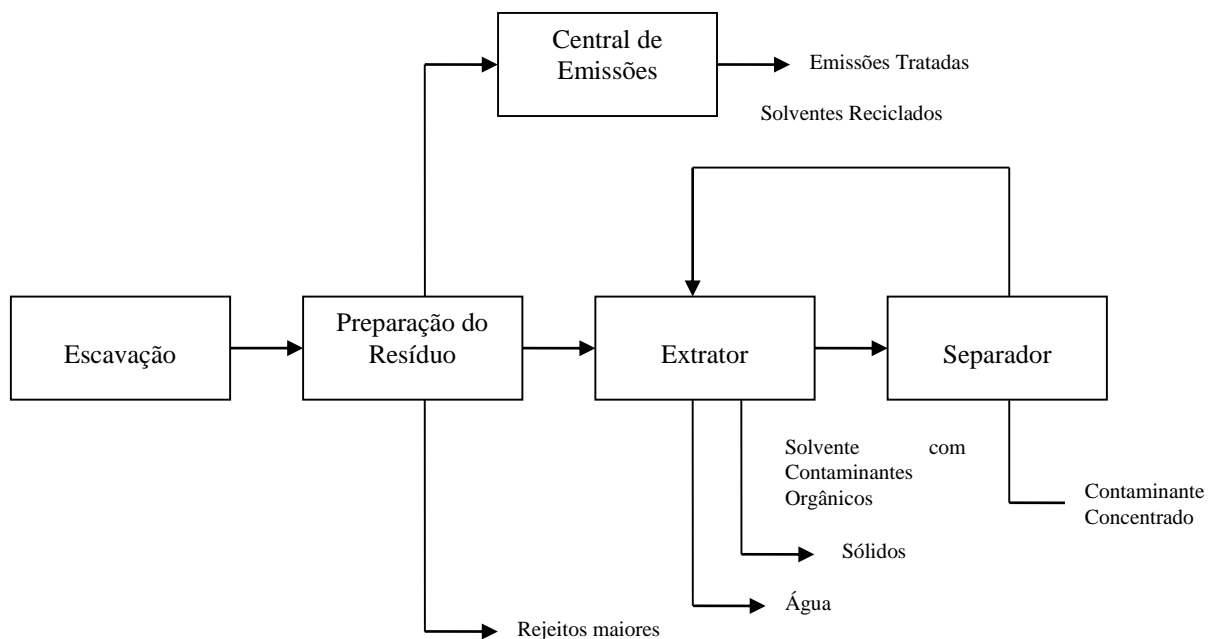
A extração química não destrói o resíduo, porém é um meio de separar o contaminante do solo e sedimentos, reduzindo assim o volume do material perigoso que deve ser tratado. A tecnologia utiliza a extração química e difere da lavagem do solo, a qual geralmente utiliza somente água ou água associada a um aditivo. Estágios de separação física são normalmente realizados antes da extração química para graduar o solo em frações grossas e finas, considerando que as partículas mais finas contêm a maior parte dos contaminantes. A separação física pode também melhorar a cinética de extração, separando elementos-traço, se presentes no solo (Federal Remediation Technologies Roundtable, 2012).

Como extratores, podem ser utilizados ácidos ou solventes orgânicos. Na extração por ácido, o ácido hidrolórico é introduzido no solo por meio da unidade de extração. O tempo de residência na unidade é variável, dependendo do tipo de solo, do contaminante da sua concentração, normalmente varia de 10 a 40 minutos. A mistura solo-extrator é continuamente conduzida ao tanque de mistura, o solo e o extrator são separados por um hidrociclone. Quando a extração é completada, os sólidos são transferidos para um sistema de

limpeza. Os solos são lavados com água para remoção do ácido e de metais. A solução de extração e a água de lavagem são recicladas com o uso de precipitantes, como hidróxido de sódio ou cal, juntamente com um floculante que remove os metais e recupera o ácido. Os elementos-traço (metais potencialmente tóxicos) são concentrados numa forma potencialmente apropriada para recuperação. Na fase final, os solos são desidratados e misturados com cal e fertilizante para neutralizar o ácido residual (Figura 22).

No segundo caso, traços do solvente podem permanecer no solo, razão pela qual a toxicidade do solvente é um importante fator a ser considerado.

Figura 22 - Processo típico Extração Química.



Fonte: Adaptado de FRTR, 2012.

As tecnologias mais utilizadas no sistema Petrobras para o tratamento ex situ de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo e derivados são, além da biopilha, a incineração, o coprocessamento e a dessorção térmica (LOPES, 2007).

2.4.3 Processos Biológicos

Os métodos biológicos envolvem comumente a quebra do contaminante em formas não tóxicas, usando processos biológicos (RISER *et al.*, 1988 *apud* Sarkar *et al.*, 2005).

2.4.3.1 Biorremediação

O processo de biorremediação pode ser definido como a utilização de microrganismos para remover poluentes de solos, águas e sedimentos. A biorremediação também reduz a toxicidade dos compostos orgânicos e a migração potencial dos constituintes perigosos no material a ser tratado (DASAPPA; LOEHR, 1991).

Microrganismo é o termo frequentemente usado para descrever organismos microscópicos multicelulares e unicelulares, que desempenham um papel fundamental nos processos de biorremediação (EWEIS *et al.*, 1998). As bactérias são quase sempre os microrganismos degradadores primários, embora em muitos casos os fungos tenham grande importância. Os fungos, assim como as bactérias, metabolizam compostos orgânicos, mas não parecem muito eficazes na maioria dos sistemas tecnológicos de biorremediação (EWEIS *et al.*, 1998). Em solos bem aerados, tanto as bactérias quanto os fungos serão bastante importantes nos processos de degradação. Contudo, em solos pouco aerados, as bactérias sozinhas são responsáveis pelas transformações biológicas e químicas que ocorrem (ALEXANDER, 1991 *apud* EWEIS *et al.*, 1998).

A pesquisa e o desenvolvimento de tecnologias de biorremediação são relativamente recentes, porém a simples utilização de processos microbianos para degradar compostos químicos não é uma ideia nova. Esses processos já vêm sendo utilizados há várias décadas na remoção de substâncias químicas de efluentes industriais e no tratamento de esgoto doméstico e industrial. Algumas das substâncias tóxicas que vêm sendo removidas com sucesso por meio da biorremediação são: o tolueno, naftaleno, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (herbicida) e pentaclorofenol (fungicida e conservador de madeira), hidrocarbonetos de petróleo, dentre outros (CENPES, 2002).

As bactérias compõem um grupo extremamente diverso de organismos com uma grande variação das propriedades morfológica, ecológica e fisiológica e são os degradadores primários de compostos orgânicos naturais ou xenobióticos encontrados no solo (EWEIS *et al.*, 1998). Devido à sua diversidade, as bactérias são normalmente encontradas em comunidades heterogêneas. Algumas espécies serão os degradadores primários, isto é, elas iniciarão a degradação do material orgânico presente no solo. Outras espécies crescerão nos compostos resultantes da degradação parcial de compostos orgânicos complexos ou dos resíduos gerados pelas bactérias degradadoras primárias. As bactérias possuem três aparências físicas gerais: esférica (*cocci*), bastão (*bacilo*) e espiral (*spirillum*).

Estruturalmente, as bactérias se caracterizam por uma camada externa relativamente desorganizada composta principalmente de polissacarídeos, conhecida como cápsula, uma parede celular rígida, uma membrana celular que encapsula o citoplasma, dentro do quais todas as reações necessárias ocorrem e a região nuclear, composta do elemento genético da célula. As bactérias são geralmente móveis e o método de movimentação mais comumente observado é por meio de flagelo. As bactérias são classificadas pelas suas características físicas, químicas, genéticas e metabólicas. O gênero e a espécie são determinados com base na forma e características químicas e genéticas. O resultado é que o potencial metabólico varia enormemente dentro da mesma espécie (EWEIS *et al.*, 1998).

O tamanho de uma bactéria depende bastante das condições de crescimento. Uma bactéria pode ter um diâmetro de apenas 0,2 micrômetros. Contudo, a maioria das bactérias cultivadas em laboratório são maiores. Bactérias esféricas podem ter um diâmetro variando de 0,5 a 1,0 micrometro, enquanto os bacilos podem medir de 0,5 a 2 ou 3 micrômetros (EWEIS *et al.*, 1998). O uso e a tolerância ao oxigênio é um dos métodos mais comuns de classificação. O oxigênio é o aceptor de elétrons mais comum nos organismos vivos (EWEIS *et al.*, 1998). Nas reações de oxirredução, os elétrons removidos do composto oxidado são transferidos para um composto que está sendo reduzido. Em organismos vivos, diversos passos estão envolvidos e o passo final resulta nos elétrons removidos sendo transferidos para um composto que deixa a célula. O oxigênio molecular é este composto e o produto é a água. Aeróbios obrigatórios são bactérias que requerem o oxigênio como aceptor de elétrons e crescem somente na presença de oxigênio.

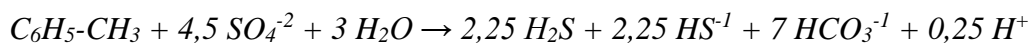
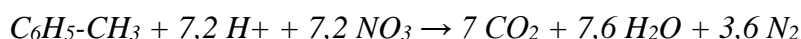
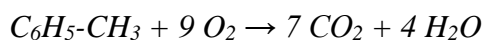
Aeróbios facultativos são bactérias que podem usar um aceptor de elétrons alternativo e crescem na presença ou na ausência de oxigênio. Anaeróbicos obrigatórios crescem somente na ausência de oxigênio. Alguns anaeróbios são tolerantes ao oxigênio, mas o oxigênio é tóxico para muitas espécies de anaeróbios obrigatórios. A habilidade dos microrganismos

degradarem hidrocarbonetos é conhecida desde 1895, quando Miyoshi demonstrou a mineralização de parafinas por microrganismos (BROWN 1987 *apud* URURAHY, 1998). A biodegradação de uma grande variedade de hidrocarbonetos tem sido demonstrada em laboratório e tem fornecido informações fundamentais sobre a bioquímica, genética e ecologia dos microrganismos responsáveis por tais eventos.

A caracterização dos genes envolvidos na degradação de poluentes tem promovido o desenvolvimento e a aplicação de técnicas moleculares para o estudo da ecologia microbiana de ambientes contaminados (MILCIC-TERZIC *et al.*, 2001). Entretanto, talvez a primeira aplicação de biorremediação num sítio contaminado por hidrocarbonetos tenha sido realizada por Richard L. Raymond. No sítio, afetado pelo vazamento de gasolina num duto na Pennsylvania-EUA em 1972, Raymond tentou biorremediar a fase dissolvida de hidrocarbonetos por meio da introdução de oxigênio na zona saturada, através de poços (RAYMOND, 1976 *apud* REISINGER, 1995). Uma observação-chave de Raymond foi a importância do fornecimento de oxigênio para o processo de biodegradação (BROWN *et al.* 1994 *apud* REISINGER, 1995).

O mecanismo metabólico pelo quais os microrganismos utilizam os hidrocarbonetos como fonte de energia pode ser aeróbio, tendo o oxigênio como aceptor primário de elétrons ou anaeróbio quando um aceptor de elétrons alternativo é usado, como por exemplo, nitrato ou sulfato (Figura 23). Embora os hidrocarbonetos possam ser degradados de ambas as formas, o mecanismo aeróbio é normalmente mais rápido e mais eficiente uma vez que as reações aeróbias requerem menos energia livre para serem iniciadas e produzem mais energia por reação (COOKSON 1995 *apud* REISINGER, 1995). O processo aeróbio domina na presença de oxigênio. Contudo, quando o oxigênio no sistema é consumido, os processos de desnitrificação dominam (BORDEN *et al.*, 1995 *apud* REISINGER, 1995).

Figura 23 - Reações de oxidação de tolueno



Fonte: MARIANO, 2006.

No caso da indústria petrolífera, os processos anaeróbios são frequentemente menos eficientes porque muitos compostos do petróleo são mais rapidamente biodegradados sob condições aeróbias (KHAITAN *et al.*, 2006). A biodegradabilidade dos compostos do petróleo é grandemente afetada por seu estado físico e toxicidade. Devido ao fato do petróleo ser uma mistura complexa, sua degradação é favorecida por uma população mista de microrganismos com uma vasta capacidade enzimática.

Adicionalmente, a degradação inicial dos hidrocarbonetos de petróleo normalmente requer a ação de enzimas oxigenase, dependendo assim da presença de oxigênio molecular. Portanto, condições aeróbias são necessárias para a quebra inicial dos hidrocarbonetos de petróleo. Nas etapas seguintes o nitrato ou o sulfato servem, como mencionado no parágrafo anterior, como aceptores de elétrons, embora seja o oxigênio mais comumente usado (EWEIS *et al.*, 1998).

Como já mencionado, no processo de biorremediação de áreas contaminadas, os hidrocarbonetos adsorvidos nas partículas de solo são metabolizados por microrganismos, tipicamente fungos, protozoários e bactérias autóctones (presentes no próprio solo). A técnica conhecida como bioestimulação consiste intensificar a atividade microbiana da população presente no solo por meio da adição de nutrientes ou de aceptores terminais de elétrons (BAPTISTA *et al.*, 2003; SARKAR *et al.*, 2005). A estratégia de biorremediação, na qual populações de microrganismos exógenos são adicionadas ao solo contaminado é conhecida como bioaugmentação (GALLEGO *et al.*, 2006).

Algumas vezes são adicionados microrganismos ao solo, mas na maioria dos casos a inoculação não se mostra efetiva, como no experimento conduzido por Filler *et al.*, (2001). Jorgensen *et al.* (2000) testaram o efeito de dois inóculos comerciais no tratamento de um solo contaminado por óleo lubrificante por meio da tecnologia de biopilhas operadas em escala de campo e verificou que a bioamplificação não exerceu influência significativa na eficiência do processo. Assim, comprovou que é muito mais vantajoso criar um ambiente favorável ao crescimento das bactérias nativas (bioestimulação) a adicionar microrganismos externos (bioaugmentação), resultados corroborados pelos obtidos nos estudos conduzidos por Pala, Freire e Sant'Anna (2002), nos quais foi avaliada a biodegradabilidade dos compostos presentes num solo impactado por petróleo cru.

Nos processos de biorremediação, a adição de corretivos orgânicos, incluindo borra de esgoto ou adubo composto, pode facilitar a degradação de contaminantes orgânicos, uma vez que eles desempenham um papel na suplementação de nutrientes e na fonte de carbono no solo contaminado (NAMKOONG *et al.*, 2002). A mistura de esterco seco ao solo além de

propiciar um suprimento adicional de nutrientes, contribui para o aumento da população microbiana, o que é vantajoso, uma vez que, segundo Bento *et al.* (2005), os microrganismos presentes já estão adaptados às condições do local.

Segundo Reisinger (1995), os microrganismos produzem enzimas usadas para extrair energia pela degradação das moléculas de hidrocarbonetos. São, portanto, heterotróficos, isto é, dependem de uma fonte externa de carbono para satisfazer suas necessidades de energia e crescimento celular. Como há uma grande variedade de organismos presentes nos solos (ALEXANDER, 1961 *apud* REISINGER, 1995), muitos podem, em maior ou menor extensão, utilizar os hidrocarbonetos para satisfazer tais necessidades. Reisinger (1995) confirma que as bactérias parecem ser as mais importantes no processo de degradação de hidrocarbonetos. De acordo com o autor, embora um organismo dominante ou grupo de organismos geralmente predomine em termos de quantidade e biomassa, outros organismos existem dentro do consórcio.

Existem alguns critérios que devem ser considerados antes da escolha da biorremediação como método de tratamento: devem existir microrganismos portadores da atividade catabólica requerida para o devido fim; esses microrganismos devem ser capazes de degradar o poluente em um tempo razoável; a rota metabólica envolvida na biodegradação não pode gerar produtos ou intermediários considerados tóxicos; a área em questão deve estar livre de substâncias consideradas inibitórias para a atuação da microbiota ou, se presentes, estarem em concentrações baixas, de tal maneira a não afetar o desempenho dos microrganismos; os contaminantes a serem removidos devem estar acessíveis aos microrganismos; o processo de biodegradação deve ser escolhido e desenvolvido de maneira a fornecer condições favoráveis à atuação dos microrganismos; o custo da tecnologia empregada não deve ser muito elevado, ou pelo menos, não ser muito mais caro que outros tipos de tecnologia igualmente eficazes na remoção do mesmo contaminante.

Vários são os fatores que influenciam a taxa de biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo. Uma dada população microbiana necessita de condições ambientais específicas. Se estas condições, as quais serão posteriormente apresentadas neste trabalho, não existirem, a população microbiana permanece em estado latente até que as condições ideais reapareçam. O solo possui, naturalmente, diversos microrganismos com atividades metabólicas variadas. A remediação de um sítio contaminado pode se dar de maneira passiva, isto é, apenas com o monitoramento das taxas de abatimento natural dos contaminantes, a atenuação natural monitorada.

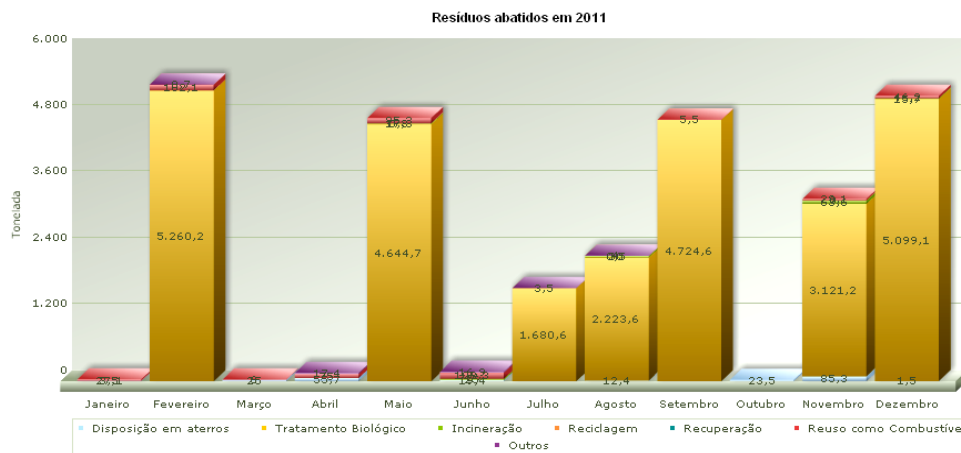
A biorremediação é efetiva para o tratamento da contaminação por hidrocarbonetos de petróleo em diversas condições (BALBA *et al.*, 1998). Um solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo e elementos-traço (metais potencialmente tóxicos) tem atividade microbiana suficiente para a biodegradação, sob condições não limitantes (PLESSIS *et al.*, 1995). Compostos altamente ramificados são, via de regra, mais recalcitrantes do que aqueles menos complexos (DEL'ARCO e FRANÇA, 1999). A seguinte sequência representa segundo Khaitan *et al.* (2006), a ordem decrescente geral de biodegradabilidade: n-alcenos, cadeias ramificadas de alcenos, cadeias ramificadas de alcanos, monoaromáticos, aromáticos polinucleares e asfaltenos. Segundo Eweis *et al.* (1998), apesar dos n-alcenos ser os mais biodegradáveis hidrocarbonetos de petróleo, alcanos normais na faixa de C₅ a C₁₀, em altas concentrações, são inibitórios para muitos degradadores, porque, como solventes, eles rompem as membranas lipídicas. Alcanos da faixa de C₂₀ a C₄₀ (chamadas de ceras) são sólidos hidrofóbicos; sua baixa solubilidade interfere com sua biodegradação. Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) são degradados um anel de cada vez, de maneira similar aos mecanismos da degradação dos compostos aromáticos (EWEIS *et al.*, 1998). Ainda segundo a autora, em alguns casos, microrganismos são capazes de transformar um composto orgânico sem, no entanto usá-lo como fonte de energia. Assim, tais microrganismos necessitarão de outro substrato como fonte de carbono e energia para crescer. Esse tipo especial de metabolismo é chamado de cometabolismo.

As bactérias representam o grupo mais numeroso e quimicamente ativo. Estes microrganismos são capazes de consumir hidrocarbonetos de petróleo, utilizando-os como fonte de carbono (para síntese de biomoléculas) e de energia. Parte da matéria orgânica (50%) é incorporada à biomassa e parte (cerca de 50%) é transformada em dióxido de carbono - CO₂ (ciclo Krebs – o oxigênio é utilizado pelos microrganismos como acceptor final de elétrons em sua cadeia respiratória) e água, produtos de sua completa mineralização. A atividade microbiana pode ser monitorada pela medição da respiração do solo - produção de CO₂, a qual reflete a degradação real da matéria orgânica (respirometria), isto é, o total de contaminante consumido - (NAMKOONG *et al.*, 2002), ou por contagem de bactérias (EWEIS *et al.*, 1998), ou ainda pela quantificação da atividade das desidrogenases (MILLIOLI, 2009). De acordo com Balba *et al.* (1998) a maneira mais confiável de se obter uma bem-sucedida biorremediação é garantir que microrganismos apropriados estejam presentes no solo em número adequado e que as condições físico-químicas do ambiente sejam otimizadas por meio de um projeto de engenharia apropriado, de maneira a intensificar o crescimento e a atividade microbianas.

2.4.3.1.1 Biopilhas

O sistema de biopilhas é uma tecnologia já desenvolvida em escala comercial. Exemplo disto, é que em uma empresa de armazenamento de petróleo no Brasil, mais de 22 mil toneladas de resíduos oriundos das atividades de recuperação de sítios contaminados foram tratadas com a tecnologia de biopilhas no decorrer do ano de 2011 (Figura 24).

Figura 24 - Tratamento com biopilhas



Fonte: Banco de Dados Empresa de Armazenamento, 2012.

Nela, o solo escavado é montado em pilhas (Figura 25) na superfície dos terrenos, para permitir a biodegradação dos contaminantes, daí o termo biopilha (BENYAHIA, *et al.*, 2005). É uma tecnologia de remediação com relação custo/benefício favorável (ITURBE *et al.*, 2004) que consiste em otimizar as condições para estimular a proliferação de microrganismos aeróbios (KODRES, 1998) por meio da aeração, adição de nutrientes (nitratos e fosfatos), uma vez que a presença de tais substâncias no solo pode ser limitada (LEAHY e COLWELL, 1990; DELILLE, 2007) e, de acordo com os experimentos conduzidos por ZHOU *et al.*, (1995), hidrocarbonetos de petróleo podem ser degradados a taxas relativamente altas depois de uma adição apropriada de nutrientes.

Experimentos conduzidos por Mariano *et al.* (2007) para a biorremediação de solo contaminados por hidrocarbonetos de petróleo mostraram que os melhores resultados eram obtidos quando nos tratamentos eram adicionados nutrientes. Esta conclusão foi corroborada pelos resultados obtidos por Rojas-Avelizapa *et al.* (2007), os quais concluíram também que agentes estruturantes (no caso, palha) e a adição de água desempenham um importante papel no estímulo à atividade microbiana aeróbia e assim, na remoção de hidrocarbonetos.

A taxa de degradação é também profundamente influenciada pela disponibilidade de oxigênio no meio das pilhas. Num sistema de biopilhas, há duas maneiras para o fornecimento de oxigênio: a aeração pode ser feita com o revolvimento das pilhas (biopilha dinâmica – Figura 26), como no experimento conduzido por Seklemova *et al.*(2001) ou pela aeração forçada usando ventiladores ou extratores de ar (COULON, *et al.*, 2005) e uma rede de tubos perfurados (biopilha estática – Figura 27).

As biopilhas podem ser instaladas *on-site* ou *off-site*, dependendo das características do local.

Figura 25 - Escavação do solo contaminado.



Figura 26 - Aeração - Biopilha dinâmica.



Figura 27 - Sistema de aeração – Biopilha estática



Num trabalho experimental com biopilha para o tratamento, conduzido por de Jorgensen *et al.* (2000), nos primeiros sessenta dias, o solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo, de maneira a permitir a aeração, foi revolvido na base de duas vezes por mês e no terceiro mês mensalmente.

Eweis *et al.* (1998) citam que a aeração deve ser realizada semanalmente e Balba *et al.* (1998) mencionam uma vez por mês. Ayotamuno *et al.* (2006) recomendam que durante a estação chuvosa, o revolvimento deve ser executado cinco vezes por semana de maneira a facilitar a difusão do oxigênio.

Devido à aeração, o solo pode se tornar seco requerendo que seja adicionada umidade. De maneira a melhorar a permeabilidade, bem como a retenção de umidade, também é necessária a adição de materiais estruturantes (serragem, palha, cascas de árvores, etc.) ao solo escavado.

a) Fatores que afetam o desempenho de biopilhas

De acordo com Shukla *et al.*(2010), são os seguintes, os mais importantes parâmetros para a biorremediação:

- Natureza dos poluentes

- Estrutura do solo, pH, umidade e hidrogeologia
- Nutrientes presentes, diversidade microbiana do local
- Temperatura e oxidação-redução (potencial redox)

Biopilhas são tratamentos comuns para a remediação *ex situ* de solos contaminados. A aplicação da tecnologia de biopilhas para o tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo é extremamente interessante para o Brasil devido às condições favoráveis de clima e à diversidade microbiana no país (ANDRADE, *et al.*, 2010).

A temperatura influencia profundamente todo processo biológico e pode-se esperar que tenha um efeito significativo na degradação biológica do óleo (DELILLE *et al.*, 2007; SEABRA, 2005).

De acordo com Atlas (1981), a biodegradação é fortemente dependente da temperatura.

Numa amostra de borra de óleo, foram observadas por Dibble *et al.* (1979) e Thavasi *et al.* (2007) maiores taxas de biodegradação com microrganismos incubados a 37° C, quando comparadas àquelas em temperaturas entre 20° C e 28° C.

Baixas temperaturas reduzem as atividades microbianas e conseqüentemente causam o decréscimo das taxas de biodegradação (YERUSHALMI, *et al.*, 2003; SANSCARTIER *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2009).

De acordo com Atlas (1981), a biodegradação de hidrocarbonetos tem sido reportada em temperaturas abaixo de 0° C. Todavia, prossegue o autor, a taxa e a extensão da biodegradação de hidrocarbonetos em baixas temperaturas geralmente é severamente restrita.

Delille *et al.* (2004) mostraram que baixas temperaturas podem ainda permitir a biodegradação por microrganismos nativos. No experimento conduzido pelos autores, uma cobertura para a pilha de solo induziu um pequeno aumento da temperatura na superfície do solo. A conclusão dos pesquisadores reforça os resultados obtidos por Rike *et al.* (2005), que mostram que atividade de biodegradação pode ocorrer a despeito de períodos com temperaturas do solo abaixo de zero.

A temperatura pode também alterar a natureza física, a composição química e a toxicidade do poluente, o que influencia no processo de degradação biológica (LEAHY e COLWELL, 1990). Os autores afirmam que, sob baixas temperaturas, a viscosidade do óleo aumenta, enquanto a volatilização dos tóxicos alcanos de cadeia curta é reduzida e sua solubilidade na água é aumentada. Tais eventos causam o retardo da biodegradação. Taxas de

degradação geralmente diminuem com a diminuição da temperatura, isto acontece como resultado das reduzidas taxas de atividade enzimática.

Temperaturas mais altas, tipicamente na faixa de 30° C a 40° C, aumentam para o máximo, as taxas do metabolismo dos microrganismos para a degradação de hidrocarbonetos. Acima dessas temperaturas, porém, a toxicidade dos hidrocarbonetos para a membrana dos microrganismos é aumentada (LEAHY e COLWELL, 1990).

De acordo com Sanscartier *et al.* (2009), o clima do deserto polar pode tornar a biorremediação de hidrocarbonetos persistentes, um desafio no Ártico. Todavia, conforme postulado por Sanscartier *et al.* (2009), o aquecimento do solo pode melhorar a biorremediação, como têm mostrado estudos de laboratório nos quais as taxas de biodegradação em solos árticos melhoram com esta técnica. Desta maneira, em regiões frias, um sistema de cobertura (Figura 28) ou outra solução de engenharia (Figura 29) deve ser aplicado para permitir o controle da temperatura, uma vez que nessas regiões, de acordo com Ferguson *et al.* (2008), a obtenção de um alto nível de eficiência da remediação é essencial para manter gerenciáveis os custos.

Figura 28 - Sistema de Cobertura



Figura 29 - Solução de Engenharia para o Controle da Temperatura



Estudos conduzidos por Coulon *et al* (2005), mostraram a viabilidade da biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo no solo em baixas temperaturas, com o uso de técnicas de engenharia. De acordo com Benyahia *et al* (2005), os benefícios dos sistemas de biopilhas com soluções de engenharia incluem também: operações mais seguras, balanço de materiais facilitado e melhor controle do processo.

Ferguson *et al.* (2008) postularam que a identificação de uma população bacteriana capaz de rapidamente mineralizar hidrocarbonetos a 42° C num sítio da Antártica contaminado com tal poluente abre a possibilidade da utilização de estratégias com o uso de aquecimento.

Schoefs *et al.* (1998) avaliaram a eficiência de um sistema de cobertura o qual pode manter a temperatura no interior das pilhas adequada para as atividades biológica, a despeito das condições climáticas no outono e inverno no Canadá. Também, os estudos conduzidos por Portier *et al.* (2007) demonstraram que a umidade e temperatura dos solos são fatores importantes para o sucesso da biorremediação de solos contaminados. De acordo com os autores o gerenciamento de tais parâmetros no estudo foi bem sucedido usando uma cobertura de polietileno (para o aprisionamento de vapor e calor), acoplado a atomizadores sprinklers (para o controle da umidade do solo) para melhorar a atividade microbiana, a despeito do frio do inverno. Citam os autores que uma significativa redução das concentrações dos

contaminantes fora observada, corroborando a conclusão de que se essas duas condições ambientais são gerenciadas, o tempo para atingir as metas de remediação podem ser significativamente reduzidas.

As características do solo no qual o contaminante é introduzido é também um importante parâmetro a ser considerado quando é planejada a biorremediação (TRUAX, 1995). De acordo com o autor, areia, silte e argila apresentam propriedades bastante distintas, as quais têm um importante papel nas taxas de biodegradação. Ainda de acordo com os autores, solos com partículas finas apresentam limitadas taxas de remoção microbiana de hidrocarbonetos quando comparados com solos arenosos, devido ao fenômeno da adsorção. Mariano *et al.* (2008) mencionam que o tamanho dos grãos e o tipo de argila são também parâmetros importantes para o controle dos processos de intemperização no solo.

A umidade do solo também é influenciada pelo silte e pela areia (GIAROLA *et al.*, 2002). Como mencionado acima, a estrutura do solo também é um fator crucial que afeta diretamente a biorremediação.

No Brasil há uma predominância de solos argilosos e arenosos. Recentes eventos envolvendo o derramamento de óleo em tais tipos de solo no Brasil têm motivado a realização de diversos estudos a este respeito (RIZZO *et al.*, 2008). Nos solos argilosos, os contaminantes não migram para muito longe da fonte e isto representa uma vantagem. Contudo, esta característica afeta negativamente a biorremediação. Assim, de acordo com Seabra (2006), a utilização de sistemas de biopilhas para o tratamento de solos contaminados ainda representa um desafio tecnológico devido aos altos conteúdos de argila e silte na maioria dos solos brasileiros. O autor realizou alguns experimentos relativos ao tratamento de solos argilosos e arenosos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo usando biopilhas dinâmicas. Após 24 semanas, a taxa de remoção dos solos argilosos foi de 86,2% (concentração inicial de 5,8%). Nos solos arenosos (concentração inicial de 1,7%) a taxa de remoção foi de 70%, mas em apenas 12 semanas. O autor cita que em ambos os casos foi utilizada casca de arroz como material estruturante (proporção solo: casca de arroz 9:1 a 4:1). O autor cita ainda que alguns outros estudos bem sucedidos, relativos ao uso da tecnologia de biopilha para o tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo foram realizados no Brasil.

2.4.3.1.2 Biorreatores

Os reatores biológicos ou biorreatores são vasos nos quais são mantidas as condições ambientais adequadas para a atividade biológica.

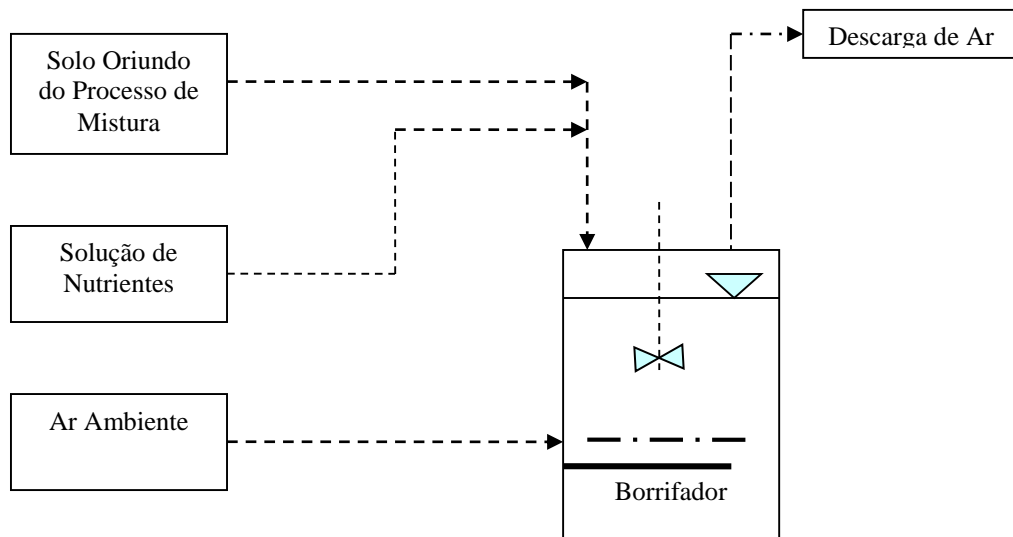
O emprego de biorreatores para o acompanhamento dos processos de biorremediação possibilita que sejam mantidas as condições ótimas para a degradação dos contaminantes (GOGOIA *et al.*, 2003; URURAHY, 1998). Dessa maneira, o uso da tecnologia permite um tratamento rápido e eficaz (BERGER, 2005).

De acordo com Fantroussi *et al.* (1999), a grande vantagem da utilização de biorreatores é que eles oferecem a possibilidade de se avaliar continuamente o processo de biorremediação em nível tridimensional. Consequentemente prosseguem os autores, torna-se fácil o acompanhamento espacial e temporal da distribuição dos microrganismos introduzidos. Por serem sistemas fechados, permitem o controle da temperatura, umidade, pH, oxigênio, nutrientes, adição de surfactantes, suplementação de microrganismos e controle da emissão de compostos orgânicos voláteis – COV (KHAN *et al.*, 2004).

Segundo Santos (2007), o biorreator mais usual para o tratamento de solos contaminados é do tipo “bioslurry”, ou reator de lama (Figura 30). De acordo com Khan *et al.* (2004), nesta tecnologia, também chamada de biorreator de fase semissólida, ao solo contaminado são adicionados os microrganismos degradadores selecionados e água. O solo escavado é previamente processado para a separação física das pedras e cascalho e a quantidade de água adicionada depende da concentração dos contaminantes, da taxa de biodegradação e da natureza do solo (Federal Remediation Technologies Roundtable, 2012). A mistura (lama) é agitada para manter os sólidos em suspensão e os microrganismos em contato com os contaminantes o que, segundo Rizzo *et al.* (2002), contribui para as altas taxas de degradação apresentadas pela tecnologia. Destacam ainda as autoras que este tipo de reator é mais indicado para solos que contenham partículas finas. Ainda de acordo com Khan *et al.* (2004), a tecnologia é adequada para a maioria dos tipos de petróleo. Rizzo *et al.* (2002) citam como desvantagem vantagem do biorreator, a necessidade de tratamento posterior os efluentes gerados, o que eleva os custos associados ao uso da tecnologia. Outros fatores limitantes para o uso da tecnologia são: a necessidade de classificação do material antes de ser introduzido no reator, o que pode dificultar e encarecer o processo; solos não homogêneos e argilosos podem criar sérios problemas de manuseio; caso haja fase livre, é mister a remoção; a desidratação do material, etapa final do tratamento, no caso dos solos finos pode se tornar

cara; é necessário um método adequado para descarte do efluente não reciclável (Federal Remediation Technologies Roundtable, 2012).

Figura 30 - Processo típico Biorreator



Reator de Agitação por Batelada

Fonte : Adaptado de FRTR, 2012.

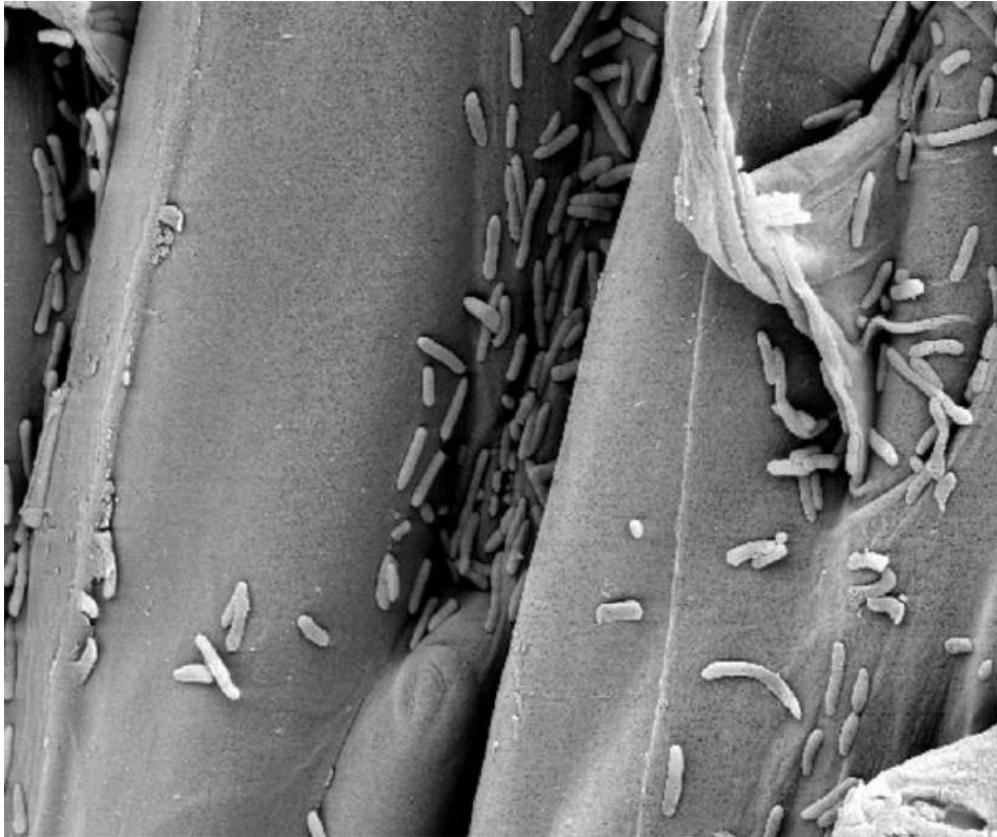
Há ainda os biorreatores de fase sólida, nos quais a umidade do solo é limitada à faixa de 10 a 20% (SANTOS, 2007), suficiente apenas, segundo Rizzo *et al.* (2002) , para manter a atividade dos microrganismos, sendo mais apropriados para o tratamento de solos com alto teor de sólidos.

2.4.3.1.3 Fitorremediação

Segundo Euliss (2008), fitorremediação é uma variação da biorremediação. É uma tecnologia emergente, a qual utiliza plantas e os microrganismos associados da rizosfera, que é a região do solo, pouco abaixo da superfície, rica em microrganismos e onde as raízes das plantas se desenvolvem (Figura 31), para remover, transformar ou conter produtos químicos tóxicos localizados nos solos, sedimentos, águas subterrâneas, águas superficiais e até mesmo na atmosfera (LIN *et al.*, 1998; SUSARLA *et al.*, 2002; GRATÃO *et al.*, 2005; GERHARDT *et al.*, 2009; SOLEIMANI *et al.*, 2010; FEDERAL REMEDIATION TECHNOLOGIES ROUNDTABLE, 2012). É considerada uma tecnologia amigável do ponto de vista ambiental,

que é segura e também uma maneira barata de remover contaminantes (SMITH *et al.*, 2011; GRATÃO *et al.*, 2005).

Figura 31 - Pseudomonas

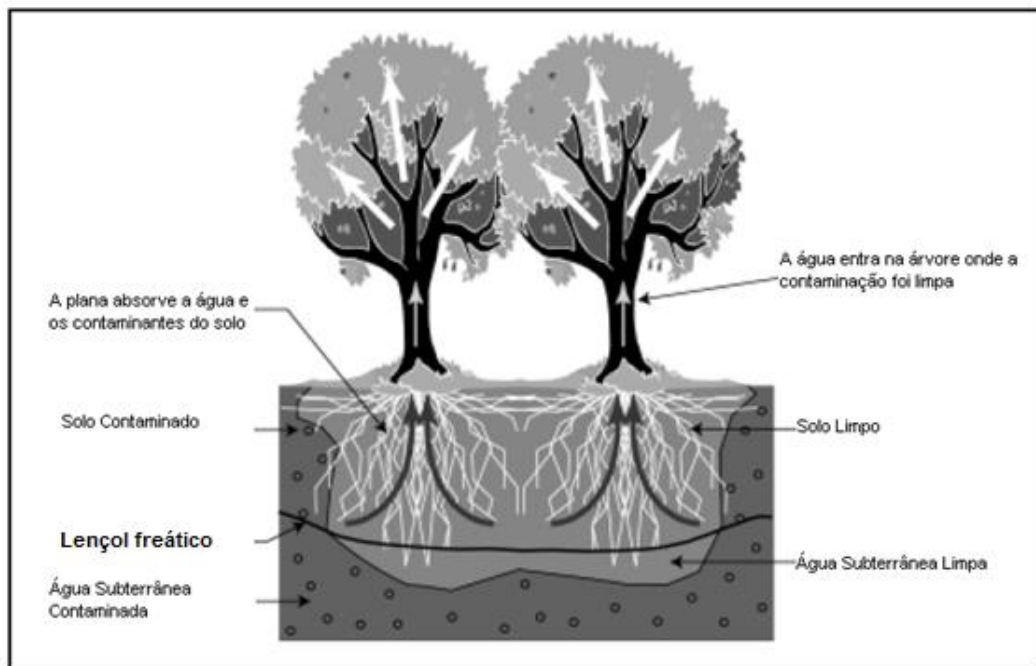


Fonte: EMBRAPA, Foto: Itamar Soares de Melo

Segundo Susarla *et al.* (1999), atualmente a fitorremediação é utilizada para tratar muitas classes de contaminantes, incluindo hidrocarbonetos de petróleo, afirmação compartilhada por Euliss *et al.* (2008) que indicam que o uso bem sucedido de plantas superiores para a remediação de solos e sedimentos contaminados com compostos de petróleo tem sido bem documentado na literatura. Corroboram a afirmação dos autores acima mencionados, os experimentos de fitorremediação de um solo contaminado com petróleo intemperizado (Figura 32), conduzidos por Soleimani *et al.* (2010), nos quais a degradação de hidrocarbonetos de petróleo foi aumentada na presença de raízes de plantas no solo. De acordo com estes autores, o plantio aumentou tanto o número total de bactérias como o de bactérias degradadoras de óleo. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos – US EPA (2001), aponta que fitorremediação tem sido testada com sucesso em muitas áreas e utilizada em muitos sítios do *Superfund*, que é o nome dado ao programa dos Estados Unidos, criado para tratar sítios abandonados com resíduos perigosos.

Através das raízes das plantas ocorre a liberação de para o solo de diversas substâncias orgânicas resultantes da fotossíntese. A existência desses substratos específicos excretados pelas plantas, chamados de exsudatos radiculares, produz uma alta concentração de microrganismos, favorecendo a degradação de poluentes eventualmente existentes no solo, especialmente por cometabolismo. A degradação de contaminantes por meio dos microrganismos da rizosfera é chamada de rizorremediação (DAMS, 2006)

Figura 32 - Fitorremediação *In Situ*



Fonte: Adaptado de US EPA, 2001.

De acordo com o Federal Remediation Technologies Roundtable (2012), os mecanismos da fitorremediação incluem: o aprimoramento da biodegradação na rizosfera; a fito-extração, também chamada de fito acumulação; a fito-degradação e a fito-estabilização:

- O aprimoramento da biodegradação na rizosfera ocorre no solo que circunda imediatamente as raízes das plantas. Os exsudatos radiculares liberados pelas raízes fornecem nutrientes para os organismos que melhoram sua atividade biológica. As raízes das plantas também desprendem o solo e então morrem, deixando caminhos preferenciais para o transporte de água e aeração. Este processo tende a puxar água para a zona superficial e secar a zonas saturadas inferiores.

- A fito acumulação consiste na captura dos contaminantes pelas raízes da planta e a transferência/acumulação (fito-extração) dos contaminantes para os galhos e folhas
- A fito-degradação é o metabolismo dos contaminantes no interior dos tecidos da planta. A planta produz enzimas, os quais ajudam a catalisar a degradação
- A fito-estabilização imobiliza os contaminantes na interface das raízes com o solo.

Krämer (2005) indica que a estratégia de fitorremediação mais efetiva, porém tecnicamente mais difícil é a fito-extração. Segundo o autor, a técnica envolve o cultivo de plantas tolerantes, as quais concentram os contaminantes em seus tecidos que ficam acima do solo. No final do período de crescimento, prossegue o autor, a biomassa da planta é colhida, seca ou incinerada e o material enriquecido com o contaminante é disposto em um depósito de rejeitos especial ou introduzido num fundidor. A energia obtida com a queima da biomassa, prossegue o autor, poderia suportar a lucratividade da tecnologia se a fumaça resultante puder ser adequadamente limpa. Acrescenta o autor que, para a fito-extração valer a pena, a biomassa seca ou a cinza oriunda dos tecidos da planta, que ficam acima do solo, deveria conter substancialmente uma concentração de contaminantes maior que a do solo contaminado.

Boonsaner *et al.* (2011) citam ainda como limitação da tecnologia, o fato de que determinadas espécies de plantas não crescerem em muitos tipos de solo, visão compartilhada por Gratão *et al.* (2005).

De acordo com Susarla *et al.* (1999), além da liberação de exsudatos radiculares, que dá causa ao aumento do carbono orgânico presente no solo, o processo inclui ainda: a alteração física e química das propriedades dos solos contaminados; a melhoria da aeração, por meio da liberação direta de oxigênio na zona da raiz como também pelo aumento da porosidade nas zonas superiores do solo; a interceptação e o retardo do movimento dos contaminantes; a ocorrência de transformações enzimáticas cometabólicas microbianas e de plantas, dos contaminantes e a redução da migração vertical e lateral dos poluentes para a água subterrânea pela extração da água disponível e reversão do gradiente hidráulico.

Conforme mencionado acima, além dos hidrocarbonetos de petróleo, a fitorremediação pode ser aplicada para remediação de diversos contaminantes, incluindo metais, pesticidas, solventes, explosivos e lixiviados de aterros (FRTR, 2011). Ainda segundo a entidade, algumas plantas têm a habilidade de estocar metais em suas raízes. Elas podem ser

transplantadas para áreas para filtrar os metais de efluentes. Assim que as raízes se tornam saturadas com os contaminantes, elas podem ser colhidas. Com relação a essa biomassa, Abhilash *et al.* (2011) alertam sobre o acúmulo de poluentes nas plantas colhidas e indicam como pontos de apreensão, as dúvidas quanto à chance de que tais poluentes acumulados possam entrar na cadeia alimentar. Apontam ainda as chances da exposição ocupacional daqueles que têm contato direto com o processamento e utilização dessa biomassa, bem como da possibilidade de que tais poluentes afetem os processos químicos, referindo-se à possibilidade do material ser empregado na fabricação de papel, polpa ou qualquer outra produção industrial.

As limitações da tecnologia, apontadas pela entidade supracitada são:

- A profundidade da zona de tratamento é determinada pelas plantas usadas na fitorremediação. Em muitos casos é limitada a solos rasos
- Altas concentrações de poluentes podem ser tóxicas para as plantas
- Envolve as mesmas limitações de transferência de massa de outros biotratamentos
- Pode ser sazonal, dependendo da localização
- Pode transferir contaminação através da mídia, como por exemplo. do solo para o ar
- Não é efetiva para contaminantes forte (como bifenila policloradas) ou fracamente adsorvidos
- A toxicidade e a biodisponibilidade dos produtos da biodegradação não são sempre conhecidos
- Os produtos podem ser mobilizados para a água subterrânea ou bioacumulados em animais
- Ainda está num estágio de demonstração
- Não é familiar para os legisladores

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos – US EPA (2001), indica que o tempo para remediação com o uso da fitorremediação depende dos seguintes fatores:

- Tipo e quantidade das plantas usadas na remediação
- Tipo e quantidade de contaminantes presentes
- Tamanho e profundidade da área contaminada

- Tipo de solo e condições presentes

A citada agência aponta ainda que normalmente são necessários vários anos para a descontaminação de uma área, com o uso da fitorremediação.

A decisão quanto ao uso da fitorremediação ou de tecnologias convencionais de remediação se traduz em uma escolha entre um processo barato, ainda que e outro, caro mais que possibilita, por outro lado, o rápido desenvolvimento da área. Esta decisão dependerá muito da intenção de uso futuro

2.4.3.2 Ecotoxicidade

2.4.3.2.1 Testes com minhocas

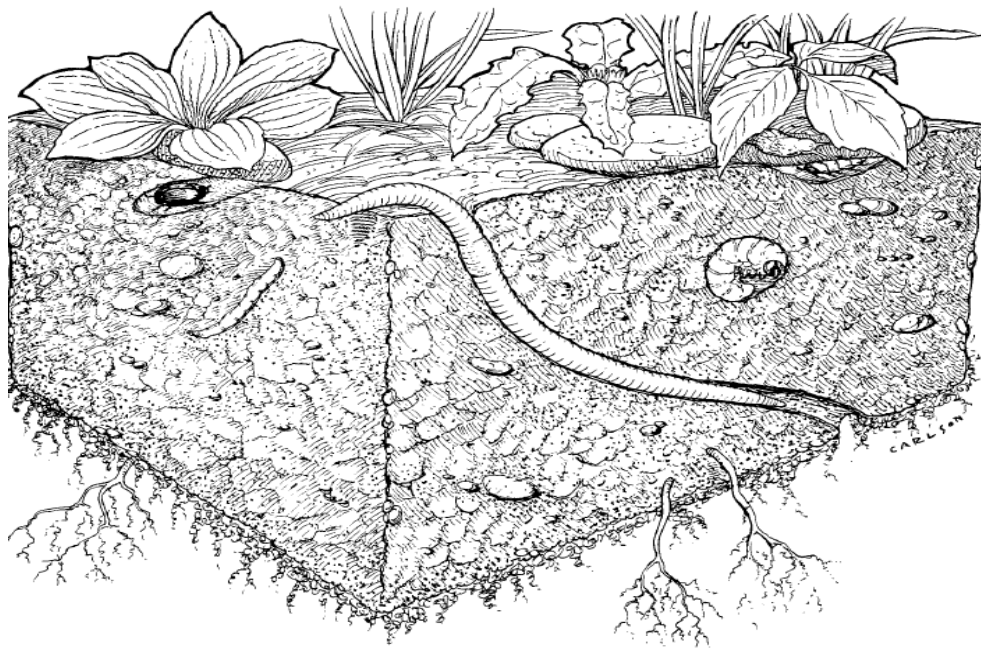
A matéria orgânica, a qual serve de valorosa fonte de recurso para a biota do solo e o próprio solo constituem o último depósito para a maioria dos contaminantes (REINECKE *et al.*, 2004).

Muitos problemas ambientais que parecem diferentes têm na verdade muito em comum (BEYER, 1990). Por exemplo, prossegue o autor, se sedimentos devem ser dragados e dispostos em terra, se o lodo sanitário deve ser aplicado em *landfarms* (tecnologia de remediação de solos que reduz as concentrações dos constituintes do pétreo por meio de biodegradação) ou um sítio contaminado deve ser remediado, tudo isto envolve estimar a concentração do contaminante que pode ser considerada segura em cada situação. Como as concentrações consideradas seguras dependem de cada situação particular, a avaliação de risco para os diferentes habitats é adequada para compartilhar linhas comuns de razoabilidade. Cita ainda o autor que há uma divergência entre os pesquisadores quanto à melhor maneira de se avaliar os perigos dos contaminantes do solo. Ainda segundo Beyer (1990), alguns pesquisadores negam o valor de se usar as concentrações dos contaminantes como indicador e preferem a determinação da atividade biológica de uma substância por meio do exame de sua influência sobre o crescimento de organismos diversos; outros ressaltam a inadequação dos dados disponíveis para produzir guias e usam concentrações de background e seu próprio julgamento para selecionar um valor; outros depositam total confiança na avaliação de risco.

Os organismos presentes no solo são relativamente vulneráveis aos efeitos adversos da contaminação por petróleo (JUVONEN, 2000) e, conforme indicado por Reinecke *et al.* (2004), a legislação em muitos países tem concentrado a atenção de cientistas na necessidade

de organismos sensíveis do solo para utilização em pesquisa, monitoramento ambiental, como indicadores de contaminação e para os testes regulatórios de toxicidade, similares aos desenvolvimentos no campo aquático. Os autores observam ainda que as minhocas desempenham um importante papel como “engenheiros” e muitos solos, nos quais contribuem para o complexo processo de decomposição da matéria orgânica e afetam a aeração, transporte de água e estrutura do solo (Figura 33).

Figura 33 - Fauna do solo



Fonte :Adaptado de Beyer, 1990.

Os testes de toxicidade do solo fornecem informações relativas à toxicidade e biodisponibilidade de contaminantes associados com o solo para os organismos terrestres.

Como importantes membros da fauna do solo, as minhocas apresentam um número de características que fazem delas organismos apropriados para a avaliação de solos potencialmente perigosos. Elas podem ingerir grandes quantidades de solo, relacionar-se com outras biomassas do solo, como por exemplo invertebrados, raízes, húmus, detritos e microrganismos, constituem até 92% por cento da biomassa invertebrada do solo e são importantes na reciclagem de nutrientes.

As minhocas acumulam e são afetadas por uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos. Adicionalmente, as minhocas são importantes na cadeia alimentar terrestre, constituindo uma fonte de alimento para uma grande variedade de organismos, incluindo pássaros, mamíferos, répteis, anfíbios, peixes, insetos e centopeias. Uma mudança significativa na abundância de invertebrados como as minhocas, tanto como fonte de alimento

como organismos que atuam na transferência trófica de energia e na reciclagem de nutrientes, pode ocasionar sérios efeitos adversos em todo o sistema terrestre (REINECKE *et al.*, 2004; ASTM, 1997).

Reinecke *et al.* (2004) ressaltam que as minhocas não só são representantes gerais da fauna do solo, mas também são práticas para serem criadas e usadas em testes de toxicidade tanto em laboratório como em campo. Salientam ainda que elas são convenientes para o manuseio por serem relativamente grandes e podem alcançar uma biomassa também relativamente alta em alguns solos e que muitas espécies são adequadas para criação em cativeiro, o que as torna facilmente disponíveis. Os autores relatam ainda que o comportamento das minhocas traz indivíduos não contaminados para um contato próximo com o solo, além do fato de que elas apresentam um ciclo de vida relativamente curto, permitindo o estudo de longo prazo de sucessivas gerações. Afirmam os autores que novas tendências nos testes de ecotoxicologia não tornaram o teste com minhocas obsoleto. Schaefer (2003) afirma que as minhocas são comumente utilizadas para testes ecotoxicológicos em terra.

Reinecke *et al.* (2004) apontam que dúvidas já foram levantadas quanto ao uso da *Eisenia fetida* como uma minhoca “típica” nos testes de toxicidade do tipo espécie única. Todavia, continuam os autores, em testes bem conduzidos de toxicidade com fins regulatórios, a posição dessa espécie parece bem estabelecida. De fato a norma E 1676 – 97 da ASTM - descreve em seu Anexo A 1, os procedimentos de teste para a citada espécie. Esta norma apresenta os procedimentos para a obtenção de dados de laboratório para a avaliação dos efeitos adversos dos contaminantes associados ao solo nas minhocas a partir de testes de toxicidade e de bioacumulação. Os métodos apresentados são definidos para avaliar os efeitos tóxicos letais e subletais nas minhocas ou a bioacumulação de contaminantes em testes de curto prazo (7 a 28 dias) em sistemas terrestres. Afirma Millioli (2009) que tais efeitos subletais podem ser o crescimento, comportamento, reprodução e processos fisiológicos, afirmação corroborada por Schaefer (2003) o qual afirma que mudanças no comportamento das minhocas, como a evasão do substrato pelas minhocas é ecologicamente relevante. O autor indica ainda que a emigração das minhocas e a subsequente perda dos benefícios que trazem às funções do solo (aeração, drenagem, enriquecimento de material orgânico, etc.) levam à degradação das qualidades do solo.

O teste de evasão do substrato (fuga de minhocas) permite a avaliação de sítios contaminados com nível de estresse mais baixo dos organismos do que os testes de toxicidade aguda e pode ser aplicado, facilmente, para verificar compostos tóxicos no solo. O teste de

fuga pode, em muitos casos, ser um indicador mais sensível do que os testes de toxicidade aguda (MILLIOLI, 2009).

Os efeitos sub-letais mencionados por Millioli (2009) também foram citados por Spurgeon, *et al.* (1996), em cujo experimento foram observados efeitos tóxicos significativos no crescimento e no tempo de maturação sexual de espécimes jovens de minhoca. Segundo os autores, a grande sensibilidade das minhocas jovens indica a importância de considerar os efeitos na variedade de estágios de vida quando da condução de uma avaliação de risco os efeitos de poluentes no solo.

Os estudos para avaliação da toxicidade aguda são conduzidos para se averiguar os efeitos biológicos adversos causados durante um período finito de tempo após a administração de uma dose única, normalmente alta de contaminante. Esses estudos são especificados para expressar a potência do contaminante em termos de uma Dose Letal Mediana - LD50, causando a morte de 50% da população universal da espécie exposta, sob as condições definidas do teste. Quando é feita a administração indireta do contaminante, a potência é expressa como a Concentração Letal Mediana - LC50, a qual é mais comum no caso dos estudos com minhocas (REINECKE *et al.*, 2004). Segundo Millioli (2009), a toxicidade aguda é avaliada num período de tempo relativamente curto para o ciclo de vida do organismo testado. As respostas de toxicidade aguda podem também ser expressas, segundo a autora, por EC50 - Concentração Efetiva Mediana, significando que a metade dos organismos morre ou sofre uma mudança específica no seu comportamento normal. Ainda segundo a autora, a toxicidade crônica é está associada a efeitos longos e persistentes, mas que não causam morte.

A norma E 1676 – 97 da ASTM indica que os resultados dos testes de toxicidade com (1) materiais (produtos químicos ou misturas de resíduos) adicionados experimentalmente ao solo, solos de referência, ou solo do sítio (2) solos do sítio diluídos com solos de referência e (3) solos de referência ou do sítio diluídos com solo artificial, com o objetivo de criar uma série de concentrações, podem ser apresentados por LC50 e algumas vezes como EC50. Ainda menciona a norma, os resultados dos testes podem ser apresentados como NOEC - Concentração Efetiva Não Observada e LOEC- Mais Baixa Concentração Efetiva Observada.

2.4.3.3 Fitotoxicidade

A fitotoxicidade se refere aos efeitos deletérios causados ao desenvolvimento das plantas, por substâncias químicas.

Estudos ecotoxicológicos mostram que a biodisponibilidade e, por conseguinte, a toxicidade dos contaminantes, normalmente depende das características físico-químicas do solo (HEEMSBERGEN, 2009). De fato, o experimento realizado por Ruttens *et al.* (2006) com a fitoestabilização de um solo arenoso contaminado por metais, apresentou redução da biodisponibilidade dos contaminantes e conseqüentemente da toxicidade do solo. Por sua vez, essa redução foi efeito do aumento do pH do solo devido à adição de corretivos. Ogbo (2009) também corrobora a afirmação quando indica que em seus estudos, o efeito tóxico observado no solo contaminado pode não ter sido decorrente somente da concentração do contaminante, mas também devido ao tipo e propriedades do solo.

Segundo Heemsbergen *et al.* (2009), as propriedades do solo que mais frequentemente afetam a toxicidade de metais para microrganismos, plantas e invertebrados são: a capacidade de troca catiônica, conteúdo de carbono orgânico, conteúdo de argila e pH do solo.

Os testes de toxicidade têm se mostrado ferramentas úteis para a avaliação dos riscos representados pelo solo contaminado e para a verificação da eficácia de um processo de remediação (OGBO, 2009).

A toxicidade de uma mistura química complexa frequentemente não é facilmente medida por análises químicas e o desaparecimento de compostos da mesma família do contaminante pode não indicar que a desintoxicação do solo (BAUD-GRASSET *et al.*, 1993).

As plantas, sendo as produtoras primárias essenciais no ecossistema terrestre, configuram-se como uma fonte de alimentos para todos os organismos heterotróficos e formam a base da cadeia alimentar. Adicionalmente, a produção e a qualidade são critérios importantes de sucesso na agricultura (SCHOWANEK *et al.*, 2004). Assim, prosseguem os autores, é importante identificar os potenciais fitotoxinas e compreender a magnitude de seus impactos nos diferentes ecossistemas terrestres. Portanto, como indica Henner *et al.*, (1999), devem ser realizados exames, chamados testes de fitotoxicidade, para avaliar a toxicidade dos solos contaminados para as plantas, as quais, segundo Millioli (2009), podem ser utilizadas como biomarcadores.

A presença de agentes tóxicos pode ser detectada pelas mudanças causadas num organismo, com o uso de exames biológicos (VALERIO *et al.*, 2007), conforme demonstrou o estudo conduzido por Ogbo (2009), no qual foi observada a redução do comprimento da plúmula (parte do embrião de onde se forma a haste do vegetal) de plantas usadas para avaliar os efeitos da contaminação por óleo diesel na germinação de sementes. Segundo a autora, ficou comprovado que essa redução do comprimento da radícula da planta foi causada pelo contaminante, uma vez que no controle, o comprimento da plúmula foi maior. A autora

acrescenta que os resultados do estudo mostraram ainda que com o aumento dos níveis de contaminação, houve redução do comprimento da radícula. Estudo semelhante, mas para avaliar a fitotoxicidade de efluentes industriais, foi conduzido por Charles *et al.* (2011). No estudo, os autores avaliaram os impactos dos efluentes oriundos de quatro diferentes companhias, utilizando sementes de alface (*Lactuca sativa*). Foram medidas as Taxas de Germinação e também foram verificados os comprimentos e a massa das plântulas (embrião em desenvolvimento, após a germinação da semente) do vegetal (Figura 34). Segundo os autores, o estudo demonstrou que os testes de monitoramento biológico de plantas usando a alface são ferramentas úteis para avaliar e comparar a toxicidade de efluentes. Segundo Green *et al.* (1996), é de grande preocupação para os toxicologistas, o mecanismo de intoxicação e a dose que dá causam a efeitos deletérios. O autor relata que muitos regulamentos estaduais e federais não indicam quais concentrações de contaminação são realmente problemáticos para o crescimento e desenvolvimento de plantas.

Figura 34 - Efeitos dos contaminantes em sementes de alface.



Fonte: Charles J. *et al.*, 2011

Testes de Germinação de Sementes usando amostras de solo contaminado e testes de Elongação Radicular, usando eluição do solo (dessorção provocada por um fluxo de líquido ou de gás através de um adsorvente), com vegetais também foram conduzidos Baud-Grasset *et al.* (1993) para avaliar a remediação de solo contaminado com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Segundo os pesquisadores, o estudo indicou que os testes de fitotoxicidade têm realmente um bom potencial para ser usado como uma ferramenta ambiental para avaliar a eficácia de uma tecnologia de remediação. Acrescentam os autores que nos estudos por eles conduzidos foram selecionadas plantas de porte maior porque vegetação é o componente biológico dominante dos ecossistemas terrestres e pode refletir a toxicidade dos resíduos perigosos. Ainda segundo os autores, os testes de fitotoxicidade, foram conduzidos no solo contaminado, usando três diferentes modos: controle antes de tratamento, controle depois de tratamento com microrganismos nativos e depois do tratamento com fungos.

No trabalho conduzido por Valério *et al* (2007) foi avaliada a sensibilidade da alface (*Lactuca sativa*) por meio de testes de Germinação de Sementes, Elongação Radicular, Taxas de Germinação e Necrose Radicular, quando o vegetal foi exposto a diferentes concentrações de elementos dissolvidos em soluções solo-água, como uma maneira alternativa de determinar a toxicidade do solo. Nesse trabalho os autores concluíram que a metodologia proposta é aplicável como um método alternativo barato, rápido e reproduzível, para a medição da fitotoxicidade. Os testes de fitotoxicidade, segundo Schowanek *et al* (2004), podem ser conduzidos durante diferentes estágios do ciclo de vida e uma variedade de pontos de mudança de fase no processo de desenvolvimento da plantas pode ser medida.

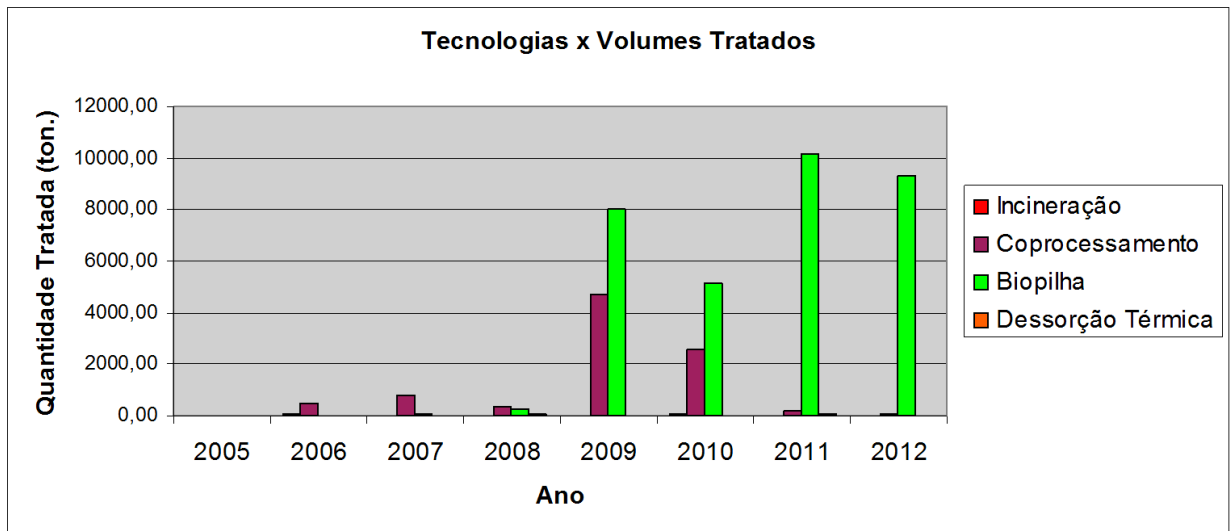
2.5 Estudo de caso

2.5.1 Custos de tecnologias de tratamento

2.5.1.1 Aspectos do uso da tecnologia de Biopilhas

A tecnologia de biopilhas para o tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo está bem estabelecida no mercado internacional, especialmente nos Estados Unidos da América e Europa e, de forma mais limitada, no Brasil. Um indicativo disso é a crescente quantidade de solo contaminado tratado nos últimos anos (sendo que até 2009 os volumes registrados eram insignificantes) com esta tecnologia por uma das maiores empresas do setor de óleo e gás no Brasil, conforme indicado na Figura 35 abaixo.

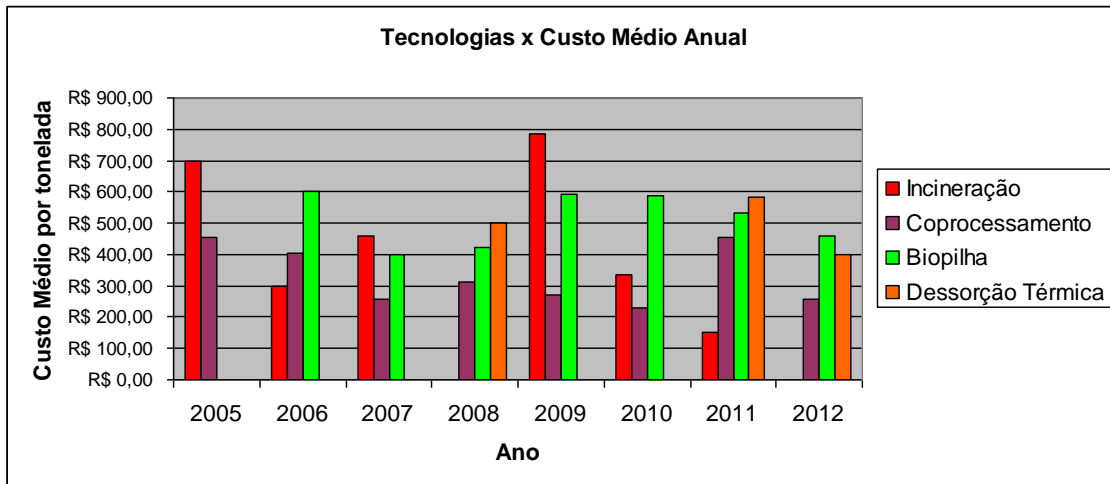
Figura 35 - Solo tratado por diferentes técnicas de remediação em empresa no Brasil



Observa-se também, por meio da Figura 36, que o custo da tecnologia de biopilhas para o tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo nesta empresa foi, no período de 2006 a meados de 2012, compatível com as demais tecnologias utilizadas para este fim. Salienta-se que, conforme Lopes (2007), a norma da empresa em questão que estabelece os critérios internos básicos para o gerenciamento de resíduos e a disposição de resíduos, indica que a escolha das tecnologias para tratamento de tais massas contaminadas deve considerar, entre outros, o menor impacto ambiental, com redução do uso de recursos naturais.

Os dados apresentados nas duas figuras sugerem que tal indicação foi considerada pela empresa, tendo sido aplicada na escolha da tecnologia, conforme Moura (2000), o conceito de BATNEEC – Best Available Techniques Not Exceeding Excessive Costs, ou seja, a melhor técnica disponível sem incorrer em custos excessivos.

Figura 36 - Custo médio (R\$) por tonelada de solo remediado e tecnologia aplicada.



3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo abordou os procedimentos de biorremediação de um solo argiloso proveniente de uma instalação de armazenamento de petróleo cru e derivados oriundos de uma área contaminada por práticas de disposição de resíduos (borra) e afetada por eventos de vazamento acidental de produto.

Foram conduzidos dois experimentos:

(I) Ensaio para otimização de taxas nutricionais, pH e proporção de material estruturante em respirômetros de Bartha;

(II) Ensaio para biodegradação, em microcosmos e biorreatores, investigando estratégia de bioestímulo e bioestímulo associado ao bioaumento.

Um experimento adicional visou monitorar o decaimento dos HTP (hidrocarbonetos totais do petróleo) e HPA (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos), além dos BTEX (benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos) emitidos durante o processo de biodegradação nos biorreatores.

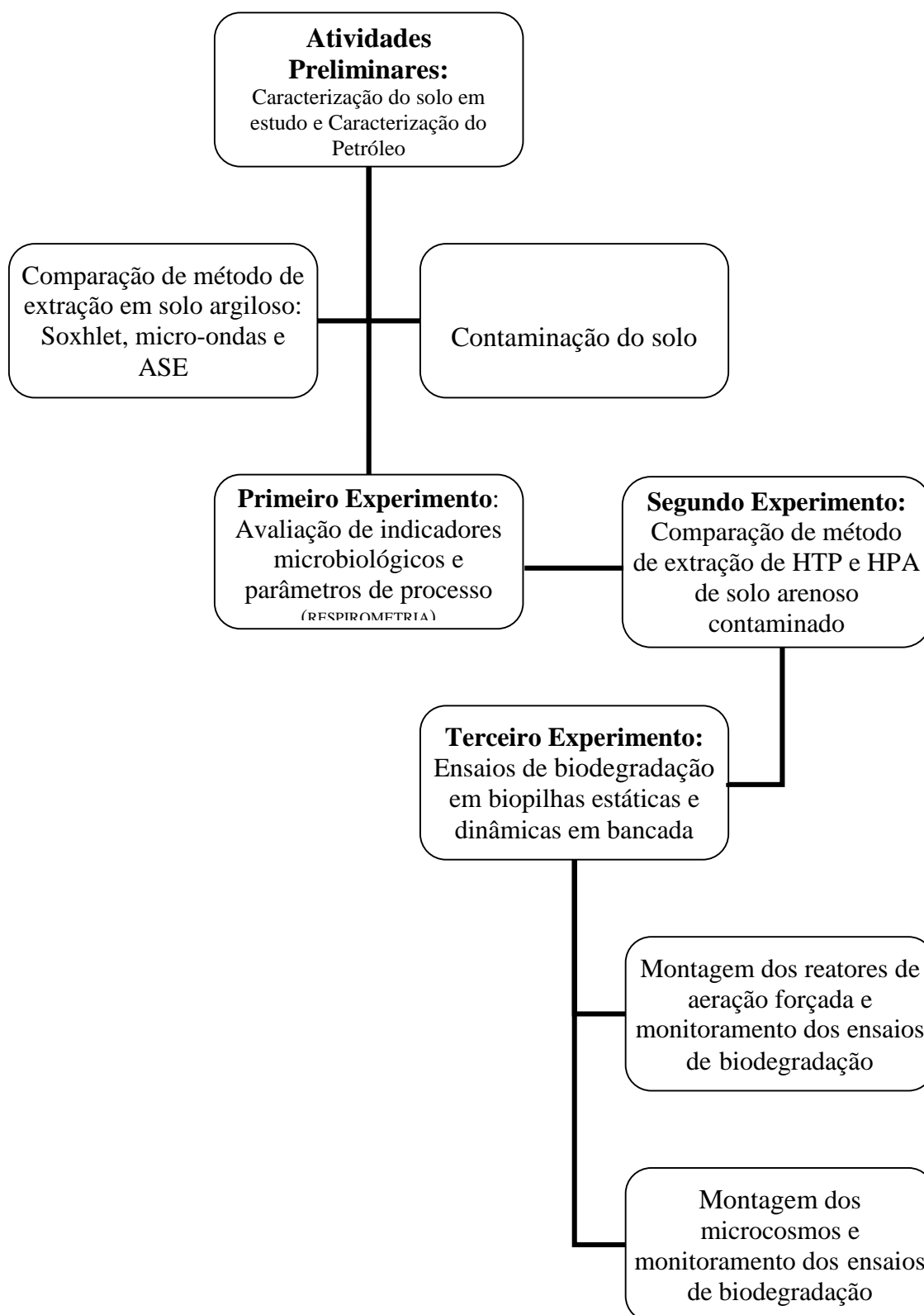
Todas as etapas foram acompanhadas da caracterização e monitoramento de variáveis físicas, químicas e biológicas do solo. Neste estágio realizou-se o monitoramento de toxicidade do solo, por meio de teste de ecotoxicidade aguda com minhocas da espécie *Eisenia Andrei*, conduzidos no início e no final do experimento.

A Figura 37 ilustra as principais etapas desenvolvidas no presente trabalho.

Adicionalmente, foram conduzidos testes para identificar o método ideal de extração, em solo argiloso, de hidrocarbonetos totais de petróleo e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, correlacionando a sua recuperação de extração com o custo-benefício do método.

Todo o trabalho foi conduzido no laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias (LABIFI), do Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente da Faculdade de Engenharia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ.

Figura 37 - Fluxograma com resumo das atividades e etapas experimentais.



3.1 Atividades preliminares

3.1.1 Obtenção e caracterização do solo em estudo.

O solo utilizado para o presente estudo foi escavado em uma instalação antiga de armazenamento de petróleo e derivados, composto por tanques, linhas aéreas e enterradas, a qual se encontra em atividade desde 1951 no estado de São Paulo. A escavação decorreu do processo de remediação abrangido pelo programa de reabilitação ambiental implementado pela operadora da instalação. Para o estudo comparativo de técnicas de Extração de HTP e HPA, foi utilizado o solo proveniente de uma área em Seropédica, no Estado do Rio de Janeiro, com histórico de contaminação identificada e quantificada em estudo anterior (Ciannella, 2010) conduzido pelo grupo de pesquisa, classificado como Planossolo Distrófico Típico (solo arenoso com histórico de contaminação, conforme Ciannella, 2010). As amostras foram mantidas em refrigeração e para a extração inicialmente foram secas em estufa e peneiradas (2 mm).

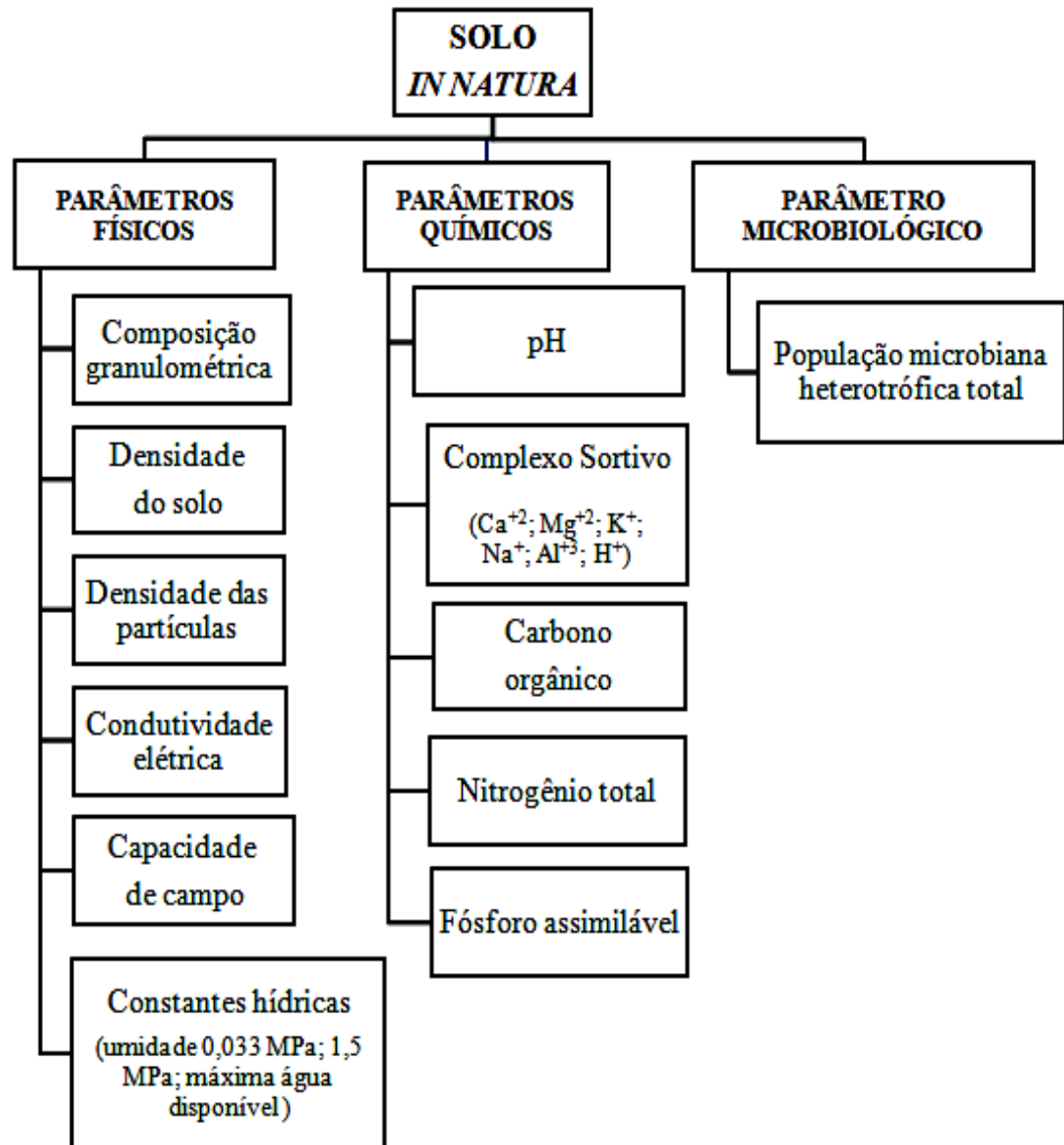
A amostragem dos solos empregados no trabalho foi realizada por uma equipe especializada neste tipo de procedimento, o que garantiu a representatividade das amostras. A amostra de solo foi distribuída em sacos plásticos e armazenada sob refrigeração de 4°C até a realização do experimento.

Antes de iniciar os experimentos, o solo foi transferido para bandejas de alumínio e conduzido à estufa de secagem a 45° C durante três dias. Em seguida, o solo foi peneirado em malha de 2 mm de abertura em peneira Granutest (ABNT 10; Tyler 9), para permitir a remoção de restos de material vegetal e grandes torrões de terra, tornando o solo mais homogêneo. A amostra de solo peneirado foi particionada em três, em proporções diferentes. A primeira parte foi destinada à caracterização física, química e microbiológica. A segunda foi acondicionada em sacos plásticos e armazenada em temperatura ambiente até a realização do experimento. E a terceira alíquota foi recontaminada para atingir 3% (mm^{-1}) de hidrocarbonetos totais de petróleo, já que o solo em estudo apresenta baixa contaminação.

A determinação dos parâmetros físicos e químicos, conforme o fluxograma (Figura 38) foi realizada nos laboratórios da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Solos), localizada no município do Rio de Janeiro, de acordo com o Manual de Métodos de Análise de Solo (EMBRAPA, 1997), com exceção dos parâmetros químicos de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e os parâmetros microbiológicos, os quais foram determinados no Laboratório de

Biorremediação e Fitotecnologias - LABIFI, na Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ.

Figura 38 - Fluxograma dos parâmetros físicos, químicos e microbiológicos avaliados no solo (*in natura*)



A Tabela 4 apresenta a caracterização biológica, física e química do solo original.

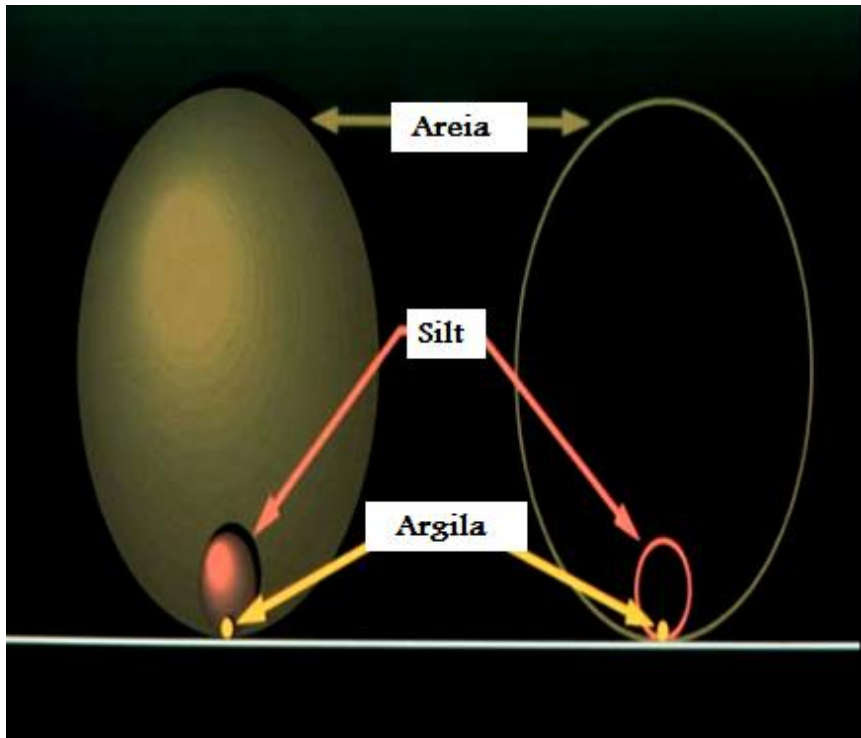
Tabela 4 - Caracterização físico-química e biológica do solo utilizado *in natura*¹

Composição granulométrica da terra fina dispersão com NaOH /calgon (g Kg ⁻¹)	Areia 2-0,05 mm	414
	Silte 0,05-0,002 mm	286
	Argila <0,002 mm	300
% Silte / % Argila		0,95
Densidade (g cm ⁻³)	Solo	1,21
	Partículas	2,56
Porosidade total (%)		52,73
Capacidade de campo (%)		28,48
pH (1:2,5)	Água	5,4
	KCl (1N)	4,8
Complexo Sortivo (cmol _c kg ⁻¹)	Ca ²⁺	7,2
	Mg ²⁺	1,5
	K ⁺	0,17
	Na ⁺	0,96
	Valor S (soma)	9,8
	Al ³⁺	0,00
	H ⁺	2,60
	Valor T (soma)	12,4
	Valor V (saturação de base)	79
Nutrientes		
Fósforo assimilável (g kg ⁻¹)		8
Carbono orgânico (g kg ⁻¹)		41,6
Matéria Orgânica (g kg ⁻¹)		83,2
Nitrogênio total (g kg ⁻¹)		1,8
Relação C:N		23
População heterotrófica total UFC g ⁻¹ de solo		4,45 x 10 ⁶
População de fungos UFC g ⁻¹ de solo		1,5 x 10 ²
População de microrganismos degradadores de óleo cru NMP g ⁻¹ de solo		1,00 x 10 ⁶

Como mostra a Tabela 4 o solo em estudo original apresentou uma proporção granulométrica de 41% de areia, 29% de silte e 30% de argila. A Figura 39 apresenta uma comparação entre as proporções destas partículas.

¹ Notas: Valor S (S) = Soma de bases trocáveis (Ca+2, Mg+2, K+1, Na+1); Valor T = Soma das bases trocáveis mais a acidez potencial (S + H+ + Al3+).

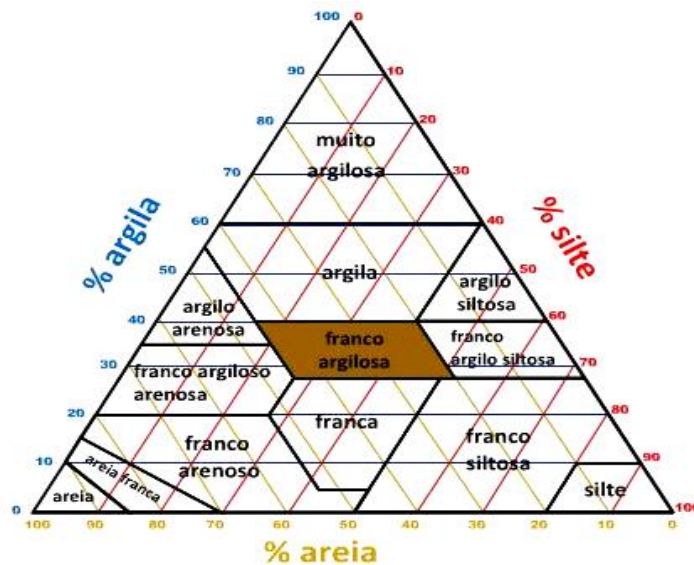
Figura 39 - Tamanhos relativos da areia, silte e argila



Fonte: Natural Resources Conservation Service – NRCS, 2012

Utilizando o Triângulo das classes texturais do solo (Figura 40) para os dados granulométricos citados acima, concluiu-se que o solo é classificado como FRANCO ARGILOSO, assim sendo, o solo apresenta uma textura argilosa média, já que tem textura ($35\% < \text{Argila} < 60\%$).

Figura 40 - Indicação das texturas: 41% e areia, 29% silte, 30% argila



Fonte: MSRS, 2012.

Segundo Scheffer *et al.* (1998) e Kiiehl *et al.* (1976), tanto a textura quanto a porosidade do solo influenciam diretamente a densidade e permeabilidade deste, o que por sua vez reflete na distribuição de gases e água. Quanto maior a densidade do solo mais compacto será o mesmo e menor será a sua porosidade. Dessa forma, solos argilosos são tratados com mais dificuldade quando comparados aos solos com frações mais grossas, constituído por uma porcentagem maior de areia. Os mesmos autores ressaltam também que a textura influencia diretamente na capacidade de retenção do contaminante. Assim, solos argilosos são capazes de reter mais facilmente uma quantidade maior do contaminante por meio do processo de adsorção.

A determinação da capacidade de campo (C.C), juntamente com a textura e a porosidade é de fundamental importância na aplicação do processo de biorremediação em solos contaminados. Tal parâmetro permite o conhecimento do teor máximo de água que o solo é capaz de reter, sendo bastante utilizado para ajustar a umidade do mesmo (BAPTISTA, 2003; SEABRA, 2005; CHAGAS-SPINELLI, 2007). A literatura tem reportado teores ideais de água no solo para a atividade microbiana na faixa de 12% a 30% ($m\ m^{-1}$), o que corresponde a 40% - 85% da capacidade de campo (U.S.EPA, 2004).

O pH do solo do presente estudo apresentou-se moderadamente ácido – 5,4 em água e 4,8 em KCl - estando ambos os valores abaixo da faixa ótima de pH reportada na literatura para processos de biorremediação (6,5 a 8,5) (SARKAR *et al.*, 2005).

A capacidade de troca catiônica (CTC) ou valor T do solo em estudo apresentou argila de baixa atividade ($T < 27\ cmolc/kg$). Esse resultado reflete que, sob condições naturais ácidas, o solo *em estudo* apresenta baixa capacidade para reter cátions. Segundo CHAGAS-SPINELLI (2007), altas concentrações de argila de baixa atividade resultam em uma CTC semelhante à de solos arenosos, fato que ressalta a textura argilosa média do solo estudado. Cabe mencionar que a capacidade de troca catiônica indica uma intensa lixiviação dos cátions Mg^{+2} , Ca^{+2} , K^{+} e Na^{+} trocáveis, indicando que este solo possui baixa fertilidade e elevado grau de intemperismo (MEURER, 2004).

A relação nutricional C:N:P do solo original apresentou-se em torno de 100:4,32:19,2. Tal relação foi calculada a partir dos resultados de carbono orgânico, nitrogênio e fósforo assimilável, que foram respectivamente de: $41,6\ g\ kg^{-1}$, $1,8\ g\ kg^{-1}$ e $8\ mg\ Kg^{-1}$. A relação recomendada pela EPA (1994) de Carbono, Nitrogênio e Fósforo para manter um crescimento microbiano adequado e manter o processo de biodegradação do solo contaminado encontra-se na faixa de 100:10:1 a 100:1:0,5.

Ainda segundo U.S.EPA (1994), para que a biodegradação nos biorreatores seja efetiva, a quantificação mínima de microrganismos heterotróficos no solo deve ser de 10^3 UFC g^{-1} . O solo *em estudo* original apresentou uma população heterotrófica total (PHT) de $4,45 \times 10^6$ UFC g^{-1} de solo, uma população de fungos (PF) de $1,5 \times 10^2$ UFC g^{-1} de solo e população de microrganismos degradadores de óleo cru (PDO) de $1,0 \times 10^6$ NMP g^{-1} de solo, mostrando-se inicialmente bastante satisfatório ao processo de biorremediação.

3.1.2 Caracterização do petróleo.

O óleo utilizado nos experimentos é proveniente de campo de produção em terra, Fazenda Alegre, no estado de Espírito Santo e foi cedido pela Gerência de Pesquisa e Desenvolvimento de Abastecimento /Engenharia de Plantas Piloto – PDAB/PP do Centro de Pesquisa da Petrobras – CENPES em 13/08/2010. O óleo foi submetido às análises quantitativas para caracterizar os teores dos hidrocarbonetos totais de petróleo e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. O óleo cru foi armazenado em bombona de Policloreto de Vinila – PVC de 5 litros, ao abrigo da luz e a temperatura de 20-25 °C até o uso.

3.1.3 Métodos de extração em solo argiloso

Ao longo de muitos anos, a avaliação de impactos ambientais causados por derramamento de petróleo era realizada apenas por quantificação de HTP. No entanto, não havia métodos estabelecidos para extração de HTP para a avaliação de impactos ambientais por derramamento. Sendo assim, a Agência de Proteção Ambiental Americana, a Sociedade Americana de Ensaio e Materiais e a comunidade científica, elaboraram diferentes métodos de extração de HTP.

Há algum tempo, por serem os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos conhecidos por apresentar potenciais mutagênicos e carcinogênicos, os mesmos se tornaram alvos prioritários para investigações dos órgãos ambientais. Até hoje, já foram reportados mais de 30 compostos e centenas de derivados dos HPA alquilados e nitrados, o que os tornam a maior classe de compostos carcinogênicos conhecida. Consequentemente, ocorreu uma necessidade em desenvolver técnicas de extração de HPA e TPH do solo, que atendessem a peculiaridade dos HPA.

Atualmente, já foi comprovado que as variações das técnicas utilizadas para extrações de ambos os compostos, HTP e HPA, podem trazer uma diferença significativa nos resultados, conduzindo a incoerências ao comparar uma mesma amostra analisada pelos diferentes métodos disponíveis para determinação destes contaminantes. Devido a esses fatos, nesta fase *em estudo* objetivou-se avaliar três diferentes métodos de extração de HTP e HPA no solo em estudo, correlacionando a recuperação de extração com o custo-benefício de cada método testado.

3.1.4 Recontaminação do solo

Com base em um conjunto de estudos laboratoriais observados em literatura com o óleo cru, foi decidido realizar uma recontaminação do solo de modo a iniciar uma biodegradação a partir de uma contaminação de 3 % ($m\ m^{-1}$).

A recontaminação do solo foi realizada em recipientes plásticos aos quais foram adicionados por vez 10 kg do solo em estudo e 0,225 kg de óleo cru, o que correspondeu a um percentual de contaminação de 2,25% (mm seco). Tal percentual foi escolhido com base na caracterização do solo que indicou a presença de 0,75% de hidrocarbonetos totais de petróleo.

A homogeneização foi realizada misturando-se o contaminante (óleo cru) ao solo. A Figura 41 ilustra o processo de recontaminação do solo *em estudo*.

Figura 41 - Foto ilustrativa do procedimento de recontaminação de solo



Fonte: Lab. de Biorremediação e Fitotecnologias

Após a contaminação, o solo foi conduzido a recipiente de polietileno e permaneceu no interior de uma capela de exaustão durante uma semana para permitir a emissão dos voláteis, até a realização do experimento.

3.2 Otimização dos parâmetros

3.2.1 Planejamento experimental

Esse primeiro experimento, realizado nos meses de junho, julho e agosto de 2011, teve como objetivo otimizar a atividade microbiana aeróbia na biodegradação do solo contaminado por hidrocarbonetos totais de petróleo por planejamento experimental.

Dentre os vários tipos de planejamentos existentes, um dos mais conhecidos e aplicados é o Planejamento Fatorial Completo, um método que busca os resultados por meio de uma matriz, onde todas as combinações são investigadas até obtenção de uma solução final. A escolha adequada do tipo de planejamento fatorial depende de inúmeros fatores, tais como recursos disponíveis para a realização dos experimentos, tempo de análise de cada condição planejada, espaço físico, entre outros fatores (TRINDADE, 2002).

Foram avaliadas as variáveis de pH, taxas nutricionais e proporção de material estruturante - PME. Para tanto, foram percorridas algumas etapas para a otimização do processo. Verificou-se primeiramente em literatura, as condições ditas como ótimas para algumas variáveis (pH, umidade, nutriente, teor de oxigênio dissolvido, potencial redox, permeabilidade) separadamente, de forma a verificar as restrições do processo.

Definiram-se as variáveis independentes mais relevantes para o presente estudo (pH, taxas nutricionais e PME) e as respostas de interesse a ser analisados (eficiência de biodegradação determinada pela evolução de CO₂ quantificada durante o experimento).

Como foi determinada uma faixa de estudo em função do impacto que as variáveis tiveram sobre a resposta, além de se tratar de três variáveis independentes, tornou-se clara a utilização de um planejamento do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). A ferramenta utilizada para determinar os efeitos das variáveis sobre a atividade microbiana foi o método respirométrico de Bartha (ABNT, 1999).

Para o DCCR foi necessária a realização de 17 ensaios (8 ensaios fatoriais representados pelo vértice do cubo mais 6 ensaios nos pontos axiais para testar o modelo de 2ª ordem mais 3 ensaios repetidos na condição central). A condição central é uma região de estudo que torna possível calcular o erro experimental ao repetir pelo menos três vezes esta

condição, o que é indispensável para avaliar a reprodutividade do processo. É possível ainda elaborar um modelo matemático que, se validado estatisticamente, pode ser usado para obtenção da superfície de resposta e por meio desta análise, determinarem-se as condições otimizadas, conhecendo-se a significância estatística das respostas. Os níveis utilizados e os ensaios experimentais deste planejamento estão apresentados nas Tabelas 5 e 6. Respeitando a cinética do processo, para cada ensaio do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foram retiradas amostras em função do tempo para a determinação da evolução do CO₂ e conseqüentemente a eficiência de cada tratamento.

Tabela 5 - Valores utilizados no DCCR para três fatores

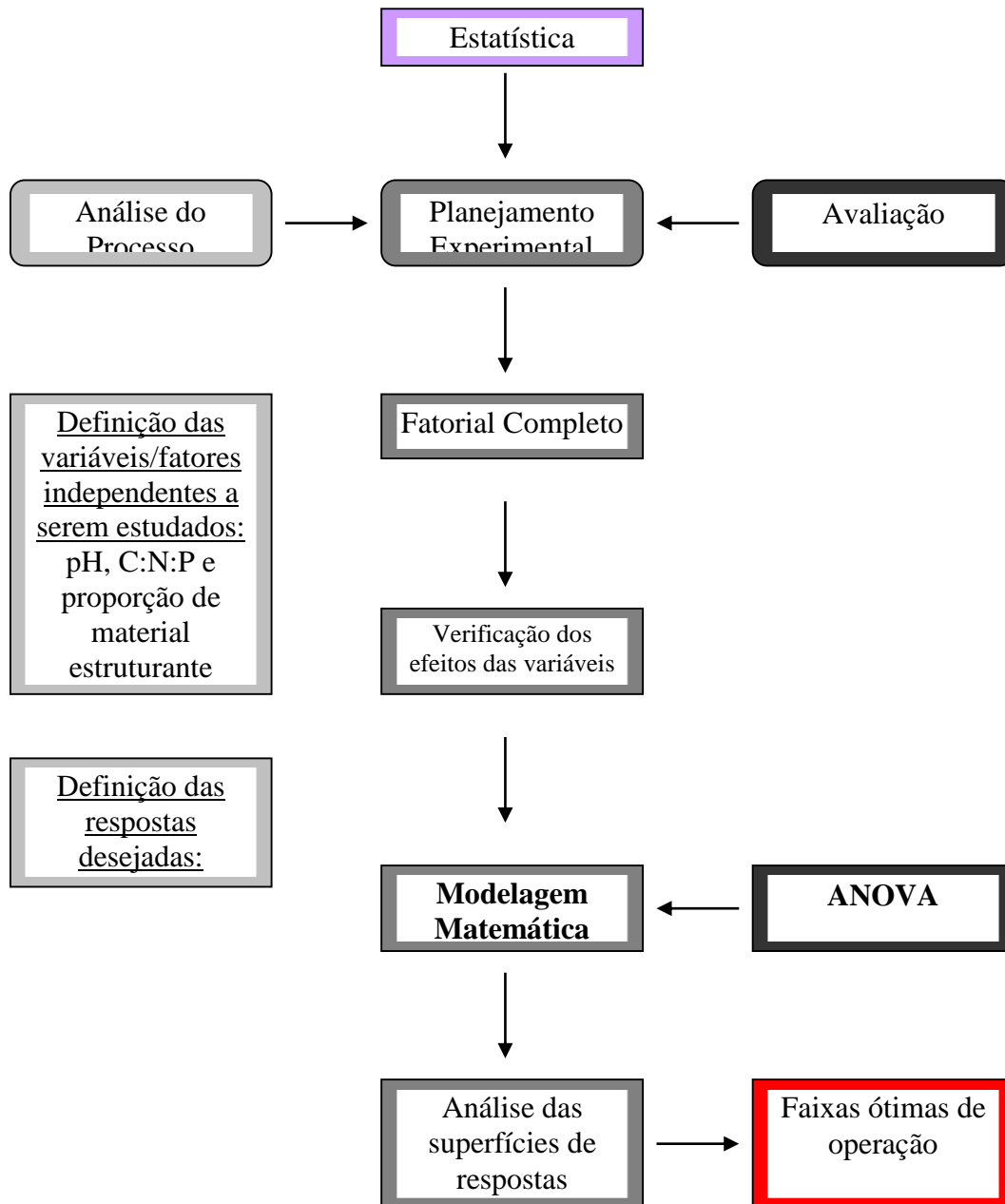
Variáveis	Código	-1,68	-1	0	+1	+1,68
pH	x ₁	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5
C:N:P	x ₂	100:1:0, 5	100:2,75:0,62 5	100:5,5:0,7 5	100:8,25:0,8 75	100:10: 1
PME	x ₃	0%	2,5%	5%	7,5%	10%

Tabela 6 - Valores codificados do Planejamento Experimental

	Tratamentos	pH	C:N:P	PME
8 ENSAIOS	1	-1	-1	-1
	2	+1	-1	-1
	3	-1	+1	-1
	4	+1	+1	-1
	5	-1	-1	-1
	6	+1	-1	-1
	7	-1	+1	-1
	8	+1	+1	-1
6 PONTOS AXIAIS	9	-1,68	0	0
	10	+1,68	0	0
	11	0	-1,68	0
	12	0	+1,68	0
	13	0	0	-1,68
	14	0	0	+1,68
3 PONTOS CENTRAIS	15	0	0	0
	16	0	0	0
	17	0	0	0

A Figura 42 apresenta o fluxograma das etapas necessárias para se atingir as faixas ótimas das variáveis pH, taxa nutricional e proporção do material estruturante.

Figura 42 - Fluxograma das etapas em estudo do primeiro experimento



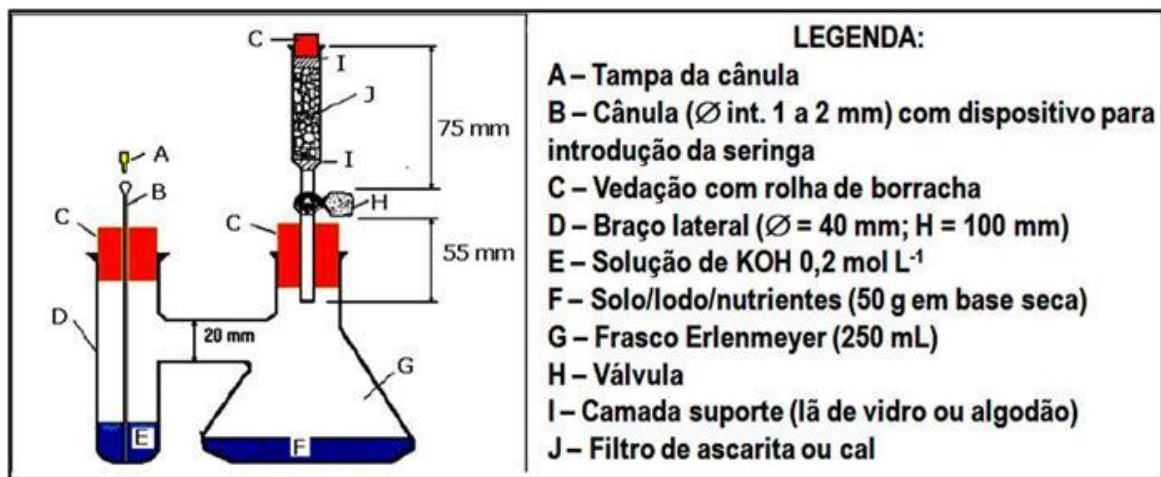
3.2.2 Descrição dos respirômetros de Bartha

No presente estudo foram utilizados respirômetros de Bartha, como preconizados pela norma NBR 14283 (ABNT, 1999) com algumas adaptações (Figura 43). Tais respirômetros consistem em um sistema fechado, constituído de duas câmaras interligadas (Figuras 37 - Letra G e Figura 37- Letra D).

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 45 - 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 45 - Letra D). A quantificação do CO₂ é feita em instantes de tempo regulares, por meio 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 microrganismos aeróbios presentes no solo, pode-se estimar, por meio da evolução do CO₂, a quantidade de carbono biodegradado durante o processo de mineralização do contaminante (ANDREO, 1999; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Figura 43 – Esquema de respirômetro de Bartha preconizado na NBR 14283



Fonte – ABNT, 1999.

3.2.2.1 Montagem dos respirômetros

A partir do solo contaminado foi conduzida a montagem de dezessete sistemas de tratamento em triplicatas, para cada uma das condições experimentais descritas na Tabela 5.

A montagem de cada sistema de tratamento (respirômetros) foi iniciada pela adição de uma alíquota de 50 g de solo recontaminado (Figura 44). No entanto, antes da introdução do solo nos respirômetros, foram realizados os procedimentos de ajuste de umidade.

Figura 44 - Montagem dos respirômetros



Fonte: Lab. de Biorremediação e Fitotecnologias

O ajuste de umidade inicial foi efetuado em todos os tratamentos para aproximadamente 30% da capacidade de campo, valor este que se encontra dentro da faixa ótima de umidade recomendada na literatura (PAUL e CLARK, 1989). A umidade foi corrigida pela adição de água destilada. O volume total de água a ser adicionado foi calculado a partir da equação 1:

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

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, a contaminação do solo.

A capacidade de campo (C.C.), por sua vez, foi determinada previamente conforme a metodologia descrita por Trindade (2002). Em uma proveta de 50 mL, de peso conhecido, foram pesados 50 g do solo *em estudo* úmido (m_{su}), suficiente para formar uma pequena coluna. Em seguida, ao solo da proveta adicionou-se água destilada gota a gota, até que por

percolação, a água chegasse ao fundo da proveta (condição de saturação). O conjunto proveta + solo foi pesado (m_{ssa}) e levado à secagem em estufa microprocessada (Quimis modelo 317-2M) a 110 °C, por 24 h. Ao término 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

C.C. = Capacidade de campo

Destaca-se que a adição de água necessária para o ajuste de 50% da capacidade de campo do solo foi realizada de cinco modos distintos dependendo da condição do sistema:

Condição do sistema com 0; 2,5; 5; 7,5 e 10% de proporção de material estruturante.

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 44 – Letra D) (ABNT, 1999).

3.2.2.2 Monitoramento dos ensaios respirométricos

Após a montagem, os respirômetros foram incubados em estufa (Tecnal TE-401), no escuro, a temperatura de 28 C ± 2 C . O experimento foi conduzido por 70 dias e a quantidade de CO₂ produzida em cada respirômetro determinada em intervalos regulares de uma semana, pelo método titulométrico preconizado na NBR 14283 (ABNT, 1999), descrito *na seção 2.3.4*. A cada leitura, durante o procedimento de titulação, o filtro de ascarita ou cal soldada (Figura 44 – Letra J), permanecia aberto por cerca de 90 segundos para aeração do sistema.

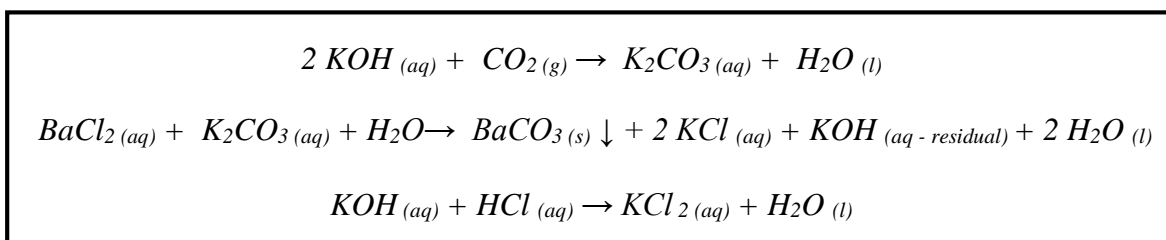
A partir da produção semanal de CO₂, acumulada ao longo dos 70 dias de experimento, estimou-se a quantidade total de carbono biodegradado em cada tratamento,

assim como a eficiência da biodegradação dos mesmos. Os cálculos para tais determinações encontram-se descritos, respectivamente, nas *seções*: 3.2.2.5 e 3.2.2.6.

3.2.2.3 Quantificação da produção de CO₂

A determinação da quantidade de CO₂ produzida foi realizada por meio 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 erlenmeyer de 250 mL. Durante esse procedimento a válvula do filtro da ascarita (Figura 37 - 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 44 - Letra D), de forma a dar continuidade à captura do CO₂ produzido pela mineralização proveniente da biodegradação 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 realizada a titulação com a solução de ácido clorídrico.

As principais reações que ocorrem no ensaio respirométrico estão representadas conforme segue:



Para cada leitura, as soluções de KOH e HCl eram 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. Todos os reagentes utilizados foram da marca Vetec.

A produção semanal de CO₂ em cada respirômetro foi calculada a partir da equação 4:

$$CO_2 (mg) = (A - B) \times 50 \times 0,044 \times f_{HCl} \quad (4)$$

Onde:

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

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

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

50 = Fator para transformar equivalente em mol de CO₂

0,044 = fator para transformar μ mol_{CO₂SU} em mg_{CO₂SU}

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

Ressalta-se que a produção semanal de CO₂ em cada tratamento foi dada pela média aritmética das três réplicas de respirômetros.

3.2.2.4 Quantificação da produção de CO₂ por biodegradação

A quantidade de CO₂ produzida por biodegradação, CO₂ (mg), foi determinada a partir da subtração da quantidade semanal de gás produzida o tratamento controle (CONT) da quantidade produzida no respirômetro-ensaio (demais tratamentos). A produção acumulada de CO₂ por biodegradação em função do tempo (70 dias) foi determinada por meio de soma de todas as massas de CO₂ obtidas em cada um dos intervalos de tempo analisados.

3.2.2.5 Quantificação de carbono biodegradado

A quantidade de carbono biodegradado foi calculada conforme a equação 5:

$$C_b (mg C) = 2 \times CO_{2b} (mg CO_2) \quad (5)$$

onde :

C_b (mg C) = massa de Carbono (C) biodegradado em miligrama (mg).

CO_{2b} (mg CO₂) = massa de dióxido de carbono (CO₂) biodegradado em miligrama (mg)

Em tal equação admitiu-se que 50% do carbono biodegradado se transforma em CO₂ e os 50% remanescente se incorporam ao solo sob a forma de húmus e biomassa microbiana, conforme preconizado na NBR 14283 (ABNT, 1999).

3.2.2.6 Eficiência da biodegradação a partir da produção de CO₂

A eficiência de biodegradação de cada tratamento ao final do experimento foi calculada a partir da quantidade acumulada de carbono biodegradado, conforme a equação 6 (TRINDADE, 2002; MARIANO, 2006).

$$EB (\%) = \frac{C_b(\text{mg C})}{C_o(\text{mg C})} \times 100 \quad (6)$$

Onde:

EB% = eficiência da biodegradação,

C_b (mg C) = massa de Carbono (C) biodegradado em miligrama (mg),

C_o (mg C) = massa de Carbono orgânico (C) inicial no solo em miligrama (mg).

3.2.2.7 Monitoramento das variáveis

As alíquotas das amostras de solo do primeiro experimento foram coletadas no início e no final do experimento, já que o respirômetro é um sistema fechado para monitoramento da evolução de dióxido de carbono. Nestas alíquotas foram quantificados os microrganismos presentes e alguns parâmetros físico-químicos importantes. A Tabela 7 apresenta os intervalos amostrais e parâmetros que foram avaliados no primeiro experimento.

Tabela 7 - Intervalos amostrais e parâmetros ao longo do primeiro experimento

Parâmetros	Análises	0 dia	70 dias
	Temperatura	X	X
	Umidade	X	X
Físicos	Densidade de partícula	X	X
	Densidade aparente	X	X
	Porosidade	X	X
	PHT (UFC. g de solo ⁻¹)	X	X
Biológicos	PF (UFC. g de solo ⁻¹)	X	X
	PMDO (NMP. g de solo ⁻¹)	X	X
Químicos	pH	X	X

PHT = População Heterotrófica Total; PF=População de Fungos; PMDO=População de Microrganismos Degradadores de Óleo

3.2.3 Ajuste de pH do solo

De modo a não comprometer a atividade microbiana, o pH do solo original foi ajustado para um valor próximo da neutralidade (7,0) e dentro da faixa de 6,5 a 8,5, considerada adequada à atividade da maioria dos microrganismos (SARKAR *et al.*, 2005). Tal ajuste foi efetuado pela adição de hidróxido de cálcio, Ca(OH)_2 , cuja quantidade foi determinada por meio de uma curva de neutralização, elaborada conforme metodologia de Lima (2004), descrita a seguir. Ressalta-se que o ajuste foi efetuado antes da recontaminação e verificado a cada três dias durante os quinze dias que antecederam a recontaminação, de modo, a garantir que as cinco condições de pH (6,5; 7,0; 7,5; 8,0 e 8,5) em estudo fossem atingidos

Em Erlenmeyers, foram pesados (em duplicata) $20\text{g} \pm 0,1\text{ g}$ do solo em estudo e adicionados, as seguintes quantidades de Ca(OH)_2 (marca Vetec) para cada ponto da curva: 0 (controle); 0,001 g; 0,006 g; 0,010 g; 0,015 ; 0,030 g; 0,051 g; 0,100 g; 0,300 g; 0,500 g. Cada sistema (Erlenmeyer) foi vigorosamente homogeneizado com bastão de vidro 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 orbital de 150 min^{-1} em *shaker* (Q 816M20) durante 1 h. Após agitação, os mesmos 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 .

3.2.4 Ajuste de nutrientes

A correção de nitrogênio e fósforo foi realizada utilizando-se solução de sais de nitrato de amônio (NH_4NO_3) e de fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4), respectivamente. A concentração das soluções utilizadas dependeu da relação C:N:P testada. Nos experimentos de biodegradação foram utilizadas as seguintes relações C:N:P: 100: 10:1; 100:8,24:0,875; 100:5,5:0,75; 100:2,75:0,625 e 100:1:0,5. Tais cálculos foram baseados no conteúdo de carbono orgânico total no solo, determinado pelo teor de carbono da matéria orgânica já presente no solo mais o teor de carbono proveniente da contaminação. Admitiu-se que este último era de 85% (m m^{-1}).

3.2.5 Adição de material estruturante

A adição de material estruturante foi realizada com a adição de areia peneirada em malha de 2 mm e esterilizada termicamente de modo a eliminar a presença de microrganismos. A areia em questão foi esterilizada três vezes em autoclave (Q290-I2), em temperatura de 121°C, por 30 minutos, durante três dias consecutivos (BENTO *et al.*, 2005). Nos experimentos de biodegradação foram adicionadas as seguintes proporções de material estruturante: 0; 2,5; 5; 7,5 e 10%. O maior valor testado foi determinado, em virtude que valor acima de 10% de material estruturante haveria uma diluição da contaminação.

A escolha da areia como material estruturante foi realizada por ser tratar de um material totalmente inerte ao processo de biodegradação de hidrocarbonetos totais de petróleo.

3.3 **Ensaio de biodegradação em microcosmos e biorreatores**

O segundo experimento foi conduzido por 121 dias, em microcosmos e biorreatores, a avaliação do efeito da taxa nutricional, o pH e a proporção de material estruturante otimizados no primeiro experimento sobre a biodegradação de hidrocarbonetos totais de petróleo e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Ambas as tecnologias receberam aplicação da estratégia de bioestímulo e bioestímulo associado ao bioaumento. Na Tabela 8 estão apresentadas às condições experimentais que serão estudadas nesta fase.

Tabela 8 - Delineamento dos tratamentos empregados na avaliação da biotratabilidade

Biorreatores e Biopilhas	Tratamentos	Condições Experimentais
CONT	Controle	Solo sem contaminação recente, sem ajuste de pH, sem ajuste de nutrientes, sem material estruturante, ajuste de umidade
BIOS	Bioestímulo	Solo com contaminação, com ajuste de pH, com ajuste de nutrientes, com adição de material estruturante, ajuste de umidade
BIOS + BIOA ₁	Bioestímulo + Bioaumento	Solo com contaminação, com ajuste de pH, com ajuste de nutrientes, com adição de material estruturante, ajuste de umidade, inoculo de microrganismos provenientes do próprio solo

A composição dos microcosmos e biorreatores foram realizadas, de acordo as metodologias de ajuste de pH, nutrientes, material estruturante, umidade e adição de inóculo nos tratamentos CONT, BIOS e (BIOS + BIOA) conduzidos em respirômetros, no segundo experimento.

O tratamento CONT (controle – solo sem recontaminação) foi realizado com o objetivo de comparar o comportamento da biodegradação em solo de baixa contaminação em relação ao solo com contaminação elevada.

Para avaliar apenas a ação da população nativa do solo na biodegradação do contaminante, foi conduzido o tratamento BIOS, contendo somente solo recontaminado com ajuste de pH, nutrientes, material estruturante e umidade, otimizados no primeiro experimento. Já para avaliar o efeito do inóculo, proveniente do tratamento que apresentou melhor eficiência na biodegradação no primeiro experimento, sobre os parâmetros otimizados anteriormente foram conduzidos os tratamentos BIOS + BIOA.

3.3.1 Extração da cultura microbiana do solo

A cultura microbiana (EXP11) utilizada neste estudo foi obtida por meio da amostra de solo que apresentou a melhor eficiência na biodegradação do contaminante, além de ser uma fonte de grande potencial de microrganismos degradadores de derivados de petróleo.

Antes de realizar a extração de microrganismos do solo em questão, foi realizada uma avaliação preliminar da população de bactérias heterotróficas totais, fungos e microrganismos degradadores de óleo cru.

Para a extração dos microrganismos, pesou-se uma alíquota de 100 g do solo, adicionou-se em erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de meio mineral líquido BH (Bushnell Hass) acrescido de glicose como fonte de carbono e, cuja composição encontra-se apresentada na Tabela 9. A mistura foi mantida sob agitação em shaker (Quimis 816M200) a 150 min^{-1} , em temperatura de $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, após 4 dias. Após esse período, o crescimento microbiano foi observado pela turvação do meio de cultivo comparado ao frasco controle contendo o mesmo meio, sem amostra de solo. (CIANNELLA, 2010). Conjuntamente, foi realizada a quantificação da população microbiana heterotrófica, fungos e microrganismos degradadores, conforme metodologia descrita na secção pertinente.

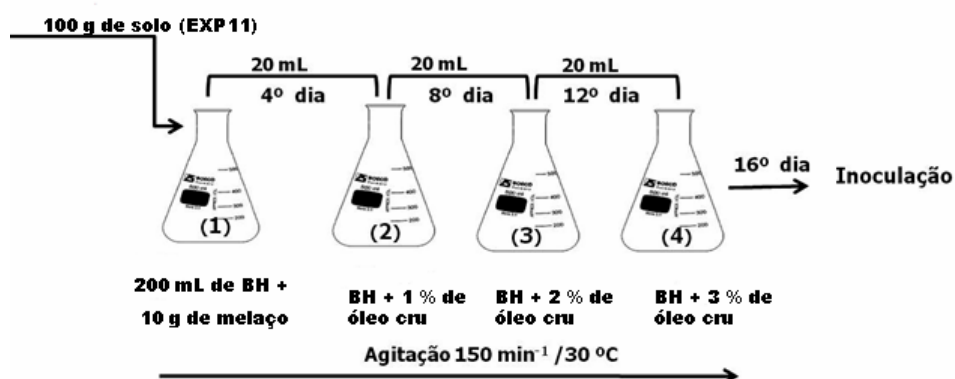
Tabela 9 - Composição do meio mineral Bushnell Hass

Sais	Concentração (g L ⁻¹)
Melaço	10,0
NaCl	5,0
K ₂ HPO ₄	1,0
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
pH = 7,0 ± 0,2 ²	

3.3.2 Aclimatização da cultura microbiana EXP11

Primeiramente, fez-se a extração da cultura microbiana EXP11 em meio mineral líquido BH acrescido de melaço. Ao final desse processo, seguiu-se a aclimatização da cultura microbiana EXP11, conforme ilustrado na Figura 45.

Figura 45 - Processo de aclimatização das culturas microbianas



Em câmara de fluxo laminar (Pachane TPCR-T2,5 CB), uma alíquota de 20 mL da suspensão microbiana do meio de extração (1) foi transferida para outro frasco Erlenmeyer (2), contendo 200 mL do meio mineral líquido BH, porém sem melaço, que foi substituído por 1% (v v⁻¹) de óleo cru como única fonte de carbono. Essa nova mistura foi mantida sob agitação em *shaker* (Q 816M20) a 150 min⁻¹, temperatura de 30 °C ± 1 °C, por 4 dias, quando, uma alíquota de 20 mL foi retirada e transferida para outro frasco erlenmeyer contendo meio mineral líquido BH acrescido de 2% (vv⁻¹) de óleo cru. Nova incubação, nas mesmas condições, foi conduzida.

² Ajustado com solução de ácido clorídrico (HCl) 1 mol L⁻¹ e/ou solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol L⁻¹

O procedimento foi repetido depois de 4 dias de incubação para a concentração de 3% ($v v^{-1}$) de óleo cru. Ao final deste processo (16º dia), uma alíquota da suspensão microbiana aclimatada foi utilizada nos ensaios de bioaumento. A substituição do melão por concentrações variáveis de óleo cru teve por objetivo não só estimular os micro-organismos com potencial de utilização desse contaminante como fonte de nutrientes, dando-lhes uma vantagem seletiva em detrimento aos demais, mas também torná-los menos vulneráveis aos efeitos tóxicos do contaminante nos ensaios de biorremediação subsequentes.

Todo o material e vidraria utilizados nos processos de extração e aclimação, assim como o meio mineral líquido BH, sem óleo cru, foram previamente esterilizados em autoclave (Q 290-I2) a 121° C por 15 minutos.

3.3.3 Montagem dos biorreatores

O experimento foi conduzido em espaço físico de aproximadamente 21 m², com pontos de fornecimento de energia para alimentação dos sistemas de aeração. Foram montados três sistemas de tratamento, conforme as condições experimentais descritas na Tabela 6.

Os biorreatores utilizados foram constituídos de colunas em acrílico, de 33 cm de altura (27 cm de leito) e 14 de diâmetro (Figura 46), mantidos à temperatura ambiente.

Figura 46 - Biorreatores utilizados durante o experimento.

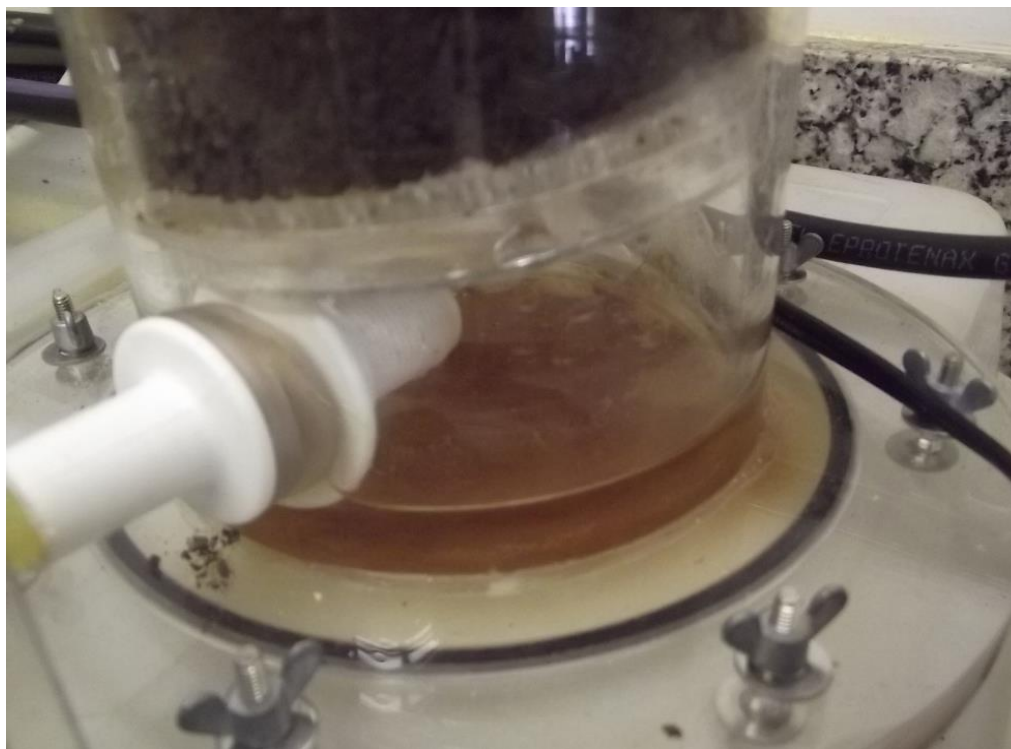


Fonte: Lab. de Biorremediação e Fitotecnologias

No inferior de cada biorreator foi projetado um espaço de aproximadamente 923 cm³ para coleta de eventuais lixiviados gerados (Figura 47), além de um furo de ½” com uma distância de 33 cm de altura da base para a entrada de ar no sistema. Entre a camada de solo e

a área para coleta de lixiviado foi colocada um fundo de acrílico perfurado e sob este uma fina tela de nylon para suportar o solo contaminado.

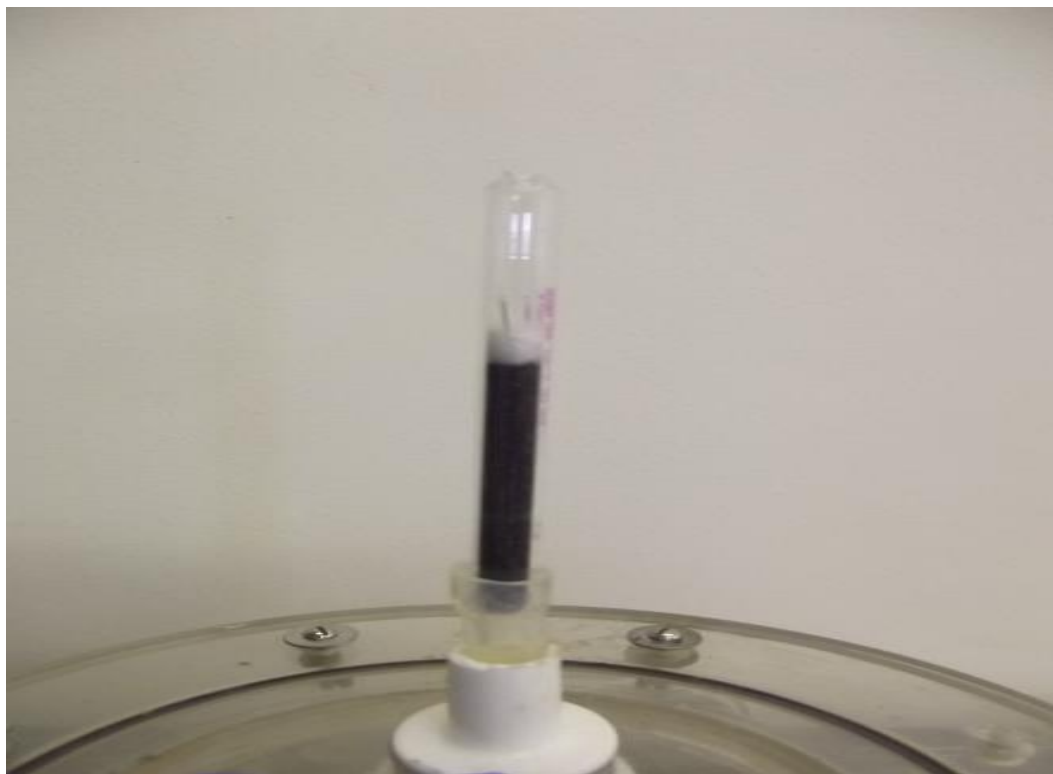
Figura 47 - Detalhe do espaço para coleta de lixiviados nos biorreatores



Fonte: Lab. de Biorremediação e Fitotecnologias

Na parte superior de cada biorreator, foi projetado um furo de ½” onde foi acoplado um cartucho de carvão ativado (Supelco ORBO 42) com dois leitos (400/200mg) para o monitoramento de benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos – BTEX e outros VOC até 9 átomos de carbono (Figura 48). Cada biorreator recebeu 1150 g de solo contaminado com 3% de hidrocarbonetos totais de petróleo, e receberam seus respectivos tratamentos (bioestímulo e bioestímulo associado ao bioaumento)

Figura 48 - Detalhe do cartucho de carvão ativado nos biorreatores



Fonte: Lab. de Biorremediação e Fitotecnologias

O sistema de aeração foi realizado por meio de injeção de ar. Foram utilizadas três bombas (Figura 49) que possuem uma vazão máxima de 19 L min^{-1} , vácuo máximo de 26,9 Hg e são capazes de suportar até 36 psi de pressão contínua, o que corresponde a 2,24 atmosferas. Cada bomba insuflava ar, em paralelo, para dois biorreatores (Figura 52). Uma mangueira foi conectada em cada biorreator e antes do ponto de entrada do mesmo foi interligado um rotâmetro marca Dwyer ($0 \text{ a } 25 \text{ L min}^{-1}$) (Figura 50) para controle do ar a ser distribuído no sistema. Cada mangueira, por sua vez, foi acoplada ao respectivo biorreator por meio de niples de $\frac{1}{2}$ " flanges de $\frac{1}{2}$ ". A aeração foi programada para garantir a seguinte relação: $0,6 \text{ L ar min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ de solo contaminado, de acordo com ensaios realizados, em biorreatores piloto por Gobby (2006).

Figura 49 - Detalhe do sistema de aeração dos biorreatores



Fonte: Lab. de Biorremediação e Fitotecnologias

A leitura da vazão de ar é realizada diretamente por meio de uma escala graduada fixada em rotômetros, que são aparelhos constituídos por um tubo cônico transparente com flutuador esférico, de NYLON, o que proporciona alta resistência química, baixa absorção de umidade e transparência para facilitar a inspeção de rotina, conforme ilustrado na Figura 50.

Figura 50 - Rotâmetro de marca Dwyer utilizado para controlar a vazão de ar na entrada de cada biorreator.



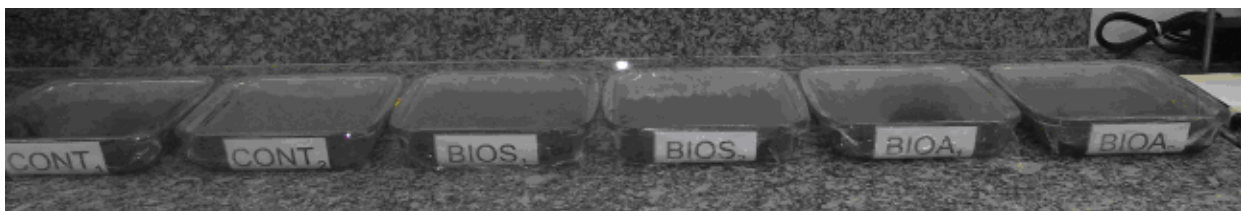
Fonte: Lab. de Biorremediação e Fitotecnologias

Ao longo do experimento, foi realizado periodicamente análise de umidade e quando se observou necessário foi introduzida pela parte superior dos biorreatores água destilada, em quantidade pré-determinada.

3.3.4 Montagem dos microcosmos

Os microcosmos utilizados foram construídos em recipientes de vidro (Figura 51) de 4,5 cm de altura, 420,0 cm² de área e de 1890,0 cm³ de volume. Cada microcosmo recebeu 1150 gramas de solo recontaminado com óleo cru, o que correspondeu a um percentual de contaminação de 3 % (mm⁻¹) de HTP.

Figura 51 - Aspecto geral dos microcosmos



Fonte: Lab. de Biorremediação e Fitotecnologias

A aeração foi realizada por meio de revolvimento do solo, três vezes por semana (BENTO *et al.*, 2005). Tal revolvimento foi realizado com auxílio de uma colher de alumínio de 20 cm de haste, previamente estéril. O solo de cada sistema também era umedecido periodicamente com água destilada estéril para manter o teor de água no solo e evitar introdução de microrganismos no sistema. A adição de água ao sistema era conduzida após análise de umidade de solo. Durante todo o experimento, os microcosmos foram mantidos cobertos em uma folha de para-filme para minimizar contaminações externas, principalmente microbiológicas (BENTO *et al.*, 2005).

3.3.5 Monitoramento dos ensaios de biodegradação

As alíquotas das amostras de solo foram coletadas ao longo das 16 semanas de experimento, no 0, 3°, 17°, 24°, 32°, 45°, 59°, 80°, 101° e 122° dias (Tabela 10), em todos os sistemas de tratamento (em microcosmos e biorreatores). Nestas alíquotas foram quantificados população heterotrófica total, população de fungos, população de microrganismos degradadores de óleo cru, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA),

hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP), benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos (BTEX) (apenas nos biorreatores) e alguns parâmetros físico-químicos necessários (pH e umidade). As análises de capacidade de campo, densidade de partículas, densidade de solo, porosidade, carbono orgânico total, nitrogênio total e fósforo assimilável, foram realizadas no início (0 d), em um período intermediário (59 d) e ao final do experimento (122 d). O teste ecotoxicológico foi realizado no início (0 d) e no final (122 d) do experimento.

Tabela 10 - Intervalos amostrais e parâmetros avaliados ao longo do 3º experimento³

Análises	Amostragem	0 d	3d	17d	24d	45d	59d	80d	101d	121d
Temperatura	simples	x	x	x	x	x	x	x	x	X
Umidade	simples	x	x	x	x	x	x	x	x	X
Cap. Campo	simples	x					x			X
Densidade de partícula	simples	x					x			X
Densidade aparente	simples	x					x			X
Porosidade	simples	x					x			X
Teste de ecotoxicidade	simples	x								X
PHT (UFC g solo ⁻¹)	compostas	x	x	x	x	x	x	x	x	X
PD (UFC g solo ⁻¹)	compostas	x	x	x	x	x	x	x	x	X
PDO (NMP g solo ⁻¹)	compostas	x	x	x	x	x	x	x	x	X
Emissões	simples	x	x	x	x	x	x	x	x	X
pH	simples	x	x	x	x	x	x	x	x	X
TPH (mg kg solo ⁻¹)	composta	x	x	x	x	x	x	x	x	X
HPA (mg kg solo ⁻¹)	composta	x	x	x	x	x	x	x	x	X
Carbono orgânico total	simples						x			
Nitrogênio total	simples						x			
Fósforo Assimilável	simples	x					x			X

Os parâmetros (PHT, PD, PDO, TPH, HPA) foram avaliados a partir de uma amostragem composta dos tratamentos, ou seja, da junção de amostras coletadas em seis pontos aleatórios em cada triplicata dos tratamentos (amostra tratamento = réplica 1 + réplica 2 + réplica 3). Isso foi necessário para reduzir o custo e o tempo para execução de alguns procedimentos, bem como para permitir a comparação entre parâmetros diretamente interligados. Os demais parâmetros (temperatura, umidade, densidade de partícula, densidade aparente, porosidade, teste de ecotoxicidade, emissões, pH, carbono orgânico total, nitrogênio total e fósforo assimilável) foram analisados em cada duplicata dos tratamentos (amostra tratamento réplica 1 e amostra tratamento réplica 2), também amostradas em cinco pontos

³ Amostra composta – amostra proveniente da junção de alíquotas das réplicas dos tratamentos (LF = LF1 + LF2). Amostra simples – amostra proveniente de alíquotas de cada réplica dos tratamentos (LF1 e LF2).

aleatórios (amostras simples). Todos os parâmetros foram analisados em triplicatas. A amostragem correspondente ao tempo 0, para todos os parâmetros, foi executada imediatamente depois da introdução dos incrementos (introdução de água destilada, nutrientes, calagem e inóculo) no solo contaminados com HTP.

3.3.5.1 Amostragem nos microcosmos e biorreatores

A amostragem foi realizada nos biorreatores por meio de um amostrador tubular (Figura 52), de forma aleatória e ao longo do perfil do solo. Já a amostragem nos microcosmos foi realizada (Figura 53), após revolvimento do solo com o auxílio de uma colher de alumínio, previamente esterilizada. As amostras compostas consistiram em uma mistura de 6 sub-amostras e imediatamente após a retirada foram acondicionadas em recipiente de vidro previamente esterilizados. Ressalta-se que o amostrador tubular e a colher de alumínio foram devidamente descontaminado a cada amostragem, conforme o Manual de gerenciamento de áreas contaminadas da CETESB - 6300 - Amostragem do solo.

Figura 52 - Amostrador tubular



Fonte: Lab. de Biorremediação e Fitotecnologias

Figura 53 - Montagem, aeração, umidificação e amostragem dos microcosmos



Fonte: Lab. de Biorremediação e Fitotecnologias

3.3.5.2 Parâmetros físicos

3.3.5.2.1 Temperatura

Para a determinação da temperatura, nos microcosmos e nos biorreatores, foi realizada a medição com um termômetro analógico.

3.3.5.2.2 Umidade

Para a determinação do teor de umidade total foi utilizada a metodologia descrita no Manual de Análise de Solo (EMBRAPA, 1997). Após uma boa homogeneização, pesou-se 10 g da amostra de solo em um béquer de 30 mL (em triplicatas), de peso de previamente conhecido. Em seguida, conduziu o béquer a uma estufa de secagem (marca Nova), previamente regulada a $105^{\circ}\text{C} \pm 0,1$. Após 24 horas em estufa, o béquer foi transferido para

um dessecador, por aproximadamente 30 minutos. Após este período realizou-se a pesagem do sistema. O cálculo da umidade do solo foi feito por gravimetria, subtraindo a massa final da massa inicial, considerando à média das três réplicas. Este cálculo foi realizado a partir da equação 7:

$$\% \text{ umidade total} = ((m_{\text{ solo úmido.}} - m_{\text{ solo seco}}) / m_{\text{ solo úmido.}}) \times 100 \quad (7)$$

Onde:

$m_{\text{ solo úmido.}}$ = massa de solo amostrada (g).

$m_{\text{ solo seco}}$ = massa de solo obtida após secagem da amostra em estufa a 105°C por 48 horas (g).

3.3.5.2.3 Densidade de partículas

Para a determinação de densidade de partículas, utilizou-se a metodologia descrita no Manual de Análise de Solo (EMBRAPA, 1997). Em um balão volumétrico de 50 mL (V_B), transferiu-se 20,0 g de amostra de solo (M) previamente seco em estufa a 105°C por 24 horas. Em seguida, foi adicionado álcool etílico, com auxílio de uma bureta graduada de 50 mL, até atingir a aferição do frasco e o volume gasto foi anotado (V_A). Primeiramente, calculou-se o volume do solo (V_S) de acordo com a equação 8. A densidade de partícula foi calculada de acordo com a equação 9.

$$V_S = V_B - V_A \quad (8)$$

Onde:

V_S = volume do solo (gcm^3)

V_B = volume do balão (mL)

V_A = volume do álcool etílico (mL)

$$D_p = M/V_S (\text{gcm}^{-3}) \quad (9)$$

Onde:

D_p = densidade de partícula

M = massa de solo

V_S = volume do solo

3.3.5.2.4 Densidade aparente

Para a determinação da densidade aparente, pesou-se um béquer de 10 mL (A) e o peso (g) foi anotado. Em seguida, adicionou-se solo até atingir o nível de aferimento da proveta. O béquer contendo a amostra foi pesado e o peso obtido foi anotado (B). Com a diferença entre os pesos (B – A) calculou-se a densidade aparente por meio da equação 10.

$$D_A = (B - A) / 100 \quad (10)$$

Onde:

D_A = densidade aparente (g.cm⁻³)

A = peso da proveta (g)

B = peso da proveta + solo (g)

3.3.5.2.5 Porosidade

A porosidade de um solo é a razão entre o volume ocupado pelos poros e o volume aparente do solo. Para efetuar o cálculo da porosidade, os dados obtidos nos cálculos da densidade de partícula (D_P) e da densidade aparente (D_A) foram utilizados. O resultado foi expresso em percentagem conforme demonstrado na Equação 11.

$$P (\%) = ((D_P - D_A) / D_P) \times 100 \quad (11)$$

Onde:

P = Porosidade (%)

D_P = densidade de partícula

D_A = densidade aparente

3.3.5.3 Parâmetros biológicos

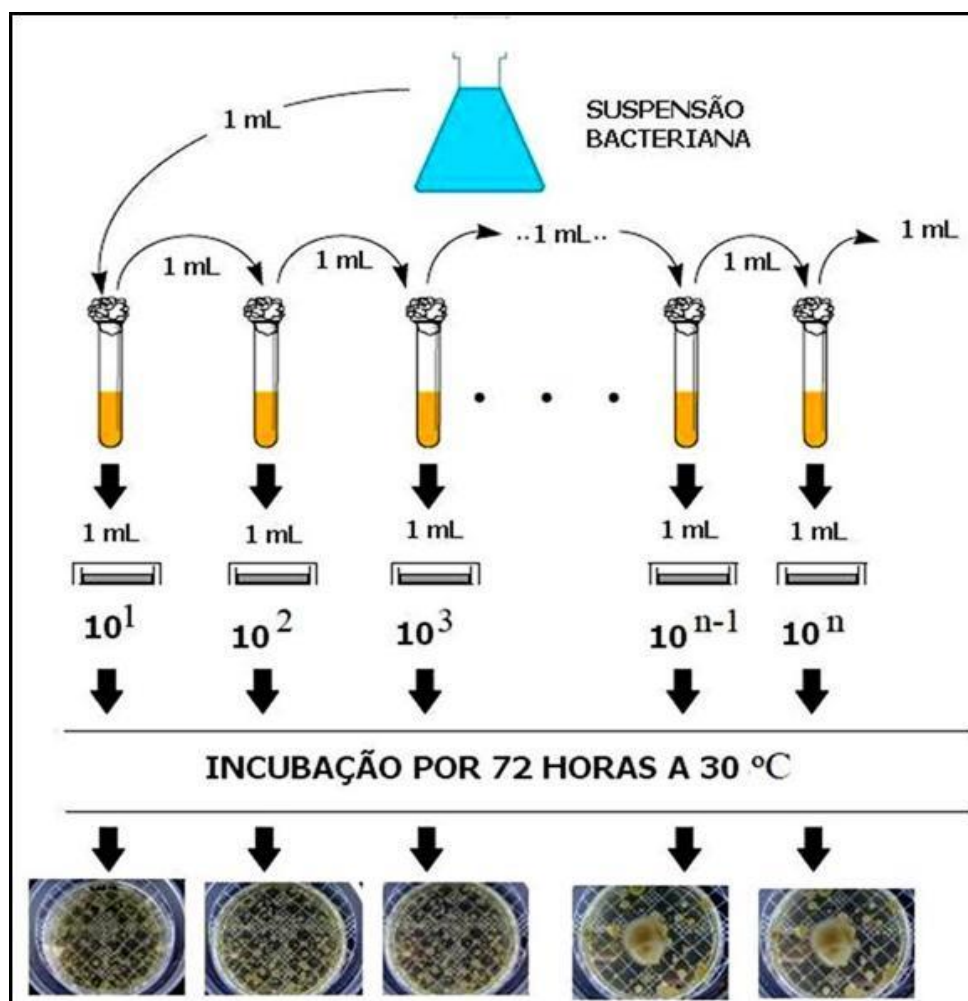
Para realizar a caracterização microbiológica durante os ensaios foram conduzidas análises para quantificação de microrganismos heterotróficos totais, de população de fungos e degradadora de óleo cru.

3.3.5.3.1 Extração da cultura microbiana

Para realizar a caracterização microbiológica durante os ensaios foram conduzidas extrações dos microrganismos para quantificação de microrganismos heterotróficos totais, de população de fungos e população degradadora de óleo cru.

Para a extração dos microrganismos do solo, 10 g deste foram pesados e adicionados em um frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de solução salina 0,85%. O frasco foi mantido sob agitação de 150 min^{-1} em *shaker* (Quimis 816M20) durante 30 min, a temperatura de $30 \text{ °C} \pm 1$, 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 , conforme ilustrado na Figura 54.

Figura 54 - Método padrão de diluição e contagem em placas



Fonte: Lab. de Biorremediação e Fitotecnologias

Ressalta-se que todo material e vidraria utilizados nas análises microbiológicas, assim como o meio de cultura e a solução salina, foram previamente esterilizados em autoclave (Quimis 290-I2) a 121° C por 15 min, antes do uso.

3.3.5.3.2 População heterotrófica total

Após a diluição, prosseguiu-se o plaqueamento em meio de cultivo sólido Agar-Agar (Tabela 11), por meio da técnica *pour plate*. Após solidificação do meio, as placas foram incubadas em estufa microbiológica (TE-392/I) a 30 °C ± 1°C, por 72 h.

Tabela 11 - Composição do meio de cultivo sólido Ágar-Ágar

Componentes	Concentração (g L ⁻¹)
Glicose	10,0
Triptona	5,0
Extrato de levedo	2,5
Ágar-Ágar bacteriológico	15,0
pH = 7,0 ± 0,2	

Fonte: Perreira, 2008

Ao término do período de incubação foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias em cada placa de Petri (Figura 58), com o auxílio de um contador eletrônico de colônias (Quimis modelo Q 2958). A contagem foi realizada segundo a metodologia do Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento (MAPA, 2003), considerando-se o intervalo de precisão e repetibilidade de 30 a 300 colônias, ou seja, placas com contagem de 30 a 300 colônias. As placas foram preparadas em triplicata e os desvios padrões foram calculados para cada diluição. Os resultados foram expressos em UFC g⁻¹ de solo.

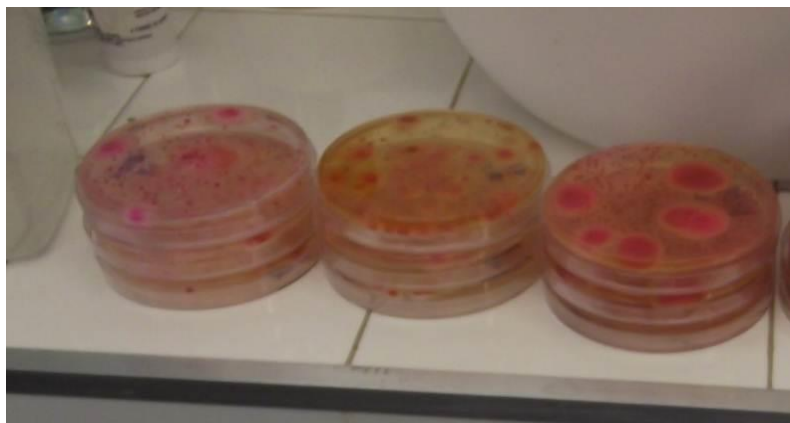
Branco também foram utilizados para garantir a esterilização do aparato usado no teste.

3.3.5.3.3 População de fungos

Em seguida, prosseguiu-se o plaqueamento em meio de cultivo sólido Rosa de Bengala, da marca Tedia (Figura 55), por meio da técnica *pour plate*. Após solidificação do

meio, as placas foram incubadas em estufa microbiológica (TE-392/I) a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 5 dias.

Figura 55 - Aspecto das unidades formadoras de colônias nas placas de Petri



Fonte: Lab. de Biorremediação e Fitotecnologias

Ao término do período de incubação foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias em cada placa de Petri, com o auxílio de um contador eletrônico de colônias (Quimis modelo Q 2958).

A contagem foi realizada segundo a metodologia do Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento (MAPA, 2003), considerando-se o intervalo de precisão e repetibilidade de 30 a 300 colônias, ou seja, placas com contagem de 30 a 300 colônias. As placas foram preparadas em triplicata e os desvios padrões foram calculados para cada diluição. Os resultados foram expressos em UFC g^{-1} de solo.

Branco também foram utilizados para garantir a esterilização do aparato usado no teste.

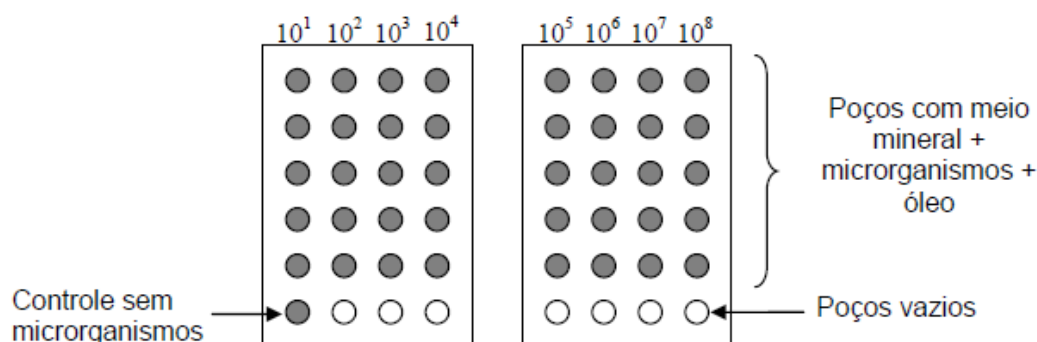
3.3.5.3.4 População de microrganismos degradadores de óleo cru

E finalmente, prosseguiu-se com a adição de 0,1 mL de inóculo das diluições de solução salina ($\text{NaCl } 0,85\% \text{ vv}^{-1}$) adequadas nos poços das placas de NMP contendo 1,8 mL de meio mineral Bushnell-Hass líquido cada (Tabela 12). Em seguida, adicionou-se 10 μL de óleo cru ($\approx 0,5\% \text{ vv}^{-1}$) como sendo a única fonte de carbono e energia presente. (Figura 56). As placas foram incubadas em estufa microbiológica (TE-392/I) a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 7 dias.

Tabela 12 - Composição do meio de cultivo Bushnell-Hass líquido

Componentes	Concentração (g L ⁻¹)
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
CaCl ₂	0,02
K ₂ HPO ₄	1,0
KH ₂ PO ₄	1,0
NH ₄ NO ₃	1,0
FeCl ₃	0,05
pH = 7,0 ± 0,2	

Figura 56 - Esquema de utilização de Placas de Número Mais Provável



Fonte: Perreira, 2008.

Ao término do período de incubação foi realizada a leitura dos mesmos considerando como positivo (presença de biodegradação) qualquer alteração visual no halo de óleo quando comparado com controle sem inóculo. Os resultados foram expressos em microrganismos g⁻¹ de solo.

3.3.5.3.5 Teste de ecotoxicidade (teste de reprodução de minhocas)

A metodologia foi desenvolvida conforme proposto por Ramos (2007). Este teste foi realizado para avaliar os efeitos do contaminante na reprodução das minhocas da espécie *Eisenia Andrei* (Figura 57). Um ciclo reprodutivo desta espécie dura em média 56 dias.

Em béquer de 600 mL, foram pesados 200 gramas de solo (em triplicata), ajustou-se a umidade de modo atingir 50% da capacidade de campo. Os béqueres foram pesados e os valores anotados em uma tabela Controle de Umidade. As réplicas foram cobertas com papel filme perfurado e colocadas na estante de teste, distribuídas de modo aleatório, em

temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de 75% e iluminação constante por 7 dias para o processo de aclimatização da amostra.

Figura 57 - *Eisenia andrei*



Foto: Sanye Soroldoni Guimarães.

Após uma semana, acrescentaram-se em cada réplica 10 minhocas adultas, com o clitelo bem desenvolvido e massa entre 300 e 600 mg. Previamente as minhocas foram lavadas, secas e colocadas durante 2h para purgar o conteúdo intestinal. Seus pesos foram anotados na Tabela de Biomassa (Anexo 2). Adicionou-se em cada réplica 8 gramas do esterco do próprio minhocário.

A cada 14 dias foi realizada nas réplicas a enumeração de minhocas vivas, ovos e juvenis. As minhocas vivas foram pesadas e devolvidas para os seus respectivos béqueres. Os valores encontrados foram adicionados na tabela do teste de reprodução (Anexo 3). A contagem das minhocas vivas, peso das minhocas vivas, a quantidade de ovos e juvenis foi expressa, respectivamente, em termos de percentual de mortalidade, redução de biomassa e reprodução da espécie.

Cabe ressaltar, que a cada leitura ajustou-se a umidade e adicionou-se 8 gramas de esterco do próprio minhocário a cada réplica.

3.3.5.4 Parâmetros químicos

3.3.5.4.1 Medição de pH

Para verificação do pH do solo adotou-se a metodologia descrita no Manual de Métodos de Análise de Solo (EMBRAPA, 1997), na qual a medição é realizada em solução salina. Para tal, mediu-se 10 mL em um béquer de 10 mL. A este foram adicionados 25 mL da solução de KCL – 1,0 mol L⁻¹. O sistema solo + água foi agitado manualmente no interior de um tubo Falcon de 50 mL. A medição do pH foi realizada no líquido sobrenadante por meio de medidor de pH Quimis modelo Q 400AS, previamente calibrado com soluções padrão de pH 4 e 7 (Quimis) e eletrodo combinado de vidro.

3.3.5.4.2 Quantificação de carbono orgânico total

A análise de carbono orgânico é uma técnica destrutiva que tem a finalidade de quantificar o teor de carbono orgânico presente em uma grande variedade de matrizes, sendo utilizado com frequência na quantificação de resíduos orgânicos disponíveis para estudos de biodegradação.

A quantificação de carbono orgânico presente nas amostras em estudo foi determinada pelo método de Walkley e Black modificado descrito no Manual de Métodos de Análise de Solo (EMBRAPA, 1997). Para quantificar o teor de carbono orgânico das amostras em estudo, foi utilizado o método de combustão úmida, empregando-se o ácido crômico (resultante da reação do dicromato de potássio com o ácido sulfúrico) como oxidante, durante a liberação de CO₂.

Pesou-se 0,1 grama de solo contaminado, transferiu este para um Erlenmeyer de 250 mL. Adicionaram-se 10 mL de solução de dicromato de potássio 0,4 mol L⁻¹. Colocou-se um condensador de refluxo na boca do Erlenmeyer. Em seguida, aqueceu-se em placa elétrica até a fervura branda durante 5 minutos. Deixou-se esfriar e adicionaram-se 80 mL de água destilada, 2 mL de ácido ortofosfórico e 3 gotas do indicador difenilamina. Titulou-se com solução de sulfato ferroso amoniacal 0,1 mol L⁻¹ até a mudança da cor azul para a cor verde e anotou-se o volume gasto. Um ensaio em branco é realizado sem adição de solo, para se descontar qualquer presença de carbono orgânico nos reagentes. A quantificação de carbono orgânico total foi determinada pela equação 11:

$$C \text{ (g kg}^{-1}\text{)} = (40 - \text{volume gasto}) \times f \times 0,6 \quad (11)$$

Onde:

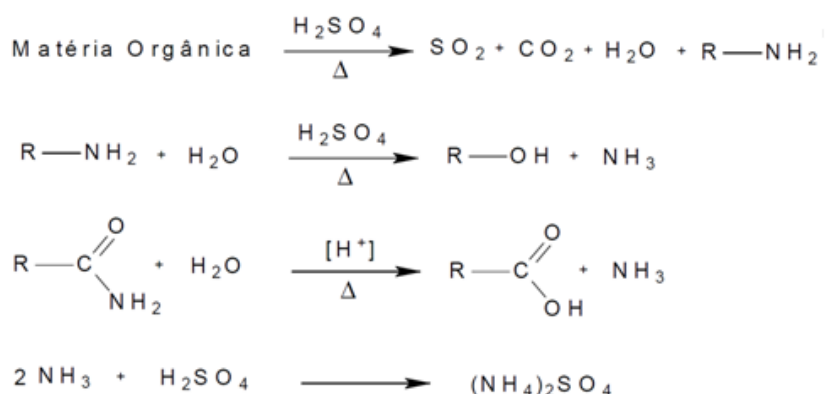
$f = 40/\text{volume de sulfato gasto na prova em branco.}$

O percentual de matéria orgânica foi calculado multiplicando-se o resultado do carbono orgânico por 1,724. Este fator é utilizado por admitir que a composição média do húmus, o carbono orgânico participa com 58% (EMBRAPA, 1997).

3.3.5.4.3 Quantificação de nitrogênio total

A determinação de nitrogênio nas amostras de solo foi feita pelo Manual de Métodos de Análise de Solo (EMBRAPA, 1997). O método mais utilizado para avaliação de Nitrogênio Total consiste em uma oxidação úmida, que converte o N-orgânico em N-amoniacal, conhecido por Método Kjeldahl. Esta análise decorre em três principais etapas: digestão, destilação e titulação da amostra.

A primeira etapa consistir na digestão, onde o carbono presente na matéria orgânica é oxidado, de forma a desprender o dióxido de carbono (CO_2). Durante este processo ocorre a completa destruição da matéria orgânica e o N é convertido em sulfato de amônio por meio da oxidação com a mistura dos ácidos presentes na solução ácida. Na reação de digestão, abaixo, além dos agrupamentos proteicos, existe no solo o nitrogênio sob a forma de amina e nitrila, que é transformado em amônia (NH_3). Esta reage com o ácido sulfúrico (H_2SO_4), formando o sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) que ao esfriar forma cristais.

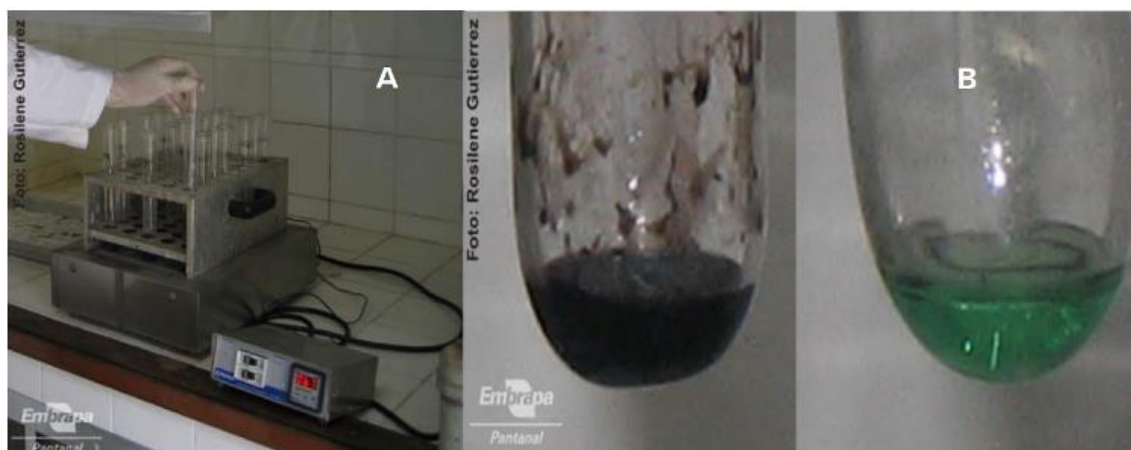


Em um tubo digestor foram pesados 700 mg (0,7 g) de terra fina macerada e passada em peneira de 80 mesh. Foram adicionados 15 mL da solução ácida de sulfatos ao tubo e procedeu-se a digestão em bloco digestor, no interior da capela de exaustão. A temperatura foi

controlada, inicialmente a 150⁰C por 30 minutos e ao longo da digestão elevou-se a temperatura a 50⁰C a cada 30 minutos até ter atingido 350⁰C, em aproximadamente 2 horas. Após a digestão, permitiu-se o esfriamento do sistema em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados ao tubo digestor 28 mL de água destilada e 3 gotas de solução xaroposa de cloreto férrico e agitou-se o tubo no vortex. Cabe ressaltar, a necessidade de realizar a análise do branco, sem adição de solo, para identificar a possível interferência causada pela presença de nitrogênio nos reagentes utilizados.

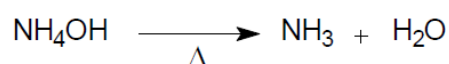
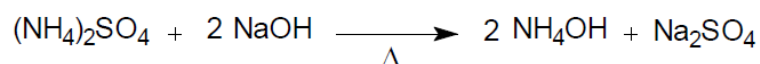
Durante o processo da digestão a solução passa de uma coloração escura para verde claro. Observou-se a reação de mineralização completa quando a solução passou de verde azulada clara para uma coloração mais escura e a parte sólida ficou branca (Figura 58).

Figura 58 - Digestão para determinação de N total(A) e mudança de coloração durante o processo (B)



Fonte: Lab. de Biorremediação e Fitotecnologias

Na segunda etapa ocorre a destilação na qual, por arraste de vapor, o sulfato de amônio é tratado com o hidróxido de sódio (NaOH) que, em excesso, permite a liberação de amônia, conforme abaixo. Ao reagir o hidróxido de sódio, a solução adquiriu uma coloração marrom mostrando que está neutralizada.



Durante a destilação a amônia se desprende na solução e foi coletada em um frasco contendo ácido bórico como indicador, previamente adaptado ao conjunto de destilação.

Considerou-se terminado o processo quando toda a amônia (NH_3) se despreendeu, conforme a reação abaixo. A solução contendo ácido bórico com o indicador misto, que no início apresentava com rosa adquire coloração azul à medida que foi se formando o borato de amônio (Figura 59).

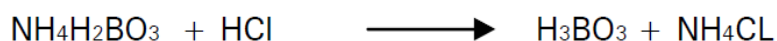


Figura 59 - Formação do borato de amônio



Fonte: Lab. de Biorremediação e Fitotecnologias

A última etapa da determinação de N corresponde à titulação, onde o borato de amônio foi titulado com uma solução padrão de ácido clorídrico de fator conhecido até a viragem do indicador, assumindo coloração rosada (coloração inicial).



O teor nitrogênio total (NT) foi determinado de acordo com a equação 12.

$$N (\text{gkg}^{-1}) = (A-B)/5 \quad (12)$$

Onde:

N = teor de nitrogênio total na amostra;

A = volume (mL) da solução de ácido clorídrico (HCl 0,01N) gasto na titulação da amostra;

B = volume (mL) da solução de ácido clorídrico gasto na titulação do branco.

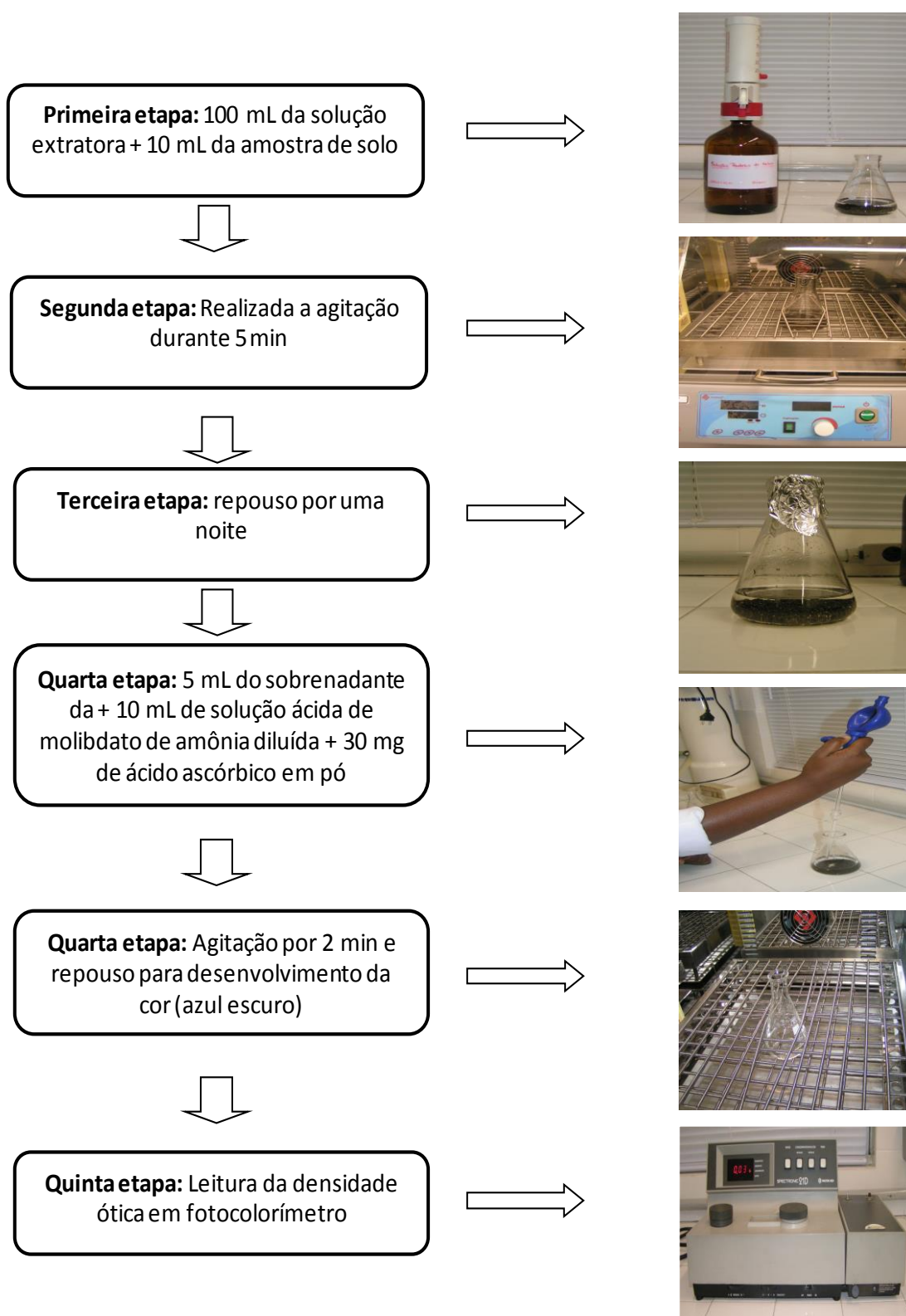
O nitrogênio total é a determinação do nitrogênio orgânico e amoniacal. O nitrogênio total é expresso em g. kg⁻¹.

3.3.5.4.4 Quantificação de fósforo assimilável

O teor de fósforo assimilável foi analisado segundo a metodologia descrita no Manual de Métodos de Análises Químicas para Avaliação da Fertilidade do Solo (EMBRAPA, 1998), cujas principais etapas encontram-se ilustradas na Figura 60.

Em Erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 100 mL da solução extratora duplo-ácida (HCl 0,05 mol L⁻¹ + H₂SO₄ 0,0125 mol L⁻¹) e 10 mL da amostra de solo a ser analisada. A mistura foi submetida à agitação em *shaker* (Quimis 816M20) durante 5 min. Após agitação, a solução foi deixada em repouso por uma noite para desfazer os montículos de solo que se formam no fundo dos erlenmeyers. Posteriormente, 5 mL do extrato foram adicionados a outro Erlenmeyer (125 mL), seguidamente de 10 mL de solução de molibdato de amônio e 30 mg de ácido ascórbico em pó (Vetec). A mistura foi agitada por 2 min em *shaker*, ficando em repouso por 1h para o desenvolvimento da cor azul escuro (complexo fosfomolibdico produzido pela redução do molibdato com ácido ascórbico). Após este período foi efetuada a leitura da densidade ótica em fotocolorímetro (Spectronic 21D – Milton Roy), no comprimento de onda de 660 nm do complexo. Para obtenção da concentração do analito em questão uma curva de concentração foi construída utilizando-se padrões de 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg e 5 mg de P₂O₅.

Figura 60 - Fluxograma da análise de fósforo assimilável



Fonte: Lab. de Biorremediação e Fitotecnologias

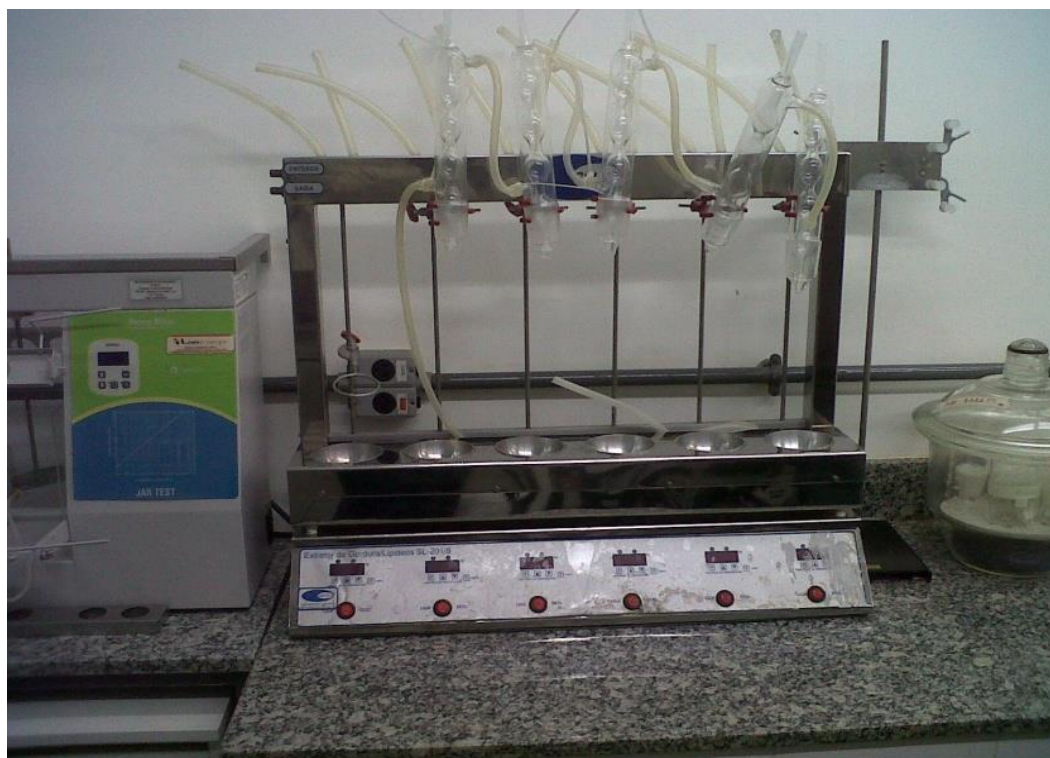
a) Extração

As extrações foram em triplicatas para cada solo, método e grupo de hidrocarbonetos. A cada amostra destinada à análise de HPA, foram adicionados 10 µl de HPA. A cada amostra destinada à análise de HTP, foram adicionados 10µl de HTP.

b) Extração com Soxhlet

A extração por Soxhlet (Figura 61) foi realizada utilizando 5 g da amostra de solo adicionando-se 5 g de sulfato de sódio. A mistura era então transferida para o cartucho de celulose acoplado à coluna de extração. Em balão de fundo redondo eram vertidos 180 mL de DCM e a extração era realizada por 16 h, em temperatura de 150° C. Após a extração, o extrato era acondicionado em um balão volumétrico de 100 mL colocado sob refrigeração até a realização da análise cromatográfica.

Figura 61 – Extratores do tipo *Soxhlet*



Fonte: Lab. de Biorremediação e Fitotecnologias

c) Extração por micro-ondas

O equipamento utilizado (Figura 62) para extração foi o CEM MARS *Xpress Microwave Reaction System* (CEM Corporation). A extração por MARS foi realizada com 5 g da amostra de solo através da adição de 5 g de sulfato de sódio. A mistura era vertida para um frasco de teflon do próprio equipamento sendo que 25 mL de DCM eram adicionados em cada frasco antes de colocá-los em ordem no carrossel localizado dentro da cavidade do forno de micro-ondas. A temperatura ia de 110 °C a 115 °C e a pressão de 50 a 150 psi com tempo de aquecimento de 10 a 20 min (tabela 13). Após a extração, o resfriamento ocorria em temperatura ambiente. Os frascos eram então abertos e o extrato filtrado em um papel de filtro com DCM para retirar todo o solo do frasco. O extrato era acondicionado em balão volumétrico de 100 mL e colocado em ambiente refrigerado até a realização da análise cromatográfica.

Figura 62 - Extrator do tipo micro-ondas



Fonte: Lab. de Biorremediação e Fitotecnologias

Tabela 13 - Condições de extração

Temperatura (°C)	100 – 115
Pressão (psi)	50 – 150
Tempo de aquecimento (min)	10 – 20
Resfriamento	Temperatura ambiente
Filtração/lavagem	Mesmo solvente usado na extração

d) Extração Acelerada por Solvente

A extração acelerada por solvente (*accelerated-solvent extraction-ASE*) utilizando-se o modelo de extrator acelerado 350 da Dionex foi realizada com 5 g da amostra de solo com adição de 5 g de sulfato de sódio. A mistura era vertida para o frasco de aço do próprio equipamento. A extração era realizada com uma mistura de DCM e Acetona (1:1) a 140 °C e 1500 psi de pressão durante 7 min de aquecimento seguidos de 5 min de extração estática. Os frascos eram rinsados com 17 mL da mistura de solventes e o extrato purgado por uma membrana de filtração da mesma marca do equipamento, utilizando-se N₂ pressurizado a 1550 psi. Todo o procedimento de extração durava aproximadamente 30 min. Após extração, o extrato era acondicionado em um balão volumétrico de 100 mL e colocado em ambiente refrigerado até a realização da análise cromatográfica.

3.3.5.4.5 Análises cromatográficas

As análises cromatográficas dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) foram realizadas em um CG Agilent, modelo 7890A acoplado a um espectrômetro de massas da mesma marca (modelo 5975C), com detector por ionização de chama (FID), equipado com uma coluna capilar Agilent modelo DB-1MS (30 m; 0,25 mm; 0,25 µm). O gás de arraste utilizado era o Hélio na vazão de 1 mL min⁻¹, sem divisão de fluxo. O volume de injeção era de 1,0 µL. A temperatura do injetor era de 290 °C. A quantificação das amostras foi realizada através de padronização externa, tendo como referência a metodologia da U.S. EPA 8000. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) foram analisados utilizando-se como referência o método 8015 da U.S. EPA. As análises foram realizadas no mesmo cromatógrafo

a gás acoplado ao espectrômetro de massas, com detector quadrupolo, equipado com coluna capilar marca Agilent modelo DB-5MS (30 m; 0,25 mm; 0,25 μm). O gás de arraste utilizado também foi o Hélio na mesma vazão de 1 mL min⁻¹, sem divisão de fluxo (splitless). A temperatura do injetor era de 290 °C. O volume de injeção foi de 1,0 μl . Os HPA foram determinados pelo monitoramento do íon seletivo.

3.3.5.4.6 Variáveis adicionais na comparação dos métodos

Para a escolha do melhor método de extração, além da (I) eficácia da extração e recuperação dos HTP e dos HPA foram analisadas outras variáveis nesta ordem de importância (II) consumo de solvente por extração; (III) consumo de água por extração; (IV) tempo de preparação e de extração por amostra. Foram determinadas notas de Foram determinadas notas de classificação sendo (1) ruim; (2) regular; (3) bom. Os seguintes pesos foram aplicados para cada variável: (1) menos relevante; (2) relevante; (3) muito relevante.

3.3.5.4.7 Análises estatísticas

Foi utilizado o teste paramétrico *one way* ANOVA seguido do teste de comparação de Tukey. O programa utilizado foi o GraphPad Prism versão 5.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Indicadores microbianos e avaliação do processo

4.1.1 Quantificação da geração de CO₂

A quantificação da geração de CO₂ pelos diferentes tratamentos permitiu avaliar os respectivos perfis de geração durante os 70 dias de monitoramento (Figura 63). Observa-se que a condição 11 (pH = 7,5; C:N:P = 100:1:0,5 e PME = 5%) foi a que apresentou a maior produção acumulada de CO₂ (57,75 mg 50g⁻¹) aos 70 dias de incubação. Baseado na quantidade total de CO₂ gerado para cada condição testada ao final do experimento e conseqüentemente, na estimativa de incorporação de carbono à biomassa produzida, calculou-se a eficiência de biodegradação, conforme descrito anteriormente (Equação 2). Este parâmetro foi utilizado como variável resposta (eficiência). Na Tabela 14 encontram-se os valores das eficiências de biodegradação (EB%) para as condições testadas.

Figura 63 - Produção de CO₂ em 70 dias em respirômetros de Bartha nos 17 tratamentos (1 a 17)

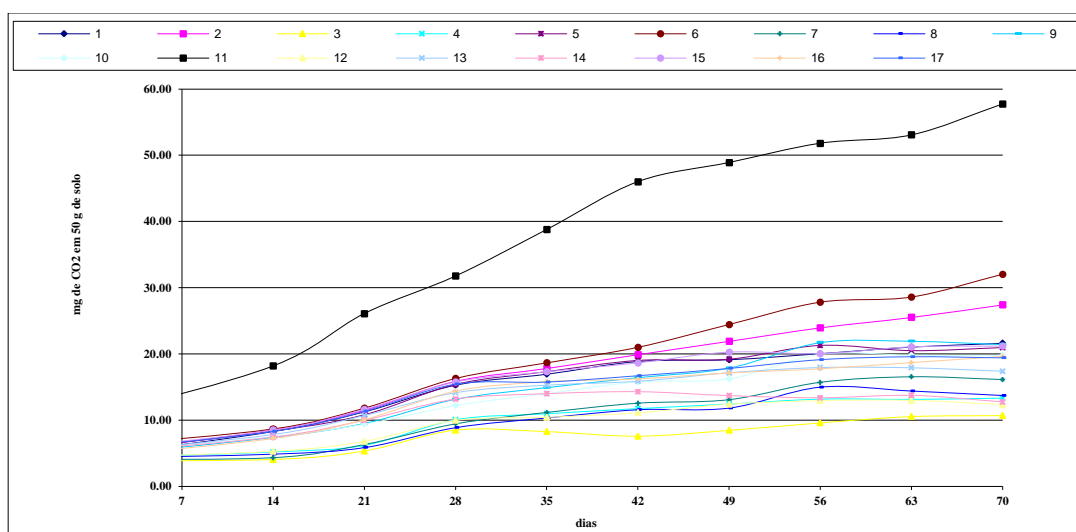


Tabela 14 - Matriz do Planejamento experimental e resposta eficiência da biodegradação (EB em %)⁴

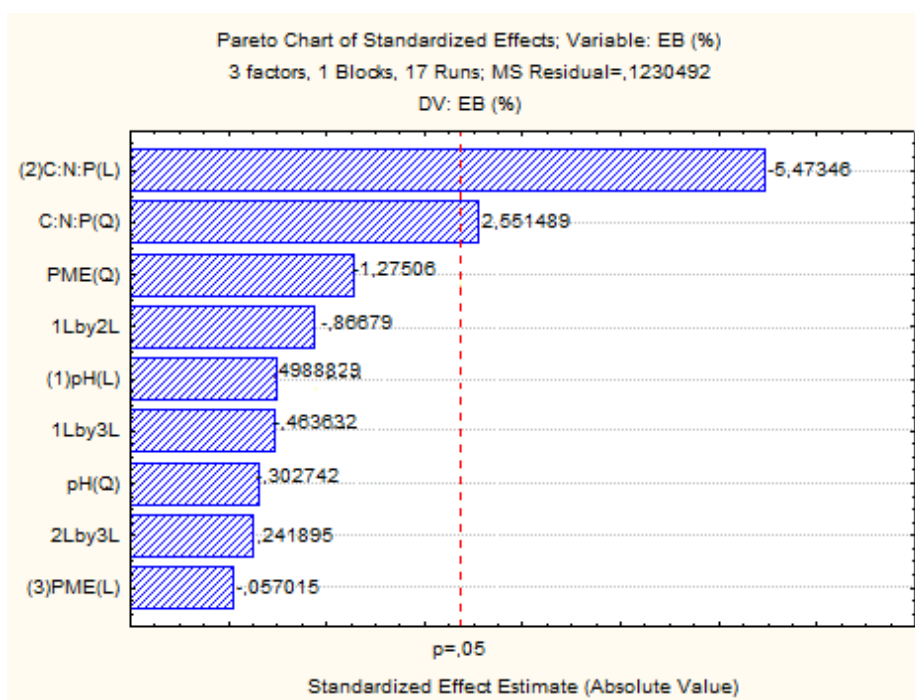
	Tratamentos	pH	C:N:P	PME	EB (%)*
Ensaio	1	-1	-1	-1	1,31 ± 0,09
	2	+1	-1	-1	1,71 ± 0,18
	3	-1	+1	-1	0,67 ± 0,06
	4	+1	+1	-1	1,02 ± 0,43
	5	-1	-1	+1	1,22 ± 0,02
	6	+1	-1	+1	1,77 ± 0,02
	7	-1	+1	+1	1,08 ± 0,10
	8	+1	+1	+1	0,82 ± 0,01
Pontos Axiais	9	-1,68	0	0	1,30 ± 0,05
	10	+1,68	0	0	1,13 ± 0,10
	11	0	-1,68	0	3,44 ± 0,10
	12	0	+1,68	0	0,81 ± 0,04
	13	0	0	-1,68	0,97 ± 0,02
	14	0	0	+1,68	0,84 ± 0,04
Pontos Centrais	15	0	0	0	1,26 ± 0,08
	16	0	0	0	1,38 ± 0,31
	17	0	0	0	1,20 ± 0,11

No Gráfico de Pareto, apresentado na Figura 64, o módulo do efeito ou influência das variáveis independentes sobre a eficiência de biodegradação (variável resposta), e algumas de suas interações são ordenadas em ordem crescente. De acordo com a Figura 72, apenas o ajuste de taxa nutricional (C:N:P) nos termos linear e quadrático apresenta um efeito significativo ($p=0,05$) na eficiência de biodegradação. Uma proporção adequada de C:N:P tem sido comumente relatada na literatura como essencial para a biodegradação de petróleo e derivados presentes no solo contaminado (TRINDADE, 2005).

Com intuito de verificar o efeito das combinações, e também de obter mais informações a respeito da identificação das melhores relações entre as variáveis independentes, os Gráficos de Superfície de Resposta (Figuras 65 e 66) foram construídos.

⁴ Nota :médias e desvios-padrão das eficiências de biodegradação obtidas pelas triplicatas.

Figura 64 - Variáveis 1 (pH); 2 (C:N:P) e 3 (PME). A linha tracejada: nível de significância $p=0,05$.



Nota-se na Figura 65 que os menores ajustes de nutrientes, combinados à ausência de material estruturante, resultaram em eficiência superior de biodegradação EB (acima de 2%). Combinações de taxa nutricional acima de 100:1:0,5 em torno de 100:2,5:0,65, associadas à proporções de material estruturante acima de zero e abaixo de 7%, apresentaram uma eficiência de biodegradação, entre 1,5 e 2%. A Figura 66 mostra pH versus C:N:P onde se observa que o pH na faixa estudada não teve relevância quando associado às taxas nutricionais estudadas. No entanto, é observado que a maior eficiência de biodegradação EB (%) ocorreu quando as taxas nutricionais estavam em torno de 100:1:0,5. Com base nos gráficos de superfície de resposta e, tendo em vista que as faixas de valores investigados para pH e taxas nutricionais C:N:P, conclui-se que para o solo arenoso em questão, somente a taxa nutricional teve influência significativa na determinação da eficiência da biodegradação do óleo cru.

Figura 65 - Superfície de resposta: (PME) versus taxa nutricional do solo (C:N:P)

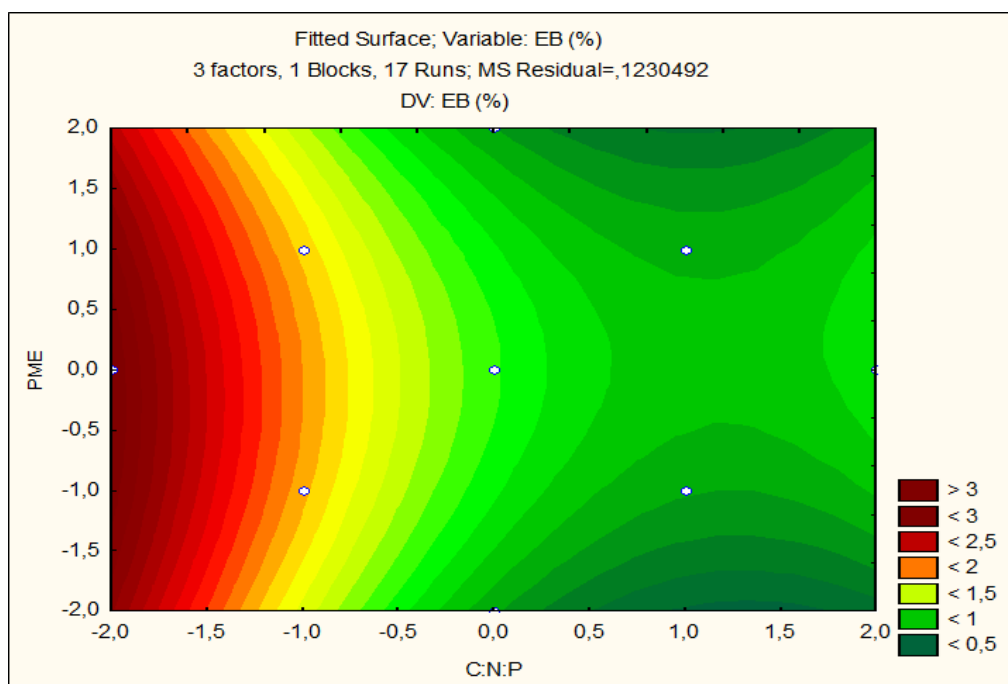
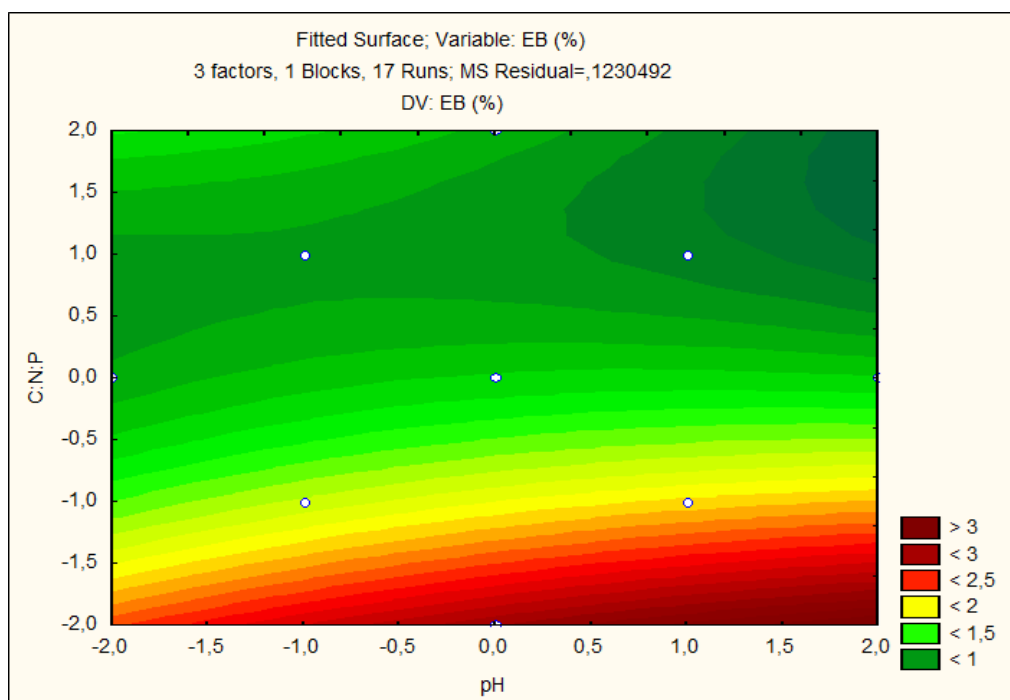


Figura 66 - Superfície de resposta: Taxa Nutricional (C:N:P) versus pH.

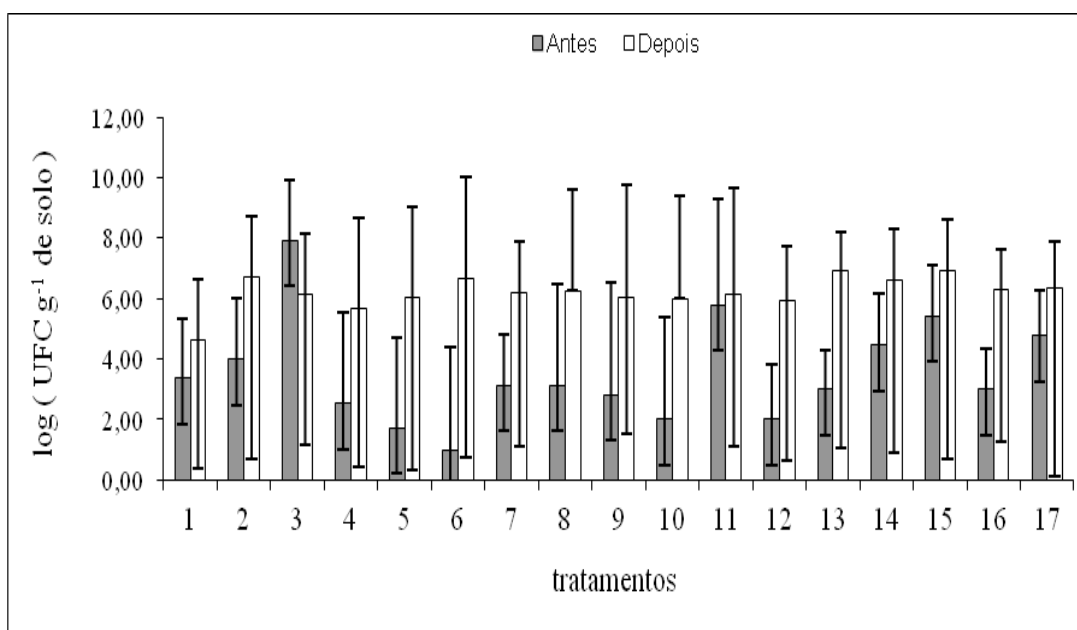


4.1.2 Quantificação de MHT

A Figura 67 apresenta as densidades microbianas heterotróficas totais nos diferentes tratamentos no início e ao final do experimento. As mesmas foram expressas em unidades

formadoras de colônia por grama de solo (UFC g⁻¹). Conforme ilustrado, no início do experimento, o tratamento 3 foi o que apresentou a maior população de microrganismos heterotróficos totais ($8,40 \times 10^7$ UFC g⁻¹ de solo) quando comparado aos demais tratamentos testados. No entanto, a diferença entre este e os demais tratamentos não foi significativa ($p < 0,05$), como resultado dos altos desvios-padrão. Cabe ressaltar que o tratamento 11, que apresentou a melhor eficiência de biodegradação (EB) e o tratamento 15 apresentaram populações de microrganismos heterotróficos totais em ordem de grandeza igual a 10^5 . Quando as populações heterotróficas totais no início e no final de cada tratamento são comparadas, todos os tratamentos resultaram em crescimento microbiano, com exceção do tratamento 3, que coincidentemente, foi o que apresentou a eficiência de degradação mais baixa dentre todos os tratamentos (Tabela 14). Ao final do experimento, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as densidades de microrganismos heterotróficos totais dos tratamentos testados.

Figura 67 - MHT nos diferentes tratamentos, no início e ao final do experimento em termos de UFC (n=3).



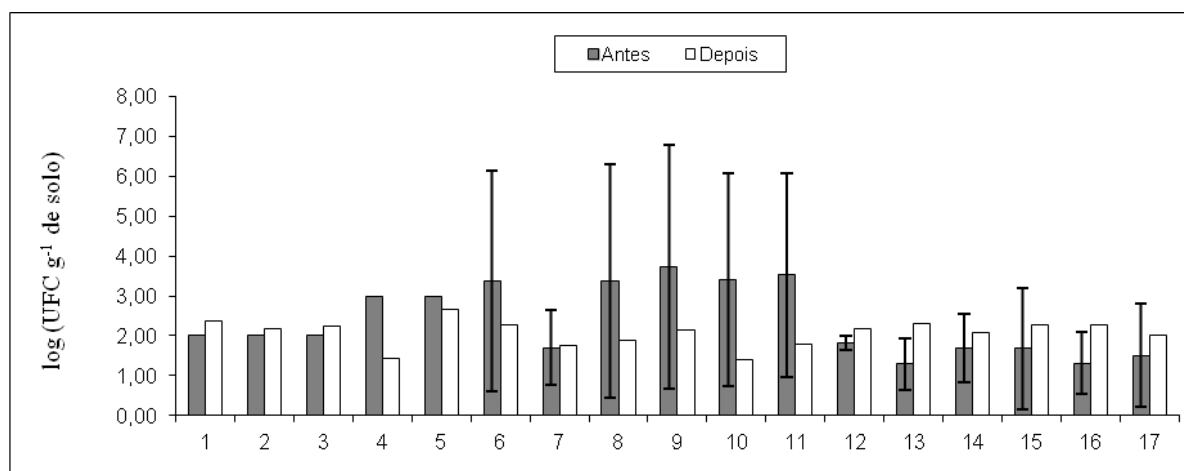
4.1.3 Quantificação da população de fungos

A Figura 68 mostra as quantificações da população de fungos nos diferentes tratamentos adotados no início e no final do experimento. Pode-se observar que o tratamento 11 (maior eficiência de degradação dentre todas as condições) apresentou população fúngica

na faixa superior, juntamente com as condições 6, 8, 9, 10, 11 (sendo as últimas três representando pontos axiais no planejamento experimental, Tabela 3).

Os tratamentos 1, 2, 3, 12, 13, 14, 15, 16 e 17 apresentaram aumento da densidade populacional de fungos ao longo dos 70 dias de estudo. Já os tratamentos 4, 5, 6, 8, 9, 10, e 11 apresentaram uma queda na densidade populacional de fungos, ainda que sem diferença significativa ($p < 0,05$). Tais tendências distintas na dinâmica de crescimento e decaimento da população fúngica sugerem que períodos menores do que os 70 dias teriam provavelmente sido mais apropriados para a observação de diferenças entre densidades populacionais de fungos nos diferentes tratamentos.

Figura 68 - População de fungos nos diferentes tratamentos: início e final dos experimentos (n=3).



4.1.4 Quantificação de MBP

A Figura 69 apresenta as quantificações de microrganismos degradadores de óleo cru nos diferentes tratamentos no início e ao final do experimento. As mesmas foram expressas em números mais prováveis por grama de solo (NMP g⁻¹ de solo). O tratamento 11 que apresentou a maior EB (%) foi também a que apresentou a maior população de microrganismos degradadores de óleo cru ($1,10 \times 10^6$ NMP g⁻¹ de solo) tanto no início quanto no final do experimento. O tratamento 3 que teve a menor EB (%) foi também a que apresentou as menores populações de MBP no início e no fim. A comparação dos diferentes indicadores populacionais microbianos sugere que os MBP (Figura 69) são os mais indicados para refletir o metabolismo aeróbio em curso em solo contaminado por óleo cru, seguido da

população fúngica (Figura 68). A Figura 70 resume os dados sobre EB e MBP. O tratamento 11 (pH = 7,5; C:N:P = 100:1:0,5 e PME = 5%) apresentou a maior eficiência de biodegradação (3,4%) de matéria orgânica, a maior população de microrganismos degradadores de óleo cru ($1,1 \times 10^6$ NMP g^{-1} de solo). Com base na Figura 68, foi o tratamento que também apresentou a maior densidade aparente de fungos ($3,3 \times 10^3$ UFC g^{-1} de solo).

Figura 69 - Monitoramento da população de MDP nas condições testadas

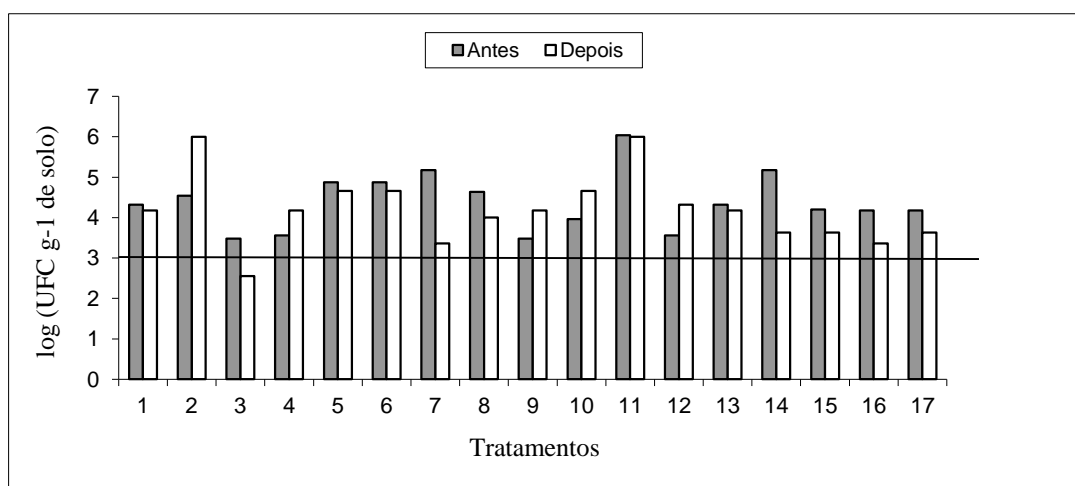
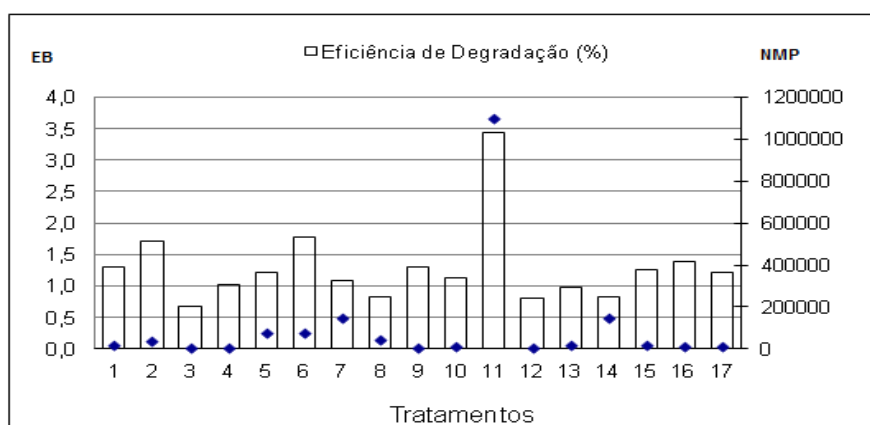


Figura 70 - EB(%) versus quantificação de microrganismos degradadores de petróleo-MDP (NMP g-1 solo)



4.1.5 Discussão

A utilização do método respirométrico para distinção da eficiência de diferentes tratamentos na degradação de compostos orgânicos em solos contaminados por petróleo mostrou-se bastante útil como abordagem preliminar laboratorial para, em curto espaço de

tempo, determinar os melhores níveis a serem alcançados e a variáveis importantes em ações de biorremediação em escala de campo.

Dentre os indicadores da população microbiológica, a contagem dos microrganismos degradadores de petróleo-MDP (em NMP/g solo) foi mais adequada do que a contagem de microrganismos heterotróficos totais e população fúngica, quando o objetivo é refletir o avanço da biodegradação dos hidrocarbonetos presentes no solo.

4.2 Estudo Comparativo de Técnicas de Extração de HTP e HPA

4.2.1 Extração de HTP por Soxhlet, MARS e ASE

4.2.1.1 Solo argiloso: extração de HTP

A Tabela 15 apresenta os valores (mgKg^{-1}) encontrados para n-alcenos, hidrocarbonetos resolvidos de petróleo (HRP), mistura complexa não resolvida (MCNR) e hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP).

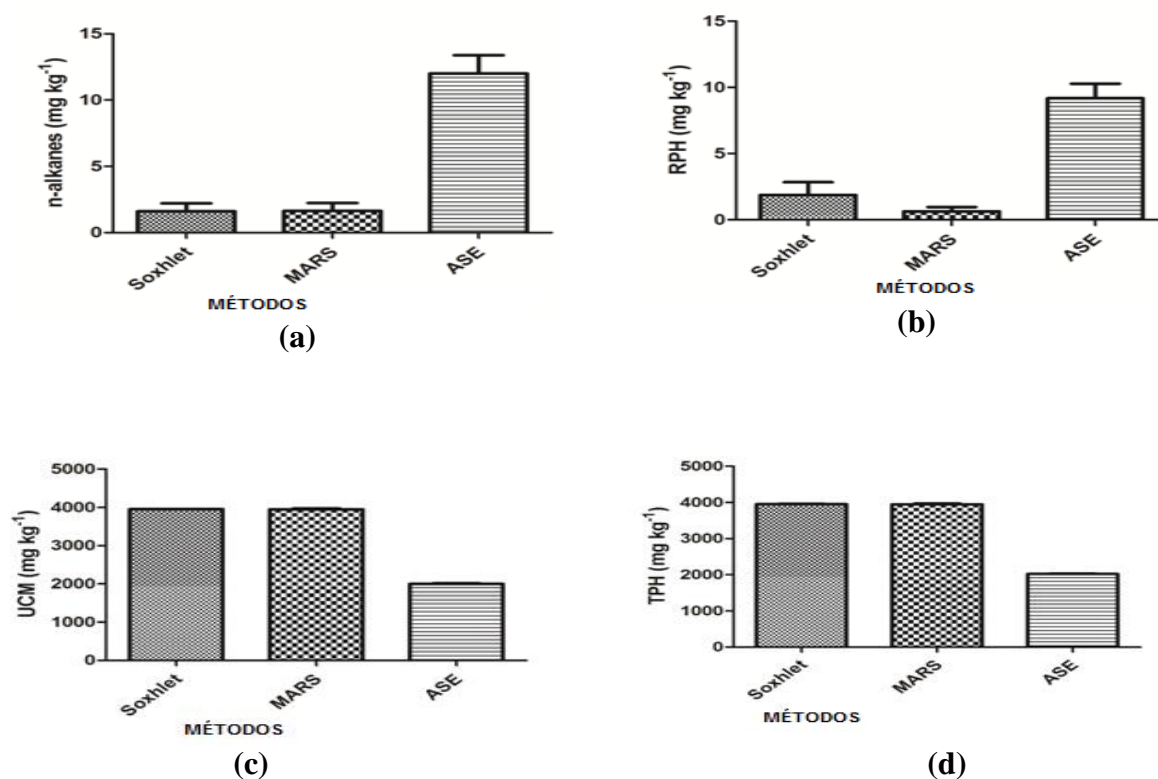
Tabela 15 - Médias e desvio padrão para n-alcenos, HRP, MCNR e HTP - solo argiloso - contaminação antiga ⁵

Compostos	Soxhlet	MARS	ASE
n- alcanos	1,58 ± 0,58(b)	1,6 ± 0,6(b)	12,4 ± 1,7(a)
HRP	1,87 ± 0,93(b)	0,7 ± 0,3(b)	8,9 ± 1,4(a)
MCNR	3946,26 ± 7,31(a)	3941,9 ± 23,4(a)	1992,3 ± 17,8(b)
HTP	3949,71 ± 6,64(a)	3944,2 ± 22,8(a)	2013,6 ± 17,5(b)

No solo argiloso com contaminação antiga, os resultados da extração por Soxhlet e pelo MARS não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 15), mas os resultados foram significativamente diferentes comparados aos obtidos com ASE ($p < 0,0001$). A Figura 71 apresenta média e desvio padrão dos teores extraídos do solo argiloso.

⁵ Nota: Valores com letras iguais não apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$). Valores em negrito, melhores resultados em termos de eficiência de extração para cada grupo de compostos.

Figura 71 - Média e desvio padrão dos teores extraídos do solo argiloso



Legenda: (a) - n-alcenos; (b) - HRP; (c) - MCNR ; (d) - HTP-Extração pelos três métodos.

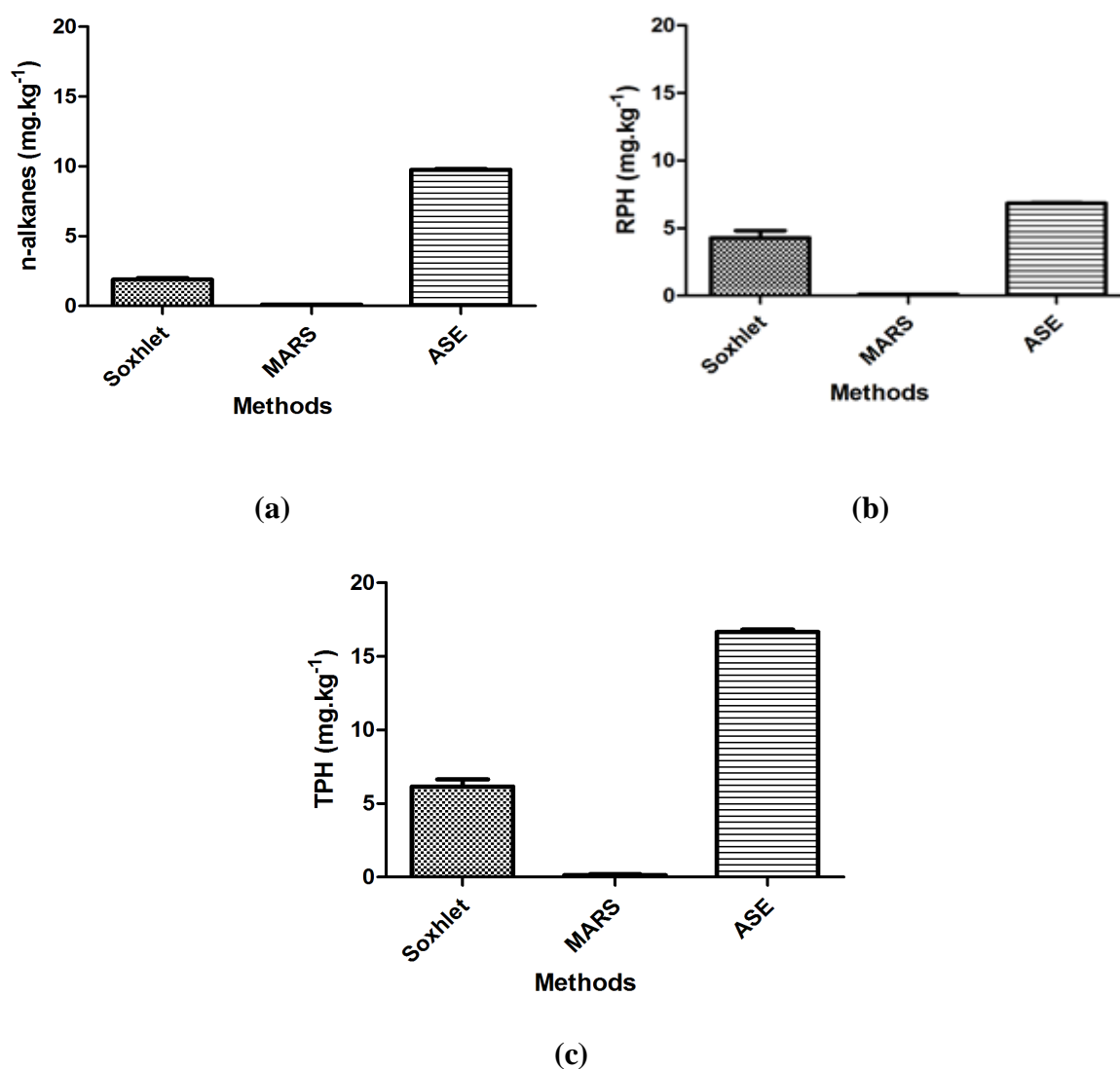
4.2.1.2 Solo arenoso: extração de HTP

A Tabela 16 apresenta os valores de n-alcenos, HRP, MCNR e HTP para o solo arenoso com histórico de contaminação (oriundo de Seropédica). No tocante ao solo arenoso, todas as técnicas de extração resultaram em diferenças significativas nos teores de n-alcenos, HRP e HTP ($p < 0.05$). Entretanto, para MCNR não foi observada diferenças entre os métodos, tendo em vista que os teores de MCNR estavam abaixo dos limites de detecção nos três procedimentos. A Figura 72 apresenta as médias e desvios padrão para solo arenoso.

Tabela 16 - Médias e desvio padrão n-alcenos, HRP, MCNR e HTP para solo arenoso⁶

Compostos	Soxhlet	MARS	ASE
n- alcanos	1.90 ± 0.11(a)	0.10 ± 0.01(b)	9.75 ± 0.01(c)
HRP	4.30 ± 0.55(a)	0.10 ± 0.00(b)	6.80 ± 0.08(c)
MCNR	< LD (a)	< LD (a)	< LD (a)
HTP	6.15 ± 0.46(a)	0.14 ± 0.01(b)	16.70 ± 0.18(c)

Figura 72 – Valores extraídos do solo arenoso a partir da extração pelos três métodos estudados (Soxhlet; extração por micro-ondas MARS; extração acelerada com ASE).



⁶ Nota: Valores com letras iguais não apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$). Valores em negrito, melhores resultados em termos de eficiência de extração para cada grupo de compostos

4.2.1.3 Conclusão sobre extração de HTP

A extração através do ASE foi a que apresentou uma maior recuperação dos n-alcenos, tanto para o solo argiloso quanto para o arenoso. Para o solo argiloso, o Soxhlet e o MARS apresentaram melhor recuperação para as frações mais pesadas, refletido na recuperação superior de MCNR. Tais resultados sugerem que os métodos que promovem melhor extração de compostos pesados presentes no solo argiloso (Soxhlet e micro-ondas), provavelmente promovem perdas dos compostos mais leves, motivo da baixa concentração dos n-alcenos no extrato final. É sabido que o solo argiloso possui uma capacidade de adsorção maior dos contaminantes mais pesados, dificultando tanto a biodisponibilização (SILVA, 2010; MARIANO, 2006), quanto extração dos mesmos que, por essa razão, permanecem no solo por mais tempo (KRIIPSALU *et al.*, 2007).

4.2.2 Extração de HPA com Soxhlet, MARS e ASE

4.2.2.1 Solo argiloso: extração de HPA

A Tabela 17 apresenta os valores encontrados para os 16 HPA no solo argiloso.

Tabela 17 - Médias e desvio padrão dos HPA extraídos do solo argiloso⁷

Compostos (nº de anéis)	Soxhlet	MARS	ASE
Naftaleno (2)	< LD	< LD	< LD
Acenaftileno (3)	0.01 ± 0.02	< LD	< LD
Acenafteno (3)	< LD	< LD	< LD
Fluoreno (3)	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00
Fenantreno (3)	< LD	< LD	< LD
Antraceno (3)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Fluoranteno (4)	< LD	< LD	0.00 ± 0.01
Pireno (4)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01
Benzo(a)antraceno (4)	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Criseno (4)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.01
Benzo(b)fluoranteno (5)	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Benzo(k)fluoranteno (5)	0.00 ± 0.01	0.01 ± 0.00	< LD
Benzo(a)pireno (5)	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Indeno(1,2,3-cd)pireno (6)	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Dibenzo(a,h)antraceno (6)	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Benzo (g,h,i)perileno (6)	0.05 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00
Total	0,46 ± 0.06(a)	0.33 ± 0.01(b)	0,29 ± 0.04(b)

⁷ Nota: Valores com letras iguais não apresentam diferenças significativas (p<0,05). Valores em negrito, melhores resultados em termos de eficiência de extração para cada grupo de compostos.

Com relação aos HPA em solo argiloso (Tabela 17), não houve diferença significativa entre os teores extraídos por MARS e ASE ($p < 0.05$). No entanto, ambos diferiram dos teores obtidos com Soxhlet.

4.2.2.2 Solo arenoso: extração de HPA

A Tabela 18 apresenta os valores dos HPA encontrados no solo arenoso nas extrações por Soxhlet, MARS e ASE.

Tabela 18 - Médias e desvio padrão de HPA extraídos de solo arenoso⁸

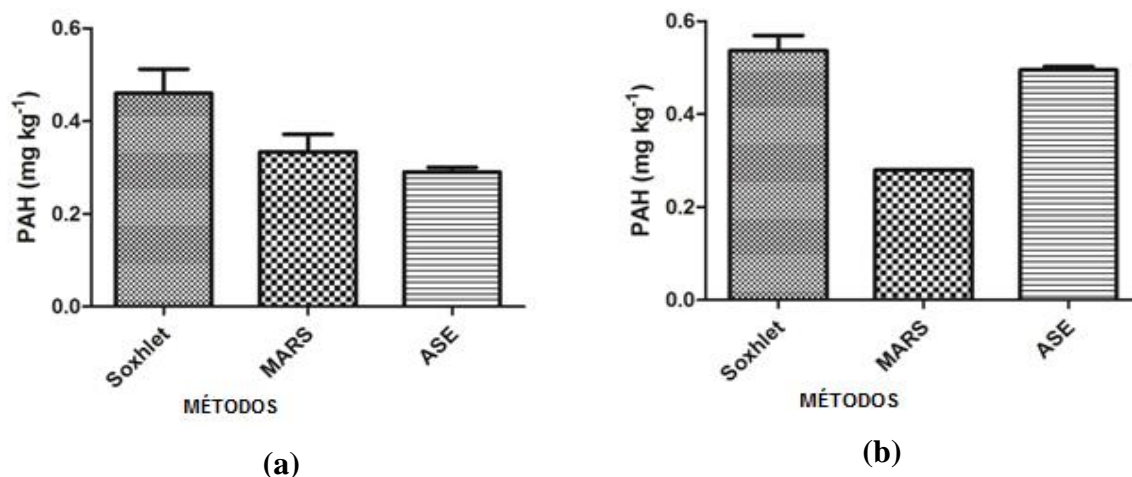
Compostos (nº de anéis)	Soxhlet	MARS	ASE
Naftaleno (2)	< LD	< LD	< LD
Acenaftileno (3)	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00
Acenafteno (3)	< LD	< LD	< LD
Fluoreno (3)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Fenantreno (3)	< LD	< LD	< LD
Antraceno (3)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Fluoranteno (4)	< LD	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01
Pireno (4)	0.01 ± 0.00	< LD	0.01 ± 0.01
Benzo(a)antraceno (4)	0.07 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Criseno (4)	0.07 ± 0.00	< LD	0.01 ± 0.01
Benzo(b)fluoranteno (5)	0.09 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Benzo(k)fluoranteno (5)	0.10 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Benzo(a)pireno (5)	0.09 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Indeno(1,2,3-cd)pireno (6)	0.06 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00
Dibenzo(a,h)antraceno (6)	0.15 ± 0.01	0.09 ± 0.00	0.11 ± 0.00
Benzo (g,h,i)perileno (6)	0.07 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.00
Total	0.54 ± 0.03(a)	0.28 ± 0.00(b)	0,49 ± 0.01(a)

Os teores de HPA extraídos com Soxhlet e ASE a partir de solo arenoso foram estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$) e estes, por sua vez, foram significativamente diferentes (superiores) aos teores obtidos com micro-ondas (MARS) (Tabela 18).

⁸ Nota: Valores com letras iguais não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$). Valores em negrito, melhores resultados em termos de eficiência de extração para cada grupo de compostos

A Figura 73 mostra os teores extraídos por cada uma das técnicas investigadas, tanto de solo argiloso quanto arenoso.

Figura 73 – Médias e desvios-padrão dos teores de HPA extraídos de (a) solo argiloso e de (b) solo arenoso pelos métodos soxhlet, MARS e ASE



4.2.2.3 Variáveis adicionais consideradas

O conjunto de variáveis consideradas com uma escala simples selecionada para decisão sobre o melhor método de extração é apresentado na Tabela 19. As diferenças inerentes à aplicação de cada método (temperatura, pressão, o modo de contato com a amostra, dentre outros) fazem com que uma direta comparação entre os métodos não seja possível (WANG et al., 2007). No entanto, a eficiência na recuperação dos compostos de interesse pode ser considerada a variável de maior peso no momento da escolha, sendo as variáveis referentes ao impacto ambiental (consumo de solvente e água) as variáveis com peso médio e o tempo gasto em todo o processo, a variável de peso relativamente menor. Assim, se a eficácia da extração for o único fator, a seleção será baseada nas notas de maior valor apresentadas nas linhas (a) para solo argiloso e (b) para solo arenoso da Tabela 19. Se for baseada na variável eficácia de extração em conjunto com os impactos ambientais, os métodos de maior pontuação nas linhas g e h seriam escolhidos. Se a decisão incluir além destas, a variável tempo consumido, os métodos que obtiveram as maiores notas encontradas nas linhas g e h serão os escolhidos.

Saim *et al.* (1997) comparando outras variáveis, tais como custo do equipamento, além de eficácia de extração, consumo de solvente e tempo de extração, observaram que para cada variável, uma técnica diferente se destacava. Utilizando esse ponto de vista, no nosso estudo, o menor custo seria obtido com o Soxhlet, menor uso de solvente com o ASE e menor tempo de extração, com o MARS. Berset *et al.* (1999) ressaltaram que o consumo de solvente é um importante parâmetro no que tange custos econômicos e ambientais. Wang *et al.* (2007), comparando a extração por Soxhlet, MARS e ASE para HPA em solo com diferentes teores de matéria orgânica e contaminação recente, observaram que a técnica baseada no ASE apresentou melhor eficiência e que as extrações por Soxhlet e MARS eram comparáveis. Saim *et al.* (1997), comparando diferentes técnicas de extração (Soxhlet, extração por micro-ondas-MARS, extração por fluido supercrítico-SFE e extração acelerada por solvente-ASE), notaram que para todos os HPA, exceto Benzo(b)fluoranteno, a extração com ASE foi inferior à obtida com o Soxhlet. No presente estudo, o Soxhlet foi superior ao ASE e mais superior ainda ao MARS particularmente para os HPA de 4 a 6 anéis aromáticos. Berset *et al.* (1999), confrontaram a eficácia de métodos distintos (Soxhlet, ASE, SFE e mesa agitadora) para extração para HPA, no entanto, não especificando o tipo do solo, e observaram que ASE e SFE mostraram melhores resultados em relação aos outros métodos clássicos estudados.

Tabela 19 - Classificação das variáveis (valor x peso) para a escolha da melhor técnica

Variável		Nota conferida a cada variável e método de extração					
Eficácia da extração		Extração p/ HTP			Extração p/ HPA		
		Soxhlet	MARS	ASE	Soxhlet	MARS	ASE
Solo argiloso	n-alcanos	1	1	3	3	2	2
	HTP	3	3	2			
Solo arenoso	n-alcanos	2	1	3	3	2	3
	HTP	2	1	3			
Efic. global solo arg.	a	4	4	5	3	2	2
Efic. global solo are.	b	4	2	6	3	2	3
Consumo solvente	c	1	3	2	1	3	2
Consumo de água	d	1	3	2	1	3	2
Tempo de extração	e	1	3	2	1	3	2
Tempo preparação	f	2	3	1	2	3	1
Nota global:							
(a) Solo argiloso	$g=(a+c+d+e+f)$	9	16	12	8	14	9
(b) Solo arenoso	$h=(b+c+d+e+f)$	9	14	13	8	14	10

Valor: 1 = ruim; 2 = médio; 3 = bom.

4.2.2.4 Discussão

A extração de HTP e HPA a partir de solos arenoso e argiloso com histórico de contaminação antiga (mais de dois anos) por hidrocarbonetos de petróleo, utilizando três métodos selecionados (Soxhlet, MARS e ASE) foi realizada, comparando-se a eficiência da extração de diferentes frações de HTP (n-alcenos, HRP, MCNR) e 16 HPA. Além da variável eficiência de extração, outros fatores, tais como consumo de solvente, de água e de tempo para preparo e extração, foram considerados para avaliação comparativa dos métodos. Os resultados mostraram que com base na eficácia de extração, o melhor método depende da classe textural de solo e do grupo de compostos de interesse. Assim, para HTP em solo argiloso, o ASE foi o que apresentou melhores resultados para n-alcenos e para a fração HRP. No entanto, para a fração MCNR, o Soxhlet e MARS foram superiores e comparáveis entre si, promovendo inclusive, perdas dos compostos mais leves.

No solo arenoso, o ASE foi o método que apresentou o melhor resultado tanto para n-alcenos quanto para HRP e MCNR. Portanto, com base na eficácia da extração, o ASE foi de maneira geral, superior aos outros dois métodos para análise de HTP e o que melhor recupera n-alcenos e HRP. No caso dos HPA, a extração por Soxhlet foi a que apresentou o melhor resultado, tanto em solo argiloso quanto arenoso.

O método MARS, seguido do ASE apresentam os menores consumos de solvente e de tempo de extração comparando com a extração por Soxhlet. O ASE requer um trabalho mais demorado de preparação comparado com os outros métodos. Assim, quando fatores tais como economia de solvente, água e tempo são relevantes, o MARS é o método mais atraente, particularmente quando o HTP é o grupo de interesse e os n-alcenos de baixo peso não são os compostos em foco. Dessa forma, em contaminações antigas, a classe textural do solo e a fração de hidrocarbonetos de interesse devem ser consideradas para a escolha do método mais adequado de extração.

4.3 Biorremediação de solo argiloso: biopilha dinâmica e estática

4.3.1 Caracterização do solo em estudo

A Tabela 20 apresenta a caracterização biológica, física e química do solo original antes da contaminação e início dos tratamentos.

Tabela 20 - Caracterização do solo original utilizado no experimento⁹

Composição granulométrica da terra fina dispersão com NaOH /calgon (g Kg ⁻¹)	Areia 2-0,05 mm	414
	Silte 0,05-0,002 mm	286
	Argila <0,002 mm	300
Densidade (g cm ⁻³)	Solo	1,21
	Partículas	2,56
Porosidade total (%)		52,73
Capacidade de campo (%)		28,48
pH (1:2,5)	Água	5,4
	KCl (1N)	4,8
Complexo Sortivo (cmol _c kg ⁻¹)	Ca ²⁺	7,2
	Mg ²⁺	1,5
	K ⁺	0,17
	Na ⁺	0,96
	Valor S (soma)	9,8
	Al ³⁺	0,00
	H ⁺	2,60
	Valor T (soma)	12,4
	Valor V (saturação de base)	79
	Nutrientes:	
Matéria Orgânica (g kg ⁻¹)		83,2
Carbono Orgânico (g kg ⁻¹)		41,6
Nitrogênio total (g kg ⁻¹)		1,8
Fósforo assimilável (g kg ⁻¹)		8,0
Metais tóxicos (mg kg ⁻¹):		
Cr		2,54
Co		1,45
Ni		1,95
Cd		0,10
Pb		10,80
Hidrocarboneto total do petróleo (mg kg ⁻¹)		1119,00
Hidrocarboneto policíclico aromático (mg kg ⁻¹)		2,69
População heterotrófica total (UFC g ⁻¹)		4,45 x 10 ⁶
População de fungos (UFC g ⁻¹)		1,5 x 10 ²
População de microrganismos degradadores de óleo (NMP g ⁻¹)		1,00 x 10 ⁶
Teste de mortalidade (<i>E. andrei</i> duração do teste 56 dias)		0%

O solo em estudo apresentou uma proporção granulométrica de 41% de areia, 29% de silte e 30% de argila. Utilizando o triângulo das classes texturais do solo (ABNT, 1989) para os dados granulométricos citados acima, concluiu-se que o solo é classificado como franco argiloso médio (35% < argila < 60%). Cabe ressaltar que uma característica marcante do solo franco é a presença acentuada de matéria orgânica, o que aumenta a capacidade da

⁹ Notas: Valor S (S) = Soma de bases trocáveis (Ca+2, Mg+2, K+1, Na+1); Valor T = Soma das bases trocáveis mais a acidez potencial (S + H+ + Al3+).

disponibilidade de água no solo (Soil Quality Information Sheet, 2012). Essa textura e característica têm aspectos relevantes que interferem nas atividades química e microbiológica do solo.

O pH do solo do presente estudo apresentou-se moderadamente ácido (5,4 em água e 4,8 em KCl) estando ambos os valores abaixo da faixa ótima de pH relatada na literatura para processos de biorremediação (6,5 a 8,5) (SARKAR *et al.*, 2005).

De acordo com a Tabela 20, a capacidade de troca catiônica (CTC) ou valor T do solo *em estudo* sugere argila de baixa atividade ($T < 27 \text{ cmolc kg}^{-1}$). Esse resultado indica que, em condições naturais ácidas, tal solo apresenta baixa capacidade para reter cátions. Segundo Chagas-Spinelli (2007), altas concentrações de argila de baixa atividade resultam em uma CTC semelhante à de solos arenosos. Cabe mencionar que a capacidade de troca catiônica indica uma intensa lixiviação dos cátions Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^{+} e Na^{+} trocáveis, indicando que este solo possui baixa fertilidade e elevado grau de intemperismo (MEURER, 2004).

A taxa nutricional C:N:P do solo original apresentou-se em torno de 100:4,32:19,2. Tal relação foi calculada a partir dos resultados de carbono orgânico, nitrogênio e fósforo assimilável, que foram respectivamente de: $41,6 \text{ g kg}^{-1}$, $1,8 \text{ g kg}^{-1}$ e 8 mg kg^{-1} . A faixa recomendada pela EPA (1994) de Carbono, Nitrogênio e Fósforo para manter um crescimento microbiano adequado e manter o processo de biodegradação do solo contaminado varia de 100:10:1 a 100:1:0,5. A Tabela 21 mostra os valores para determinados metais tóxicos no solo original. Todos os metais tóxicos analisados estavam abaixo do limite recomendado para os mesmos na Resolução Conama N° 420 (CONAMA, 2009). A quantificação de hidrocarbonetos totais de petróleo no solo *in natura* é de 1119 mg kg^{-1} . A Resolução CONAMA N° 420/09 (CONAMA, 2009) não apresenta valores orientadores para HTP. No entanto, Ferreira (2010) destaca que na Lista Holandesa os valores de HPT no solo referenciados variam de 50 (valor de solo limpo) a 5000 (valor de solo para intervenção). Na Lista de Berlim, os valores variam de 300 a 5000 mg kg^{-1} , dependendo da sensibilidade do local (SEABRA, 2005). Segundo tais referências, o solo em estudo encontra-se na faixa de intervenção. A quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos HPA no solo *in natura* foi de $2,69 \text{ mg kg}^{-1}$. A Tabela 21 apresenta os valores observados no solo em estudo e os valores orientadores da Resolução CONAMA No. 420, do *Canadian Soil Quality Guidelines* (2008) e da Lista Holandesa para os 16 HPA prioritários da EPA.

Tabela 21 - HPA em mg kg⁻¹ solo original e valores orientadores órgãos ambientais¹⁰

Composto (Nº de anéis aromáticos)	Solo Original	Conama 420 (2009)	Canaden se (2008)	Holandes a (2010)
Naftaleno (2)	0,20	0,12	0,14	*
Acenaftileno (3)	<0,10	**	**	*
Acenafteno (3)	<0,10	**	**	*
Fluoreno (3)	nd	**	**	*
Fenantreno (3)	<0,10	3,3	0,51	*
Antraceno (3)	<0,10	0,039	0,12	*
Fluoranteno (4)	<0,10	**	**	*
Pireno (4)	0,11	**	**	*
Benzo(a)antraceno (4)	<0,10	0,025	0,25	*
Criseno (4)	0,70	8,1	10,7	*
Benzo(b)fluoranteno (5)	nd	**	**	*
Benzo(k)fluoranteno (5)	nd	0,38	2,4	*
Benzo(a)pireno (5)	nd	0,052	0,26	*
Indeno(1,2,3-cd)pireno (6)	0,35	0,031	**	
Dibenzo(a,h)antraceno (6)	0,33	0,08	**	
Benzo (g,h,i)perileno (6)	0,93	0,57	7,5	
Soma	2,64	-	-	*40

Alguns HPA estavam presentes em concentrações superiores aos preconizados tanto na Resolução CONAMA N°420, quanto na Norma Canadense. Esse fato sugere que a qualidade do solo em estudo possa estar inadequada para a biota. Segundo U.S. EPA (1994), para que a biodegradação nos reatores seja efetiva, a quantificação mínima de microrganismos heterotróficos no solo deve ser 10³ UFC g⁻¹. O solo *em estudo* original apresentou condições iniciais bastante satisfatórias ao processo de biorremediação.

Na avaliação da toxicidade foi constatada mortalidade de *E. andrei* ao logo de 56 dias, período necessário para o ciclo reprodutivo da minhoca, realizando leitura quanto à mortalidade e reprodução (número de ovos e juvenis aos 14, 28, 42 e 56 dias). Não foi observado mortalidade no solo em estudo, no entanto, foi observado ao longo do teste um decaimento na biomassa. Segundo Roberts e Dorough (1984), a perda de peso corporal é um bom indicador de efeitos subletais. Porém, alguns fatores causam estresse nos indivíduos durante o ensaio, por exemplo, repetidos ajustes de umidade (SATERBAK *et al.*, 2000). No entanto, ao longo do teste, não foi observado presença de ovos não eclodidos. Eom *et al.* (2007) utilizaram teste similar em uma área industrial de carvoaria desativada a 30 anos, com

¹⁰ Não possuem valores de referência na norma; LD = Limite de detecção do método.

altas concentrações de HPA e observaram que na mais alta concentração de HPA (40%) a quantidade de ovos foi reduzida em 70 % em relação ao controle, mas a sobrevivência não foi afetada.

Caracterização dos tratamentos no início do experimento ($t_0 = 0$ dia)

A caracterização física, química e biológica do solo contaminado no início do experimento ($t_0 =$ dia) representado pela média das triplicatas (Tabela 22).

Tabela 22 - Caracterização do solo recém-contaminado no início do experimento

Parâmetros	0 dia (microcosmos e reatores)		
	CONT	BIOS	BIOA
C (g kg^{-1})	35,75	29,56	27,10
N (g kg^{-1})	3,33	3,01	2,8
P (mg kg^{-1})	1,67	1,43	1,32
pH (em H_2O)	7,3	7,6	7,4
HPA (mg kg^{-1})	2,69	3,99	5,16
HTP (mg kg^{-1})	1119	2762	2791
Umidade (%)	14,3	14,6	14,2
Capacidade de Campo (%)	28	30	29
Densidade do solo (g cm^{-3})	1,17	1,14	1,09
PHT (UFC g^{-1})	$5,7 \times 10^6$	$6,3 \times 10^5$	$7,2 \times 10^8$
PF (UFC g^{-1})	$3,20 \times 10^4$	$1,69 \times 10^3$	$1,60 \times 10^3$
PDO (NMP g^{-1})	$1,10 \times 10^5$	$4,3 \times 10^3$	$4,6 \times 10^4$
Teste de mortalidade <i>E. andrei</i> , 14 dias (%)	3,3	23,3	100,0
Teste de mortalidade <i>E. andrei</i> , 28 dias (%)	3,3	80,0	100,0
Teste de mortalidade <i>E. andrei</i> , 42 dias (%)	3,3	100,0	100,0
Teste de mortalidade <i>E. andrei</i> , 56 dias (%)	3,3	100,0	100,0

As taxas nutricionais e pH iniciais estão com valores aproximados do pré-estabelecido em estudos anteriores, C:N:P (100:1:0,5) e pH = 7,5. Na Tabela 22 pode-se ainda observar que, ao início do experimento, os valores dos HTP nos tratamentos (BIOS e BIOA) apresentam valores de alerta (T) e os valores de intervenção (I) indicados na Lista Holandesa. Os valores dos 16 HPA prioritários nos tratamentos BIOS e BIOA estavam abaixo dos valores relacionados na Lista Holandesa, porém em ambos os tratamentos alguns compostos aromáticos apresentam valores acima da Resolução COMANA N^o 420 e da Lista Canadense.

4.3.2 Indicadores microbiológicos ao longo dos tratamentos

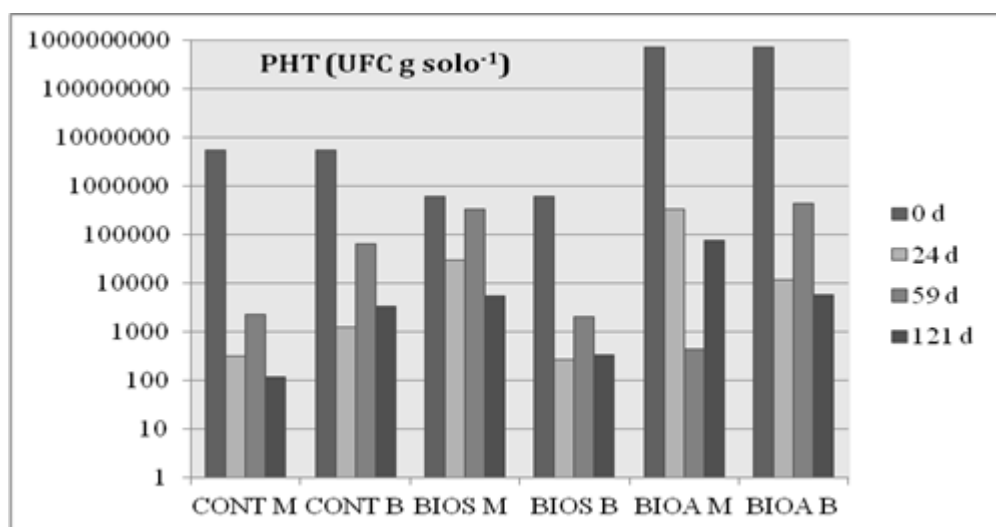
Segundo a U.S. EPA (1994), para que a biodegradação seja efetiva, a quantificação mínima de microrganismos heterotróficos no solo deve ser de 10^3 UFC g solo⁻¹. Os tratamentos CONT, BIOS e BIOA apresentaram inicialmente uma população de microrganismos heterotróficos totais (PHT), de fungos (PF) e de microrganismos degradadores de óleo cru (PDO) em níveis satisfatórios ao processo de biorremediação (Tabela 23). Quanto à avaliação da toxicidade aguda (ensaio de letalidade) nos tratamentos iniciais foi observada a mortalidade de *E. andrei*, ao longo de 56 dias, período necessário para o ciclo reprodutivo da minhoca, realizando leitura quanto à mortalidade e reprodução (número de ovos e juvenis aos 14, 28, 42 e 56 dias). Nas amostras dos tratamentos BIOS e BIOA, no tempo 0, os organismos expostos ao solo contaminado tiveram alta mortalidade (100%) quando comparados ao controle (3,33% de mortalidade). No entanto, o tratamento que recebeu inóculo (BIOA) apresentou 100% de mortalidade aos 14 dias, e o tratamento bioestimulado (BIOS) foi observado 80% de mortalidade. Os microrganismos PHT, PF e PDO nos tratamentos BIOS e BIOA, nos dias 0, 24°, 59° e 121° de tratamento são vistos nas tabelas 23, 24 e 25. Ao longo do período de incubação as quantificações de microrganismos apresentaram variação ampla.

Tabela 23 - PHT (UFC g solo⁻¹) - tratamentos CONT, BIOS e BIOA
aos 0, 24°, 59° e 121° dias

Dias	Microcosmos			Biorreatores		
	CONT	BIOS	BIOA	CONT	BIOS	BIOA
0	$5,7 \times 10^6$	$6,3 \times 10^5$	$7,2 \times 10^8$	$5,7 \times 10^6$	$6,3 \times 10^5$	$7,2 \times 10^8$
24	$3,3 \times 10^2$	$3,0 \times 10^4$	$3,5 \times 10^5$	$1,3 \times 10^3$	$2,7 \times 10^2$	$1,2 \times 10^4$
59	$2,3 \times 10^3$	$3,5 \times 10^5$	$4,5 \times 10^6$	$6,5 \times 10^4$	$2,1 \times 10^3$	$4,5 \times 10^5$
121	$1,2 \times 10^2$	$5,6 \times 10^3$	$7,8 \times 10^4$	$3,4 \times 10^3$	$3,4 \times 10^2$	$5,8 \times 10^3$

A Figura 74 apresenta as quantificações de população de microrganismos heterotróficos totais PHT nos diferentes tratamentos adotados ao longo do período de realização do experimento, expressos em unidades formadoras de colônia por grama de solo (UFC g solo⁻¹).

Figura 74 - População de PHT em diferentes fases do experimento
(de 0, 24, 59 e 121 dias).



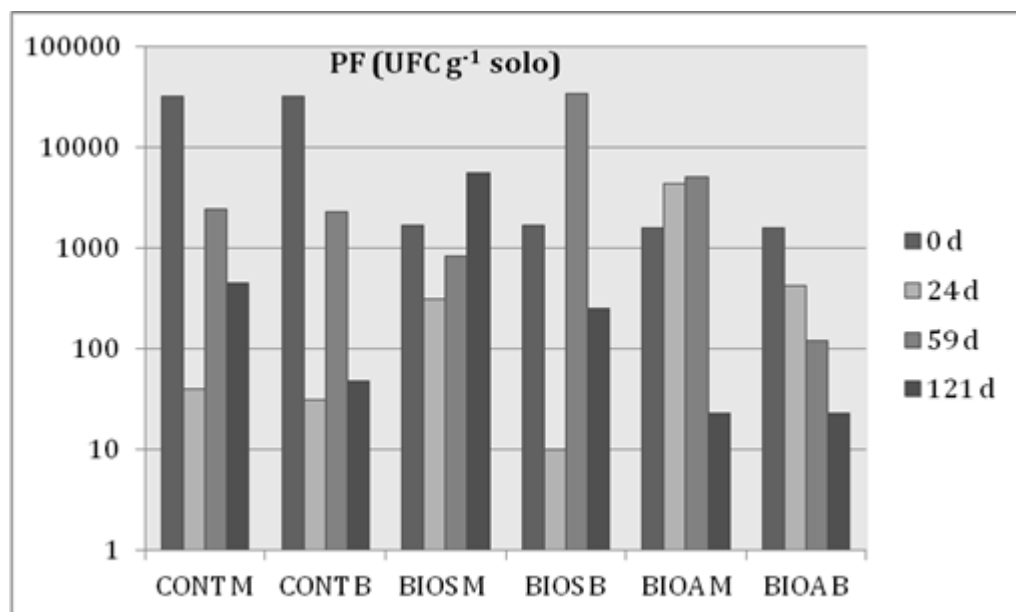
Como esperado, a PHT nos solos bioaumentados era superior (de duas a três ordens de grandeza) às PHT presentes nos demais solos. Aos 121 dias, a superioridade já não era tão evidente.

Tabela 24 - PF (UFC g solo⁻¹) - tratamentos CONT, BIOS e BIOA
aos 0, 24°, 59° e 121° dias

Dias	Microcosmos			Reatores		
	CONT	BIOS	BIOA	CONT	BIOS	BIOA
0	$3,2 \times 10^4$	$1,7 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	$3,2 \times 10^4$	$1,7 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$
24	$4,0 \times 10^1$	$3,1 \times 10^2$	$4,3 \times 10^3$	$3,1 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$4,2 \times 10^2$
59	$2,4 \times 10^3$	$8,3 \times 10^2$	$5,0 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	$3,4 \times 10^4$	$1,2 \times 10^2$
121	$4,5 \times 10^2$	$5,6 \times 10^3$	$2,3 \times 10^2$	$4,8 \times 10^1$	$2,5 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$

A tabela 24 apresenta as populações de fungos nos diferentes tratamentos adotados ao longo do período de realização do experimento. As mesmas foram expressas em unidades formadoras de colônia por grama de solo (UFC g solo⁻¹). Ao longo do período de incubação as quantificações de microrganismos apresentaram uma ampla variação. Sendo assim, os dados foram ajustados para log na base 10. Em todos os tratamentos, observou-se uma tendência de diminuição da PHT com o passar do tempo.

Figura 75 - Quantificação de fungos (UFC g solo-1) ao longo do tratamento



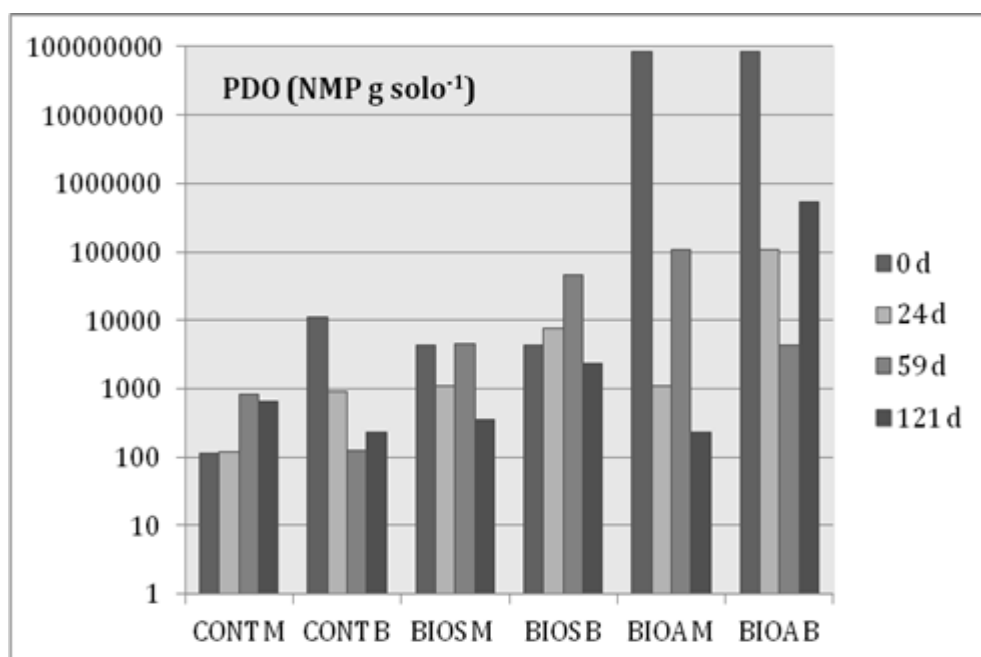
No início do experimento, a população de fungos (PF) era superior (em mais de uma ordem de grandeza) nos solos controle (CONT) e similar nos demais tratamentos. Ao longo do experimento (Figura 75), não houve diferença aparente entre os tratamentos CONT, BIOS e BIOA. Com exceção do BIOS M, observou-se uma tendência de decaimento da PF com o passar do tempo.

Tabela 25 - PDO (NMP g solo⁻¹) - tratamentos CONT, BIOS e BIOA aos 0, 24°, 59° e 121° dias

Dias	Microcosmos			Biorreatores		
	CONT	BIOS	BIOA	CONT	BIOS	BIOA
0	$1,1 \times 10^4$	$4,3 \times 10^3$	$8,6 \times 10^7$	$1,1 \times 10^4$	$4,3 \times 10^3$	$8,6 \times 10^7$
24	$1,2 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$9,2 \times 10^2$	$7,5 \times 10^3$	$1,1 \times 10^5$
59	$7,8 \times 10^4$	$4,6 \times 10^3$	$1,1 \times 10^5$	$1,3 \times 10^2$	$4,6 \times 10^4$	$4,3 \times 10^3$
121	$6,5 \times 10^2$	$3,5 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$2,34 \times 10^3$	$5,4 \times 10^2$

A Tabela 25 apresenta os microrganismos degradadores de óleo (PDO) nos diferentes tratamentos adotados ao longo do período de realização do experimento. As mesmas foram expressas em número mais provável por grama de solo (NMP g solo⁻¹).

Figura 76 - Microrganismos degradadores de óleo (PDO) em NMP g solo-1 ao longo experimento.

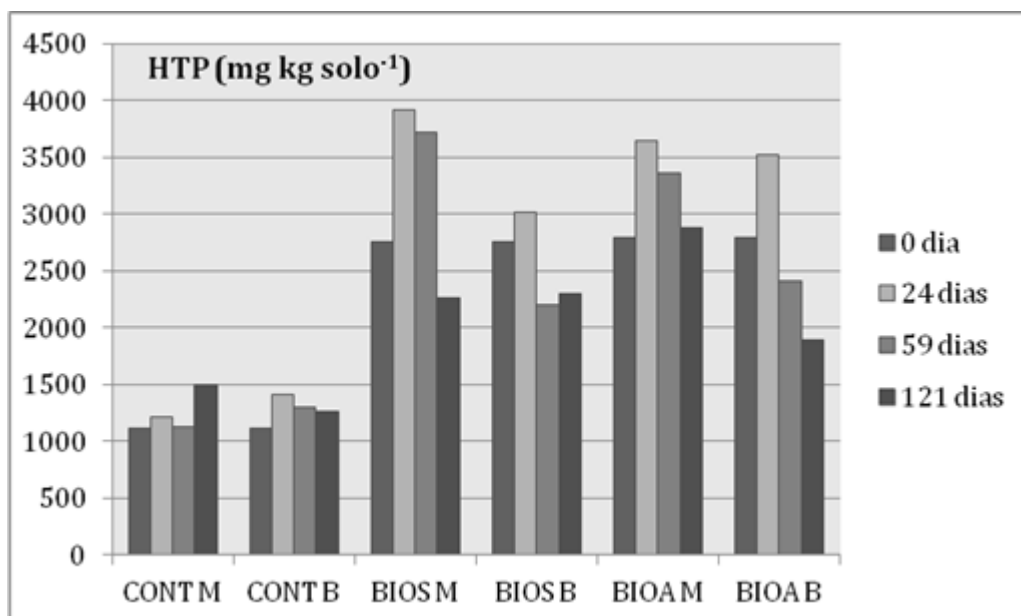


Assim como o observado com a PHT e ao contrário do observado com a PF, a PDO (Figura 76) inicial era muito superior nos solos bioaumentados. Observou-se uma tendência de decaimento ao longo do tempo, com exceção do CONT M. As populações que iniciaram com densidades semelhantes no solo bioaumentado nos microcosmos (biopilha dinâmica) e nos reatores (biopilha estática com aeração forçada), aos 121 dias, eram bem superiores nos reatores (cerca de 3 ordens de grandeza). Portanto, ao final do experimento, a atividade de degradação de óleo era mais intensa nos sistemas simulando biopilhas estáticas (BIOA B), comparados com os sistemas simulando biopilhas dinâmicas (BIOA M).

4.3.3 Avaliação do decaimento de HTP e HPA

A Figura 77 mostra a evolução dos teores extraíveis de HTP de solo argiloso nos tempos 0, 24, 59 e 121 dias.

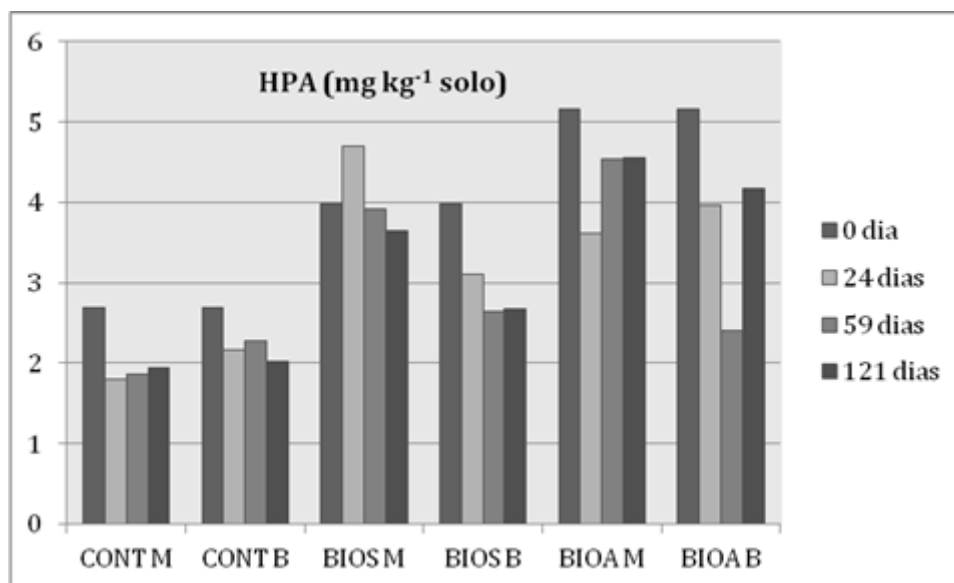
Figura 77 - Teores de HTP nos microcosmos e nos reatores ao longo do experimento.



HTP: Pode-se observar que todos os tratamentos bioestimulados e bioaumentados, tanto em simulação de biopilha dinâmica quanto estática houve elevação da concentração de HTP ao longo do tratamento, com decaimento final aos 121 dias. No entanto, ainda assim, aos 121 dias todos os tratamentos apresentavam valores maiores do que os controles (CONT M e B). Aparentemente, o BIOA B foi o que promoveu a melhor remoção de HTP. Tal resultado sugere que a aeração forçada apresenta uma maior velocidade de biodegradação, quando comparada à técnica de aeração por revolvimento.

HPA: A Figura 78 mostra a evolução dos HPA extraíveis nos dias 0, 24, 59 e 121 de tratamento. Os teores de HPA extraídos dos solos, nos tratamentos simulando biopilha dinâmica apresentaram uma tendência de aumento. Permanece inexplicável o fato de que os teores de HPA extraídos do solo bioaumentado no início do experimento se encontravam superiores aos teores extraíveis do solo bioestimulado, tendo em vista que ambos receberam a mesma quantidade de óleo e ambos os solos são provenientes do mesmo lote que compôs os controles (CONT M e CONT B). Tal fato pode estar associado a um processo de quebra de cadeias longas em mais curtas, ocorrido no decorrer do experimento.

Figura 78 - Teores de HPA nos microcosmos e reatores ao longo do experimento.

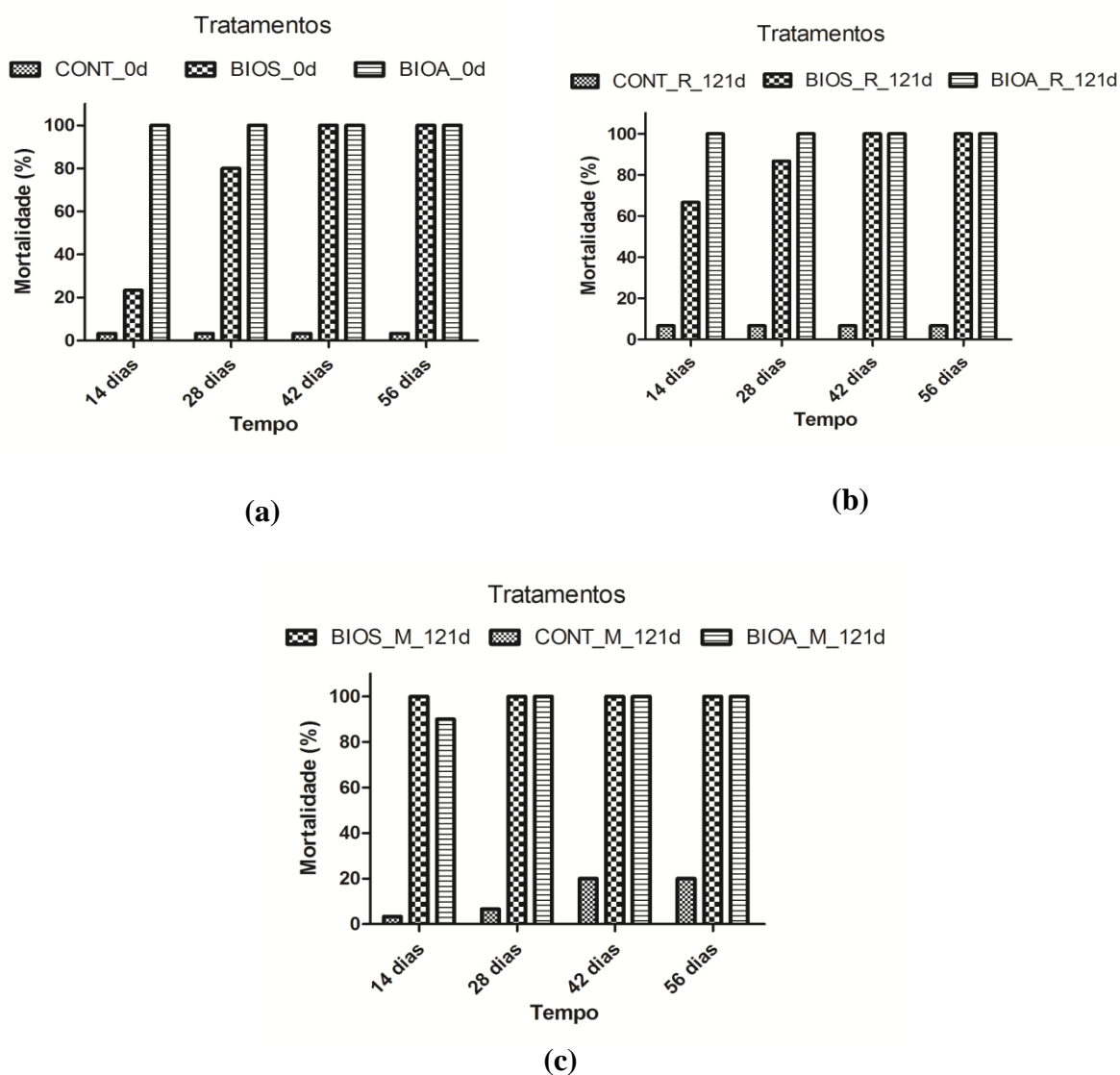


Com relação às flutuações com elevação de valores ao longo do tratamento, tanto de HTP quanto de HPA, várias hipóteses podem ser formuladas. O fenômeno pode ser decorrente da heterogeneidade da massa contaminada nos microcosmos ou reatores e, conseqüentemente, dificuldades na obtenção de uma amostra representativa ou, mais provavelmente, pode refletir o processo de biodegradação de compostos complexos e pesados gerando hidrocarbonetos de menor peso molecular, detectáveis nas faixas monitoradas. Tal fenômeno é mais provável nas contaminações com óleo cru, teores de compostos de alto peso molecular. O aumento da concentração de hidrocarbonetos ocorrido no presente experimento não é um fato comumente reportado na literatura, embora já tenha sido descrito anteriormente (CIANELLA, 2010; LÓPEZ e MUELLER, 2009; OLIVEIRA *et al.* 2007). De acordo com tais autores, o aumento dos HTP observado pode estar relacionado ao processo de degradação desses compostos, que por apresentarem cadeias hidrocarbônicas mais longas, são, primeiramente, quebrados em cadeias mais curtas, para depois serem degradados, proporcionando, inicialmente, um aumento na concentração total. Essas quebras podem dar origem a compostos intermediários que são detectados pelo método cromatográfico usado para medição dos hidrocarbonetos totais.

Como o decaimento tanto de HTP quanto HPA foi lento, recomenda-se fortemente que no futuro, seja feito uso de surfactantes para aceleração da biorremediação, particularmente de solos argilosos contaminados com óleo cru.

4.3.4 Avaliação da toxicidade aguda sobre *E. andrei*

A Figura 79 mostra a toxicidade aguda (% letalidade) do solo no início e no fim do experimento, sendo observado um aumento na toxicidade do solo em todos os tratamentos. Tais resultados sugerem que o processo de degradação dos compostos orgânicos presentes no solo torna disponível compostos mais tóxicos aos organismos do que os compostos originais.



No ensaio de letalidade, a *E. andrei* sofreu efeito letal na taxa de 100% após apenas 14 dias em contato com o solo preparado para o bioaumento (Figura 79a). Já o solo preparado para o bioestímulo só resultou em taxa de letalidade de 100% após 42 dias de exposição da *E. andrei* (Figura 79a). Tudo indica que a degradação acelerada de hidrocarbonetos ocorrida no solo que recebeu inóculo no dia 0, mesmo nos recipientes com as minhocas gerou compostos

mais tóxicos, o que é consistente com estudos realizados recentemente (GUIMARÃES *et al.*, 2012). Após 121 dias de tratamento tanto em microcosmos como em reatores, a toxicidade só fez aumentar, sendo que em microcosmos (biopilhas dinâmicas) ela resultou em taxa de 100% mais cedo (Figura 79b) do que o observado em reatores simulando biopilha estática (Figura 79c). O ensaio de toxicidade com o solo BIOS obtido no dia 0 do experimento apresentou aos 14 dias, mortalidade de 23,3%. Porém aos 42 dias a taxa de mortalidade assim como o BIOA também atingiu aos 100%. Observou-se uma pequena diferença na toxicidade, do solo obtido de BIOS após 121 dias, quando os dois métodos de aeração são comparados. Porém não foi observada diferença significativa em nenhum dos tratamentos, mesmo quando se comparou a toxicidade no início ao final da remediação.

4.3.5 Discussão

Apesar das flutuações nos valores aferidos, foi possível observar uma tendência de diminuição da densidade microbiana das PHT, PF e PDO quando o início (dia 0) foi comparado ao final (121 dias) dos experimentos. Tanto a densidade microbiana da PHT quanto a densidade da PDO foram claramente superiores nos solos com bioaumento, no início dos tratamentos, sendo que ao final do experimento tal superioridade foi observada apenas para o bioaumento em reator BIOA B (aeração forçada). Para HTP, a técnica de aeração forçada mostrou-se superior na remoção de hidrocarbonetos totais de petróleo, apenas no tratamento de bioaumento (BIOA B), sendo equivalente à técnica de revolvimento manual nos demais tratamentos (CONT e BIOS). Para HPA, tal superioridade foi menos evidente, mas foi também observada tanto no tratamento bioestímulo (BIOS B), como bioaumento (BIOA B).

Embora tais conclusões necessitem de futura confirmação, os resultados sugerem que a biopilha de aeração forçada alcança melhores resultados em termos de redução de hidrocarbonetos do solo. A estratégia de bioaumento foi aparentemente superior à de bioestímulo na remoção de HTP. Entretanto, com relação à HPA, o aumento inexplicável dos teores desse grupo de hidrocarbonetos no tempo 0, após a inoculação com PDO dificultou a comparação entre as duas estratégias (bioestímulo x bioaumento) e requer maiores investigações para que seja elucidada.

Em linhas gerais, a biorremediação de solo argiloso contaminado por óleo cru, contendo tanto contaminação antiga quanto recente, reúne os maiores desafios à biorremediação, tanto no aspecto textural do solo quanto na natureza do contaminante. Os

processos são aparentemente lentos e requerem ferramentas auxiliares para aceleração do processo.

5 CONCLUSÕES

Quando a extração de HTP e HPA a partir de solos arenoso e argiloso com histórico de contaminação antiga (mais de dois anos) por hidrocarbonetos de petróleo, utilizando três métodos selecionados (Soxhlet, MARS e ASE) foi realizada e a eficiência da extração de diferentes frações de HTP (n-alcanos, HRP, MCNR) e dos 16 HPA prioritários foi avaliada, concluiu-se que o método mais apropriado depende da classe textural de solo e do grupo de compostos de interesse. Assim, para HTP em solo argiloso, o ASE foi o que apresentou melhores resultados para n-alcanos e para a fração HRP. No entanto, para a fração MCNR, Soxhlet e MARS foram superiores e comparáveis entre si, mas promoveram perda de compostos mais leves. No solo arenoso, o ASE foi o método que apresentou o melhor resultado tanto para n-alcanos quanto para HRP e MCNR. Portanto, com base na eficácia da extração, o ASE foi de maneira geral, superior aos outros dois métodos para análise de HTP e o que melhor recupera n-alcanos e HRP. No caso dos HPA, a extração por Soxhlet foi a que apresentou o melhor resultado, tanto em solo argiloso quanto arenoso. O método MARS, seguido do ASE apresentam os menores consumos de solvente e de tempo de extração comparando com a extração por Soxhlet. O ASE requer mais tempo de preparação, comparado com os outros métodos. Assim, quando fatores tais como economia de solvente, água e tempo são relevantes, o MARS é o método mais atraente, particularmente quando o HTP é o grupo de interesse e os n-alcanos de baixo peso não são o principal foco. Dessa forma, em contaminações antigas, a classe textural do solo e a fração de hidrocarbonetos de interesse devem ser consideradas para a escolha do método mais adequado de extração.

A utilização do método respirométrico e a produção de CO₂ para distinção da eficiência de diferentes tratamentos na degradação de compostos orgânicos em solos contaminados por petróleo mostrou-se bastante útil como abordagem preliminar laboratorial para em curto espaço de tempo, determinar os melhores níveis a serem e a variáveis importantes em ações de biorremediação em escala de campo. Dentre os indicadores da população microbiológica, a contagem dos microrganismos degradadores de óleo-PDO (em NMP/g solo) foi mais adequado do que a contagem de microrganismos heterotróficos totais ou a população fúngica, quando o objetivo era refletir o avanço da biodegradação dos hidrocarbonetos presentes no solo.

Apesar das flutuações nos valores aferidos, foi possível observar uma tendência de diminuição da densidade microbiana das PHT, PF e PDO quando o início (dia 0) foi comparado ao final (121 dias) dos experimentos. Tanto a densidade microbiana da PHT

quanto a densidade da PDO foram claramente superiores nos solos com bioaumento, no início dos tratamentos, sendo que ao final do experimento tal superioridade foi observada apenas para o bioaumento em reator BIOA B (aeração forçada).

Para HTP, a técnica de aeração forçada mostrou-se superior na remoção de hidrocarbonetos totais de petróleo, apenas no tratamento de bioaumento (BIOA B), sendo equivalente à técnica de revolvimento manual nos demais tratamentos (CONT e BIOS). Para HPA, tal superioridade foi menos evidente, mas foi também observada tanto no tratamento de bioestímulo (BIOS B), assim como no de bioaumento (BIOA B).

Embora tais conclusões necessitem de futura confirmação, os resultados sugerem que a biopilha de aeração forçada alcança melhores resultados em termos de redução de hidrocarbonetos do solo. A estratégia de bioaumento foi aparentemente superior à de bioestímulo na remoção de HTP. Entretanto, com relação à HPA, o aumento inexplicável de dos teores desse grupo de hidrocarbonetos no tempo 0, após a inoculação com PDO dificultou a comparação entre as duas estratégias (bioestímulo x bioaumento) e requer maiores investigações para que seja elucidada.

Em linhas gerais, a biorremediação de solo argiloso contaminado por óleo cru, contendo tanto contaminação antiga quanto recente, reúne os maiores desafios à biorremediação, tanto no aspecto textural do solo quanto na natureza do contaminante. Os processos são aparentemente lentos e requerem ferramentas auxiliares para aceleração do processo.

6 REFERÊNCIAS

ABDULSALAM, S.; OMALE, A. B. **Comparison of biostimulation and bioaugmentation techniques for the remediation of used motor oil contaminated soil:** Braz. Arch. Biol. Technol, v. 52, n. 3, p. 747-54, may./jun. 2009.

ABHILALASH, P. C.; YUNUS, M. **Can we use biomass produced from phytoremediation?:** Biomass and Bioenergy, v. 35, n. 3, p. 1371-72, mar. 2011.

AGAMUTHU, P.; ABIOYE, O. P.; AZIZ, A. A. **Phytoremediation of soil contaminated with used lubricating oil using:** *Jatropha curcas*. Journal of Hazardous Materials, v. 179, n. 1-3, p. 891-94, 15 jul. 2010.

ALKORTA, I.; GARBISU, C. **Phytoremediation of organic contaminants in soils:** Bioresource Technology, v. 79, n. 3, p. 273-76, 2001.

ALMEIDA, R. O. P. O. **Revegetação de áreas mineradas:** estudo dos procedimentos aplicados em minerações de areia. 2011. 160f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mineral) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ALONSO, T. P. **Condutividade hidráulica de solos compactados em ensaios com permeâmetro de parede flexível.** 2005. 137 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Solos) – Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2005.

ALTEKRUSE, S. F.; ELVINGER, F.; WANG, Y.; YE, K. **A model to estimate the optimal sample size for microbiological surveys:** Applied and Environmental Microbiology. Washington, DC, v. 69, n. 10, p. 6174-78, Oct. 2003.

ALSHAMMARI, J S.; GAD, F. K.; ELGIBALY, A. A. M.; KHAN, A. R. **Solid waste management in petroleum refineries:** American Journal of Environmental Sciences. Nova Iorque, v. 4, n. 4, p. 353-61, aug. 2008.

ALVES, M. R. F. V. Alves. **Reciclagem de borra oleosa:** uma contribuição para gestão sustentável dos resíduos da indústria de petróleo em Sergipe. 2003. 191 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, S.E., 2003.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). **E 1676:** Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests With the Lumbricid Earthworm *Eisenia Fetida*. Philadelphia, 1997.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). **D 5092:** Standard practice for design and installation of ground water monitoring wells in aquifers. Philadelphia, 1998.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. **Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados.** Eclét. Quím, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 17-43, sep. 2010.

ANGARTEN, R. G. **Termodinâmica de micelização de alquilglicosídeos em H₂O e em D₂O**. 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2007.

ANTIZAR-LADISLAO, B.; BECK, A. J.; SPANOVA, K.; LOPEZ-REAL, J.; RUSSELL, N. J. **The influence of different temperature programmes on the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a coal-tar contaminated soil by in-vessel composting**. Journal of Hazardous Materials. Amsterdam, v. 144, n. 1-2, p. 340-7, jun. 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6502: **Rochas e solos**. Rio de Janeiro, 1995.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14283: **Resíduos em solo: determinação em da biodegradação pelo método respirométrico**. Rio de Janeiro, 1999.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 7181: **Análise granulométrica: método de ensaio**. Rio de Janeiro, 1984.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10004: **Resíduos sólidos: classificação**. Rio de Janeiro, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10005: **Procedimento para obtenção de extrato lixiviado de resíduos sólidos**. Rio de Janeiro, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10006: **Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos**. Rio de Janeiro, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10007: **Amostragem de resíduos sólidos**. Rio de Janeiro, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13600: **Solo Determinação do teor de material orgânica por queima a 440°C: Método de ensaio**. Rio de Janeiro, 1996.

ATLAS, R. M. **Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: environmental perspective**. Microbiological reviews. Washington, US, v. 45, n. 1, p. 180-209, march, 1981.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. **GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS**. ANP - Autorizações de Operação concedidas a dutos. 2012

AYOTAMUNO, M. J.; KOGBARA, R. B.; OGAJI, S. O. T; PROBERT, S. D. **Bioremediation of a crude-oil polluted agricultural-soil at Port Harcourt, Nigeria**. Applied Energy. Londres, v. 83, n. 11, p. 1246-57, nov. 2006.

AZEVEDO, Ricardo Latgé Milward de; ESTRELLA, Guilherme de Oliveira; FORMIGLI FILHO, José Miranda. **Pré-Sal: conhecimento, estratégia e oportunidades**. In: VELLOSO, João Paulo Reis (coord.). Teatro Mágico da Cultura, Crise Global e Oportunidades do Brasil. Rio de Janeiro: Ed. J. Olympio, 2009.

BALBA, M. T.; AI-DAHER, R., AI-AWADHI, N. **Bioremediation of oil-contaminated desert soil: the Kuwaiti experience.** Environment International. Nova Iorque, v. 24, n. 1-2, p. 163-73, jan./feb. 1998.

BALDOTTO, H. A. **Avaliação da temperatura de início do aparecimento dos cristais (TIAC) e composição do primeiro cristal no fenômeno de precipitação parafínica em petróleos método simplificado.** 2004. 127 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Reservatório e de Exploração) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Macaé, 2004.

BANDALA, E. R.; VELASCO, Y.; TORRES, L. G. **Decontamination of soil washing wastewater using solar driven advanced oxidation processes.** Journal of Hazardous Materials. Amsterdam, v. 160, n. 2-3, p. 402–7, Dec. 2008.

BAPTISTA, S. J. **Avaliação do Emprego de Biossurfactante na Biorremediação de Solos Contaminados com Óleo Diesel.** 2007. 146 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

BAPTISTA, S. J. **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, 2003.

BAUD-GRASSET, F.; BAUD-GRASSET, S.; SAFFERMAN, S. I. **Evaluation of the bioremediation of a contaminated soil with phytotoxicity tests.** Chemosphere. Oxford, Inglaterra, v. 26, n. 7, p. 1365-74, apr. 1993.

BECK, F. L.; BOHNEN, H.; CABEDA, M. S. V.; CAMARGO, F. A. O.; KÄMPF, N.; MEURER, E. J. Projeto pedagógico - ensino de graduação. Porto Alegre: Departamento de solos da UFRGS, 2000. Boletim técnico n. 6. In: MEURER, E. J.; **Fundamentos de química do solo.** Porto Alegre: Genesis, 2000. 174 p.

BERGER, T. M. **Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos totais de petróleo: enfoque na aplicação do processo Terraferm.** 2005. [Tese de Doutorado]. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências. Programa de Pós-graduação em ecologia. 2005.

BERSET, J.D; EJEM, M.; HOLZER, R.; LISCHER, P. **Comparison of different drying: extraction and detection techniques for the determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in background contaminated soil samples,** Analytica Chimica Acta, 383: 263-275, 1999;

BEAUDIN, N.; CARON. R. F.; LEGROS, R.; RAMSAY, J.; RAMSAY, B. **Identification of the key factors affecting composting of a weathered hydrocarbon-contaminated soil.** Biodegradation, Dordrecht, Holanda, v. 10, n. 2, p. 127-133, 1999.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. C.; FRANKENBERG, W. T. **Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation: biostimulation and bioaugmentation.** Bioresource Technology, Essex, Inglaterra, v. 96, n. 9, p. 1049-1055, Jun 2005.

BENYAHIA, F.; ABDULKARIM, M.; ZEKRI, A.; CHAALAL, O.; HASANAIN, H. **Bioremediation of crude oil contaminated soils: A Black Art or an Engineering Challenge?** In: WORLD CONGRESS OF CHEMICAL, 7. 2005, Glasgow, Escócia. Process Safety and Environmental Protection, Rugby, Inglaterra, v. 83, n. 4, p. 364-370, July 2005.

BERGER, T. M. **Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos totais de petróleo: enfoque na aplicação do processo Terraferm.** 2005. [Tese de Doutorado]. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ecologia. 2005.

BEZAMA, A.; SZARKA, N.; WOLFBAUER, J.; LORBER, K. E. **Application of a balanced scorecard system for supporting decision-making in contaminated sites remediation.** Water Air Soil Pollut, Dortrech, Holanda, v. 181, n. 1-4, p. 3-16, 2007.

BEYER, N. W. **Evaluating soil contamination.** Biol. Report, v. 90, n. 2, 1990.

BIOCELL TECHNOLOGY. **Remediation of petroleum-contaminated soils: 2ª revisão** Tech. Data Sheet Naval Facilities Engineering Service Center. California. 1998.

BOONSANER, M.; BORRIRUKWISITSAK, S; BOONSANER, A. A. **Phytoremediation of BTEX contaminated soil by Canna X generalis: Ecotoxicology and Environmental Safety.** San Diego, v. 74, n. 6, p. 1700-07, Sep. 2011.

BRAMUCCI, M.; KANE, H.; CHEN, M.; NAGARAJAN, V. **Bacterial diversity in an industrial wastewater bioreactor.** Appl. Microbiol. Biotechnol., Berlim, v. 62, n. 5-6, p. 594-600, 2003.

BRANCO, R. C. **Energia e Meio Ambiente in Biodiversidade na Província petrolífera de Urucu:** Organizado por Sirayama de Oliveira Ferreira Lima... [et al.]. – Rio de Janeiro : PETROBRAS. CENPES, 2008. 194 p

CASTRO, R. A. *et al.* **Otimização do Sistema de Landfarming da RPBC:** Refinaria Presidente. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE P&D EM PETRÓLEO E GÁS, 3., 2005, Salvador. Anais. Rio de Janeiro: IBP, 2005. 6 f.

Cement Kiln Co-Processing. **High Temperature Treatment.** Chadbourne, 1997, Pesticides Treatment Technology Fact Sheet.

CENPES. **Biorremediação de áreas contaminadas por petróleo.** Rio de Janeiro, 2002, 77p. (Relatório Técnico RT BIO 23/2002).

CETESB - COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas> . Acesso em 22 de junho de 2012.

CETESB - COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Manual de gerenciamento de áreas contaminadas da CETESB - Amostragem do solo – 6300, 1999.

CHAGAS-SPINELLI, A. C. O. **Biorremediação de solo argiloso contaminado por hidrocarbonetos poliaromáticos provenientes de derrame de óleo diesel** [Tese de Doutorado]. Recife, Brasil: Universidade Federal de Pernambuco; 2007.

CHAILLAN, F. CHAÎNEAU C.H. ; POINT,V. ;SALIOT, A. ; OUDOT, J. **Factors inhibiting bioremediation of soil contaminated with weathered oils and drill cuttings.** Environmental Pollution, Barking, Inglaterra, v. 144, n. 1, p. 255-265, Nov. 2006.

CHAÎNEAU, C. H. ; YEPREMIAN, C. ; VIDALIE, J. F. ; DUCREUX, J. ; BALLERINI, D. **Bioremediation of a crude oil-polluted soil:** biodegradation, leaching and toxicity assessments. Water, Air, and Soil Pollution, Dordrech, Holanda, v. 144, n. 1-4, p. 419-440, 2003.

CHAMBRIARD, M. M. R.; DUARTE, K. S.; MARINS, G. M. S.; COUTINHO, C. I.; PEDROSA, L. F.; VARGAS, M. V. M. **Riquezas Minerais in Geodiversidade do Brasil:** conhecer o passado, para entender o presente e prever o futuro. Rio de Janeiro: CPRM, 2008. 264 p. Rio de Janeiro: CPRM, 2008.

CHARLES, J. *et al.* **Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant:** (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. Ecotoxicology and Environmental Safety, Nova Iorque, v. 74, n. 7, p. 2057-2064, Oct. 2011.

CHEQUER, L. P. T.; CRAPEZ, M. A. C.; FONTANA, L. F.; SILVA, F. S. **Efeito rizosfera:** simbiose entre raízes de plantas e bactérias. Educação Pública, Rio de Janeiro, CECIERJ, 2011.

CIANELLA, R.C. **Avaliação de diferentes estratégias de biorremediação no tratamento de solo contaminado por diesel B5.** 2010 [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. 2010.

COULON, F. ; Pelletier, E. ;Gourhant, L. ; Delille, D. **Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sub-Antarctic soil.** Chemosphere, Oxford, Inglaterra, v. 58, n. 10, p. 1439-1448, Mar. 2005.

COULON, F. AWADI, M. A.; COWIE, W.; MARDLIN, D.; POLLARD, S.; CUNNINGHAM, C.; RISDON, G.; ARTHUR, P.; SEMPLE, K. T.; PATON, G. I. **When is a soil remediated?:** Comparison of biopiled and windrowed soils contaminated with bunker-fuel in a full-scale trial. Environmental Pollution, Barking, Inglaterra, v. 158, n. 10, p. 3032-3040, Oct. 2010.

COWELL, R. R.; LEAHY, J. G. **Microbial degradation of hydrocarbons in the environment:** Microbiological Reviews. Washington, Estados Unidos, v. 54, n. 3, p. 305-315, Sep. 1990.

CRIVELARO, S. H. R. *et al.* **Evaluation of the use of vinasse as a biostimulation agent evaluation of the use of vinasse as a biostimulation agent for the biodegradation of oily sludge in soil.** Braz. Arch. Biol. Technol, Curitiba, v. 53, n. 5, p. 1217-1224, Sept./Oct. 2010.

DA COSTA, G.M., OLIVEIRA, T.B., SODRÉ, E.D., MARQUES, M., CORREA, S.M., **Design, construção e operação de biorreator aeróbico em escala piloto para biorremediação de solos contaminados com petróleo e derivados.** In: Anais...24º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental.CD p. 2006.

DAMS, R. I. **Pesticidas: Usos e perigos à saúde e ao meio ambiente.** Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal, v. 7, n. 2, dez. 06

DASAPPA, S. M.; LOEHR, R. C. **Toxicity reduction in contaminated soil bioremediation processes.** Water Research Volume 25, Issue 9, September 1991, Pages 1121–1130.

DAVIS, J. W.; MADSEN, S. **Factors affecting the biodegradation of toluene in soil.** Chemosphere, Oxford, Inglaterra, v. 33, n. 1, p. 103-130, July. 1996.

DEL'ARCO, J. P., FRANÇA, F. P. **Biodegradation of crude oil in sandy sediment.** International Biodeterioration & Biodegradation, v. 44, p. 87 – 92, 1999.

DELILLE, D.; COULON, F.; PELLETIER, E.. **Effects of temperature warming during a bioremediation study of natural and nutrient-amended hydrocarbon-contaminated sub-Antarctic soils.** Cold Regions Science and Technology, Amsterdam, Holanda, v. 40, n. 1-2, p. 61-70, Nov. 2004.

DELILLE, D.; COULON, F.; PELLETIER, E. **The influence of temperature on bacterial assemblages during bioremediation of a diesel fuel contaminated sub Antarctic soil.** Cold Regions Science and Technology, Amsterdam, Holanda, v. 48, n. 2, p. 74-83, May. 2007.

DELILLE, D.; DUVAL, A.; PELLETIER, E. **Highly efficient pilot biopiles for on-site fertilization treatment of diesel oil-contaminated sub-Antarctic soil.** Cold Regions Science and Technology, Amsterdam, Holanda, v. 54, n. 1, p. 7-18, Sept. 2008.

DELILLE, D. *et al.* **Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in sub-Antarctic coastal seawater.** Polar Biol., v. 32, n. 10, p. 1521-1528, 2009.

DERMONT, G *et al.* **Soil washing for metal removal: A review of physical/chemical technologies and field applications.** Journal of Hazardous Materials, Amsterdam, Holanda, v. 152, n. 1, p. 1-31, Mar. 2008.

DIBBLE, J. T.; BARTHA, R. **Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge.** Applied and Environmental Microbiology, Washington, Estados Unidos, v. 37, n. 4, p. 729-239, Apr. 1979.

DIPLOCK, E. E.; MARDLIN, D. P.; KILLHAM, K. S.; PATON, G. I. **Predicting bioremediation of hydrocarbons: Laboratory to field scale.** Environmental Pollution 157 (2009) 1831–1840.

DIYA'UDDEN, B. H.; WAN DAUD, Wan Mohd Ashri; AZIZ, A. R. Abdul. **Treatment technologies for petroleum refinery effluents: a review.** Process Safety and Environmental Protection, Rugby, Inglaterra, v. 89, n. 2, p. 95-105, Mar. 2011.

DOMENE, X. *et al.* **Role of soil properties in sewage sludge toxicity to soil collembolans.** Soil Biol. & Biochemistry, Elmsford, Nova Iorque, v. 42, n. 11, p. 1982-1990, Nov. 2010.

DUARTE, C. L. *et al.* **Treatment of effluents from petroleum production by electron beam irradiation.** Radiation Physics and Chemistry, Oxford, Inglaterra, v. 71, n. 1-2, p. 445-449, Sept./Oct. 2004.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos.** 2.ed. Brasília, DF, 2006. 306 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solos.** 2ª ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 1998. 212 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise química para avaliação de fertilidade do solo.** 1 ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 1997. 42 p.

EKE, P. E.; SCHOLZ, M.; WALLACE, S. D. **Constructed treatment wetlands:** innovative technology for petroleum industry. In: SPE ANNUAL TECHNICAL CONFERENCE AND EXHIBITION, 2007, Anaheim, California. Anais... Anaheim, California, SPE, 2007. 9 p. ISBN 978-1-55563-148-2.

ENVIRONMENTAL SCIENCE & ENGINEERING. Augusta, may. 2006 ESSENCIS. Pesquisa geral na homepage. Disponível em <<http://www.essencis.com.br/tratamento-e-destinacao-de-residuos/tdu>> Acesso em 10 set. 2006.

EULISS, K.; HO, CHI-HUA; SCHWAB, A. P.; ROCK, S.; BANKS, M. K. **Greenhouse and field assessment of phytoremediation for petroleum contaminants in a riparian zone.** Bioresource Technology 99 (2008) 1961–1971.

EWEIS, J. B. ERGAS, S. J.; CHANG, D. P. Y.; SCHROEDER, E. D. **Bioremediation principles.** [s.L.]: McGraw-Hill, 1998. p.296

FAHNESTOCK, F. M. *et al.* **Biopile, design, operation, and maintenance handbook for treating hydrocarbon-contaminated soils.** [s.L.]: Columbus Battelle Press, 1998. p.163

FANTROUSSI, S. **Bioaugmentation of a Soil Bioreactor Designed for Pilot:** scale Anaerobic Bioremediation Studies. Environ. Sci. Technol., n. 33, p. 2992-3001, 1999.

FARIA, F. D.; GONÇALVES, D. S.; VASCONCELOS, A. P. **Determinação quantitativa da distribuição dos hidrocarbonetos em petróleos e frações pesadas por cromatografia gasosa.** Boletim Técnico da Petrobras, Rio de Janeiro, v. 52, n. 1/3, p. 89-97, abr./ago./dez. 2009

FEDERAL REMEDIATION TECHNOLOGIES ROUNDTABLE. **Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide.** 2012.

FERGUSON, S. H.; POWELL, S. M.; SNAPE, I; GIBSON, J. A. E.; FRANZMANN, P. D. **Effect of temperature on the microbial ecology of a hydrocarbon-contaminated Antarctic soil:** Implications for high temperature remediation. Cold Regions Science and Technology. n. 3, p. 115–129, 2008.

FERREIRA, V. R. **Otimização de protocolo analítico para extração e fracionamento de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos em sedimentos**, Dissertação (mestrado) UFPR, Curitiba, 2010;

FILLER, D. M. *et al.* **Integral biopile components for successful bioremediation in the Arctic**. Cold Regions Science and Technology, Amsterdam, Holanda, v. 32, n. 2-3, p. 143-156, Sept. 2001.

FILLER, D. M. *et al.* **Advances in engineered remediation for use in the Arctic and Antarctica**. Polar Record, Cambridge, v. 42, n. 2, p. 111–120, 2006.

FORMOSINHO, S. J. *et al.* **Parecer relativo ao tratamento de resíduos industriais perigosos**. Aveiro: [S.n.], 2000. (Comissão científica independente de controlo e fiscalização ambiental da co-incineração criada pelo decreto-lei 120/99 de 16 de abril).

FRANCISCO, J.L.; FRANÇA, K. C.. **Dossiê técnico: métodos de tratamento de resíduos de petróleo**. Rio de Janeiro: REDETEC, 2007. 22 f.

GALLEGO, J. R. *et al.* **Natural attenuation and bioremediation of prestige fuel oil along the Atlantic Coast of Galicia (Spain)**. Organic Geochemistry, v.30, p.30, 2006.

GIAROLA, N. F. B.; SILVA, A. P.; IMHOFF, S. **Relações entre propriedades físicas e características de solos sa região sul do Brasil**. R. Bras. Ci. Solo, n. 26, p.885-893, 2002.

GELUDA, L. **Financiando o éden: potencial econômico da compensação Ambiental prevista na lei do sistema Nacional de unidades de conservação da Natureza**. 2004. 73 p. Monografia (Bacharelado em Ciências Econômicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

GERHARDT, K. E.; HUANG, X. D.; GLICK, B. R.; GREENBERG, B. M. **Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges**. Plant Science 176 (2009) 20–30.

GOGOIA, B. K.; DUTTA, N. N.; GOSWAMI, P.; MOHAN, T. R. K. **A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site**. Advances in Environmental Research, Berkley, California, v. 7, n. 4, p. 767-782, Jun. 2003.

GOMEZ, E. *et al.* **Thermal plasma technology for the treatment of wastes: a critical review**. Journal of Hazardous Materials, Amsterdam, Holanda, v. 161, n. 2-3, p. 614–626, Jan. 2009.

GIUSTI, L. **A review of waste management practices and their impact on human health**. Waste Management, Oxford, Inglaterra, v. 29, n. 8, p. 2227–2239, Aug. 2009.

GUIDELINES ON CO-PROCESSING WASTE MATERIALS IN CEMENT PRODUCTION – GCWMCP, FINAL DRAFT. L. Timberlake Edit, 15 March 2005.

GRATÃO, P. L.; PRASAD, M. N. V.; CARDOSO, P. F.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. **Fitorremediação: tecnologia verde na limpeza de metais tóxicos do ambiente**. Braz. J. Plant Physiol. vol.17 no.1 Londrina Jan./Mar. 2005.

GREEN, B. T.; WIBERG, C. T.; WOODRUFF, J. L.; MILLER, E. W.; POAE, V. L.; CHILDRESS, D. M.; FEULNER, J. A.; PROSCH, S. A.; RUNKEL, J. A.; WANDERCHEID, R. L.; WIERMA, M. D.; YANG, X.; CHOE, H. T.; MERCURIO, S. T. **Phytotoxicity observed in tradescantia correlates with diesel fuel contamination in soil.** Environmental and Experimental Botany, vol. 36, no. 3, pp 313-321, 1996.

HEEMSBERGEN, D.; Warne, M. S. J.; Broos, K.; Bell, M.; Nash, D.; McLaughlin, M.; Whatmuff, M.; Barry, G. Pritchard, D.; Penney, N. **Application of phytotoxicity data to a new Australian soil quality guideline framework for biosolids.** Science of the Total Environment 407 (2009) 2546–2556.

HENNER, P.; SCHIAVONA, M.; DRUELLE, V.; LICHTFOUSE, E. **Phytotoxicity of ancient gaswork soils.** Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on plant germination. Organic Geochemistry 30 (1999) 963-969.

HORN, R.; **Aggregate strength of differently textured soils and its alteration with external stress applix&n.** Proc. Int. Symp. Sealing, Crusting and Hardsetting Soils, Brisbane, Qld., Australia, in press, 1994.

HOW STUFF WORKS. Pesquisa geral na homepage. Disponível em <<http://www.howstuffworks.com/enlarge-image.htm?terms=plasma&page=9>> Acesso em 10 jul. 2011.

INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER (IARC). IARC Monograph Volume 92 – **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons**, p. 754-773, 2000. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr> Acessado em: 15/01/12;

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Soil quality- Effects of pollutants on earthworms – **Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate.** ISO 11268-1. Genebra, Suíça, 1993.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Soil quality – Effects of pollutants on earthworms – **Part 2: Determination of effects on reproduction.** ISO 11268- 2. Genebra, Suíça 1998.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Soil quality – Determination of content of hydrocarbon in the range C10 to C40 by gas chromatography.** ISO 16703. Genebra, Suíça 2001.

IORIO, S. M. B. M.; CERQUEIRA, J. R.. **Avaliação de diferenças composicionais do petróleo fazenda alegre e a produção de lubrificantes naftênicos.** In: Bol. Téc. Petrobras. Rio de Janeiro, v. 45, n. 3-4, p. 255-266, jul./dez. 2002.

ITURBI, R.; FLORES, C.; CHAVEZ, C.; BAUTISTA, G.; TORRES, L. G. **Remediation of contaminated soil using soil washing and biopile methodologies at a field level.** Journal of Soils and Sediments June 2004, Volume 4, Issue 2, pp 115-122.

IZUMI, J.Y. **Energia eólica**: aerogeradores e materiais empregados. In: MORA, N. D.; LUCAS, J. F. R.; MARAN, M. A. **Materiais elétricos: compêndio de trabalhos**. Universidade Estadual do Oeste do Paraná: Foz do Iguaçu, 2010. v. 3, p. 234-247.

JENNY, H. 1994. **Factors of Soil Formation**: A System of quantitative Pedology. New York, Dover publications. 281p.

JIMÉNEZ ISLAS, D.; MEDINA-MORENO, S. A.; GRACIDA-RODRIGUEZ, J. N. **Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos**: una revisión. Rev. Int. Contam. Ambient, v. 26, n. 1, p. 65-84, 2010.

JORGENSEN, K.S., PUUSTINEN, J, SUORTTI, A.M. **Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles**. Environmental Pollution, v. 107, n. 2, p. 245-254, Feb., 2000.

JACOMINE, P. K. T. **A nova versão do sistema brasileiro de classificação de solos (SiBCS)**. Recife: UFRPE, [2005]. 16 f.

JUTEAU, P. *et al.* **Improving the biotreatment of hydrocarbons-contaminated soils by addition of activated sludge taken from the wastewater treatment facilities of an oil refinery**. Biodegradation, Dordrecht, Holanda, v. 14, n. 1, p. 31–40, 2003.

JUVONEN, R.; MARTIKAINEN, E.; SCHULTZ, E.; JOUTTI, A.; AHTIAINEN, J.; LEHTOKARI, M. **A Battery of Toxicity Tests as Indicators of Decontamination in Composting Oily Waste**. Ecotoxicology and Environmental Safety 47, 156 166 (2000).

KARSTENSEN, K. H. **A literature review on co-processing of alternative fuels and raw materials and hazardous wastes in cement kilns**. [S.l.: s.n.], 2007. 420 p.

KÄSTNER, M.; BREUER-JAMMALI, M.; MAHRO, B. **Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil**. Applied and Environmental Microbiology, v. 64, n. 1, p. 359-362, Jan., 2000.

KHAITAN, S. *et al.* **Remediation of sites contaminated by oil refinery operations**. Environmental Progress, v.25, n.1, p.20 – 31, 2006.

KHAN, F. I.; HUSAIN, T.; HEJAZI, R. **An overview and analysis of site remediation technologies**. Journal of Environmental Management, v. 71, p. 95–122, February 2004.

KIIEHL, E. J.; **Manual de edafologia**. São Paulo; Agronomia Ceres, 1976.

KODRES, C. A. **Coupled water and air flows through a bioremediation soil pile**. Environmental Modelling & Software, Oxford, Inglaterra, v. 14, n. 1, p. 37–47, Oct. 1998.

KRÄMER, U. **Phytoremediation**: novel approaches to cleaning up polluted soils. Current Opinion in Biotechnology, Londres, v. 16, n. 2, p. 133–141, April 2005.

KWOK, C. K.; LOH, K. C. **Effects of Singapore soil type on bioavailability of nutrients in soil Bioremediation**. Advances in Environmental Research, Berkley, California, v. 7, n. 4, p. 889–900, June. 2003.

KRIIPSALU, M., MARQUES, M., NAMMARI, D.; HOGGLAND, W. **Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons during composting of oily sludge**. Environmental Technology, Vol. 29. pp 43-53. 2007.

KRIIPSALU, M.; NAMMARI, D. **Monitoring of biopile composting of oily sludge**. Waste Management & Research. 1-9. 2009.

LEAHY, J. G.; COWELL, R. R. **Microbial degradation of hydrocarbons in the environment**. Microbiological reviews. Washington, Estados Unidos, v. 54, n. 3, p. 305-315, Sep. 1990.

LEPSCH, I. F. **Solos Formação e Conservação Melhoramentos**. São Paulo, 1993.

LI, C.; BAI, Y.; JIAO, Z.e. **Influence of Pollution Concentration on Bioremediation of Petroleum-Contaminated Soil Engineering Research Center for Waste Oil Recovery Technology and Equipment**. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOINFORMATICS AND BIOMEDICAL ENGINEERING (ICBBE), 4, 2010. Proceedings... Piscataway, Nova Jersey: Institute of electrical and Electronic Engineers, 2010.

LI, L.; CUNNINGHAM, C. J.; PAS, V.; PHILP, J. C; BARRY D. A.; ANDERSON, P. **Field trial of new aeration system for enhancing biodegradation in a biopile**. Waste Management, v.24, p.127 – 137, 2004.

LIMA, C.A. **Quantificação do decréscimo do risco associado à biorremediação de um solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo**. [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro, Brasil: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2004.

LIN, Q.; MENDELSSOHN, I. **The combined effects of phytoremediation and biostimulation in enhancing habitat restoration and oil degradation of petroleum contaminated wetlands**. Ecological Engineering, Oxford, Inglaterra, v. 10, n. 3, p 263–274, June. 1998.

LIN, T. C.; PAN, P.T.; CHENG, S.S. **Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil**. Journal of Hazardous Materials, Amsterdam, Holanda, v. 176, n. 1-3, p. 27–34, Apr. 2010.

LIU, X. *et al.* **Retention–oxidation–adsorption process for emergent treatment of organic liquid spills**. Journal of Hazardous Materials, Amsterdam, Holanda, v. 195, n., p. 162-169, Nov. 2011.

LIU, Y et al. **Plant test of industrial waste disposal in a cement kiln**. Chinese Journal of Chemical Engineering, v.11, n.1, p.102-105, feb. 2003.

LOPES, J. A. **Viabilidade da tecnologia de biopilhas para o tratamento do solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo: área do Morro do Marzagão**. 2007.

Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia Ambiental) – Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, São Paulo, 2007.

LÓPEZ, D. A. R.; MUELLER, D. **Uso de peróxido de cálcio na biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos**. Caderno de Pesquisa série Biologia, v. 21, n. 3, p. 61-72, 2009.

LU, M. *et al.* **Remediation of petroleum-contaminated soil after composting by sequential treatment with Fenton-like oxidation and biodegradation**. Bioresource Technology, Essex, Inglaterra, v. 101, n. 7, p. 2106–2113, Apr. 2010.

LUCHESE, E.B.; FAVERO, L. O. B.; LENZI, E. **Fundamentos da química do solo**. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 2001. 182 p.

MCKENZIE, B. M.; DEXTER, A. R. **Methods for studying the permeability of individual soil aggregates**. Journal of agricultural engineering research, v. 65, n. 1, p. 23-28, 1996.

MANIASSO, N. **Ambientes micelares em química analítica**. Quím. Nova, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 87-93, jan./fev. 2001.

MANZO, S.; NICOLA, F.D.; PICIONE, F.D.L.; MAISTO, G.; ALFANI, A. **Assessment of the effect of soil PAH accumulation by a battery of ecotoxicological tests**. Chemosphere 71, 1937-1944, 2008.

MAKADIA, T., H *et al.* **Re-use of remediated soils for the bioremediation of waste oil sludge**. Journal of Environmental Management, Londres, v. 92, n. 3, p. 866-871, Mar. 2011.

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

MARIANO, A. P.; DANIEL D. M; ANGELIS, D. F.; ;PIRÔLLO, M. P. S.; CONTIERO, J. **Biodegradability of Commercial And Weathered Diesel Oils**. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 133-142, Jan/Mar. 2008.

MARIANO, A.P. *et al.* **Investigation about the efficiency of the bioaugmentation technique when applied to diesel oil contaminated soils**. Brazilian Archives of Biology and Technology, Curitiba, v. 52, n. 5, p. 1297-1313, Sept./Oct. 2009.

MARIANO, A. P. *et al.* **Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station**. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 346-353, June 2007.

MARIANO, A. P. **The Ecology of Stability in Southeast Asia's Forests: Biodiversity and Common**. Global Ecology and Biogeography Letters, Oxford, Inglaterra, v. 3 n. 4-6, p. 290-296, Jul./Sep./Nov. 1993. ISSN 0960-7447.

MARIANO, A.P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. 2006. 162 f. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MARQUES, M. **Fitorremediação de solos multicontaminados por HPAs e metais pesados a partir de óleo lubrificante usado**. Projeto aprovado pelo Edital Universal CNPq No 15/2007, Processo 475644/2007 no âmbito do Programa de Pesquisa Científica, Tecnológica e Inovação, MCT/CNPq, 2007.

MARQUES, M. *et al.* **Biopile to treat oil-contaminated soils: Brazilian experience**. Proceedings of Linnaeus EcoTech 2010 Linnaeus University, Suécia, 2010

MARTINI, L. C.; GUSMÃO, A. C. F. **Gestão ambiental na industrial Rio de Janeiro: Destaque**, 2003. 209 p.

MELLO, G. S. L.; MORITA, D. M.; MAFREDINI, S.; RIVIERA, I. N. G. **Viabilidade da aplicação do método respirométrico de bartha para determinação da biodegradação de poluentes ou resíduos em latossolos**. Escola de Engenharia Mauá, Eng. sanit. ambient., v. 12, n. 1, p. 71-78, 2007. (Artigo).

MENEZES, M. P.; RIZZO, A. C.L.; SANTOS, R. L. C. **Biorremediação ex-situ de solos contaminados por petróleo com a adição de material estruturante**. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15., [2007?], Rio de Janeiro. Trabalho... Rio de Janeiro: CETEM, [2007?].

MENICONI, M. F. G. *et al.* **Metodologias para diferenciação de fontes de hidrocarbonetos no meio ambiente para Ecossistemas estuarinos e terrestres: Relatório Parcial**. Rio de Janeiro: PETROBRAS, 2010. 60 f.

MESQUINA, A. C. **Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes**. 2004. 158 f. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Civil) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

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

MEURER, E. J. **Fundamentos de química do solo**. 2ª. Edição. Porto Alegre, p. 290. Gênese, 2004.

MIURA, K. **Um estudo sobre a segurança operacional na construção e reparo de poços marítimos de petróleo**. 2004. Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Petróleo) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

METIN, E.; ERÖZTÜRK, A.; NEYIM, C. **Solid waste management practices and review of recovery and recycling operations in Turkey**. Waste Management, Oxford, Inglaterra, v. 23, n. 5, p. 425-432, 2003.

MEUDEC, A. *et al.* **Relationship between heavy fuel oil phytotoxicity and polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in *Salicornia fragilis***. Science of the Total Environment, Amsterdam, Holanda, v 381, n. 1-3, p, 146-156, Aug. 2007.

MERKI, N.; SCHULTZE-KRAFT, R.; INFANTE, C. **Phytoremediation in the tropics e influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids**. Environmental Pollution, Barking, Inglaterra, v. 138, n. 1, p. 86-91, p. Nov. 2005.

MILARÉ, E. **Direito do Ambiente**. 2ª Ed. São Paulo: Revista dos Tribunais, 2001. 78 p.

MILCIC-TERZIC, J. *et al.* **Detection of catabolic genes in indigenous microbial consortia isolated from a diesel-contaminated soil**. *Bioresource Technology*, Essex, Inglaterra, v. 78, n. 1, p. 47-54, May. 2001.

MILLIOLI, V.S. **Avaliação da potencialidade da utilização de surfactantes na biorremediação de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo**. 2009. 200 f. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

MINAI-TEHRANI, D.; MINOUI, S.; HERFATMANESH, A. **Effect of salinity on biodegradation of polycyclic aromatic: hydrocarbons (PAHs) of heavy crude oil in soil**. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, Nova Iorque, v. 82, n. 2, p. 179–184, 2009..

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Secretaria de Defesa **Agropecuária**. Instrução normativa 62, de 22 de agosto de 2003. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14. Anexo IV.

MISHRA, S. *et al.* **Evaluation of Inoculum Addition To Stimulate In Situ Bioremediation of Oily-Sludge-Contaminated Soil**. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, Estados Unidos, v. 67, n. 4, p. 1675–1681, Apr. 2011.

MOHN, W. *et al.* **On site bioremediation of hydrocarbon-contaminated Arctic tundra soils in inoculated biopiles**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Berlim, v. 57, n. 1-2, p. 242–247, 2001.

MOLINA-BARAHONA, L. *et al.* **Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues**. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, Holanda, v. 27, n. 2, p. 165–175, Oct. 2004.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2 ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p (LIVRO).

MOUSSAVI, G.; KHOSRAVI, R.; FARZADKIA, M. **Removal of petroleum hydrocarbons from contaminated groundwater using an electrocoagulation process: batch and continuous experiments**. *Desalination*, Amsterdam, Holanda, v. 278, n. 1-3, p. 288-294, Sept. 2011.

MOURA, L. A. B. **Qualidade e Gestão Ambiental**. 2ed. São Paulo: Juarez de Oliveira, 2000. 228p.

MUGGLER, C. C.; PINTO-SOBRINHO, F. A.; MACHADO, V. A. **Educação em solos: princípios, teoria e métodos**. *R. Brás. Ci. Solo*, v. 30, n. 4, p. 733-740, jul./ago. 2006.

MUELLER, P.; BREIDENBACH, D.; HOFMAN, M. **Ist der Einsatz von speziell inLabor gezuchteten Mikroorganismen in der Bodensanierung sinnvoll**. In: STEGMANN, R. *Neue Techniken der Bodenreinigung*. Bonn: Econômica, 1996.

MUSEU DE SOLOS DO RIO GRANDE DO SUL. Disponível em: <<http://coralx.ufsm.br/msrs/textural.php>. Acesso em: 01 abril 2012>.

NAMKOONG, W.; HWANG, EUI-YOUNG; PARK, JOON-SEOK; CHOI, JUNG-YOUNG. **Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting**. Environmental Pollution, v. 119, n. 1, p. 23-31, 2002.

PEREIRA, P.F.S. **Perfil analítico da biodegradação de solos arenoso e argiloso contaminados por óleo cru**. [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro, Brasil: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

NATURAL RESOURCES CONSERVATION SERVICE. **Soils – Fundamental Concepts**. Disponível em: <<http://urbanext.illinois.edu/soil/concepts/concepts.pdf>>. Acesso em: 02 abr. 2012

NATURAL RESOURCES CONSERVATION SERVICE. **Soil Quality Information Sheet**. January 1998 Disponível em: http://soils.usda.gov/sqi/assessment/files/available_water_capacity_sq_physical_indicator_sheet.pdf

NEBRA, Y.; BONJOCH, X.; BLANCH, A. R. **Use of *Bifidobacterium dentium* as an indicator of the origin of fecal water pollution**. Applied And Environmental Microbiology, v. 69, n. 5, p. 2651-2656, May, 2003.

NEWMAN, M. C.; CLEMENTS, W. H. **Ecotoxicology: a comprehensive treatment**. Boca Raton: Taylor & Francis. 2008.

NOCENTINI, M.; PINELLI, D.; FAVA, F. **Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixtures: the residual concentration problem**. Chemosphere, Oxford, Inglaterra, v. 41, n. 8, p. 1115-1123, Oct. 2000.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**, 3ª Ed., Editora Atheneu, São Paulo, 2008;

OGBO, E. M. **Effects of diesel fuel contamination on seed germination of four crop plants: *Arachis hypogaea*, *Vigna unguiculata*, *Sorghum bicolor* and *Zea mays***. African Journal of Biotechnology, Nairóbi, Kenya, v. 8, n. 2, p. 250-253. Jan. 2009.

OLIVEIRA, D. S.; BAISCH, P. R. M.; MACHADO, M. I. **Degradação do petróleo em ambiente estuarino da lagoa dos Patos através de um derrame induzido**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS, 4, 2007, Campinas, SP. Anais... Campinas: DPETRO, 2007.

OLIVEIRA, F. J. S. de. **Biorremediação de solo arenoso contaminado por óleo cru**. 2001. 101 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

OLIVEIRA, J. B. **O novo sistema brasileiro de classificação de solos**. O Agrônomo, Campinas, v 53, n. 1, p. 8-11, 2001.

OLIVEIRA, M. L. *et al.* **Pirólise de resíduos poliméricos gerados por atividades offshore.** Polímeros, São Carlos, v. 19, n. 4, p. 297-304, 2009.

OROPEZA, M, V. C. **Avaliação do método Wavelet-Galarkin multi-malha para caracterização das propriedades de petróleo e subprodutos.** 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo. 2007.

PARAG, R; GOGATE, A. B. **A review of imperative technologies for wastewater treatment II: hybrid methods.** Advances in Environmental Research, v. 8, p. 553–597, Apr. 2003.

PENGA S. *et al.* **Phytoremediation of petroleum contaminated soils by *Mirabilis Jalapa* L:** in a greenhouse plot experiment. Journal of Hazardous Materials, Amsterdam, Holanda, v. 168, p. 1490–1496, 2009.

PENNER, G. C. **Estudos laboratoriais da contaminação do solo por gasolina com o uso de detector de fotionização.** 2000. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade de São Carlos, São Carlos, 2000.

PEREIRA, P. F. S. **Perfil analítico da biodegradação de solos arenoso e argiloso contaminados por óleo cru.** 2008. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

PEREIRA, J. R. P.; PEGORETTI, V. C. B., LELIS, M. F. F. **Degradação de compostos orgânicos em meio aquoso por meio de processos oxidativos avançados em presença de FE3-XCOXO4.** Revista Capixaba de Ciência e Tecnologia, Vitória, v.2, n. 3p.1-6, 2007.

PETROBRAS – **Banco de Imagens**, Rio de Janeiro, 2011.

PETROBRAS – Norma Técnica N-2622C: **Resíduos industriais**. Rio de Janeiro, 2010.

PETRONI, S. L. G.; PIRES, M. A. F.; MUNITA, C. S. **Adsorção de cádmio em colunas de turfa.** Química Nova, 23 (4) (2000).

PIERINI, C. **Caracterização de paleossolos aluviais em bacias sedimentares mesozóicas:** determinação dos controles sedimentares e implicações paleoambientais. 2006. Tese (Doutorado em Geociências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

PLESSIS, C. A. *et al.* **Bioremediation of soil contaminated with hydrocarbons and heavy metals:** 1995. In: HINCHEE, R. E. *et al.* Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons. Columbus: Battelle Press, 1995. p.107-113.

PORTIER, R. J.; IQBAL, J.; METOSH-DICKEY, C A.; DAVIS. T. M. **Managing Bioremediation of a Creosote-Contaminated Superfund Site by Optimizing Moisture and Temperature in a Biopile:** Wiley Interscience. Wiley Periodicals, 2007

PRINCE, R.C., GAREM R.E., GARRETT, R.M., GROSSMAN, M.J., HAITH, C.E., KEIM, L.G., LEE, K., HOLTOM, G.J., LAMBERT, PL, SERGY, G.A., OWENS, E.H.,

GUÉNETTE, C.C. **Bioremediation of stranded oil on an Arctic shoreline.** Spill Science & Technology Bulletin, 8:303-312. 2003.

POZDNYAKOVA, Larisa; POZDNYAKOV, Anatoly; ZHANG, Renduo. **Application of geophysical methods to evaluate hydrology and soil properties in urban areas.** Urban Water, v. 3, n. 3, p. 205-216, 2001.

PYROGENESIS ENERGY FROM INNOVATION. Montreal, Canada. Disponível em: www.pyrogenesis.com

QUEIROZ, S.C.N.; FERRACINI, V.L.; SOUZA, D.R.C.d. **Métodos de extração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostra de solo, sedimento e lodo.** Embrapa Meio Ambiente, 15 p., Jaguariúna, 2009.

RAMOS, A.; Egler, S.; César, R.; Rodrigues, A. P.; Cardoso, J. L.; Castilhos, Z. C.. **Testes de ecotoxicidade utilizando minhocas da espécie Eisenia foetida para avaliação da contaminação mercurial em solos.** 2007.

RAMOS, Luiz Pereira *et al.* **Biodiesel: um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil.** Curitiba, [s.n.] 2008. Disponível em: <<http://www.resol.com.br/textos/Biodiesel.pdf>>. Acesso em: 27 dez. 2011.

REINECKE, A. J. REINECKE, S. A. **Earthworms as test organisms in ecotoxicological assessment of toxicant impacts on ecosystems.** In: EDWARDS, Clive A. Earthworms and Environmental. Pollution: Earthworm Ecology. 2. ed. Boca Raton: CRC; 2004. Cap. 8.

REISINGER, H. J. **Hydrocarbon bioremediation: an overview.** 1995. In: HINCHEE, R. E. *et al.* Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons. Columbus Battelle Press, 1995. p.1-9.

REVISTA MEIO AMBIENTE INDUSTRIAL. São Paulo: Editora Tocalino, jul. 2003.

RHYKERD, R. L. *et al.* **Impact of bulking agents, forced aeration, and Tillage on remediation of oil-contaminated soil.** Biosource Technology, v.67, p.279-285, 1999.

RIBEIRO, M. P. **Aplicação de termogravimetria acoplada à espectrometria de massas para caracterização de petróleo e determinação da curva de evolução de gás sulfídrico.** 2009. 110 f. Dissertação (Mestrado em ciências e Engenharia do Petróleo) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

RIBEIRO, R. A. **Correlações nos DFA de diversos perfis geológicos: estudo de caso: bacia de campos: Rio de Janeiro.** 2010. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia do Petróleo) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

RIKE, A. G.; HAUGEN, K. B.; ENGENE, B. **In situ biodegradation of hydrocarbons in arctic soil at sub-zero temperatures: field monitoring and theoretical simulation of the microbial activation temperature at a Spitsbergen contaminated site.** Cold Regions Science and Technology, Amsterdam, Holanda, v. 41, n. 3, p. 189– 209, Mar. 2005.

RIZZATTI, I. M.; ZANETTE, D. R.; MELLO, L. C. **Determinação potenciométrica da concentração micelar crítica de surfactantes: uma nova aplicação metodológica no ensino de química.** Quim. Nova, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 518-521, 2009.

RIZZO, A. C. L.; RAIMUNDO, R. S. **Utilização de biorreatores no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo.** In: JORNADA DA INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10., 2002. Anais... Rio de Janeiro, CETEM, 2002.

RIZZO, A. C. L., *et al.* **Biorremediação de solos contaminados por petróleos: ênfase no uso de biorretadores.** Série Tecnologia Ambiental. Anais....CETEM, 2007.

RIZZO, A. C. L.; RAIMUNDO, R. S. **Emprego de biorreator não convencional no tratamento de solo contaminado por petróleo.** In: JORNADA DA INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12., 2004. Trabalho... Rio de Janeiro, CETEM, 2004.

RIZZO, A. C. L., CUNHA, C.D.; SANTOS, R. L. C.; SANTOS, R. M.; MAGALHÃES, H. M.; LEITE, S. G. F.; SORIANO, A. U.; **Preliminary identification of the bioremediation limiting factors of a clay bearing soil contaminated with crude oil.** Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 19, n. 1, 169-174, 2008.

ROCHA, S. D. F.; LINS, V. F. C.; SANTOS, B. C. E. **Aspectos do coprocessamento de resíduos em fornos de clínquer.** Engenharia Sanitária Ambiental, v. 16, n. 1, p. 1-10, jan/mar 2011.

ROCHA, O. R. S. **Avaliação de diferentes processos oxidativos avançados no tratamento de resíduos de petróleo.** 2010. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

ROJAS-AVELIZAPA, N. G. *et al.* **A field trial for an ex-situ bioremediation of a drilling mud-polluted site.** Chemosphere, v. 66, p. 1595-1600, 2007.

RUTTENS, A. *et al.* **Phytostabilization of a metal contaminated sandy soil: influence of compost and/or inorganic metal immobilizing soil amendments on phytotoxicity and plant availability of metals.** Environmental Pollution, v.144, p. 524-532, 2006.

SAIM, N.; DEAN, J.R.; ABDULLAH, M.P.; ZAKARIA, Z. **Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil using Soxhlet extraction, pressurized and atmospheric microwave-assisted extraction, supercritical fluid extraction and accelerated solvent extraction.** Journal of Chromatography A, 791: 361-366, 1997.

SALANITRO, J. P.; DORN, P. B; HUESEMANN, M. H.; MOORE, K. O.; RHODE S, I. A.; JACKSON, L. M. R.; VIPOND, T. E.; WESTERN, M. M.; WISNIEWSKI, H. L. **Crude Oil Hydrocarbon Bioremediation and Soil Ecotoxicity Assessment.** Environmental Science & Technology. 31: 1769-1776.1997

SANSCARTIER, D. *et al.* **Bioremediation of diesel-contaminated soil by heated and humidified biopile system in cold climates.** Cold Regions Science and Technology, v. 55, p. 167–173, 2009.

SANSCARTIER, D.; LAING, T.; REIMER, K.; ZEEB, B. **Bioremediation of weathered petroleum hydrocarbon soil contamination in the Canadian high arctic: laboratory and field studies.** Chemosphere, v. 77, p. 1121–1126, 2009.

SANTOS, E.C., SILVA, I.S., SIMÕES, H.N., SIMIONI, K.C.M., OLIVEIRA, V.M., GROSSMAN, M.J., DURRANT, L.R. **Correlation of soil microbial community responses to contamination with crude oil with and without chromium and copper.** International Biodeterioration & Biodegradation. 70:104-110. 2012.

SANTOS, R. M. **Avaliação da adição do pó da casca de coco verde, como material estruturante, na biorremediação de solo contaminado por petróleo.** 2007. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Relatório de estabelecimento de Valores **Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo.** São Paulo, 2001. 73 p. (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental).

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.

SCHOEFS, O.; DESCHÊNES, L.; SAMSON, R. **Efficiency of a new covering system for the environmental control of biopiles used for the treatment of contaminated soils: Industrial Chair In Site Bioremediation.** Montreal: Ecole Polytechnique de Montreal, 1998.

SCHAEFER, M. **Behavioral endpoints in earthworm ecotoxicology: evaluation of different test systems in soil toxicity assessment.** J Soils & Sediments, v. 3, n. 2, p. 79 – 84, 2003.

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

SCHOWANEK, D. *et al.* **A risk-based methodology for deriving quality standards for organic contaminants in sewage sludge for use in agriculture: conceptual framework.** Regulatory Toxicology and Pharmacology, v. 40, p. 227–251, 2004.

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

SEABRA, P. *et al.* **Bioremediation of crude oil contaminated tropical soil in bench-scale piles.** Environmental Engineering and Management Journal, v. 5, n. 3, p 399-406, Sept. 2006.

SEABRA, P. **Curso de tratamento de solos e aquíferos: bioventilação e bioslurping.** [Apresentação em slides]. Out. 2004.

SECRON, M. B. *et al.* **Controle da poluição hídrica gerada pelas atividades automotivas.** Série gestão e planejamento ambiental. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2010.

SEKLEMOVA, E.; PAVLOVA, A.; KOVACHEVA, K. **Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel: field demonstration.** *Biodegradation*, v. 12, p. 311–316, 2011.

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.

SHUKLA, K.; SINGH, N. K.; SHARMA, S. **Bioremediation: Developments, Current Practices and Perspectives: Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, 2010.

SIDDIQUE, T.; OKEKE, B.C.; ARSHARD, M; FRANKENBERGER, W. T. Jr. **Temperature and pH effects on biodegradation of hexachlorocyclohexane isomers in water and soil slurry.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 5070–5076, 2002. (ARTIGO).

SILVA, A. C. *et al.* **Bioremediation of Marine Sediments Impacted by Petroleum.** *Appl Biochem Biotechnol*, v. 26, 2008.

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

SILVA, G. **Bioestímulo e bioaumento na remediação de solo contaminado com óleo lubrificante usado: escala piloto.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, 2010.

SILVA, S. R.; TONHOLO, J.; ZANTA, C. L. P. S. **Aplicação de processos oxidativos avançados no tratamento de água produzida de petróleo.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE P&D EM PRETRÓLEO E GÁS, 3, 2005, Salvador. Anais... Salvador, IBP, 2005.

SILVA, R. J.; ARAÚJO, S. **Co-processamento de resíduos industriais em fornos rotativos de fábricas de cimento.** In: WORKSHOP CO-PROCESSAMENTO DE RESÍDUOS NA INDÚSTRIA DE CIMENTO, 7, 2003, Belo Horizonte, Anais... Belo Horizonte: UFMG/EE, 2003. 1 cd-rom.

SINGH, A.; WARD, O. P. **Biodegradation and bioremediation.** 3 ed. Springer, 2004. 308 p.

SMIT, C. E.; GESTEL, C. A. M. V. **Effects of soil type, percolation, and ageing on bioaccumulation and toxicity of zinc for the springtail *Folsomia candida*.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 17, n. 6, p. 1132–1141, 1998.

SMITH, M. J. *et al.* **Study of PAH dissipation and phytoremediation in soils: Comparing freshly spiked with weathered soil from a former coking works.** *Journal of Hazardous Materials*, v. 192, p. 1219–1225, 2011.

SOLEIMANI, M. *et al.* **Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses.** *Chemosphere*, v. 81, p. 1084–1090, 2010.

SPECIAL Abstracts. *Journal of Biotechnology*, v. 150, p.S1–S576, 2010.

SPINELLI, A. C. O. C. **Biorremediação ao de solo argiloso contaminado por hidrocarbonetos poliaromáticos provenientes de derrame de óleo diesel.** 2007. Tese (Doutorado em Geociências) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2007.

SPURGEON, D. J.; HOPKIN, S. P. **Effects of metal-contaminated soils on the growth, sexual development, and early cocoon production of the earthworm *Eisenia foetida*, with particular reference to zinc.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 35, p. 86–95. 1996.

SZENETE, R. N. **Tecnologias Inovadoras Aplicadas ao Tratamento de Resíduos.** [Workshop- Google – slides]. Disponível em: <<http://www.slideserve.com/presentation/188223/Tecnologias-Inovadoras-Aplicadas-ao-Tratamento-de-Res-duos-.>> Acesso em: 02 jan. 2012.

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T; BANAL, I. M. **Biosurfactant production by *Corynebacterium kutscheri* from waste motor lubricant oil and peanut oil cake** *Letters in Applied Microbiology*, 45: 686–691, 2007.

TIQUIA, S. M.; TAM, N. F. Y. **Elimination of phytotoxicity during co-compositioning of spent pig-manure sawdust litter and pig sludge.** *Bioresource Technology*, Essex, Inglaterra, v. 65, n. 1-2, p. 43-49, July./Aug. 1998.

TORRES, C. A. R. **Gestão ambiental e resolução de conflitos:** licenciamento de dutovias no litoral de São Paulo. 2006. Dissertação (Mestrado em Gestão de Negócios) – Universidade Católica de Santos, Santos, 2006.

TRINDADE, P.V.O. **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.

TRINDADE P.V.O.; SOBRAL L.G.; RIZZO A.C.L; LEITE S.G.F.; SORIANO A.U. **Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study.** *Chemosphere*, 58: 515-522. 2005.

TRUAX, D. D.; BRITTO, R.; SHERRARD, J. H. **Bench-scale studies of reactor-based treatment of fuel-contaminated soils.** *Waste management*, Oxford, Inglaterra, v. 15, n. 5-6, p. 351-357, 1995.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME - UNEP. **Expert Group on Best Available Techniques and Best Environmental Practices First meeting:** Compilation of comments received from Parties and others on the draft Guidelines on Best Available Techniques and provisional Guidance on Best Environmental Practices Geneva, Switzerland, 28 Nov.–2 Dec. 2005

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – USEPA **Enhanced aerobic bioremediation.** In: How to evaluate alternative cleanup technology for underground storage tank sites: a guide corrective action plan reviews. EPA 5010-R-04-002 May 2004, 69p.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – (U.S. EPA) 2001 - Superfund. Pesquisa geral a homepage. Disponível em <<http://www.epa.gov/superfund/>>. Acesso em: 24 dez. 2011.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA), **Method 8015D**: Nonhalogenated Organics using GC/FID, Rev. Jun., 2003.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA), **Method 82705D**: Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS), Rev. Jan., 1998.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Method 3535**: Solid-phase extraction (SPE), 1996.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Method 3540C**: Soxhlet extraction, 1996.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Method 3545**: Pressurized fluid extraction (PFE), 1996;

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Method 3550C**: Ultrasonic Extraction, Rev. 3, Feb., 2007.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA **Biopiles** Disponível em: http://www.epa.gov/oust/pubs/tum_ch4.pdf.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – USEPA **Hazardous Waste Incinerators** (40 CFR Parts 264/265, Subpart O). EPA530-R-99-052 PB2000-101 892 February 2000.

URURAHY, A., F. P.; MARTINS, M. D. M.; PEREIRA JUNIOR, N. **Desempenho de um biorreator do tipo CSTR no processo de degradação de borra oleosa**. In: Bol. Téc. Petrobrás, v. 41, n. 3/4, p. 125-132, Jul./Dez. 1998.

USOWICZ, B.; KOSSOWSKI, J.; BARANOWSKI, P. **Spatial variability of soil thermal properties in cultivated fields**. Soil & Tillage Research, v. 39, n. 1-2, p. 85- 100, Nov. 1996.

U. S. Department of Agriculture (USDA). **Natural Resources Conservation Service Soil Quality Information Sheet**. Soil Quality Resource Concerns: Available Water Capacity. January 2011.

VALE, T. Y. F. **Desenvolvimento de tensoativos e sistemas microemulsionados para recuperação de petróleo**. 2009. 135 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

VALERIO, M. E.; GARCÍA, J. F.; PEINADO, F. M. **Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.)**. Science of the Total Environment, Amsterdam, Holanda, v. 378, n. 1-2, p. 63–66, May. 2007.

VAN GESTEL, K. *et al.* **Bioremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste.** Environmental Pollution, Barking, Inglaterra, v. 125, n. 3, p. 361-368, Oct. 2003.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A., WARD, O. P. **Recent advances in petroleum microbiology.** Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 67, n. 4, p. 503-549, 2003.

VASCONCELOS, U.; FRANÇA, F. P. de; OLIVEIRA, F. J. S. **Removal of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons.** Quim. Nova, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 218-221, 2011.

VAZ, M. J. **Biodegradação ex-situ e avaliação da atividade biológica de solos contaminados por hidrocarbonetos.** [Dissertação de Mestrado]. Santa Cruz do Sul, Brasil: Universidade de Santa Cruz do Sul, 2010.

VECCHIOLI, G. I.; DEL PANNO, M. T. PAINCEIRA, M. T. **Use of Selected Autochthonous Soil Bacteria to Enhance Degradation of Hydrocarbons in Soil.** Environmental Pollution, Barking, Inglaterra, v. 67, n. 3, p. 249-258, 1990.

VERMA, V. K.; SINGH, Y. P.; RAI, J. P. N. **Biogas production from plant biomass used for phytoremediation of industrial wastes.** Bioresource Technology, Essex, Inglaterra, v. 98, p. 1664–1669, May. 2007.

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

VIELMO, A. L. **Limite superior da retenção da água no solo: método de campo e método de estimativa.** [Dissertação de Mestrado]. Rio Grande do Sul, Brasil: Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

VOLPON, A. G. T.; VITAL, R. L.; CASELLA, R. C. **Método NMP em microescala para contagem de microrganismos consumidores de hidrocarbonetos.** Comunicação técnica SEBIO N. 06/68. 1997.

WALKLEY, A & BLACH, L. A. **Na examination of the Detjareff method for determining soil organic matter and propose modification of the chromic titration methods.** Soil Science. vol. 37 pp. 29-38. 1934. *Apud* JARAMILLO, I. R. Fundamentos teóricos-práticos de temas selectos de la ciência del suelo. Parte 1 Universidad Autónoma Metropolitana, México, 1996.

WANG, W.; MENG, B.; LU, X.; LIU, Y.; TAO, S. **Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: A comparison between Soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques,** Analytica Chimica Acta, 602: 211-222, 2007.

WATANABE, K. *et al.* **Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities.** Applied and Environmental Microbiology, Washington, Estados Unidos, v. 66, n. 11, p. 4803–4809, Nov. 2000.

WETLER, R. M. C. **Prospecção de microrganismos responsáveis pela degradação de compostos de petróleo no sedimento de um manguezal localizado no sul da Bahia (Brasil)**. 2006. 100 f. [Dissertação de mestrado]. Ilhéus, Brasil: Universidade Estadual de Santa Cruz, 2006.

WIDDEL, F.; RABUS, R. **Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons**. *Current Opinion in Biotechnology*, Londres, v. 12, n. 3, p. 259–276, June. 2001.

WITTERS, N. *et al.* **Phytoremediation, a sustainable remediation technology? Conclusions from a case study: I** Energy production and carbon dioxide abatement. *Biomass and Bioenergy*, Oxford, Inglaterra, v. 39, n. , p. 1-16, Apr. 2012.

XAVIER, N. M.; AGUDELO, L. M. G.; THOMÉO, J. C. **Característica de movimentação e mistura de partículas de um bioreator rotativo para fermentação em estado sólido**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8, 2009, Uberlândia. Anais... Uberlândia, Cobeqic, 2009. 7 f.

YANG, Si-Zhong *et al.* **Bioremediation of Oil Spills In Cold Environments: a Review**. *Pedosphere*, Pequim, v. 19, n. 3, p. 371–381, 2009.

YERUSHALMI, L.; ROCHELEAU, S.; CIMPOIA, R.; SARRAZIN, M. SUNAHARA, G.; PEISAJOVICH, A LECLAIR, G.; GUIOT, S.R. **Enhanced biodegradation of petroleum hydrocarbons In contaminated soil**. *Bioremediation Journal*, vol. 7, p. 37-51, 2003.

ZHOU, E.; CRAWFORD, R. **Effects of oxygen, nitrogen, and temperature on gasoline biodegradation in soil**. *Biodegradation*, Dordrecht, Holanda, v. 6, n. 2, p. 127-140, 1995.

ZÍLIO, E. L.; PINTO, U. B. **Identificação e Distribuição dos Principais Grupos de Compostos Presentes nos Petróleos Brasileiros**. In: *Bol. Téc. Petrobrás*, v. 45, n. 1, p. 21-25, jan./mar. 2002.

APÊNDICE A - Manuscrito 1

Estudo Comparativo de Técnicas de Extração de HTP e HPA de solos argiloso e arenoso: Soxhlet, Micro-ondas e Extração Acelerada por Solvente

Sanye Soroldoni Guimarães¹, Jorge Antônio Lopes², Graciane Silva³, Marcia Marques^{1,11}

¹*Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias-LABIFI, Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente-DESMA, Universidade do Estado do Rio de Janeiro-UERJ*

²*Transpetro*

³*Estre Ambiental*

RESUMO O objetivo do presente trabalho foi comparar as técnicas de Soxhlet (SOX), microondas (MARS) e extração acelerada por solvente (ASE), quanto à eficiência na extração de diferentes frações de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), a partir de matrizes de solo arenoso e solo argiloso com contaminação antiga. Além da eficácia do método de extração, para fins comparativos foram considerados o consumo de solvente, de água e o tempo de preparo e de extração. Para extração de HTP de solo argiloso, o uso do ASE resultou em melhor recuperação dos n-alcanos e hidrocarbonetos resolvidos de petróleo-HRP; já o uso do SOX e do MARS resultou em melhor recuperação para a fração mais pesada (mistura complexa não resolvida-MCNR). Para extração de HTP de solo arenoso o uso do ASE apresentou melhor resultado para todas as frações. No caso dos HPA a extração por ASE foi a que apresentou melhor resultado, tanto para solo argiloso quanto para solo arenoso. Quanto aos outros fatores considerados (economia de solvente, água e tempo), o MARS é o método mais econômico, particularmente quando o HTP é o grupo de interesse e os n-alcanos são relativamente menos importantes. Dessa forma, em contaminações antigas, a classe textural de solo além da fração de hidrocarbonetos de interesse em primeiro lugar e a disponibilidade de tempo/recursos financeiros além da possibilidade de recuperação do solvente em segundo lugar, devem ser consideradas para a escolha do método de extração.

Palavras-chave: métodos de extração. cromatografia gasosa. solo contaminado. HTP. HPA.

ABSTRACT The objective of this study was to compare three extraction methods (Soxhlet-SOX, microwave-MARS and accelerated solvent extraction-ASE), regarding the extraction efficiency for different fractions of total petroleum hydrocarbons (TPH) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) from aged-contaminated sandy and clayey soils. Besides the extraction efficiency, the methods were compared regarding consumption of solvent, water and time during preparation and extraction procedures. For extraction of n-alkanes and Resolved Petroleum Hydrocarbons-RPH fractions of TPH from clayey soil, ASE was more efficient; SOX and MARS performed better for TPH heavier fraction (Unresolved Complex Mixture-UCM). For sandy soil, ASE performed better for all fractions. In the case of PAH, ASE performed better for both clayey and sandy soil. Regarding other criteria (solvent, water and time savings), MARS was the most economic method, particularly when TPH is the group of interest and when n-alkanes are not the main focus. Therefore, regarding aged-

¹¹ Corresponding author: Rua São Francisco Xavier, 524, sl 5024E, Maracanã, Rio de Janeiro, RJ, CEP Brasil. E-mail: marciam@uerj.br; tel: +5521-23340959.

contaminated soils, the textural class of the soil, the group of hydrocarbons of interest, in the first place and, the availability of resources and the possibility of solvent recovery in the second place should be taken into account before selecting the extraction method.

Keywords: extraction methods. gas chromatography. contaminated soil. TPH. PAH

Introdução

O petróleo possui compostos que, quando dispostos no meio ambiente de forma incorreta, acarreta danos à saúde e ao meio ambiente (Oga, 2008). Hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) é um termo utilizado para descrever vários compostos originados do óleo cru. A determinação de HTP é frequentemente utilizada na avaliação de áreas impactadas por derramamento de petróleo (Ferreira, 2010). Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são compostos caracterizados por possuírem dois ou mais anéis aromáticos estando amplamente distribuído nos compartimentos ambientais, sendo considerados poluentes prioritários, pois são conhecidamente tóxicos e carcinogênicos (IARC, 2000; Manzo *et al.*, 2008; Oga, 2008). A análise dos HTP e HPA nas matrizes ambientais passa, obrigatoriamente, pelo processo de extração e separação por cromatografia gasosa. Diferentes métodos são utilizados para a extração de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) da matriz solo. A eficiência de uma técnica de extração depende do método de extração, da idade da contaminação, do solvente utilizado, temperatura, dentre outros fatores. Tradicionalmente, a extração de HTP e HPA de solo é realizada através da técnica de Soxhlet, pelo método 3540 US.EPA (EPA,1996), no entanto, essa técnica requer grande tempo de extração (6-24 h), consome um grande volume de solvente e pode resultar da destruição de compostos termo-lábeis (Queiroz *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2007). Nesse sentido, novas técnicas de extração vêm sendo utilizadas com o intuito de diminuir o tempo de extração e o gasto com solvente, além de manter a eficiência na extração dos compostos. Essas técnicas incluem extração assistida por micro-ondas (MARS) e extração acelerada por solvente (ASE). A técnica de extração assistida por micro-ondas (MARS), método 3535 da U.S. EPA (EPA, 1996) envolve o uso da energia de micro-ondas para produzir condições de elevada temperatura e pressão em um recipiente fechado contendo a amostra e o solvente orgânico. Suas vantagens são o baixo uso de solvente e tempo de extração e a possibilidade de fazer várias amostras simultaneamente. No entanto, o custo do equipamento é mediano e é necessário um treinamento mais apurado para o operador (Wang *et al.* 2007). A técnica de extração acelerado por solvente acelerado (ASE) - Método 3445, da U.S. EPA (EPA, 1996), o solvente é aquecido, pressurizado e passado pela amostra. Esse método apresenta eficácia de extração comparada ao Soxhlet. Além disso, requer uma quantidade pequena de solvente e curto tempo de extração. A desvantagem é o alto custo do equipamento, além do custo pelo uso do gás nitrogênio (Ferreira, 2010). Berset *et al.* (1999), afirmam que uma boa técnica de extração é definida como aquela que remove a maior quantidade dos compostos de interesse, quando, para esses solos, não existirem valores de referência.

O presente trabalho tem como objetivo comparar as técnicas de extração por Soxhlet, MARS e ASE para HTP e HPA em solo argiloso e arenoso com histórico de contaminação antiga em concentrações relativamente baixas, cenário comum quando uma área contaminada requer avaliação da eficácia de tecnologias de remediação aplicadas e no qual, a eficácia da extração é de grande relevância.

Materiais e Métodos

Solo e substâncias químicas utilizadas

Para efeitos de comparação, foram utilizadas amostras de dois tipos de solo, a saber: (I) solo proveniente de escavação de uma instalação antiga de armazenamento de petróleo e derivados, em funcionamento desde 1951, no Estado de São Paulo, classificado como Franco Argiloso (solo argiloso com contaminação antiga); (II) solo proveniente de uma área em Seropédica, no Estado do Rio de Janeiro, com histórico de contaminação identificada e quantificada em estudo anterior (Ciannella, 2010) conduzido pelo grupo de pesquisa, classificado como Planossolo Distrófico Típico (solo arenoso com histórico de contaminação, conforme Ciannella, (2010). As amostras foram mantidas em refrigeração e para a extração inicialmente foram secas em estufa e peneiradas (2 mm).

Os solventes utilizados no processo de extração foram diclorometano (DCM) e acetona (grau pesticida marca Tedia). O sulfato de sódio anidro (marca Vetec) foi calcinado em mufla por 4 h a 600 °C e permaneceu em dessecador selado até seu uso. Toda a vidraria, peças dos equipamentos e utensílios foram limpos com DCM. Para HTP foi utilizado Mix 1 de n-alcenos (C₁₂ a C₄₄) e para HPA, foi utilizado Mix 3 com os 16 HPA (Naftaleno, Acenafaleno, Acenaftileno, Fluoreno, Fenantreno, Pireno, Benzo(a)antraceno, Criseno, Benzo(k)fluoranteno, Benzo(a)pireno, Dibenzo(a,h) antraceno, indeno(1,2,3-cd)pireno e Benzo(g,h,i)perileno), e como padrão interno o Semivolatile Internal Standard Mix (D10 Acenaphthene, Chrysene D12, Naphthalene D8, Perylene D12, Phenanthrene D10 e 1,4-Dichlorobenzene D4), todos da marca Supelco.

Extração

As extrações foram em triplicatas para cada solo, método e grupo de hidrocarbonetos. A cada amostra destinada à análise de HPA, foram adicionados 10 µl de HPA mix3. A cada amostra destinada à análise de HTP, foram adicionados 10 µl de HTP mix1.

Extração com Soxhlet

A extração por Soxhlet foi realizada utilizando 5 g da amostra de solo adicionando-se 5 g de sulfato de sódio. A mistura era então transferida para o cartucho de celulose acoplado à coluna de extração. Em balão de fundo redondo eram vertidos 180 mL de DCM e a extração era realizada por 16 h, em temperatura de 150 °C. Após a extração, o extrato era acondicionado em um balão volumétrico de 100 mL colocado sob refrigeração até a realização da análise cromatográfica.

Extração por micro-ondas

O equipamento utilizado para extração foi o CEM MARS *Xpress Microwave Reaction System* (CEM Corporation). A extração por MARS foi realizada com 5 g da amostra de solo através da adição de 5 g de sulfato de sódio. A mistura era vertida para um frasco de teflon do próprio equipamento sendo que 25 mL de DCM eram adicionados em cada frasco antes de colocá-los em ordem no carrossel localizado dentro da cavidade do forno de micro-ondas. A temperatura ia de 110 °C a 115 °C e a pressão de 50 a 150 psi com tempo de aquecimento de 10 a 20 min. Após a extração, o resfriamento ocorria em temperatura ambiente. Os vials eram então abertos e o extrato filtrado em um papel de filtro utilizando-se um piset com DCM para retirar todo o solo do vial. O extrato era acondicionado em balão volumétrico de 100 mL e colocado em ambiente refrigerado até a realização da análise cromatográfica.

Extração por ASE

A extração acelerada por solvente (*accelerated-solvent extraction-ASE*) utilizando-se o modelo de extrator acelerado 350 da Dionex foi realizada com 5 g da amostra de solo com adição de 5 g de sulfato de sódio. A mistura era vertida para o frasco de aço do próprio equipamento. A extração era realizada com uma mistura de DCM e Acetona (1:1) a 140 °C e

1500 psi de pressão durante 7 min de aquecimento seguidos de 5 min de extração estática. Os vials eram rinsados com 17 mL da mistura de solventes e o extrato purgado por uma membrana de filtração da mesma marca do equipamento, utilizando-se N₂ pressurizado a 1550 psi. Todo o procedimento de extração durava aproximadamente 30 min. Após extração, o extrato era acondicionado em um balão volumétrico de 100 mL e colocado em ambiente refrigerado até a realização da análise cromatográfica.

Análises cromatográficas

As análises cromatográficas dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) foram realizadas em um GC/MS Agilent (modelo 7890A) acoplado a um espectrômetro de massas da mesma marca (modelo 5975C), com detector por ionização de chama (FID), equipado com uma coluna capilar Agilent modelo DB-1MS (30 m; 0,25 mm; 0,25 µ). O gás de arraste utilizado era o Hélio na vazão de 1 mL min⁻¹, sem divisão de fluxo. O volume de injeção era de 1,0 µL. A temperatura do injetor era de 290 °C. A quantificação das amostras foi realizada através de padronização externa, tendo como referência a metodologia da U.S. EPA 8000. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) foram analisados utilizando-se como referência o método 8015 da U.S. EPA. As análises foram realizadas no mesmo cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas, com detector de eixo triplo, equipado com coluna capilar marca Agilent modelo DB-5MS (30 m; 0,25 mm; 0,25 µ). O gás de arraste utilizado também foi o Hélio na mesma vazão de 1 mL min⁻¹, sem divisão de fluxo (splitless). A temperatura do injetor era de 290 °C. O volume de injeção foi de 1,0 µL. Os HPA foram determinados pelo monitoramento do íon seletivo.

Variáveis adicionais utilizadas na comparação dos métodos de extração

Para a escolha do melhor método de extração, além da (i) eficácia da extração e recuperação dos HTP e dos HPA foram analisadas outras variáveis nesta ordem de importância (ii) consumo de solvente por extração; (iii) consumo de água por extração; (iv) tempo de preparação e de extração por amostra. Foram determinadas notas de classificação sendo (1) ruim; (2) regular; (3) bom. Os seguintes pesos foram aplicados para cada variável: (1) menos relevante; (2) relevante; (3) muito relevante.

Análises estatísticas

Foi utilizado o teste paramétrico one way ANOVA seguido do teste de comparação de Tukey. O programa utilizado foi o GraphPad Prism versão 5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração de HTP por Soxhlet, MARS e ASE

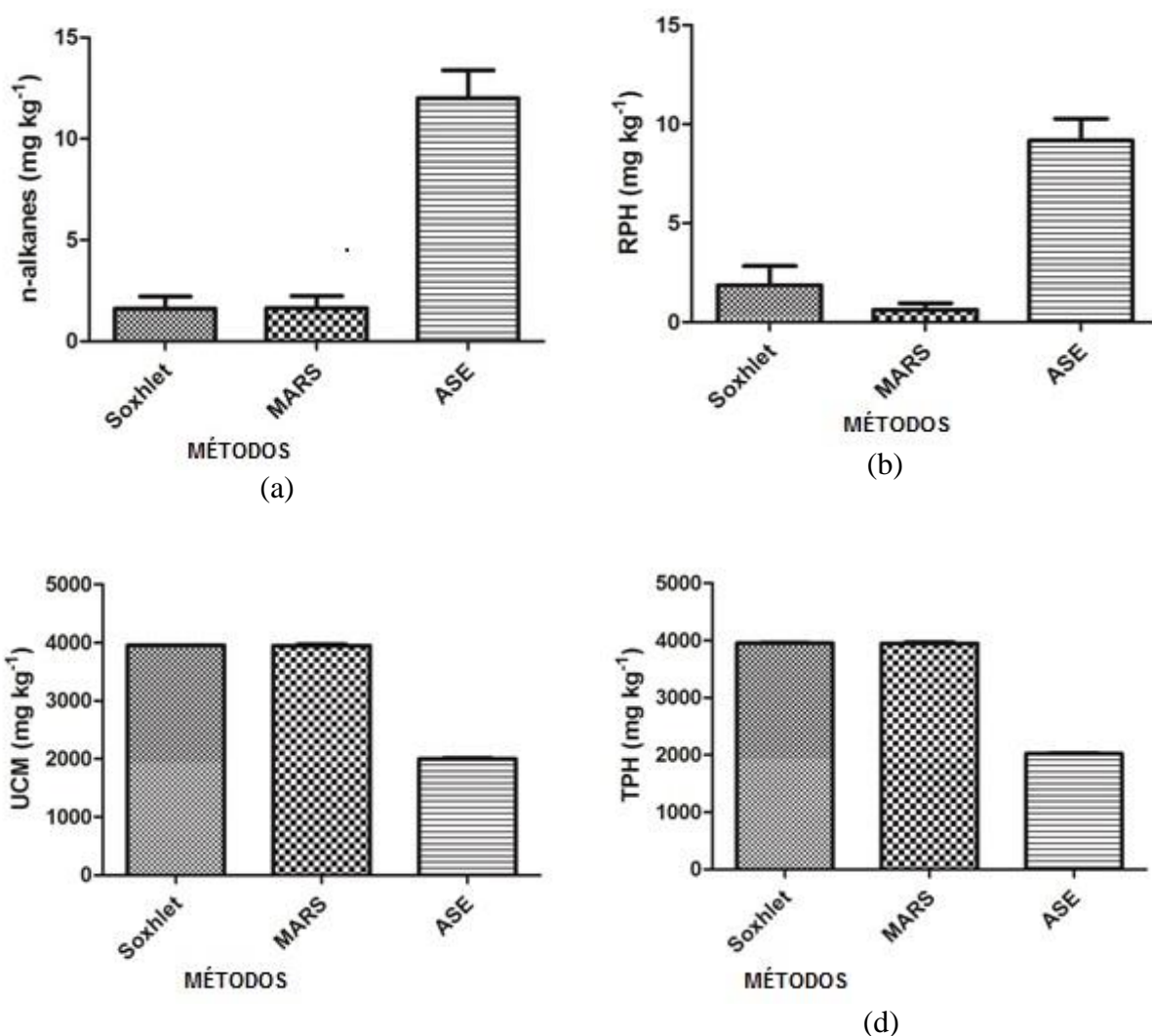
Solo argiloso: extração de HTP

A Tabela 1 apresenta os valores encontrados para n-alcenos, hidrocarbonetos resolvidos de petróleo (HRP), mistura complexa não resolvida (MCNR) e hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP). No solo argiloso com contaminação antiga, os resultados da extração por Soxhlet e pelo MARS não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 1), mas os resultados foram significativamente diferentes comparados aos obtidos com ASE ($p < 0,0001$). A Figura 1 apresenta média e desvio padrão dos teores extraídos do solo argiloso.

Tabela 1- Médias e desvio padrão para n-alcenos, HRP, MCNR e HTP para solo argiloso com contaminação antiga¹².

Compostos	Soxhlet	MARS	ASE
n- alcanos	1.58 ± 0.58(a)	1.6 ± 0.6(a)	12.4 ± 1.7(b)
HRP	1.87 ± 0.93(a)	0.7 ± 0.3(a)	8.9 ± 1.4(b)
MCNR	3946.26 ± 7.31(a)	3941.9 ± 23.4(a)	1992.3 ± 17.8(b)
HTP	3949.71 ± 6.64(a)	3944.2 ± 22.8(a)	2013.6 ± 17.5(b)

Figura 1 - Teores em mg kg⁻¹ (m m⁻¹) extraídos de solo argiloso com contaminação antiga



Legenda: Contaminação antiga de: (a) - n-alcenos; (b) - hidrocarbonetos resolvidos de petróleo-HRP; (c) - mistura complexa não-resolvida-MCNR e; (d) - hidrocarbonetos totais de petróleo-HTP. Frações obtidas a partir da extração pelos três métodos (Soxhlet; extração por micro-ondas MARS; extração acelerada com ASE).

¹² Valores com letras iguais não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$). Valores em negrito, melhores resultados em termos de eficiência de extração para cada grupo de compostos.

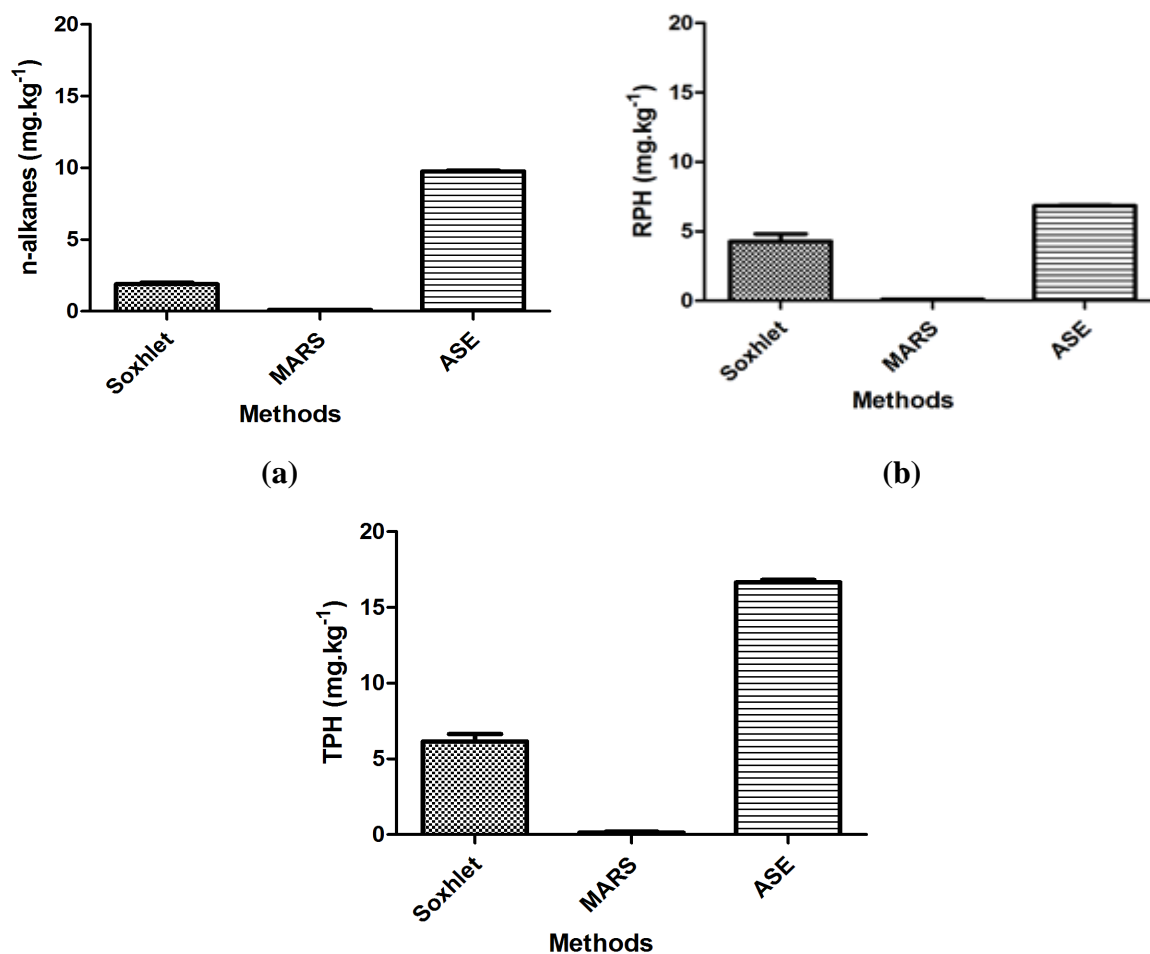
Solo arenoso; extração de HTP

A Tabela 2 apresenta os valores de n-alcenos, HRP, MCNR e HTP para o solo arenoso com histórico de contaminação. No tocante ao solo arenoso, todas as técnicas de extração resultaram em diferenças significativas nos teores de n-alcenos, HRP e HTP ($p < 0.05$) conforme Tabela 2. Entretanto, para MCNR não foi observada diferenças entre os métodos, tendo em vista que os teores de MCNR estavam abaixo dos limites de detecção nos três procedimentos. A Figura 2 apresenta as médias e desvios padrão para solo arenoso.

Tabela 2 - Médias e desvio padrão n-alcenos, HRP, MCNR e HTP para solo arenoso¹³.

Compostos	Soxhlet	MARS	ASE
n- alcanos	1.90 ± 0.11(a)	0.10 ± 0.01(b)	9.75 ± 0.01(c)
HRP	4.30 ± 0.55(a)	0.10 ± 0.00(b)	6.80 ± 0.08(c)
MCNR	0.00 ± 0,00(a)	< LD(a)	< LD(a)
HTP	6.15 ± 0,46(a)	0.14 ± 0.01(b)	16.70 ± 0.18(c)

Figura 2 – Valores extraídos do solo arenoso a partir da extração pelos três métodos estudados (Soxhlet; extração por micro-ondas MARS; extração acelerada com ASE).



¹³ Valores com letras iguais não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$). Valores em negrito, melhores resultados em termos de eficiência de extração para cada grupo de compostos.

(c)

Conclusão sobre extração de HTP: A extração através do ASE foi a que apresentou uma maior recuperação dos n-alcenos, tanto para o solo argiloso quanto para o arenoso. Para o solo argiloso, o Soxhlet e o MARS apresentaram melhor recuperação para as frações mais pesadas, refletido na recuperação superior de MCNR. Tais resultados sugerem que os métodos que promovem melhor extração de compostos pesados presentes no solo argiloso (Soxhlet e micro-ondas), provavelmente promovem perdas dos compostos mais leves, motivo da baixa concentração dos n-alcenos no extrato final. É sabido que o solo argiloso possui uma capacidade de adsorção maior dos contaminantes mais pesados, dificultando tanto a biodisponibilização (Silva, 2010; Mariano, 2006), quanto extração dos mesmos que, por essa razão, permanecem no solo por mais tempo (Kriipsalu *et al.*, 2007).

Extração de HPA com Soxhlet, MARS e ASE

Solo argiloso; extração de HPA

A Tabela 3 apresenta os valores encontrados para os 16 HPA no solo argiloso.

Tabela 3 - Médias e desvio padrão dos HPA extraídos do solo argiloso.¹⁴

Compostos (nº de anéis)	Soxhlet	MARS	ASE
Naftaleno (2)	< LD	< LD	< LD
Acenaftileno (3)	0.01 ± 0.02	< LD	< LD
Acenafteno (3)	< LD	< LD	< LD
Fluoreno (3)	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00
Fenantreno (3)	< LD	< LD	< LD
Antraceno (3)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Fluoranteno (4)	< LD	< LD	0.00 ± 0.01
Pireno (4)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01
Benzo(a)antraceno (4)	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Criseno (4)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.01
Benzo(b)fluoranteno (5)	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Benzo(k)fluoranteno (5)	0.00 ± 0.01	0.01 ± 0.00	< LD
Benzo(a)pireno (5)	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Indeno(1,2,3-cd)pireno (6)	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Dibenzo(a,h)antraceno (6)	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Benzo (g,h,i)perileno (6)	0.05 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00
Total	0,46 ± 0.06(a)	0.33 ± 0.01(b)	0,29 ± 0.04(b)

Com relação aos HPA em solo argiloso (Tabela 3 e Figura 3), não houve diferença significativa entre os teores extraídos por MARS e ASE ($p < 0.05$). No entanto, ambos diferiram dos teores obtidos com Soxhlet (Tabela 3).

Solo arenoso – extração de HPA

A Tabela 4 apresenta os valores dos HPA encontrados no solo arenoso nas extrações por Soxhlet, MARS e ASE.

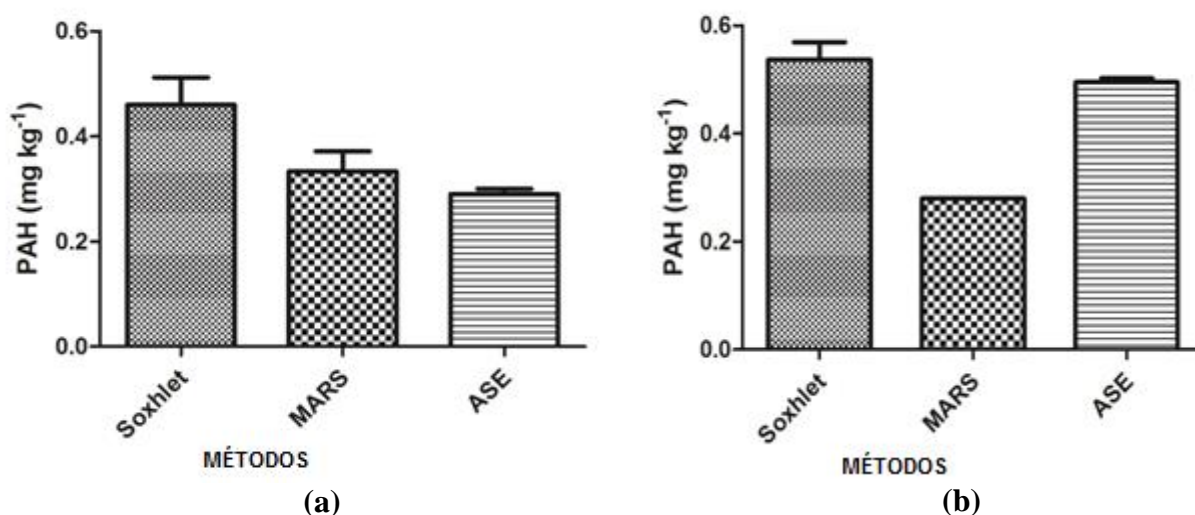
¹⁴ Valores com letras iguais não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$). Valores em negrito, melhores resultados em termos de eficiência de extração para cada grupo de compostos

Os teores de HPA extraídos com Soxhlet e ASE a partir de solo arenoso foram estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$) e estes, por sua vez, foram significativamente diferentes (superiores) aos teores obtidos com micro-ondas (MARS) (Tabela 3). A Figura 4 mostra os teores extraídos por cada uma das técnicas investigadas, tanto de solo argiloso quanto arenoso.

Tabela 4 - Médias e desvio padrão de HPA extraídos de solo arenoso.¹⁵

Compostos (nº de anéis)	Soxhlet	MARS	ASE
Naftaleno (2)	< LD	< LD	< LD
Acenaftileno (3)	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00
Acenafteno (3)	< LD	< LD	< LD
Fluoreno (3)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Fenantreno (3)	< LD	< LD	< LD
Antraceno (3)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Fluoranteno (4)	< LD	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01
Pireno (4)	0.01 ± 0.00	< LD	0.01 ± 0.01
Benzo(a)antraceno (4)	0.07 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Criseno (4)	0.07 ± 0.00	< LD	0.01 ± 0.01
Benzo(b)fluoranteno (5)	0.09 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Benzo(k)fluoranteno (5)	0.10 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Benzo(a)pireno (5)	0.09 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Indeno(1,2,3-cd)pireno (6)	0.06 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00
Dibenzo(a,h)antraceno (6)	0.15 ± 0.01	0.09 ± 0.00	0.11 ± 0.00
Benzo (g,h,i)perileno (6)	0.07 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.00
Total	0.54 ± 0.03(a)	0.28 ± 0.00(b)	0,49 ± 0.01(a)

Figura 4 - Médias e desvios-padrão dos teores de HPA



¹⁵ Valores com letras iguais não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$). Valores em negrito, melhores resultados em termos de eficiência de extração para cada grupo de compostos.

Legenda: Médias e desvios-padrão dos teores de HPA extraídos de (a) - solo argiloso; (b) - solo arenoso pelas técnicas de extração com base no Soxhlet (SOX), micro-ondas (MARS) e extração acelerada com solvente (ASE).

Variáveis adicionais consideradas para a escolha da técnica de extração

O conjunto de variáveis consideradas com uma escala simples selecionada para decisão sobre o melhor método de extração é apresentado na Tabela 5. As diferenças inerentes à aplicação de cada método (temperatura, pressão, o modo de contato com a amostra, dentre outros) fazem com que uma direta comparação entre os métodos não seja possível (Wang *et al.*, 2007). No entanto, a eficiência na recuperação dos compostos de interesse pode ser considerada a variável de maior peso no momento da escolha, sendo as variáveis referentes ao impacto ambiental (consumo de solvente e água) as variáveis com peso médio e o tempo gasto em todo o processo, a variável de peso relativamente menor. Assim, se a eficácia da extração for o único fator, a seleção será baseada nas notas de maior valor apresentadas nas linhas (a) para solo argiloso e (b) para solo arenoso da Tabela 5. Se for baseada na variável eficácia de extração em conjunto com os impactos ambientais, os métodos de maior pontuação nas linhas g e h seriam escolhidos. Se a decisão incluir além destas, a variável tempo consumido, os métodos que obtiveram as maiores notas encontradas nas linhas i e j serão os escolhidos.

Saim *et al.* (1997) comparando outras variáveis, tais como custo do equipamento, além de eficácia de extração, consumo de solvente e tempo de extração, observaram que para cada variável, uma técnica diferente se destacava. Utilizando esse ponto de vista, no nosso estudo, o menor custo seria obtido com o Soxhlet, menor gasto de solvente com o ASE e menor tempo de extração, com o MARS. Berset *et al.* (1999) ressaltaram que o consumo de solvente é um importante parâmetro no que tange custos econômicos e ambientais. Wang *et al.* (2007) comparando a extração por Soxhlet, MARS e ASE para HPA em solo com diferentes teores de matéria orgânica e contaminação recente, observaram que a técnica baseada no ASE apresentou melhor eficiência e que as extrações por Soxhlet e MARS eram comparáveis. Saim *et al.* (1997) comparando diferentes técnicas de extração (Soxhlet, extração por micro-ondas-MARS, extração por fluido supercrítico-SFE e extração acelerada por solvente-ASE), notaram que para todos os HPA, exceto Benzo(b)fluoranteno, a extração com ASE foi inferior à obtida com o Soxhlet. No presente estudo, o Soxhlet foi superior ao ASE e mais superior ainda ao MARS particularmente para os HPA de 4 a 6 anéis aromáticos. Berset *et al.* (1999), confrontaram a eficácia de métodos distintos (Soxhlet, ASE, SFE e mesa agitadora) para extração para HPA, no entanto, não especificando o tipo do solo, e observaram que ASE e SFE mostraram melhores resultados em relação aos outros métodos estudados, considerados clássicos.

Tabela 5 - Classificação das variáveis (valor x peso) para a escolha da melhor técnica de extração entre Soxhlet, MARS e ASE para HTP e HPA.

Variável		Nota conferida a cada variável e método de extração					
Eficácia da extração		Extração p/ HTP			Extração p/ HPA		
		Soxhlet	MARS	ASE	Soxhlet	MARS	ASE
Solo argiloso	n-alcanos	1	1	3	3	2	2
	HTP	3	3	2			
Solo arenoso	n-alcanos	2	1	3	3	2	3
	HTP	2	1	3			
Efic. global solo arg.	a	4	4	5	3	2	2
Efic. global solo are.	b	4	2	6	3	2	3
Consumo solvente	c	1	3	2	1	3	2
Consumo de água	d	1	3	2	1	3	2
Tempo de extração	e	1	3	2	1	3	2
Tempo preparação	f	2	3	1	2	3	1
Nota global:							
(c) Solo argiloso	$g=(a+c+d+e+f)$	9	16	12	8	14	9
(d) Solo arenoso	$h=(b+c+d+e+f)$	9	14	13	8	14	10

Valor: 1 = ruim; 2 = médio; 3 = bom.

Conclusão

A extração de HTP e HPA a partir de solos arenoso e argiloso com histórico de contaminação antiga (mais de dois anos) por hidrocarbonetos de petróleo, utilizando três métodos selecionados (Soxhlet, MARS e ASE) foi realizada, comparando-se a eficiência da extração de diferentes frações de HTP (n-alcanos, HRP, MCNR) e 16 HPA. Além da variável eficiência de extração, outros fatores, tais como consumo de solvente, de água e de tempo para preparo e extração p.d. foram considerados para avaliação comparativa dos métodos. Os resultados mostraram que com base na eficácia de extração, o melhor método depende da classe textural de solo e do grupo de compostos de interesse. Assim, para HTP em solo argiloso, o ASE foi o que apresentou melhores resultados para n-alcanos e para a fração HRP. No entanto, para a fração MCNR, o Soxhlet e MARS foram superiores e comparáveis entre si, promovendo inclusive, perdas dos compostos mais leves.

No solo arenoso, o ASE foi o método que apresentou o melhor resultado tanto para n-alcanos quanto para HRP e MCNR. Portanto, com base na eficácia da extração, o ASE foi de maneira geral, superior aos outros dois métodos para análise de HTP e o que melhor recupera n-alcanos e HRP. No caso dos HPA, a extração por Soxhlet foi a que apresentou o melhor resultado, tanto em solo argiloso quanto arenoso.

O método MARS, seguido do ASE apresentam os menores consumos de solvente e de tempo de extração comparando com a extração por Soxhlet. O ASE requer um trabalho mais demorado de preparação comparado com os outros métodos. Assim, quando fatores tais como economia de solvente, água e tempo são relevantes, o MARS é o método mais atraente, particularmente quando o HTP é o grupo de interesse e os n-alcanos de baixo peso não são os compostos em foco. Dessa forma, em contaminações antigas, a classe textural do solo e a

fração de hidrocarbonetos de interesse devem ser consideradas para a escolha do método mais adequado de extração.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPERJ pelo apoio concedido (Processos E-26/102.034/2011e E-26/103.064/2011), ao CNPq pela bolsa de produtividade concedida à 4ª autora (Processo 307.370/2010-0) e o apoio da empresa Estre Ambiental.

Referências Bibliográficas

BERSET, J.D; EJEM, M.; HOLZER, R.; LISCHER, P. **Comparison of different drying, extraction and detection techniques for the determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in background contaminated soil samples**, *Analytica Chimica Acta*, 383: 263-275, 1999.

CIANELLA, R.C. **Avaliação de diferentes estratégias de biorremediação no tratamento de solo contaminado com diesel B5**. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, 2010.

ENVIRONMENTAL PROTECY AGENCY UNITED STATES (USEPA). **Method 3540C**: Soxhlet extraction, 1996.

ENVIRONMENTAL PROTECY AGENCY UNITED STATES (USEPA). **Method 3545**: Pressurized fluid extraction (PFE), 1996.

ENVIRONMENTAL PROTECY AGENCY UNITED STATES (USEPA). **Method 3535**: Solid-phase extraction (SPE), 1996.

FERREIRA, V. R. **Otimização de protocolo analítico para extração e fracionamento de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos em sedimentos**. Dissertação (mestrado) UFPR, Curitiba, 2010.

INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER (IARC). **IARC Monograph Volume 92 – Polycyclic Aromatic Hydrocarbons**, p. 754-773, 2000. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr> Acessado em: 15/01/12.

KRIIPSALU, M.; MARQUES, M.; NAMMARI, D. R.; HOGGLAND, W. **Bio-treatment of oily sludge**: the contribution of amendment material to the content of target contaminants, and the biodegradation dynamics. *Journal of Hazardous Materials*, v 148, p. 616-622, 2007.

MANZO, S.; NICOLA, F. D.; PICIONE, F. D. L.; MAISTO, G.; ALFANI, A. **Assessment of the effect of soil**: PAH accumulation by a battery of ecotoxicological tests, *Chemosphere* 71, 1937-1944, 2008.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, 2006.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**, 3ª Ed., Editora Atheneu, São Paulo, 2008.

QUEIROZ, S. C. N.; FERRACINI, V. L.; SOUZA, D. R. C. D. **Métodos de extração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostra de solo, sedimento e lodo**. Embrapa Meio Ambiente, 15 p., Jaguariúna, 2009.

SAIM, N.; DEAN, J. R.; ABDULLAH, M. P.; ZAKARIA, Z. **Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil**: using Soxhlet extraction, pressurized and atmospheric microwave-assisted extraction, supercritical fluid extraction and accelerated solvent extraction, *Journal of Chromatography A*, 791: 361-366, 1997.

SILVA, G. **Bioestímulo e bioaumento na remediação de solo contaminado com óleo lubrificante usado – escala piloto**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, 2010.

WANG, W.; MENG, B.; LU, X.; LIU, Y.; TAO, S. **Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils**: A comparison between Soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques, *Analytica Chimica Acta*, 602: 211-222, 2007.

APÊNDICE B - Manuscrito 2

Avaliação de Indicadores Microbianos no Monitoramento da Biorremediação de Solo Argiloso Contaminado com Petróleo

Jorge Antônio Lopes¹, Graciane Silva², Marcia Marques^{3,16}, Sergio Machado Corrêa⁴

¹*Transpetro*

²*Estre Ambiental*

³ *Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias-LABIFI, Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente, Universidade do Estado do Rio de Janeiro-UERJ*

⁴ *Faculdade de Tecnologia-FAT, Universidade do Estado do Rio de Janeiro-UERJ*

RESUMO O objetivo deste estudo foi comparar três indicadores utilizados no monitoramento da biodegradação aeróbia de óleo cru em solo argiloso: densidade populacional de microrganismos heterotróficos totais (MHT) em unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de solo; densidade populacional de fungos (PF) em UFC g⁻¹ solo; densidade populacional de microrganismos degradadores de petróleo (MDP) em número mais provável (NMP) por grama de solo. O experimento foi conduzido em escala de bancada em triplicatas em respirômetros de Bartha. Foram estabelecidos três níveis para três variáveis independentes (taxa nutricional C:N:P, pH e; proporção de material estruturante) em um experimento monitorado por 70 dias. A variável resposta selecionada (eficiência de biodegradação EB em %) foi medida através da evolução de geração de CO₂. Dentre os três indicadores, o MDP foi o que se mostrou mais apropriado para medir a eficiência da biodegradação de carbono orgânico (EB %).

Palavras-chave: biorremediação; óleo cru; respirometria; metabolismo aeróbio; microrganismos degradadores de petróleo.

ABSTRACT The objective of this study was to compare three indicators used to monitor aerobic biodegradation of crude oil in clayey soil: population density of total heterotrophic microorganisms (MHT) measured as colony forming unity (UFC) per gram of soil; fungi population density (PF) as UFC per gram of soil; population density of oil degrading microorganisms (MDP) as most probable number (NMP) per gram of soil. The experiment was conducted in bench scale in triplicates in devices known as Bartha respirometer. Three levels were selected for each independent variable (C:N:P ratio, pH and structuring material) in an experiment monitored during 70 days. The selected response variable (organic carbon biodegradation efficiency EB (%)) was measured through the evolution of CO₂ generation. Among the three studied indicators, MDP showed to be the most appropriate one to measure EB.

Keywords: bioremediation. crude oil. Respirometry. aerobic metabolism. petroleum degrading microorganisms.

¹⁶ Autor correspondente: Faculdade de Engenharia-UERJ, Rua São Francisco Xavier, 524, sala 5024E, Maracanã, CEP 20550-900, Rio de Janeiro, RJ. Tel: (21) 2334-0959; e-mail: marciam@uerj.br

Introdução

Alguns setores industriais, como a indústria petrolífera particularmente no setor de combustíveis, apresentam um elevado potencial para degradação ambiental, sendo que o potencial impacto ambiental está presente ao longo de todo processo de exploração, transporte, armazenamento, processamento/refino, distribuição e reciclagem/disposição dos resíduos. Uma vez introduzidos no meio ambiente, os hidrocarbonetos de petróleo imediatamente começam a interagir com as matrizes ambientais. As interações e o grau com que ocorrem são funções das características físico-químicas dos hidrocarbonetos e da matriz em questão. Atualmente, as atividades de recuperação de áreas contaminadas por meio da escavação e remoção dos solos, constituem-se uma importante fonte de resíduos e solo contaminado, os quais devem ser adequadamente tratados e/ou dispostos. Desta forma, há uma enorme demanda por tecnologias inovadoras envolvendo a remediação ambiental de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. Atualmente, as tecnologias de tratamento de solos contaminados incluem processos físicos, químicos e biológicos. Os métodos físicos incluem também os processos térmicos de incineração, dessorção térmica e co-processamento em fábricas de cimento. Essas tecnologias podem ser eficientes na redução da concentração de uma grande variedade de contaminantes, mas apresentam desvantagens, pois além de onerosas, apresentam elevada complexidade técnica (VIDALI, 2001 *apud* DIPLOCK, 2009).

A aplicação de processos biológicos no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, desperta um grande interesse da comunidade técnica e científica, especialmente no Brasil, (ANDRADE *et al.*, 2010). Entre as suas principais vantagens dos processos biológicos está o baixo custo de tratamento. Dentre as desvantagens destaca-se o tempo mais longo para o alcance de taxas aceitáveis de remoção dos contaminantes. Portanto, a otimização das variáveis envolvidas nos processos biológicos pode tornar a biorremediação mais eficiente e rápida, com redução das atividades de manutenção e conseqüentemente, dos custos, aumentando a sua competitividade. Variáveis essenciais para o metabolismo microbiano em solo contaminado incluem: taxas de oxigênio (acceptor final de elétrons na respiração aeróbia e substrato nas reações de biodegradação catalisadas por oxigenases); umidade; taxas nutricionais C:N:P e; pH. Solos argilosos que possuem baixa permeabilidade (o que dificulta a transferência de massa durante o processo) necessitam da adição de material estruturante pra reduzir a densidade, aumentar a porosidade facilitando a difusão de oxigênio. Para algumas dessas variáveis, como proporção C:N:P nos nutrientes, pH e proporção de material estruturante há várias indicações dos valores ótimos na literatura (LI *et al.*, 2004; RHYKERD. *et al.*, 1999). Entretanto, cada tipo de solo, de contaminante e demais variáveis exigem condições ótimas diferenciadas. Apesar das diversas experiências comerciais no Brasil de remediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo utilizando a tecnologia de biopilhas, entre outras, os dados referentes às variáveis relevantes para o processo são geralmente obtidos de maneira empírica sem otimização e sujeitos ao sigilo industrial. Cabe ressaltar, a dificuldade em remediar um solo argiloso com histórico de contaminação por derivado de petróleo devido às fortes interações entre a matriz do solo e os contaminantes (KRIIPSALU *et al.*, 2007), além de uma baixa permeabilidade inerente a este tipo de solo o que torna complexo a penetração tanto de nutrientes quanto de oxigênio, fundamentais para que o processo de biodegradação ocorra (TRINDADE, 2002). Com algumas exceções (SILVA, 2004; BERGER, 2005; SEABRA, 2005, OLIVEIRA, 2001; RIZZO *et al.*, 2008; SPINELLI, 2007), a grande maioria dos dados disponíveis e experiências acumuladas são provenientes de regiões de clima temperado (BEAUDIN *et al.*, 1999; BENYAHIA *et al.*, 2005; CHAILLAN *et al.*, 2006; CHAÎNEAU *et al.*, 2003; COULON *et al.*, 2005; COULON, 2010; LEAHY *et al.*, 1990; DAVIS *et al.*, 1996; DELILLE *et al.*, 2004;

DELILLE *et al.*, 2007; DELILLE *et al.*, 2008; DELILLE *et al.*, 2009; DIBBLE *et al.*, 1979; FILLER *et al.*, 2001; FILLER *et al.*, 2006; GOGOIA *et al.*, 2003; JUTEAU *et al.*, 2003; KODRES, 1998; MOHN *et al.*, 2001; RIKE *et al.*, 2005; SANSCARTIER *et al.*, 2009; SEKLEMOVA *et al.*, 2011; VAN GESTEL *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 1995). Tais perfis de solo são muito distintos e não se aplicam às condições brasileiras.

A importância da biodiversidade microbiológica presente no solo está relacionada ao fato de que nenhuma espécie sozinha é capaz de degradar completamente um composto tão complexo quanto a maioria dos hidrocarbonetos de petróleo (WETLER, 2006). O contaminante a ser biodegradado esteja biodisponível, em ambiente com taxas nutricionais adequadas, assim como fatores abióticos favoráveis e baixos índices de toxicidade (JONGE *et al.*, 1997; DOUGLAS *et al.*, 2012; SALANITRO *et al.*, 1997). A versatilidade genética é, portanto, característica desejável em consórcios de microrganismos com espécies aptas a realizar as diferentes etapas de clivagem, até a quebra total do hidrocarboneto de petróleo (SPINELLI, 2007). A população microbiana heterotrófica total tem sido sugerida como indicador da atividade de biodegradação no solo (BALBA *et al.*, 1998). Recentemente, microrganismos degradadores de petróleo também têm sido utilizados (BALBA *et al.*, 1998). O argumento é que existiria uma alta correlação entre a densidade populacional de microrganismos no solo e a taxa de degradação de compostos orgânicos (SONG & BARTHA, 1990; DOUGLAS *et al.*, 2012). Entretanto, alguns estudos questionam a utilidade da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) como indicador da atividade metabólica de interesse na biorremediação de solo contaminado com petróleo e derivados, qual seja a biodegradação de hidrocarbonetos. Alguns autores argumentam que nesse caso específico, o mais apropriado seria a contagem de microrganismos degradadores de petróleo e, para tanto, existe método disponível (MILLIOLI *et al.*, 2009).

Uma das estratégias utilizadas para monitorar a atividade microbiana e que é diretamente relacionada ao metabolismo aeróbio é a respirometria (MELLO *et al.*, 2007). Tal método, adaptado de uma norma holandesa, tem se mostrado bastante útil na avaliação da biodegradação de contaminantes orgânicos presente no solo (ANDREO, 1999; BALBA *et al.*, 1998). Quando o acidente e a contaminação ocorrem em áreas remotas, técnicas analíticas e instrumentos laboratoriais sofisticados podem estar ausentes. Portanto, é muito importante a disponibilização de formas de monitoramento da atividade microbiana e do progresso da remediação através de métodos mais simples (SANTOS *et al.*, 2012; PRINCE *et al.*, 2003;). As propriedades bioquímicas e biológicas mais úteis para detecção da deterioração da qualidade do solo, assim como da atividade microbiana de biorremediação são aquelas mais próximas dos ciclos de nutrientes. Dentre elas merecem menção as variáveis: (i) biomassa microbiana; (ii) respiração microbiana do solo e; (iii) atividades enzimáticas do solo (SANTOS *et al.*, 2012; VISSER & PARKINSON, 1992). Particularmente no caso da respiração microbiana do solo, uma vez que a respiração representa a oxidação da matéria orgânica pelos microrganismos 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).

O objetivo deste estudo foi comparar diferentes indicadores utilizados em estudos de otimização de processos da biodegradação aeróbia de petróleo em solo argiloso contaminado, a saber: (i) densidade populacional de microrganismos heterotróficos totais-MHT (UFC g⁻¹ solo); (ii) densidade populacional de fungos-PF (UFC g⁻¹ solo); (iii) densidade populacional de microrganismos degradadores de petróleo-MDP (NMP g⁻¹ solo). Para tanto, foram estabelecidos três diferentes níveis para três fatores ou variáveis independentes (taxa nutricional C:N:P, pH e a proporção de material estruturante). Os indicadores selecionados foram então monitorados ao longo do experimento. A variável resposta selecionada para

indicar a eficiência de biodegradação (EB %) foi obtida através da evolução de geração de CO₂ nos diferentes tratamentos/condições experimentais anaeróbias.

Materiais e Métodos

Caracterização do solo em estudo

O solo utilizado nos experimentos foi obtido através de escavação em uma instalação antiga de armazenamento de óleo cru e derivados, composta por tanques, linhas aéreas e enterradas, que se encontra em atividade desde 1951 no estado de São Paulo, com histórico de contaminação antiga. O procedimento de amostragem dos solos seguiu o recomendado pelo Manual de gerenciamento de áreas contaminadas da CETESB - 6300 - Amostragem do solo. A amostra de solo foi distribuída em sacos plásticos e armazenada a 4°C até a realização do experimento. Antes do início dos experimentos, o solo foi transferido para bandejas de alumínio e conduzido à estufa de secagem mantida a 45 °C durante três dias. Em seguida, o solo foi peneirado em malha de 2 mm de abertura em peneira Granutest (ABNT 10; Tyler 9), para promover a remoção de restos de material vegetal e torrões de terra, tornando-o mais homogêneo. A amostra de solo peneirado foi dividida em três partes, em proporções diferentes. A primeira parte foi destinada à caracterização física, química e microbiológica (Tabela 1). A segunda foi acondicionada em sacos plásticos e armazenada em temperatura ambiente até a realização do experimento. A terceira foi contaminada para atingir 3% (m m⁻¹) de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP), já que o solo estudado apresentava baixa contaminação desses compostos (Tabela 1).

Os parâmetros físicos e químicos foram analisados nos laboratórios da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Solos) segundo o Manual de Métodos de Análise de Solo (EMBRAPA, 1997). As análises de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), assim como dos parâmetros microbiológicos, foram realizadas no Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias-LABIFI da Universidade do Estado do Rio de Janeiro-UERJ. A Tabela 1 apresenta a caracterização biológica, física e química do solo original.

Com base nas proporções de areia, silte e argila e com base no triângulo das classes texturais do solo (ABNT, 1989), o solo foi classificado como franco argiloso, com textura argilosa (35% < Argila < 60%). Uma característica marcante do solo franco é a presença acentuada de matéria orgânica, o que aumenta a capacidade de retenção de água no solo (SOIL QUALITY INFORMATION SHEET, 2012). Tais características influenciam as atividades química e microbiológica do solo. Segundo Scheffer *et al.* (1998) e Kiihl *et al.* (1976), tanto a textura quanto a porosidade do solo influenciam diretamente na densidade e permeabilidade deste, o que por sua vez se reflete na distribuição de gases e de água. Quanto mais denso, mais compacto, e menos poroso o solo será (RHYKERD *et al.*, 1998).

Dessa forma, solos argilosos são biorremediados com mais dificuldade quando comparados aos solos com uma porcentagem maior de areia. A textura influencia diretamente na capacidade de retenção do contaminante. Assim, solos argilosos são capazes de reter mais facilmente uma quantidade maior do contaminante através de processos de adsorção (SCHEFFER *et al.*, 1998; KIIHL *et al.*, 1976; KRIIPALU *et al.*, 2009).

A capacidade de campo (C.C.) é um importante parâmetro e permite conhecer o teor máximo de água que o solo é capaz de reter, informação bastante utilizada para ajustes com vistas à biorremediação (BAPTISTA, 2003; SEABRA, 2005; CHAGAS-SPINELLI, 2007). No solo em estudo a C.C. foi de 28,5% (Tabela 1). A literatura tem relatado teores ideais de água no solo para a atividade microbiana na faixa de 12% a 30% (m m⁻¹) (U.S.EPA, 2004).

O pH do solo apresentou-se moderadamente ácido (5,4 em água e 4,8 em KCl), estando ambos os valores abaixo da faixa ótima de pH relatada na literatura para processos de biorremediação (6,5 a 8,5) (SARKAR *et al.*, 2005).

De acordo com a capacidade de troca catiônica (CTC) ou valor T (Tabela 1) o solo apresentou argila de baixa atividade ($T < 27 \text{ cmolc kg}^{-1}$). Esse resultado sugere que sob as condições naturais ácidas, o solo apresenta baixa capacidade para reter cátions.

Tabela 1 - Caracterização físico-química e biológica do solo utilizado nos experimentos.¹⁷

Composição granulométrica da terra fina dispersão com NaOH /calgon (g Kg^{-1})	Areia 2,0-0,05 mm	414
	Silte 0,05-0,002 mm	286
	Argila <0,002 mm	300
Densidade (g cm^{-3})	Solo	1,2
	Partículas	2,6
Porosidade total (%)		52,7
Capacidade de campo (%)		28,5
pH (1:2,5)	Água	5,4
	KCl (1N)	4,8
Complexo Sortivo (cmolc kg^{-1})	Ca ²⁺	7,2
	Mg ²⁺	1,5
	K ⁺	0,2
	Na ⁺	0,96
	Valor S (soma)	9,8
	Al ³⁺	0,00
	H ⁺	2,6
	Valor T (soma)	12,4
	Valor V (saturação de base)	79
Fósforo assimilável (g kg^{-1})		8
Carbono orgânico (g kg^{-1})		41,6
Matéria orgânica (g kg^{-1})		83,2
Nitrogênio total (g kg^{-1})		1,8
Relação C:N		23
População heterotrófica total UFC g^{-1} de solo		$4,45 \times 10^6$
População de fungos UFC g^{-1} de solo		$1,5 \times 10^2$
População de microrganismos degradadores de óleo cru NMP g^{-1} de solo		$1,00 \times 10^6$

Segundo Spinelli (2007), altas concentrações de argila de baixa atividade resultam em uma CTC semelhante à de solos arenosos. Cabe mencionar que a capacidade de troca catiônica indica uma intensa lixiviação dos cátions Mg²⁺, Ca²⁺, K⁺ e Na⁺ trocáveis, indicando que este solo possui baixa fertilidade e elevado grau de intemperismo (MEURER, 2004).

A taxa nutricional C:N:P (100: 4,32: 19,2) está adequada quanto o nitrogênio e apresenta um teor de fósforo assimilável acima do necessário, de acordo com os valores recomendados pela EPA (1994) que recomenda a faixa de 100:10:1 a 100:1:0,5 para um crescimento microbiano adequado e um processo de biodegradação do solo contaminado.

¹⁷ Notas: Valor S (S) = Soma de bases trocáveis (Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, Na⁺); Valor T = Soma das bases trocáveis mais a acidez potencial (S + H⁺ + Al³⁺).

Ainda, segundo U.S.EPA (1994), para que a biodegradação em biorreatores seja efetiva, a densidade mínima de microrganismos heterotróficos no solo deve ser de 10^3 UFC g^{-1} . O solo *em estudo* original apresentou uma população heterotrófica total (MHT) de $4,45 \times 10^6$ UFC g^{-1} de solo, uma população de fungos de (PF) de $1,5 \times 10^2$ UFC g^{-1} de solo e uma população de microrganismos degradadores de petróleo (PDP) em $1,0 \times 10^6$ NMP g^{-1} de solo, mostrando-se, portanto, bem povoado e bastante apropriado do ponto de vista microbiológico ao processo de biorremediação.

Obtenção e caracterização do óleo cru

O óleo cru utilizado nos experimentos foi proveniente do campo de produção *onshore* Fazenda Alegre, Estado de Espírito Santo e foi cedido ao grupo de pesquisa pela Gerência de Pesquisa e Desenvolvimento de Abastecimento /Engenharia de Plantas Piloto – PDAB/PP do Centro de Pesquisa da Petrobras – CENPES em 13/08/2010. O óleo foi submetido às análises quantitativas para caracterizar os teores dos hidrocarbonetos totais de petróleo e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. O óleo cru foi armazenado em bombona de 5 L, ao abrigo da luz e a temperatura de 20-25°C até o uso.

Contaminação do solo

Com base em estudos prévios de biorremediação de solos contaminados com o óleo cru, este foi ao solo contaminado a 0,85% para atingir uma contaminação final em torno de 3,0 % ($m \cdot m^{-1}$). A contaminação do solo foi conduzida em recipientes plásticos aos quais foram adicionados por vez, 10 kg do solo e 0,225 kg de óleo cru, o que correspondeu a um percentual de contaminação artificial de 2,25% ($m \cdot m^{-1}$). Tal percentual foi escolhido com base na caracterização do solo que indicou a presença de 0,75% de hidrocarbonetos totais de petróleo. Após a contaminação, o solo foi conduzido a um recipiente onde permaneceu em uma capela de exaustão durante uma semana para permitir a exaustão dos compostos voláteis até a realização do experimento.

Planejamento experimental

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, taxa nutricional, teor de oxigênio dissolvido, potencial redox e permeabilidade). As variáveis independentes consideradas mais relevantes e escolhidas para o presente estudo foram: pH, taxas nutricionais e PME. A variável dependente ou resposta selecionada para medir indiretamente a eficiência de biodegradação foi à evolução de geração de CO_2 (indicador da respiração do solo) quantificada durante o experimento, através do método respirométrico de Bartha (ABNT, 1999). Por tratar-se de três fatores ou variáveis independentes, optou-se pela utilização do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Para o DCCR foram necessários 17 ensaios, sendo 8 ensaios fatoriais representados pelo vértice do cubo, 6 ensaios nos pontos axiais para testar o modelo de 2ª ordem e 3 ensaios repetidos (triplicata) na condição central. Foi possível, ainda, elaborar um modelo matemático que, validado estatisticamente, pode ser usado para obtenção da superfície de resposta e, através desta análise, determinar as condições otimizadas, conhecendo-se a significância estatística das respostas. Os níveis utilizados e os ensaios estão apresentados na Tabela 2. Respeitando-se a cinética do processo, para cada ensaio do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foram retiradas amostras em função do tempo para a determinação da evolução do CO_2 como medida indireta da eficiência de cada tratamento.

Tabela 2 - Valores utilizados no DCCR para três fatores independentes e cinco níveis.

Variáveis	Código	-2,0	-1	0	+1	+2,0
pH	x ₁	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5
C:N:P	x ₂	100:1:0,5	100:2,75:0,62 5	100:5,5:0,7 5	100:8,25:0,875	100:10:1
PME	x ₃	0%	2,5%	5%	7,5%	10%

Montagem dos respirômetros – design dos tratamentos adotados

A montagem de cada unidade experimental (respirômetro) foi iniciada pela adição de uma alíquota de 50 g de solo contaminado a 3,0 % (m m⁻¹) de óleo cru. Porém, antes da introdução do solo nos respirômetros, foram realizados os procedimentos de ajuste de umidade, pH, taxas nutricionais e adição de material estruturante.

Respirômetros de Bartha

A geração de CO₂ foi monitorada em respirômetros de Bartha segundo NBR 14283 (ABNT, 1999) com algumas adaptações. A quantificação do CO₂ produzido foi feita 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 era retirada do respirômetro de Bartha utilizando-se uma seringa de 10 mL, e conduzida para um frasco Erlenmeyer de 250 mL. O experimento foi conduzido por 70 dias e a quantidade de CO₂ produzida em cada respirômetro determinada em intervalos regulares de uma semana. A quantidade de CO₂ produzida por biodegradação foi determinada a partir da subtração da quantidade diária de gás produzida no tratamento controle (CONT) da quantidade produzida por cada um dos demais tratamentos. A produção acumulada de CO₂ por biodegradação em função do tempo (70 dias) foi determinada através de soma de todas as massas de CO₂ obtidas em cada um dos intervalos de tempo analisados. A produção diária de CO₂ em cada respirômetro foi calculada a partir da Equação 1:

$$CO_2 (mg) = (A-B) \times 50 \times 0,044 \times f_{HCl} \quad (1)$$

Onde:

Carbono biodegradado total = 2 x CO₂ (assumindo que 50% são transformados em biomassa). A partir desse valor, então, calcula-se a eficiência da biodegradação (EB) em % (Equação 2):

$$EB (\%) = (\text{carbono biodegradado total} / \text{carbono total presente em 50g de solo}) \times 100 \quad (2)$$

Ajuste de umidade

O ajuste da umidade inicial foi efetuado com adição de água destilada em todos os tratamentos até que fosse atingida aproximadamente 50% da capacidade de campo, dentro da faixa ótima de umidade recomendada na literatura (PAUL e CLARK, 1989).

Ajuste de pH do solo

O pH original foi ajustado para um valor próximo da neutralidade (7,0) dentro da faixa de 6,5 a 8,5, considerada adequada à atividade da maioria dos microrganismos (SARKAR *et al.*, 2005). Tal ajuste foi efetuado pela adição de hidróxido de cálcio Ca(OH)₂, cuja quantidade foi determinada através de uma curva de neutralização (Lima, 2004).

Ajuste de nutrientes

A correção de nitrogênio e fósforo foi realizada utilizando-se solução de sais de nitrato de amônio (NH₄NO₃) e de fosfato dibásico de potássio (K₂HPO₄), respectivamente. A concentração das soluções utilizadas dependeu da relação C:N:P definida em cada tratamento

(Tabela 2) com base no conteúdo de carbono orgânico total no solo, determinado pelo teor de carbono da matéria orgânica já presente no solo mais o teor de carbono proveniente da contaminação.

Adição de material estruturante

Areia peneirada em malha de 2 mm e esterilizada termicamente adicionada como material estruturante nas proporções informadas na Tabela 2. O valor máximo de 10% de material estruturante teve por objetivo não promover uma diluição da contaminação. A areia foi escolhida por tratar-se de material inerte e com pouca alteração do volume final a ser tratado.

Análises microbiológicas

Quantificação de população heterotrófica total e fungos: As quantificações da população microbiana heterotrófica total e de fungos foram realizadas pelo método padrão de diluição e contagem das unidades formadoras de colônias (UFC.g⁻¹) em placas de Petri. A metodologia consiste no plaqueamento de alíquotas da suspensão microbiana diluída sucessivamente, seguida da incubação de placas em estufa e posterior contagem direta do número de colônias (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). A contagem da população microbiana heterotrófica total foi realizada segundo a metodologia do Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento (MAPA, 2003), considerando-se o intervalo de precisão de no mínimo 30 e no máximo 300 colônias. Pesou-se 10 g de solo e colocou-se em 100 mL de solução salina esterilizada (0,85%). O sobrenadante foi devidamente diluído (10⁰ a 10⁻⁷) para as contagens de bactérias (em meio orgânico sólido – Ágar Triptona de Soja / Ágar Casoy), fungos (em meio orgânico sólido – Sabourand Dextrose Agar). As placas foram preparadas em triplicata e os desvios padrões foram calculados para cada diluição. Durante as análises foram realizados para garantir a esterilização do aparato usado no teste.

Quantificação de microrganismos degradadores de petróleo: Foi realizada através da técnica do Número Mais Provável (NMP) (VOLPON *et al.*, 1997). Utilizou-se para esse procedimento a diluição de 10⁻³ a 10⁻⁷, uma alíquota de 0,1 mL de cada solução foi transferida para 5 poços de uma placa com total de 24 poços, contendo 1,8 mL de meio mineral (VECCHIOLI *et al.*, 1990). Posteriormente, adicionou-se 2 gotas de óleo cru com auxílio de um conta-gotas. Foram utilizados 2 poços para controle sem inóculo e sem óleo e 2 poços para controle sem inóculo. Incubou-se em estufa a 30° C durante 7 dias e a degradação do óleo foi observado visualmente. Ao se observar alguma alteração, em relação ao teste em branco, considerou-se positivo o teste. Os resultados foram expressos em NMP.g⁻¹ de solo seco.

Monitoramento das variáveis químicas

PH: Para verificação do pH do solo adotou-se a metodologia descrita no Manual de Métodos de Análise de Solo (Embrapa, 1997), na qual a medição é realizada em solução salina, o parâmetro foi analisado em triplicatas.

Quantificação de carbono orgânico total: O teor de matéria orgânica das amostras de solo foi determinado de acordo com o método de WALKEY & BLACK (1934) *Apud* JARAMILLO (1996). A Metodologia está descrita no Manual de Métodos de Análise de Solo (EMBRAPA, 1997), o parâmetro foi analisado em triplicatas.

Análise estatística: As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software Minitab 15. Utilizou-se o Gráfico de Pareto e o Gráfico de Superfície de Reposta para apresentação dos resultados.

Resultados e Discussão

Quantificação da geração de CO₂ durante os ensaios de biodegradação.

A quantificação da geração de CO₂ pelos diferentes tratamentos permitiu avaliar os respectivos perfis de geração durante os 70 dias de monitoramento (Figura 1). Observa-se que a condição 11 (pH = 7,5; C:N:P = 100:1:0,5 e PME = 5%) foi a que apresentou a maior produção acumulada de CO₂ (57,75 mg 50g⁻¹) aos 70 dias de incubação. Baseado na quantidade total de CO₂ gerado para cada condição testada ao final do experimento e consequentemente, na estimativa de incorporação de carbono à biomassa produzida, calculou-se a eficiência de biodegradação, conforme descrito anteriormente (Equação 2). Este parâmetro foi utilizado como variável resposta (eficiência). Na Tabela 3 encontram-se os valores das eficiências de biodegradação (EB%) para as condições testadas.

No Gráfico de Pareto, apresentado na Figura 2, o módulo do efeito ou influência das variáveis independentes sobre a eficiência de biodegradação (variável resposta), e algumas de suas interações são ordenadas em ordem crescente. De acordo com a Figura 2, apenas o ajuste de taxa nutricional (C:N:P) nos termos linear e quadrático apresenta um efeito significativo ($p=0,05$) na eficiência de biodegradação. Uma proporção adequada de C:N:P tem sido comumente relatada na literatura como essencial para a biodegradação de petróleo e derivados presentes no solo contaminado (TRINDADE, 2005).

Com intuito de verificar o efeito das combinações, e também de obter mais informações a respeito da identificação das melhores relações entre as variáveis independentes, os Gráficos de Superfície de Resposta (Figuras 3, 4) foram construídos.

Figura 1 - Produção acumulada de CO₂ (mg 50 g⁻¹ solo) ao longo dos 70 dias de experimento em respirômetros de Bartha nos 17 tratamentos (1 a 17)

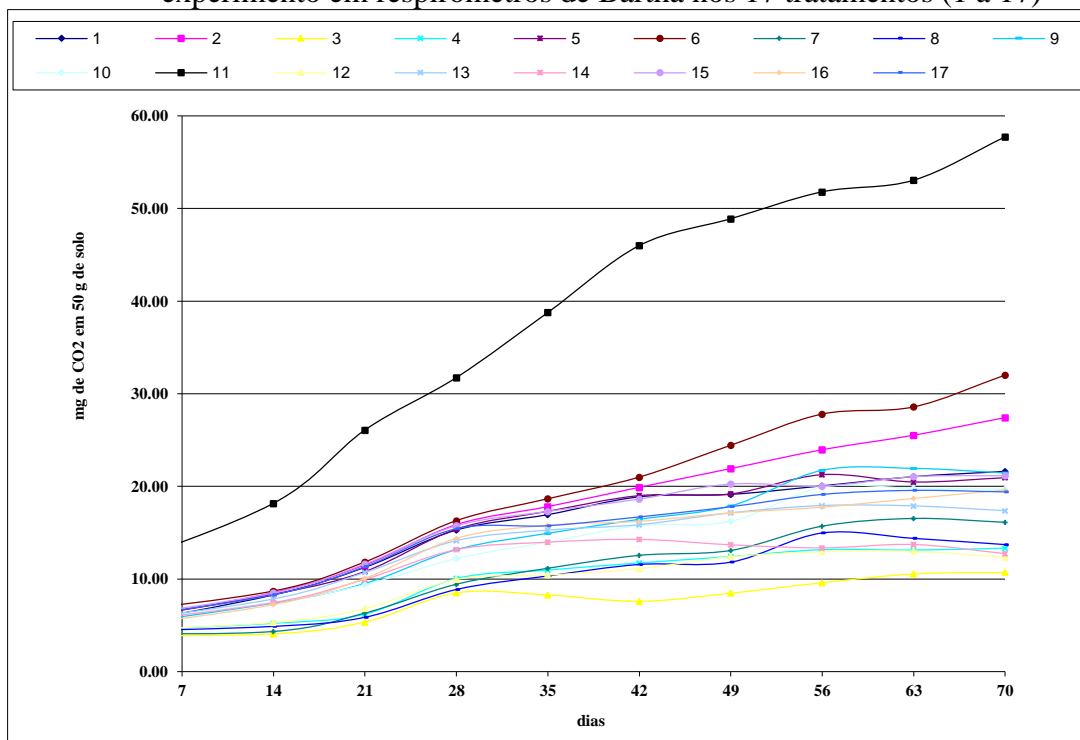
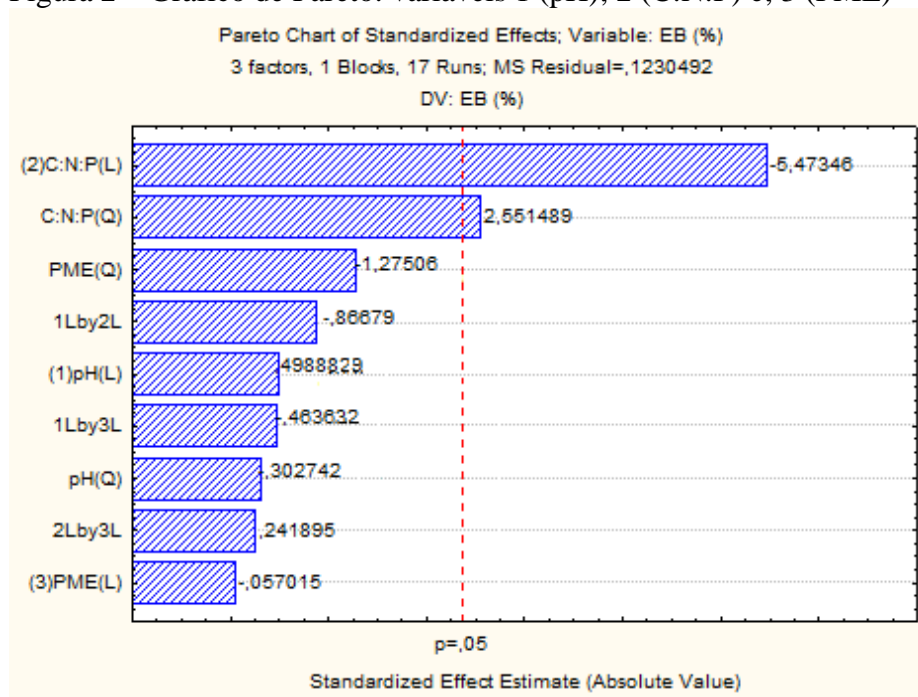


Tabela 3 - Matriz do Planejamento experimental e resposta em termos de eficiência da biodegradação (EB em %)¹⁸

	Tratamentos	pH	C:N:P	PME	EB (%)*
Ensaio	1	-1	-1	-1	1,31 ± 0,09
	2	+1	-1	-1	1,71 ± 0,18
	3	-1	+1	-1	0,67 ± 0,06
	4	+1	+1	-1	1,02 ± 0,43
	5	-1	-1	+1	1,22 ± 0,02
	6	+1	-1	+1	1,77 ± 0,02
	7	-1	+1	+1	1,08 ± 0,10
	8	+1	+1	+1	0,82 ± 0,01
Pontos Axiais	9	-1,68	0	0	1,30 ± 0,05
	10	+1,68	0	0	1,13 ± 0,10
	11	0	-1,68	0	3,44 ± 0,10
	12	0	+1,68	0	0,81 ± 0,04
	13	0	0	-1,68	0,97 ± 0,02
	14	0	0	+1,68	0,84 ± 0,04
Pontos Centrais	15	0	0	0	1,26 ± 0,08
	16	0	0	0	1,38 ± 0,31
	17	0	0	0	1,20 ± 0,11

*= médias e desvios-padrão das eficiências de biodegradação obtidas pelas triplicatas.

Figura 2 – Gráfico de Pareto: variáveis 1 (pH); 2 (C:N:P) e 3 (PME)



Nota: A linha tracejada representa o nível de significância p=0,05.

¹⁸ Médias e desvios-padrão das eficiências de biodegradação obtidas pelas triplicatas.

Nota-se na Figura 3 que os menores ajustes de nutrientes combinados à ausência de material estruturante resultaram em eficiência superior de biodegradação EB (acima de 2%). Combinações de taxa nutricional acima de 100:1:0,5 em torno de 100:2,5:0,65, associadas à proporções de material estruturante acima de zero e abaixo de 7%, apresentaram uma eficiência de biodegradação, entre 1,5 e 2%. A Figura 4 mostra pH versus C:N:P onde observa-se que o pH na faixa estudada não teve relevância quando associado às taxas nutricionais estudadas. No entanto, é observado que a maior eficiência de biodegradação EB (%) ocorreu quando as taxas nutricionais estavam em torno de 100:1:0,5. Com base nos gráficos de superfície de resposta e, tendo em vista que as faixas de valores investigados para pH e taxas nutricionais C:N:P, conclui-se que para o solo arenoso, somente a taxa nutricional teve influência significativa na determinação da eficiência da biodegradação do óleo cru.

Figura 3 - Superfície de resposta: Percentual de material estruturante (PME) versus taxa nutricional do solo (C:N:P)

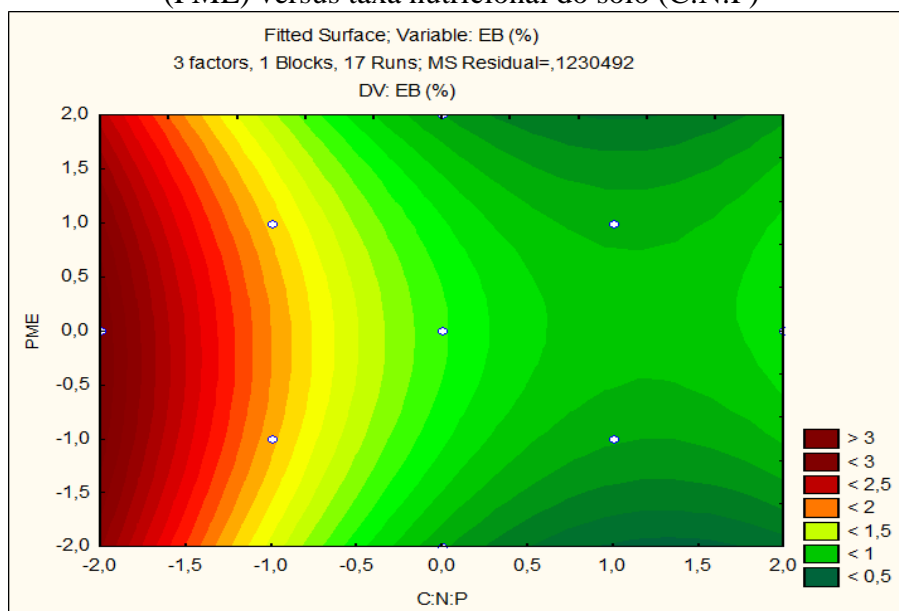
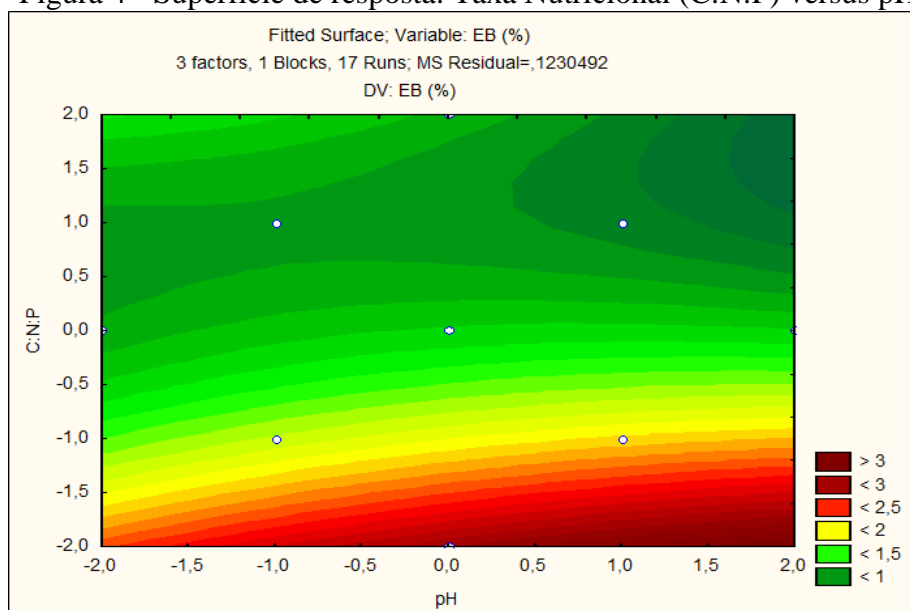


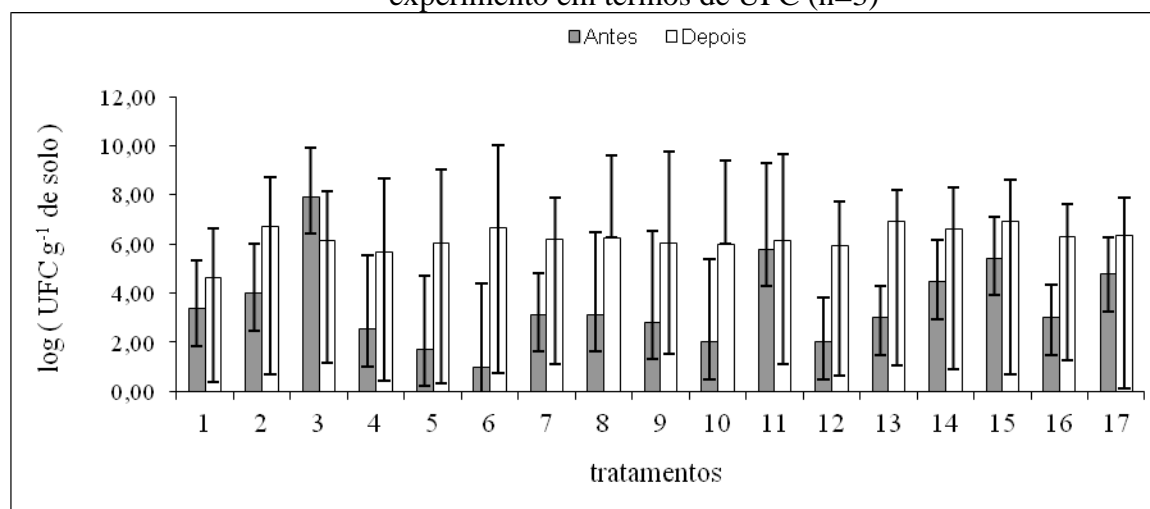
Figura 4 - Superfície de resposta: Taxa Nutricional (C:N:P) versus pH



Quantificação de microrganismos heterotróficos totais (MHT)

A Figura 5 apresenta as densidades microbianas heterotróficas totais nos diferentes tratamentos no início e ao final do experimento. As mesmas foram expressas em unidades formadoras de colônia por grama de solo (UFC g⁻¹). Conforme ilustrado, no início do experimento, o tratamento 3 foi o que apresentou a maior população de microrganismos heterotróficos totais ($8,40 \times 10^7$ UFC g⁻¹ de solo) quando comparado aos demais tratamentos testados. No entanto, a diferença entre este e os demais tratamentos não foi significativa ($p < 0,05$), como resultado dos altos desvios-padrão. Cabe ressaltar, que os tratamentos 11, que apresentou a melhor eficiência de biodegradação (EB) e o tratamento 15 apresentaram populações de microrganismos heterotróficos totais em ordem de grandeza igual a 10^5 . Quando as populações heterotróficas totais no início e no final de cada tratamento são comparadas, todos os tratamentos resultaram em crescimento microbiano, com exceção do tratamento 3, que coincidentemente, foi o que apresentou a eficiência de degradação mais baixa dentre todos os tratamentos (Tabela 3). Ao final do experimento, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as densidades de microrganismos heterotróficos totais ($8,40 \times 10^6$ UFC) dos tratamentos testados.

Figura 5 - Monitoramento da população microbiana heterotrófica total (MHT) nos diferentes tratamentos, no início e ao final do experimento em termos de UFC (n=3)



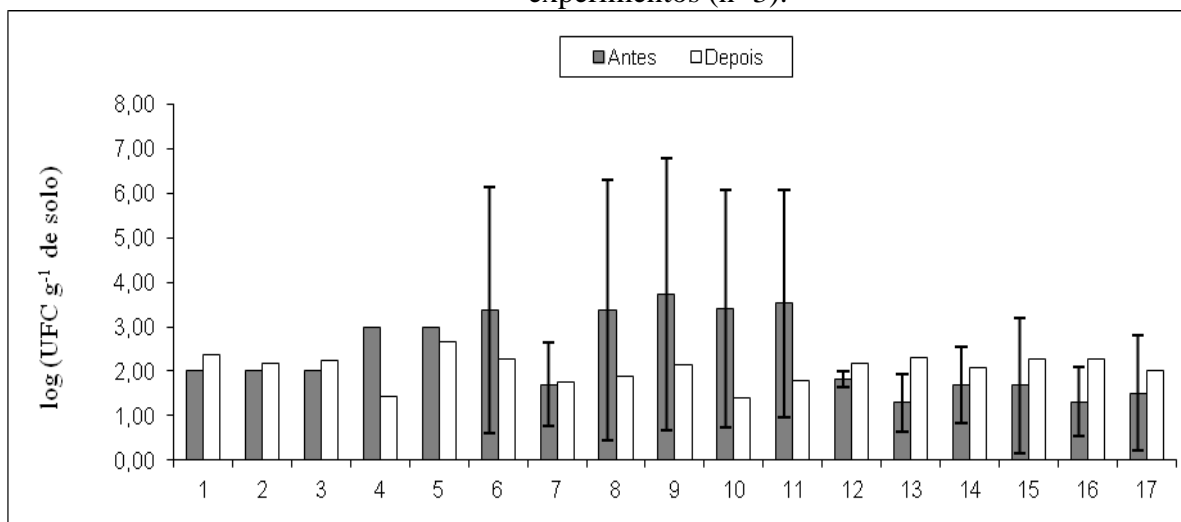
Quantificação da população de fungos

A Figura 6 mostra as quantificações da população de fungos nos diferentes tratamentos adotados no início e no final do experimento. Pode-se observar que o tratamento 11 (maior eficiência de degradação dentre todas as condições) apresentou população fúngica na faixa superior, juntamente com as condições 6, 8, 9, 10, 11 (sendo as últimas três representando pontos axiais no planejamento experimental, Tabela 3).

Os tratamentos 1, 2, 3, 12, 13, 14, 15, 16 e 17 apresentaram crescimento da densidade populacional de fungos ao longo dos 70 dias de estudo. Já os tratamentos 4, 5, 6, 8, 9, 10, e 11 apresentaram uma queda na densidade populacional de fungos, ainda que sem diferença significativa ($p < 0,05$). Tais tendências distintas na dinâmica de crescimento e decaimento da população fúngica sugerem que períodos menores do que os 70 dias teriam provavelmente

tido mais apropriados para a observação de diferenças entre densidades populacionais de fungos nos diferentes tratamentos.

Figura 6 - População de fungos nos diferentes tratamentos: início e final dos experimentos (n=3).



Quantificação de microrganismos degradadores de óleo cru

A Figura 7 apresenta as quantificações de microrganismos degradadores de óleo cru nos diferentes tratamentos no início e ao final do experimento. As mesmas foram expressas em números mais prováveis por grama de solo (NMP g⁻¹ de solo). O tratamento 11 que apresentou a maior EB (%) foi também a que apresentou a maior população de microrganismos degradadores de óleo cru ($1,10 \times 10^6$ NMP g⁻¹ de solo) tanto no início quanto no final do experimento. O tratamento 3 que teve a menor EB (%) foi também a que apresentou as menores populações de MBP no início e no fim. A comparação dos diferentes indicadores populacionais microbianos sugere que os MBP (Figura 7) são os mais indicados para refletir o metabolismo aeróbio em curso em solo contaminado por óleo cru, seguido da população fúngica (Figura 6). A Figura 8 resume os dados sobre EB e MBP. O tratamento 11 (pH = 7,5; C:N:P = 100:1:0,5 e PME = 5%) apresentou a maior eficiência de biodegradação (3,4%) de matéria orgânica, a maior população de microrganismos degradadores de óleo cru ($1,1 \times 10^6$ NMP g⁻¹ de solo). Com base na Figura 6, foi o tratamento que também apresentou a densidade aparente de fungos ($3,3 \times 10^3$ UFC g⁻¹ de solo).

Figura 7 - Monitoramento da população de microrganismos degradadores de petróleo (MDP), nas condições testadas

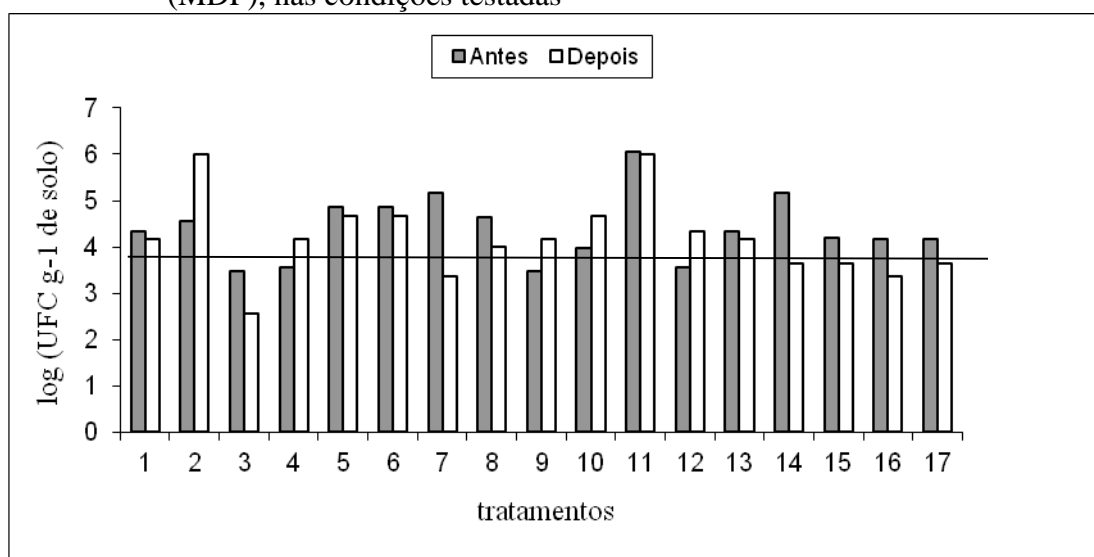
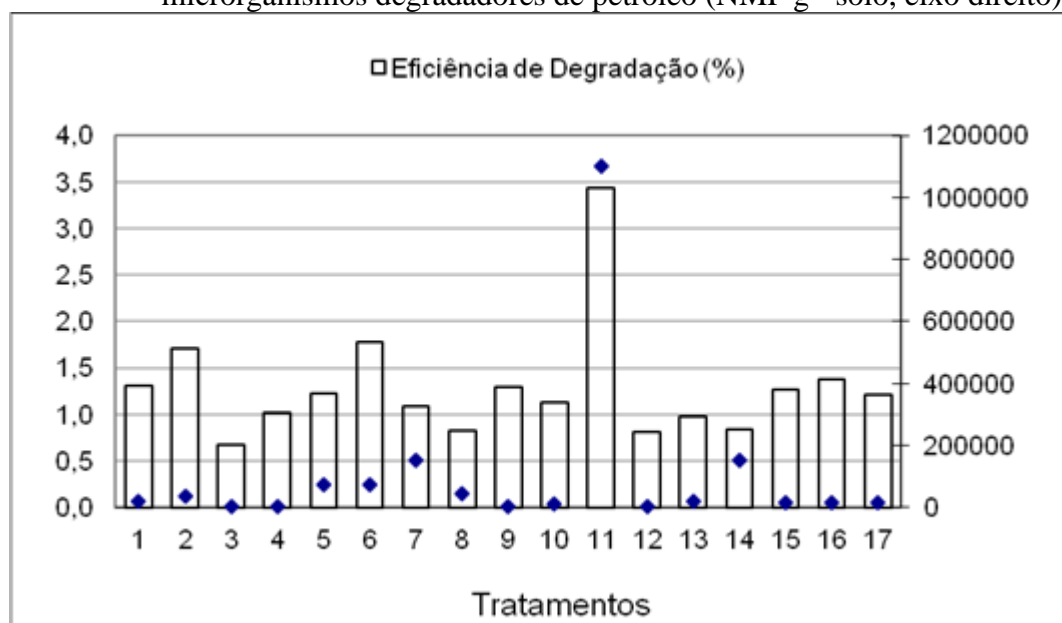


Figura 8 - Eficiência de biodegradação (EB %, eixo esquerdo) e quantificação de microrganismos degradadores de petróleo (NMP g⁻¹ solo, eixo direito)



Conclusões

A utilização do método respirométrico para distinção da eficiência de diferentes tratamentos na degradação de compostos orgânicos em solos contaminados por petróleo mostrou-se bastante útil como abordagem preliminar laboratorial para em curto espaço de tempo, determinar os melhores níveis a serem e a variáveis importantes em ações de biorremediação em escala de campo.

Dentre os indicadores da população microbiológica, a contagem dos microrganismos degradadores de petróleo-MBP (em NMP/g solo) foi mais adequada do que a contagem de microrganismos heterotróficos totais e população fúngica, quando o objetivo é refletir o avanço da biodegradação dos hidrocarbonetos presentes no solo.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (Proc. N° 307.370/2010-0), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Proc. N° E-26/103.064/2011) e à empresa Estre Ambiental pelo apoio financeiro; à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa-Solos) pelo apoio técnico nas análises de solo.

Referências Bibliográficas

ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. Academic Press, 2 ed, San Diego, USA, 239 p., 1999.

BALBA, M. T.; AI-DAHER, R., AI-AWADHI, N. **Bioremediation of oil-contaminated desert soil: the kuwaiti experience**. Environment International. New York, v. 24, n. 1-2, p. 163-73, jan./feb. 1998.

BEAUDIN, N.; CARON, R. F.; LEGROS, R.; RAMSAY, J.; RAMSAY, B. **Identification of the key factors affecting composting of a weathered hydrocarbon-contaminated soil**. Biodegradation, Dordrecht, Holand v. 10, n. 2, p. 127-133, 1999.

BENYAHIA, F.; ABDULKARIM, M.; ZEKRI, A.; CHAALAL, O.; HASANAIN, H. **Bioremediation of crude oil contaminated soils: A Black Art or an Engineering Challenge** In: WORLD CONGRESS OF CHEMICAL, 7, 2005, Glasgow, Escócia. Process Safety and Environmental Protection, Rugby, Inglaterra, v. 83, n. 4, p. 364-370, July 2005.

BERGER, T. M. **Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos totais do petróleo – enfoque na aplicação do processo terraferm**. [Tese de Doutorado]. Porto Alegre, Brasil: Universidade Federal do Rio de Grande do Sul; 2005.

CHAGAS-SPINELLI, A. C. O. **Biorremediação de solo argiloso contaminado por hidrocarbonetos poliaromáticos provenientes de derrame de óleo diesel**. [Tese de Doutorado]. Recife, Brasil: Universidade Federal de Pernambuco; 2007.

CHAILLAN, F. CHAÎNEAU C. H.; POINT, V.; SALIOT, A.; OUDOT, J. **Factors inhibiting bioremediation of soil contaminated with weathered oils and drill cuttings**. Environmental Pollution, Barking, Inglaterra, v. 144, n. 1, p. 255-265, Nov. 2006.

CHAÎNEAU, C. H.; YEPREMIAN, C.; VIDALIE, J. F.; DUCREUX, J.; BALLERINI, D. **Bioremediation of a crude oil-polluted soil: biodegradation, leaching and toxicity assessments**. Water, Air, and Soil Pollution, Dordrecht, Holanda, v. 144, n. 1-4, p. 419-440, 2003.

CIANNELLA, R. C. **Avaliação de diferentes estratégias de biorremediação no tratamento de solo contaminado por óleo diesel B5**. [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro, Brasil: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2010.

COULON, F.; PELLETIER, E.; GOURHANT, L.; DELILLE, D. **Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sub-Antarctic soil.** *Chemosphere*, Oxford, Inglaterra, v. 58, n. 10, p. 1439-1448, Mar. 2005.

COULON, F.; AWADI, M. A.; COWIE, W.; MARDLIN, D.; POLLARD, S.; CUNNINGHAM, C.; RISDON, G.; ARTHUR, P.; SEMPLE, K. T.; PATON, G. I. **When is a soil remediated? Comparison of biopiled and windrowed soils contaminated with bunker-fuel in a full-scale trial.** *Environmental Pollution*, Barking, Inglaterra, v. 158, n. 10, p. 3032-3040, Oct. 2010.

DAVIS, J. W.; MADSEN, S. **Factors affecting the biodegradation of toluene in soil.** *Chemosphere*, Oxford, Inglaterra, v. 33, n. 1, p. 103-130, July. 1996.

DELILLE, D.; COULON, F.; PELLETIER, E. **Effects of temperature warming during a bioremediation study of natural and nutrient-amended hydrocarbon-contaminated sub-Antarctic soils.** *Cold Regions Science and Technology*, Amsterdam, Holanda, v. 40, n. 1-2, p. 61-70, Nov. 2004.

DELILLE, D.; COULON, F.; PELLETIER, E. **The influence of temperature on bacterial assemblages during bioremediation of a diesel fuel contaminated sub Antarctic soil.** *Cold Regions Science and Technology*, Amsterdam, Holanda, v. 48, n. 2, p. 74-83, May. 2007.

DELILLE, D.; DUVAL, A.; PELLETIER, E. **Highly efficient pilot biopiles for on-site fertilization treatment of diesel oil-contaminated sub-Antarctic soil.** *Cold Regions Science and Technology*, Amsterdam, Holanda, v. 54, n. 1, p. 7-18, Sept. 2008.

DELILLE, D.; PELLETIER, E.; RODRIGUEZ-BLANCO, A.; GHIGLIONE, J. F. **Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in sub-Antarctic coastal seawater.** *Polar Biol*, v. 32, n. 10, p. 1521-1528, 2009.

DIBBLE, J. T.; BARTHA, R. **Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge.** *Applied and environmental microbiology*, Washington, Estados Unidos, v. 37, n. 4, p. 729-239, Apr. 1979.

DOUGLAS, G. S.; HARDENSTINE, J. H.; LIU, B.; UHLER, A. D. **Laboratory and Field Verification of a Method to Estimate the Extent of Petroleum Biodegradation in Soil.** *Environ. Sci. Technol.*, 2012.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solos.** 2ª ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 1998. 212 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise química para avaliação de fertilidade do solo.** 1 ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 1997. 42 p.

FILLER, D. M.; LINDSTROM, J. E.; BRADDOCK, J. F.; JOHNSON, R. A.; NICKALASKI, R. **Integral biopile components for successful bioremediation in the**

Arctic. Cold Regions Science and Technol, Amsterdam, Holanda, v. 32, n. 2-3, p. 143-156, Sept. 2001.

FILLER, D. M.; REYNOLDS, C. M.; SNAPE, I.; DAUGULIS, A. J.; BARNES, D. L.; WILLIAMS, P. J. **Advances in engineered remediation for use in the Arctic and Antarctica.** Polar Record, Cambridge, v. 42, n. 2, p. 111–120, 2006.

GOGOIA, B. K.; DUTTA, N. N.; GOSWAMI, P.; KRISHNA MOHAN, T. R. **A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site.** Advances in Environmental Research, Berkley, California, v. 7, n. 4, p. 767-782, June. 2003.

GOMES, A. P. N.; LIMAS, M. M.; CORSEUIL, H. X. **Biodegradação do biodiesel de mamona em águas superficiais.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 24º, 2007, Minas Gerais. Anais... Belo Horizonte, MG: FITABES, 2007.

IRVINE, D. A.; FROST, H. L. **Bioremediation of soils contaminated with industrial wastes: a report on the state-of-the-art in bioremediation,** *SBR Technologies Inc.*

JONGE, H.; FREIJER, J. I.; VERSTRAEN, J. M.; WESTERVELD, J. **Relation between Bioavailability and Fuel Oil Hydrocarbon Composition in Contaminated Soils.** Environ. Sci. Technol. 31, 771-775, 1997.

JORGENSEN, K. S.; PUUSTINEN, J; SUORTTI, A. M. **Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles.** Environmental Pollution, v. 107, n. 2, p. 245-254, Feb., 2000.

JUTEAU, P. ; J. G. BISAILLON ; L'EPINE, F. ; RATHEAU, V. ; BEAUDET, R. ; VILLEMUR, R. **Improving the biotreatment of hydrocarbons-contaminated soils by addition of activated sludge taken from the wastewater treatment facilities of an oil refinery.** Biodegradation, Dordrecht, Holanda, v. 14, n. 1, p. 31–40, 2003.

KÄSTNER, M.; BREUER-JAMMALI, M.; MAHRO, B. **Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil.** Applied and Environmental Microbiology, v. 64, n. 1, p. 359-362, Jan., 2000.

KHAN, F. I.; HUSAIN, T.; HEJAZI, R. (2004) **An Overview and Analysis of Site Remediation Technologies.** Journal of Environmental Management, v. 71, p. 95-122, 2004.

KODRES, C. A. **Coupled water and air flows through a bioremediation soil pile.** Environmental Modelling & Software, Oxford, Inglaterra, v. 14, n. 1, p. 37–47, Oct. 1998.

KRIIPSALU, M.; MARQUES, M.; HOGLAND, W.; NAMMARI, D. R. **Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons during composting of oily sludge.** Environmental Technology, v. 29, p. 43-53. 2008.

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.

LEAHY, J. G.; COWELL, R. R. **Microbial degradation of hydrocarbons in the environment**. Microbiological reviews. Washington, Estados Unidos, v. 54, n. 3, p. 305-315, Sep. 1990.

LI, L. *et al.* **Field of new aeration system for enhancing biodegradation in a biopile**. Waste Management, v.24, p.127 – 137, 2004.

LI, L.; CUNNINGHAM, C. J.; PÁS, V.; PHILP, J. C.; BARRY, D. A.; ANDERSON, P. **Field trial of a new aeration system for enhancing biodegradation in a biopile**. Waste Management. 24: 127–137. 2004.

LIMA, C.A. **Quantificação do decréscimo do risco associado à biorremediação de um solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo**. [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro, Brasil: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2004.

MARIANO, AP. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. [Tese de Doutorado]. Rio Claro, Brasil: Universidade Estadual Paulista, 2006.

MARQUES, M. **Fitorremediação de solos multicontaminados por HPAs e metais pesados a partir de óleo lubrificante usado**. Projeto aprovado pelo Edital Universal CNPq No 15/2007, Processo 475644/2007 no âmbito do Programa de Pesquisa Científica, Tecnológica e Inovação, MCT/CNPq, 2007.

MELLO, G. S. L.; MORITA, D. M.; MAFREDINI, S.; RIVIERA, I. N. G. **Viabilidade da aplicação do método respirométrico de bartha para determinação da biodegradação de poluentes ou resíduos em latossolos**. Escola de Engenharia Mauá, Eng. Sanit. Ambient., v. 12, n. 1, p. 71-78, 2007. (Artigo).

MILLIONI, V. S. **Avaliação da potencialidade da utilização de surfactantes na biorremediação de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo**. 2009. 200 f. [Tese de doutorado]. Rio de Janeiro, Brasil: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa 62, de 22 de agosto de 2003. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14. Anexo IV.

MOHN, W. W; RADZIMINSKI, C. Z.; FORTIN, M. C.; REIMER, K. J. **On site bioremediation of hydrocarbon-contaminated Arctic tundra soils in inoculated biopiles**. Appl. Microbiol. Biotechnol. Berlim. V. 57, n. 1-2, p. 242–247, 2001.

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

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2 ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p. (LIVRO).

MUELLER, P.; BREIDENBACH, D.; HOFMAN, M. **Ist der Einsatz von speziell in Labor gezuchteten Mikroorganismen in der Boden-sanierung sinnvoll.** In: STEGMANN, R. **Neue Techniken der Bodenreinigung.** Bonn: Econômica, 1996.

NAMKOONG, W.; HWANG, EUI-YOUNG; PARK, JOON-SEOK; CHOI, JUNG-YOUNG. **Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting.** Environmental Pollution, v. 119, n. 1, p. 23-31, 2002.

OLIVEIRA, F. J. S. **Biorremediação de solo arenoso contaminado por óleo cru.** 2001. 101 f. [Dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro, Brasil: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.

PEREIRA, P. F. S. **Perfil analítico da biodegradação de solos arenoso e argiloso contaminados por óleo cru** .[Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro, Brasil: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

PRINCE, R. C.; GAREM R. E.; GARRETT, R. M.; GROSSMAN, M. J.; HAITH, C. E.; KEIM, L. G.; LEE, K.; HOLTOM, G. J.; LAMBERT, P. L.; SERGY, G.A.; OWENS, E.H.; GUÉNETTE, C.C. **Bioremediation of stranded oil on an Arctic shoreline.** Spill Science & Technology Bulletin, 8:303-312. 2003.

RHYKERD, R. L.; CREWS, B.; MCLNNES, K. J.; WEAVER, R. W. **Impact of bulking agents, forced aeration, and tillage on remediation of oil-contaminated soil.** Bioresource Technology. 67: 279-285. 1998.

RIZZO, A. C. L., CUNHA, C. D.; SANTOS, R. L. C.; SANTOS, R. M.; MAGALHÃES, H. M.; LEITE, S. G. F.; SORIANO, A. U.; **Preliminary identification of the bioremediation limiting factors of a clay bearing soil contaminated with crude oil.** Journal of the Brazilian Chemical Society. V. 19, n. 1, 169-174, 2008.

SALANITRO, J. P.; DORN, P. B.; HUESEMANN, M. H.; MOORE, K. O.; RHODE S, I. A.; JACKSON, L. M. R.; VIPOND, T. E.; WESTERN, M. M.; WISNIEWSKI, H. L. **Crude Oil Hydrocarbon Bioremediation and Soil Ecotoxicity Assessment.** Environmental Science & Technology. 31: 1769-1776.1997.

SANSCARTIER, D.; LAING, T.; REIMER, K.; ZEEB, B. **Bioremediation of weathered petroleum hydrocarbon soil contamination in the Canadian high arctic: laboratory and field studies.** Chemosphere, v. 77, p. 1121–1126, 2009.

SANTOS, E. C.; SILVA, I. S.; SIMÕES, H. N.; SIMIONI, K. C. M.; OLIVEIRA, V. M.; GROSSMAN, M. J.; DURRANT, L. R. **Correlation of soil microbial community responses to contamination with crude oil with and without chromium and copper.** International Biodeterioration & Biodegradation. 70:104-110. 2012.

SARKAR, D. M.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. **Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biossolids 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.

SEABRA, PNC. **Aplicação de biopilha na biorremediação de solos argilosos contaminados por petróleo.** [Tese de doutorado]. Rio de Janeiro, Brasil: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

SEKLEMOVA, E.; PAVLOVA, A.; KOVACHEVA, K. **Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel: field demonstration.** *Biodegradation*, v. 12, p. 311–316, 2011.

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.

SIDDIQUE, T.; OKEKE, B. C.; ARSHAD, M; FRANKENBERGER, W. T. Jr. **Temperature and pH effects on biodegradation of hexachlorocyclohexane isomers in water and soil slurry.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. V. 50, pp. 5070-5076, 2002. (ARTIGO).

SILVA, E. P. **Avaliação preliminar do potencial de aplicação da tecnologia de biopilhas para a biorremediação do solo de Guamaré-RN.** 2004. [Dissertação de mestrado]. Natal, Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2004.

SINGH, A.; WARD, O. P. **Biodegradation and bioremediation.** 3 ed. Springer, 2004. 308 p.

CHAGAS-SPINELLI, A. C. O. C. **Biorremediação de solo argiloso contaminado por hidrocarbonetos poliaromáticos provenientes de derrame de óleo diesel.** [Tese de doutorado]. Recife, Brasil: Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

TRINDADE P. V. O.; SOBRAL L. G.; RIZZO A. C. L; LEITE S. G. F.; SORIANO A.U. **Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study.** *Chemosphere*, 58: 515-522. 2005.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA Natural Resources Conservation Service. **Soil Quality Information Sheet.** January 1998 Disponível em: http://soils.usda.gov/sqi/assessment/files/available_water_capacity_sq_physical_indicator_sheet.pdf

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – USEPA **Biopiles** Disponível em: http://www.epa.gov/oust/pubs/tum_ch4.pdf

VAN GESTEL, K.; MERGAERT, J.; SWINGS, J.; COOSEMANS, J.; RYCKEBOER, J. **Bioremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste.** *Environmental Pollution*, Barking, Inglaterra, v. 125, n. 3, p. 361-368, Oct. 2003.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A., WARD, O. P. **Recent advances in petroleum microbiology.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 67, n. 4, p. 503-549, 2003.

VAZ, M. J. **Biodegradação *ex-situ* e avaliação da atividade biológica de solos contaminados por hidrocarbonetos.** [Dissertação de Mestrado]. Santa Cruz do Sul, Brasil: Universidade de Santa Cruz do Sul, 2010.

VECCHIOLI, G.; Del PANNON, M. T.; PAINCEIRA, M. T. **Use of selected autochthonous soil 220acteria to enhance degradation of hidrocarbons in soil.** Environmental Pollution, vol. 67, pp. 249-258. 1990.

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

VIELMO, A. L. **Limite superior da retenção da água no solo: método de campo e método de estimativa.** [Dissertação de Mestrado]. Rio Grande do Sul, Brasil: Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

VOLPO, A. G. T.; VITAL, R. L.; CASELLA, R. C. **Método NMP em microescala para contagem de microrganismos consumidores de hidrocarbonetos.** Comunicação técnica SEBIO N. 06/68.

WALKLEY, A & BLACH, L. A. **Na examination of the Detjareff method for determining soil organic matter and propose modification of the chromic titration methods.** Soil Science. Vol. 37 p. 29-38. 1934. *Apud* JARAMILLO, I. R. **Fundamentos teóricos-práticos de temas selectos de la ciência del suelo.** Parte 1 Universidad Autónoma Metropolitana, México, 1996.

WETLER, R. M. C. **Prospecção de microrganismos responsáveis pela degradação de compostos de petróleo no sedimento de um manguezal localizado no sul da Bahia (Brasil).** 2006. 100 f. [Dissertação de mestrado]. Ilhéus, Brasil: Universidade Estadual de Santa Cruz, 2006.

YANG SI-ZHONG; JIN HUI-JUN; WEI ZHI; HE RUI-XIA; JI YAN-JUN; LI XIU-MEI; YU SHAO-PENG. **Bioremediation of oil spills in cold environments: a review.** Pedosphere, Pequim, v. 19, n. 3, p. 371-381, June. 2009.

ZHOU, E.; CRAWFORD, R. **Effects of oxygen, nitrogen, and temperature on gasoline biodegradation in soil.** Biodegradation, v. 6, n. 2, p. 127-140, 1995.

APÊNDICE C - Manuscrito 3

Biorremediação de solo argiloso contaminado com óleo cru: biopilha dinâmica e estática com aeração forçada em ensaios de bancada

Lopes¹, J.A., Silva², G., Marques^{3,19}, M., Corrêa⁴, S.M.

¹*Transpetro*

²*Estre Ambiental*

³*Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias-LABIFI, Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente, Universidade do Estado do Rio de Janeiro-UERJ*

⁴*Faculdade de Tecnologia-FAT, Universidade do Estado do Rio de Janeiro-UERJ*

RESUMO A biorremediação de solo argiloso com histórico de contaminação antiga e recém-contaminado com óleo cru foi investigada em escala de bancada, para duas estratégias (bioestímulo-BIOS e bioaumento-BIOA), simulando duas condições tecnológicas distintas (biopilha dinâmica-M e biopilha estática de aeração forçada-B). O inóculo utilizado para o bioaumento foi obtido e enriquecido a partir do próprio solo com contaminação antiga. Os tratamentos em triplicatas incluíram controles (solo original-CONT) e foram monitorados ao 0, 24, 59 e 121 dias quanto à população microbiana heterotrófica total (PHT), de fungos (PF), degradadora de óleo (PDO) e os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) e policíclicos aromáticos (HPA). Foi observada uma tendência de diminuição da densidade microbiana das PHT, PF e PDO entre os dias 0 e 121. As densidades de PHT e de PDO foram bem superiores nos solos com bioaumento, no dia 0, sendo que aos 121 dias tal superioridade foi observada apenas no reator de aeração forçada (BIOA B). A técnica de aeração forçada mostrou-se superior na remoção de HTP apenas no tratamento de bioaumento (BIOA B), sendo equivalente à técnica de revolvimento manual nos demais (CONT e BIOS). Para HPA, tal superioridade foi menos evidente, mas observada tanto no bioestímulo (BIOS B), quanto no bioaumento (BIOA B). Os resultados sugerem que com relação à HTP, a estratégia de bioaumento foi superior à de bioestímulo e a biopilha de aeração forçada alcança reduções superiores. Entretanto, com relação à HPA, o aumento inexplicável de dos teores no dia 0 (após a inoculação com PDO) dificultou a comparação entre as duas estratégias (bioestímulo x bioaumento) e requer maiores investigações. Solo argiloso contaminado por óleo cru reúne grandes desafios à biorremediação, tanto com relação ao aspecto textural do solo quanto da natureza do contaminante. Os processos são lentos, não eliminam toxicidade rapidamente e requerem ferramentas auxiliares para sua aceleração.

Palavras-chave: solo argiloso. Biorremediação. bioaumento, bioestímulo. biopilha dinâmica. biopilha estática.

ABSTRACT Bioremediation of clay soil with aged and recent contamination with crude oil was investigated in lab scale for two strategies (biostimulation-BIOS e bio-augmentation-BIOA), simulating two distinct technologies (dynamic biopile-M and forced aeration static biopile-B). The inoculum for bio-augmentation was obtained and enriched from the original soil with aged contamination. The treatments in triplicates included controls (original-CONT) and were monitored at day 0, 24, 59 and 121 regarding: total heterotrophic microorganisms (PHT), fungi population (PF), oil-degrading microorganisms (PDO), total petroleum hydrocarbons (HTP) and polycyclic aromatic hydrocarbons (HPA). It was observed a trend

¹⁹ Autor correspondente: UERJ-DESMA, Rua São Francisco Xavier, 524, sala 5024 Bloco E, Maracanã, CEP 20550-900, Rio de Janeiro, RJ. E-mail: marciam@uerj.br; tel: (21) 2334-0959.

for population density reduction for PHT, PF and PDO between 0 and 12 days. On day 0, PHT and PDO densities were higher in bio-augmented soils in both static and dynamic biopile compared to bio-stimulated and control soils. After 121 days, such superiority was observed only in static biopile (BIOA B). The static biopile seemed to perform better for HTP removal only for bio-augmented biopile (BIOA B), being equivalent to dynamic biopile for other treatments (CONT and BIOS). Regarding PAH, such static biopile superiority was less obvious, but it was suggested for both bio-stimulated (BIOS B) and bio-augmented biopiles (BIOA B). The results suggest that static biopile reached higher petroleum hydrocarbons reduction from the clayey soil. The bio-augmentation strategy was apparently superior to bio-stimulation in removing TPH. However, regarding PAH, the unexplainable PAH increase at day 0 (after augmentation with PDO) made difficult to compare both strategies (bio-stimulation and bio-augmentation) which requires further investigations. Clayey soil contaminated with crude oil raise considerable challenges regarding both the texture of the soil and the contaminant nature. The processes are slow, toxicity can increase before it is removed, which and additional tools are required to speed up the processes.

Keywords: clay soil. bioremediation, bio-stimulation. bio-augmentation. dynamic biopile. static biopile.

Introdução

A palavra biopilha é utilizada para definir um sistema de tratamento biológico no qual o solo contaminado escavado é montado em pilhas para permitir a biodegradação dos contaminantes, daí o termo (BENYAHIA, *et al.*, 2005). Há dois tipos básicos de biopilha para biorremediação de solos contaminados: estática e dinâmica. A diferença principal refere-se ao sistema de aeração. Na biopilha estática, a aeração é forçada, por meio de uma rede de tubos perfurados instalado acima da fundação, conectada a um soprador, bomba a vácuo ou um exaustor movido a vento (JORGENSEN *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2004; KRIIPSALU, *et al.*, 2009). Na biopilha dinâmica a aeração é conseguida por meio do revolvimento periódico do solo em tratamento, semelhante ao procedimento aplicado às leiras de compostagem (LOPES, *et al.*, 2011). Uma restrição importante quanto ao uso de biopilha dinâmica está associada à demanda por espaço físico. Para o uso deste tipo de biopilha há necessidade de movimentação de máquinas e equipamentos de forma mais intensa (LOPES *et al.*, 2011). Por outro lado, conforme Kriipsalu *et al.* (2009), nas biopilhas estáticas a distribuição espacial de calor, umidade e, portanto, das condições ideais para atividade microbiana no interior da massa de solo não se dá de forma homogênea, dificultando a biorremediação e criando *hotspots* onde a contaminação perdura. Com efeito, a ventilação forçada intensifica as perdas de água e calor no interior das biopilhas (KODRES, 1998; LI *et al.*, 2004; KRIIPSALU *et al.*, 2009). O fato de que nas biopilhas dinâmicas a aeração é feita pelo revolvimento mecânico do material, constitui-se em uma grande vantagem, uma vez que tal procedimento propicia a redistribuição da concentração dos compostos alvos, da temperatura e da umidade, parâmetros críticos ao processo de biorremediação. De acordo com Shukla *et al.* (2010), são os seguintes, os mais importantes parâmetros para a biorremediação: natureza dos poluentes; estrutura do solo, pH, umidade e hidrogeologia; taxa nutricional C:N:P, diversidade microbiana do local; temperatura e oxidação-redução (potencial redox).

Temperatura: A temperatura influencia todo processo biológico e tem um efeito significativo na degradação biológica do óleo (DIBBLE *et al.*, 1979; DELILLE, 2004; DELILLE *et al.*, 2007; SEABRA, 2005; YERUSHALMI *et al.*, 2003; THAVASI *et al.*, 2007; SANSCARTIER *et al.*, 2009; SI-ZHONG *et al.*, 2009; PORTIER *et al.*, 2007; KRIIPSALU *et al.*, 2009). A temperatura pode alterar a natureza física, a composição química e a toxicidade

do poluente, o que influencia o processo de degradação biológica (LEAHY e COLWELL, 1990).

Estudos anteriores mostraram a viabilidade da biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo no solo em baixas temperaturas, com o uso de técnicas de engenharia (COULON *et al.*, 2005; FERGUSON *et al.*, 2008; SCHOEFS *et al.*, 1998; PORTIER *et al.*, 2007; BENYAHIA *et al.*, 2005) sendo que a biodegradação de hidrocarbonetos já foi relatada em temperaturas abaixo de 0°C (ATLAS, 1981; RIKE *et al.*, 2005).

Umidade: A umidade do solo também é influenciada pelos teores de silte e areia (GIAROLA *et al.*, 2002). A determinação da capacidade de campo (C.C), juntamente com a textura e a porosidade são de fundamental importância na aplicação do processo de biorremediação em solos contaminados. Tal parâmetro permite o conhecimento do teor máximo de água que o solo é capaz de reter, sendo bastante utilizado para ajustar a umidade do mesmo (BAPTISTA, 2003; SEABRA, 2005; CHAGAS-SPINELLI, 2007). A literatura tem reportado teores ideais de água no solo para a atividade microbiana na faixa de 12% a 30% ($m\ m^{-1}$), o que corresponde a 40% - 85% da capacidade de campo (U.S. EPA, 2004).

Textura do solo: As características do solo no qual o contaminante é introduzido constituem-se também em um importante parâmetro a ser considerado (TRUAX, 1995; MARIANO *et al.*, 2008). Areia, silte e argila apresentam propriedades bastante distintas, as quais têm importante papel nas taxas de biodegradação. Segundo Scheffer *et al.* (1998) e Kiihl *et al.* (1976), tanto a textura quanto a porosidade do solo influenciam diretamente na densidade e permeabilidade deste, o que por sua vez se reflete na distribuição de gases e água. Quanto maior a densidade do solo mais compacto será o mesmo e menor será a sua porosidade. Dessa forma, solos argilosos são tratados com mais dificuldade quando comparados aos solos com frações mais grossas, constituído por uma porcentagem maior de areia. Os mesmos autores ressaltam também que a textura influencia diretamente na capacidade de retenção do contaminante. Assim, solos argilosos são capazes de reter mais facilmente uma quantidade maior do contaminante por meio do processo de adsorção. No Brasil há uma predominância de solos argilosos e arenosos. Quando um derrame de petróleo e derivados ocorre em solo argiloso os contaminantes não migram para muito longe da fonte de contaminação. Contudo, esta característica a princípio positiva em termos de contenção da contaminação, afeta negativamente a biorremediação. De acordo com Seabra (2005), a utilização de sistemas de biopilhas para o tratamento *in-situ* ou *ex-situ* de solos com altos teores de argila e silte (como a maioria dos solos brasileiros), representa um desafio tecnológico. O uso de biopilhas dinâmicas na biorremediação de solo argiloso contaminado com hidrocarbonetos de petróleo resultou na remoção de 86% (concentração inicial de 5,8% de hidrocarbonetos totais de petróleo-TPH) após 24 semanas, enquanto que em solo arenoso (concentração inicial de 1,7% de TPH), a taxa de remoção foi de 70% em apenas 12 semanas.

Diversidade microbiana: A diversidade microbiana do solo que contém uma grande diversidade de bactérias, fungos, algas, protozoários, nematóides e vírus também influencia o processo. Nesse habitat heterogêneo, ocorrem interações biológicas intensas e processos bioquímicos associados à degradação da matéria orgânica, além das transformações de elementos minerais, importantes para a nutrição das plantas como N, P, S, Fe e Mn (Eweis *et al.*, 1998). As bactérias, juntamente com os fungos formam o grupo de microrganismos mais abundantes nos solos e são considerados os mais importantes do ponto de vista da biodegradação de hidrocarbonetos (Eweis *et al.*, 1998). Comunidades microbianas pertencentes a ecossistemas contaminados apresentam pouca diversidade, quando comparadas aquelas presentes em ambientes não contaminados. Esse efeito pode ser explicado pelo predomínio das espécies capazes de degradar o contaminante ou, ao menos, de sobreviver na presença do mesmo (MACNAUGHTON *et al.*, 1999 *apud* CENPES, 2002). A diversidade

também pode ser influenciada pela complexidade da mistura de poluentes e pelo tempo de exposição ao mesmo.

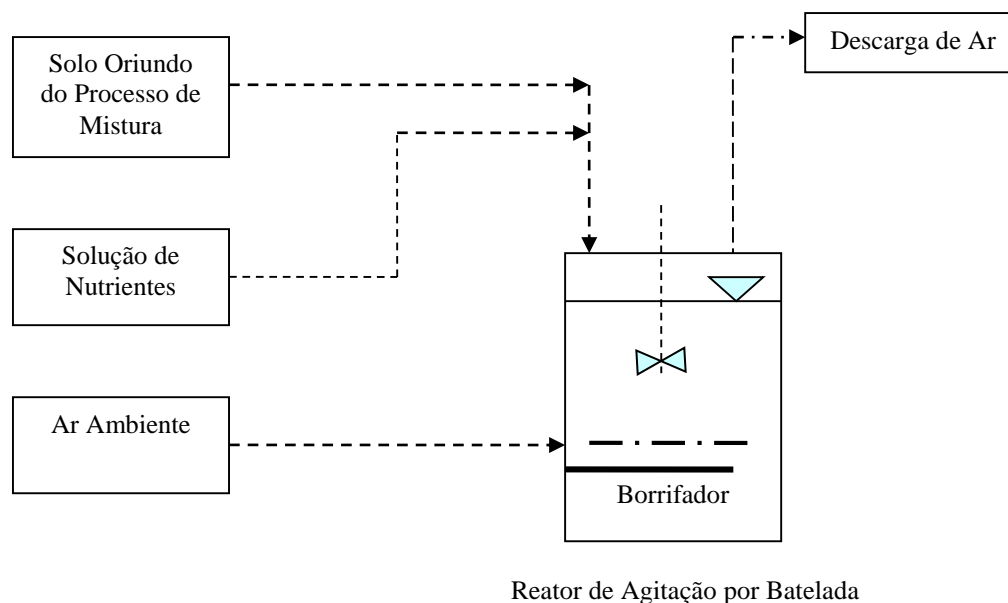
Natureza química do contaminante: Outro fator importante no processo de biorremediação é obviamente o contaminante. De acordo com Zílio e Pinto (2002), a composição global do petróleo pode ser definida quanto ao teor de hidrocarbonetos e de não-hidrocarbonetos. Os não-hidrocarbonetos são as resinas, fenóis, ácidos graxos, cetanos, ésteres etc.. Entre os hidrocarbonetos alifáticos, os alcanos são encontrados no petróleo na faixa de 5 até 40 átomos de carbono. O gás natural associado ao petróleo contém os alcanos mais voláteis, isto é, aqueles com baixos pesos moleculares - metano em sua maioria, e quantidades progressivamente menores de etano, propano e butano. Os hidrocarbonetos de petróleo são classificados como alcanos (normal e iso), ciclo-alcanos, aromáticos, asfaltenos e resinas. Os ciclo-alcanos presentes são conhecidos também por naftênicos. Os alcenos (chamados também de olefinas) são raros no petróleo cru, mas podem estar presentes em pequenas quantidades nos derivados de petróleo devido ao processo de craqueamento (EWEIS *et al.*, 1998; SEABRA, 2005).

Reatores: Os reatores biológicos ou biorreatores são vasos nos quais são mantidas as condições ambientais adequadas para a atividade biológica. O emprego de biorreatores para o acompanhamento dos processos de biorremediação possibilita que sejam mantidas as condições ótimas para a degradação dos contaminantes (GOGOIA *et al.*, 2003; URURAHY, 2008). Dessa maneira, o uso da tecnologia permite um tratamento rápido e eficaz (BERGER, 2005). De acordo com Fantroussi *et al.* (1999), com a grande vantagem da utilização de biorreatores é que eles oferecem a possibilidade de se avaliar continuamente o processo de biorremediação em nível tridimensional. Consequentemente - prosseguem os autores - torna-se fácil o acompanhamento espacial e temporal da distribuição dos microrganismos introduzidos. Por serem sistemas fechados, permitem o controle da temperatura, umidade, pH, oxigênio, nutrientes, adição de surfactantes, suplementação de microrganismos e controle da emissão de compostos orgânicos voláteis – COV. (KHAN *et al.*, 2004). Segundo Santos (2007), o biorreator mais usual para o tratamento de solos contaminados é do tipo “bioslurry”, ou reator de lama (Figura 1). De acordo com Khan *et al.* (2004), nesta tecnologia, também chamada de biorreator de fase semissólida, ao solo contaminado são adicionados os microrganismos degradadores selecionados e água. O solo escavado é previamente processado para a separação física das pedras e cascalho e a quantidade de água adicionada depende da concentração dos contaminantes, da taxa de biodegradação e da natureza do solo (Federal Remediation Technologies Roundtable, 2012). A mistura (lama) é agitada para manter os sólidos em suspensão e os microrganismos em contato com os contaminantes o que, segundo Rizzo *et al.* (2002), contribui para as altas taxas de degradação apresentadas pela tecnologia. Destacam ainda as autoras que este tipo de reator é mais indicado para solos que contenham partículas finas. Ainda de acordo com Khan *et al.* (2004), a tecnologia é adequada para a maioria dos tipos de petróleo. Rizzo *et al.* (2002) citam como desvantagem vantagem do biorreator, a necessidade de tratamento posterior os efluentes gerados, o que eleva os custos associados ao uso da tecnologia. Outros fatores limitantes para o uso da tecnologia são: a necessidade de classificação do material antes de ser introduzido no reator pode dificultar e encarecer o processo; solos não homogêneos e argilosos podem criar sérios problemas de manuseio; caso haja fase livre, a remoção ocorre; a desidratação do material, etapa final do tratamento, no caso dos solos finos pode tornar-se cara; é necessário um método adequado para descarte do efluente não reciclável (Federal Remediation Technologies Roundtable, 2012).

Há ainda os biorreatores de fase sólida, nos quais a umidade do solo é limitada à faixa de 10 a 20% (SANTOS, 2007), suficiente apenas, segundo Rizzo *et al.* (2002), para manter a

atividade dos microrganismos, sendo mais apropriados para o tratamento de solos com alto teor de sólidos.

Figura 1 - Processo típico de biorreator (adaptado de FRTR, 2012)



O objetivo principal do experimento foi comparar a eficiência na remoção de hidrocarbonetos de solo argiloso através do uso de biopilha dinâmica versus estática. Para tanto foram estabelecidos dois sistemas distintos em escala de bancada: um sistema em simulação de uma biopilha dinâmica (aeração por revolvimento) e um de biopilha estática (aeração forçada), utilizando, para tanto, microcosmos (biopilha dinâmica) e reatores aeróbios de fluxo de ar ascendente (biopilha dinâmica).

Materiais e Métodos

Microcosmos versus reatores de aeração forçada

Microcosmos: Os microcosmos utilizados foram construídos em recipientes de vidro de 4,5 cm de altura, 420 cm² de área e de 1890 cm³ de volume. Cada microcosmo recebeu 1150 g de solo recém-contaminado com óleo cru, o que correspondeu a um percentual de contaminação de 3 % de óleo cru (m m⁻¹).

A aeração foi realizada através de revolvimento do solo, três vezes por semana (BENTO *et al.*, 2005), realizado com auxílio de uma colher de alumínio de 20 cm de haste, previamente esterilizada. A umidade do solo foi feita periodicamente com água destilada estéril. A adição de água ao sistema era conduzida após análise de umidade de solo. Durante todo o experimento, os microcosmos foram mantidos cobertos em uma folha de para-filme para minimizar contaminações externas, principalmente, microbiológicas (BENTO *et al.*, 2005).

Reatores de aeração forçada: Os reatores utilizados foram constituídos de colunas em acrílico, de 33 cm de altura (27 cm de leito) e 14 cm de diâmetro, mantidos à temperatura ambiente. No inferior de cada reator foi mantida uma câmara de aproximadamente 923 cm³ para coleta de eventuais lixiviados, além de um furo de ½ polegada com uma distância de 33 cm de altura da base para a entrada de ar no sistema. Entre a camada de solo e a área para

coleta de lixiviado foi colocada um fundo de acrílico perfurado e sob este uma fina tela de nylon para evitar que o solo passasse para a câmara inferior. A aeração foi realizada por meio de injeção de ar. Foram utilizadas três bombas, que possuíam uma vazão máxima de 19 L min⁻¹, vácuo máximo de 26,9 in Hg capazes de suportar até 36 psi de pressão contínua, o que corresponde a 2,24 atm. Cada bomba insuflava ar, em paralelo, para dois reatores. Uma mangueira foi conectada em cada reator e antes do ponto de entrada do mesmo foi interligado um rotâmetro marca Dwyer (0 a 25 L min⁻¹) para controle do ar a ser distribuído no sistema. Cada mangueira foi acoplada ao respectivo reator, por meio de niples de ½” e flanges de ½”.

A aeração foi programada para garantir uma relação de aproximadamente 0,6 L min⁻¹ por kg de solo contaminado, de acordo com ensaios realizados, em reatores piloto por Miranda *et al.* (2006). A leitura da vazão de ar era realizada diretamente por meio de uma escala graduada fixada em rotômetros, que são aparelhos constituídos por um tubo cônico transparente com flutuador esférico, em nylon, o que proporciona alta resistência química, baixa absorção de umidade e transparência para facilitar a inspeção de rotina. Ao longo do experimento, foi realizado periodicamente análise de umidade e quando necessário foi introduzida água destilada e esterilizada pela parte superior dos reatores.

Solo: O solo utilizado para o presente estudo em laboratório foi escavado em uma instalação antiga de armazenamento de petróleo e derivados, composta por tanques, linhas aéreas e enterradas, a qual se encontrava em atividade desde 1951 no estado de São Paulo

Condições experimentais

Em estudo anterior (LOPES *et al.*, 2012), os efeitos da taxa nutricional, do pH e da proporção de material estruturante foram investigados por meio do teste respirométrico de Bartha, padronizado pela norma brasileira NBR 14283 (ABNT, 1999). Nesse experimento preliminar foram estabelecidas as condições para a avaliação de biodegradação no solo argiloso em estudo. No presente estudo monitorado por 121 dias, comparou-se a eficiência de microcosmos e reatores, através da análise de variáveis selecionadas. Em ambas as tecnologias, foram aplicadas as estratégias de bioestímulo e bioestímulo associado ao bioaumento. A Tabela 1 apresenta as condições experimentais estabelecidas.

Tabela 1 - Delineamento dos tratamentos empregados na avaliação da biotratabilidade.

Sigla	Tratamento	Condições Experimentais
CONT	Controle	Solo + sem ajuste de pH + sem ajuste de nutrientes + sem material estruturante + ajuste de umidade
BIOS	Bioestímulo	Solo com adição de óleo + com ajuste de pH + com ajuste de nutrientes + com adição de material estruturante + ajuste de umidade
BIOA ₁	Bioestímulo + Bioaumento	Solo com adição de óleo + com ajuste de pH + com ajuste de nutrientes + com adição de material estruturante + ajuste de umidade + inoculo de microrganismos provenientes do próprio solo

O tratamento CONT foi realizado com o objetivo de comparar o comportamento da biodegradação em solo de contaminação baixa e antiga em relação ao solo com contaminação recente e mais elevada. Para avaliar apenas a ação da população nativa do solo na biodegradação do contaminante, foi conduzido o tratamento BIOS, contendo somente solo contaminado recentemente, com ajuste de pH, nutrientes, material estruturante e umidade em valores otimizados no experimento anterior (LOPES *et al.*, 2012). Para avaliar o efeito do inoculo, proveniente do tratamento que apresentou melhor eficiência na biodegradação no

experimento anterior (LOPES *et al*, 2012) sobre os parâmetros otimizados anteriormente foram conduzidos os tratamentos BIOS + BIOA.

Obtenção e caracterização do óleo cru: O óleo utilizado nos experimentos é proveniente de campo de produção em terra, Fazenda Alegre, no estado de Espírito Santo e foi cedido pela Gerência de Pesquisa e Desenvolvimento de Abastecimento /Engenharia de Plantas Piloto – PDAB/PP do Centro de Pesquisa da Petrobras – CENPES em 13/08/2010. O óleo cru foi armazenado em bombona de 5 L, ao abrigo da luz e a temperatura de 20-25 °C até o uso.

Preparo do solo: Antes iniciar os experimentos, o solo foi transferido para bandejas de alumínio e conduzido a estufa de secagem, a 45 °C, durante três dias. Em seguida, o solo foi peneirado em malha de 2 mm de abertura em peneira Granutest (ABNT 10; Tyler 9), para permitir a remoção de restos de material vegetal e grandes torrões de terra, tornando o solo mais homogêneo.

Contaminação do solo: Com base em relatos da literatura, foi decidido realizar uma contaminação do solo, para um total de 3 % (m m^{-1}). A contaminação do solo foi conduzida em recipientes plásticos. A homogeneização foi realizada misturando-se manualmente o contaminante ao solo. Após a contaminação, o solo foi conduzido a recipiente de plástico, e permaneceu no interior de uma capela de exaustão durante uma semana para permitir a emissão dos voláteis, até a realização do experimento.

Ajuste de umidade: O ajuste de umidade inicial foi efetuado em todos os tratamentos para aproximadamente 50% da capacidade de campo, valor este que se encontra dentro da faixa ótima de umidade recomendada na literatura (PAUL e CLARK, 1989). A umidade foi corrigida pela adição de água destilada.

Ajuste de pH do solo: De modo a favorecer a atividade microbiana, o pH do solo original foi ajustado para 7,5 (valor próximo da neutralidade) dentro da faixa de 6,5 a 8,5, considerada adequada à atividade da maioria dos microrganismos (SARKAR *et al.*, 2005). Tal 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). Ressalta-se que o ajuste do pH foi efetuado antes da contaminação e foi verificado a cada três dias durante os quinze dias que antecederam a contaminação, de modo, a garantir que a condição de pH (7,5) em estudo fosse mantida.

Ajuste de nutrientes: A correção de nitrogênio e fósforo foi realizada utilizando-se solução de sais de nitrato de amônio (NH_4NO_3) e de fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4), respectivamente conforme Lopes *et al* (2012). A concentração das soluções utilizadas dependeu da relação C:N:P testada. No experimento de biodegradação foi utilizada a seguinte relação C:N:P: 100:1:0,5. Tais cálculos foram baseados no conteúdo de carbono orgânico total no solo, determinado pelo teor de carbono da matéria orgânica já presente no solo mais o teor de carbono proveniente da contaminação. Admitiu-se que este último era de 85% (m m^{-1}).

Adição de material estruturante: A adição de material estruturante foi realizada com a adição de areia peneirada em malha de 2 mm e esterilizada. Nos experimentos de biodegradação foram adicionados 5% (m m^{-1}) de material estruturante. A areia foi escolhida como material estruturante por tratar-se de material inerte que não interfere quimicamente com o processo de biodegradação.

Extração da cultura microbiana do solo: A cultura microbiana (EXP11) utilizada neste estudo foi obtida de uma amostra do solo que apresentou a melhor eficiência na biodegradação do contaminante do experimento anterior (LOPES *et al*, 2012), que supõe-se seja uma fonte de microrganismos degradadores de derivados de petróleo. Antes de realizar a extração de microrganismos do solo em questão, foi realizada uma avaliação preliminar da população de bactérias heterotróficas totais, fungos e microrganismos degradadores de óleo cru. Para extração dos microrganismos, pesou-se uma alíquota de 100 g do solo determinado,

adicionou-se em Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de meio mineral líquido BH acrescido de glicose como fonte de carbono e, cuja composição encontra-se na Tabela 2. A mistura foi mantida sob agitação em shaker (Quimis 816M200) a 150 min^{-1} , em temperatura de $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, após 4 dias. Após esse período, o crescimento microbiano foi observado pela turvação do meio de cultivo comparado ao frasco controle contendo o mesmo meio, sem amostra de solo. (CIANNELLA, 2010). Conjuntamente, foi realizada a quantificação da população microbiana heterotrófica, fungos e microrganismos degradadores.

Tabela 2 - Composição do meio mineral Bushnell Hass.²⁰

Sais	Concentração (g L ⁻¹)
Melaço	10,0
NaCl	5,0
K ₂ HPO ₄	1,0
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
pH = $7,0 \pm 0,2^*$	

Aclimatização da cultura microbiana EXP11: Ao final desse processo de extração de microrganismos do solo do tratamento do experimento que apresentou melhor eficiência de biodegradação, em 70 dias de experimento, seguiu-se a aclimatização da cultura microbiana EXP11. Em câmara de fluxo laminar (Pachane TPCR-T2,5 CB), uma alíquota de 20 mL da suspensão microbiana do meio de extração (1) foi transferida para outro frasco Erlenmeyer, contendo 200 mL do meio mineral líquido BH, porém sem melaço, que foi substituído por 1% (v v⁻¹) de óleo cru como única fonte de carbono. Essa nova mistura foi mantida sob agitação em *shaker* (Q 816M20) a 150 min^{-1} , temperatura de $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, por 4 dias, quando, uma alíquota de 20 mL foi retirada e transferida para outro frasco Erlenmeyer contendo meio mineral líquido BH acrescido de 2% (v.v⁻¹) de óleo cru. Nova incubação, nas mesmas condições, foi realizada. O procedimento foi repetido depois de 4 dias de incubação para a concentração de 3% de óleo cru. Ao final deste processo (16º dia), uma alíquota da suspensão microbiana aclimatada foi utilizada nos ensaios de bioaumento. A substituição do melaço por concentrações variáveis de óleo cru teve por objetivo estimular os microrganismos com potencial de utilização desse contaminante como fonte de carbono, dando-lhes uma vantagem seletiva em detrimento aos demais e também tornar a população microbiana menos vulnerável aos efeitos tóxicos do contaminante nos ensaios de biorremediação subsequentes. Todo o material e vidraria utilizados nos processos de extração e aclimação, assim como o meio mineral líquido BH, sem óleo cru foram previamente esterilizados em autoclave (Q 290-I2) a 121°C por 15 min.

Análises químicas, físicas e microbiológicas: Os parâmetros físicos e químicos foram realizados pelos laboratórios da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Solos), de acordo com o Manual de Métodos de Análise de Solo (EMBRAPA, 1997). Os HTP e os HPA foram analisados em laboratório comercial acreditado. Os parâmetros microbiológicos foram analisados no Laboratório de Biorremediação e Fitotecnologias (LABIFI) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). A Tabela 3 apresenta as análises e os métodos aplicados ao longo do experimento.

²⁰ pH ajustado com solução de ácido clorídrico (HCl) 1 mol L^{-1} e/ou solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol L^{-1} .

Tabela 3 - Parâmetros, análises, metodologia e intervalos de tempo para amostragens ao longo do experimento.

Análises	Metodologia	0d	24d	59d	121d
Teste de toxicidade (<i>Eisenia andrei</i>)	Normas ISO 11268-1 ISO 11268-2 (ISO, 2003)	x			x
PHT (UFC g solo ⁻¹)	Chagas-Spinellim, 2007	x	x	x	x
PF (UFC g solo ⁻¹)					
MDP (NMP g solo ⁻¹)	Trindade, 2002	x	x	x	x
TPH (mg kg solo ⁻¹)	ISO 16703: 2001 EPA 8015 (D): 2003	x	x	x	x
HPA (mg kg solo ⁻¹)	EPA 8270 (D): 2007 EPA 3550 (C): 2007	x	x	x	x
C:N:P (mg kg solo ⁻¹)	Embrapa, 1997	x			

Microrganismos: Os dados de quantificação da população heterotrófica total (PHT), da população de fungos (PF) e da população de microrganismos degradadores (PDO) foram transformados em log (10).

Resultados e Discussão

Caracterização do solo em estudo

A Tabela 4 apresenta a caracterização biológica, física e química do solo original antes da contaminação e início dos tratamentos.

O solo em estudo apresentou uma proporção granulométrica de 41% de areia, 29% de silte e 30% de argila. Utilizando o triângulo das classes texturais do solo (ABNT, 1989) para os dados granulométricos citados acima, concluiu-se que o solo é classificado como franco argiloso (35% < argila < 60%). Cabe ressaltar que uma característica marcante do solo franco é a presença acentuada de matéria orgânica, o que aumenta a capacidade da disponibilidade de água no solo (Soil Quality Information Sheet, 2012). Essa textura e característica têm aspectos relevantes que interferem nas atividades química e microbiológica do solo.

O pH do solo do presente estudo apresentou-se moderadamente ácido (5,4 em água e 4,8 em KCl) estando ambos os valores abaixo da faixa ótima de pH relatada na literatura para processos de biorremediação (6,5 a 8,5) (SARKAR *et al.*, 2005).

De acordo com a Tabela 4, a capacidade de troca catiônica (CTC) ou valor T do solo *em estudo* sugere argila de baixa atividade ($T < 27 \text{ cmolc kg}^{-1}$). Esse resultado indica que, em condições naturais ácidas, tal solo apresenta baixa capacidade para reter cátions. Segundo Chagas-Spinelli (2007), altas concentrações de argila de baixa atividade resultam em uma CTC semelhante à de solos arenosos. Cabe mencionar que a capacidade de troca catiônica indica uma intensa lixiviação dos cátions Mg^{+2} , Ca^{+2} , K^{+} e Na^{+} trocáveis, indicando que este solo possui baixa fertilidade e elevado grau de intemperismo (MEURER, 2004).

A taxa nutricional C:N:P do solo original apresentou-se em torno de 100:4,32:19,2. Tal relação foi calculada a partir dos resultados de carbono orgânico, nitrogênio e fósforo assimilável, que foram respectivamente de: 41,6 g kg⁻¹, 1,8 g kg⁻¹ e 8 mg kg⁻¹. A faixa recomendada pela EPA (1994) de Carbono, Nitrogênio e Fósforo para manter um crescimento microbiano adequado e manter o processo de biodegradação do solo contaminado varia de 100:10:1 a 100:1:0,5.

Tabela 4 - Caracterização do solo original utilizado no experimento.²¹

Composição granulométrica da terra fina dispersão com NaOH /calgon (g Kg ⁻¹)	Areia 2-0,05 mm	414
	Silte 0,05-0,002 mm	286
	Argila <0,002 mm	300
Densidade (g cm ⁻³)	Solo	1,21
	Partículas	2,56
Porosidade total (%)		52,73
Capacidade de campo (%)		28,48
pH (1:2,5)	Água	5,4
	KCl (1N)	4,8
Complexo Sortivo (cmol _c kg ⁻¹)	Ca ²⁺	7,2
	Mg ²⁺	1,5
	K ⁺	0,17
	Na ⁺	0,96
	Valor S (soma)	9,8
	Al ³⁺	0,00
	H ⁺	2,60
	Valor T (soma)	12,4
	Valor V (saturação de base)	79
Nutrientes:		
Matéria Orgânica (g kg ⁻¹)		83,2
Carbono Orgânico (g kg ⁻¹)		41,6
Nitrogênio total (g kg ⁻¹)		1,8
Fósforo assimilável (g kg ⁻¹)		8,0
Metais tóxicos (mg kg ⁻¹):		
Cr		2,54
Co		1,45
Ni		1,95
Cd		0,10
Pb		10,80
Hidrocarboneto total do petróleo (mg kg ⁻¹)		1119,00
Hidrocarboneto policíclico aromático (mg kg ⁻¹)		2,69
População heterotrófica total (UFC g ⁻¹)		4,45 x 10 ⁶
População de fungos (UFC g ⁻¹)		1,5 x 10 ²
População de microrganismos degradadores de óleo (NMP g ⁻¹)		1,00 x 10 ⁶
Teste de mortalidade (<i>E. andrei</i> duração do teste 56 dias)		0%

A Tabela 4 mostra os valores para determinados metais tóxicos no solo original. Todos os metais tóxicos analisados estavam abaixo do limite recomendado para os mesmos na Resolução Conama N° 420 (CONAMA, 2009). A quantificação de hidrocarbonetos totais de petróleo no solo *in natura* é de 1119 mg kg⁻¹. A Resolução CONAMA N° 420/09 (CONAMA, 2009) não apresenta valores orientadores para HTP.

No entanto, Ferreira (2010) destaca que na Lista Holandesa os valores de HPT no solo referenciados variam de 50 (valor de solo limpo) a 5000 (valor de solo para intervenção). Na Lista de Berlim, os valores variam de 300 a 5000 mg kg⁻¹, dependendo da sensibilidade do local (SEABRA, 2005). Segundo tais referências, o solo em estudo encontra-se na faixa de intervenção. A quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos HPA no solo *in natura* foi de 2,69 mg kg⁻¹. A Tabela 5 apresenta os valores observados no solo em estudo e

²¹ Notas: Valor S (S) = Soma de bases trocáveis (Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, Na⁺); Valor T = Soma das bases trocáveis mais a acidez potencial (S + H⁺ + Al³⁺).

os valores orientadores da Resolução COMANA No. 420, do Canadian Soil Quality Guidelines (2008) e da Lista Holandesa para os 16 HPA prioritários da EPA.

Tabela 5 - HPA em mg kg^{-1} (m m^{-1}) nas amostras do solo original e valores orientadores das agências e órgãos ambientais.²²

Composto (Nº de anéis aromáticos)	Solo Original	Conama 420 (2009)	Canadense (2008)	Holandesa (2010)
Naftaleno (2)	0,20	0,12	0,14	*
Acenaftileno (3)	<0,10	**	**	*
Acenafteno (3)	<0,10	**	**	*
Fluoreno (3)	nd	**	**	*
Fenantreno (3)	<0,10	3,3	0,51	*
Antraceno (3)	<0,10	0,039	0,12	*
Fluoranteno (4)	<0,10	**	**	*
Pireno (4)	0,11	**	**	*
Benzo(a)antraceno (4)	<0,10	0,025	0,25	*
Criseno (4)	0,70	8,1	10,7	*
Benzo(b)fluoranteno (5)	nd	**	**	*
Benzo(k)fluoranteno (5)	nd	0,38	2,4	*
Benzo(a)pireno (5)	nd	0,052	0,26	*
Indeno(1,2,3-cd)pireno (6)	0,35	0,031	**	*
Dibenzo(a,h)antraceno (6)	0,33	0,08	**	*
Benzo (g,h,i)perileno (6)	0,93	0,57	7,5	
Soma	2,64	-	-	*40

Alguns HPA estavam presentes em concentrações superiores aos preconizados tanto na Resolução CONAMA N°420, quanto na Norma Canadense. Esse fato sugere que a qualidade do solo em estudo possa estar inadequada para a biota. Segundo U.S. EPA (1994), para que a biodegradação nos reatores seja efetiva, a quantificação mínima de microrganismos heterotróficos no solo deve ser 10^3 UFC g^{-1} . O solo *em estudo* original apresentou condições iniciais bastante satisfatórias ao processo de biorremediação.

Na avaliação da toxicidade foi constatada mortalidade de *E. andrei*, ao logo de 56 dias, período necessário para o ciclo reprodutivo da minhoca, realizando leitura quanto à mortalidade e reprodução (número de ovos e juvenis aos 14, 28, 42 e 56 dias). Não foi observado mortalidade no solo em estudo, no entanto, foi observado ao longo do teste um decaimento na biomassa. Segundo Roberts & Dorough (1984), a perda de peso corporal é um bom indicador de efeitos subletais. Porém, alguns fatores causam estresse nos indivíduos durante o ensaio, por exemplo, repetidos ajustes de umidade (SATERBAK *et al.*, 2000). No entanto, ao longo do teste, não foi observado presença de ovos não eclodidos. Eom *et al.* (2007) utilizaram teste similar em uma área industrial de carvoaria desativada a 30 anos, com altas concentrações de HPA e observaram que na mais alta concentração de HPA (40%) a quantidade de ovos foi reduzida em 70 % em relação ao controle, mas a sobrevivência não foi afetada.

²² Não possuem valores de referência na norma; LD = Limite de detecção do método.

Caracterização dos tratamentos no início do experimento ($t_0 = 0$ dia)

A caracterização física, química e biológica do solo contaminado no início do experimento ($t_0 =$ dia) representado pela média das triplicatas (Tabela 6).

Tabela 6 - Caracterização do solo recém-contaminado no início do experimento

Parâmetros	0 dia (microcosmos e reatores)		
	CONT	BIOS	BIOA
C (g kg^{-1})	35,75	29,56	27,10
N (g kg^{-1})	3,33	3,01	2,8
P (mg kg^{-1})	1,67	1,43	1,32
pH (em H_2O)	7,3	7,6	7,4
HPA (mg kg^{-1})	2,69	3,99	5,16
HTP (mg kg^{-1})	1119	2762	2791
Umidade (%)	14,3	14,6	14,2
Capacidade de Campo (%)	28	30	29
Densidade do solo (g cm^{-3})	1,17	1,14	1,09
PHT (UFC g^{-1})	$5,7 \times 10^6$	$6,3 \times 10^5$	$7,2 \times 10^8$
PF (UFC g^{-1})	$3,20 \times 10^4$	$1,69 \times 10^3$	$1,60 \times 10^3$
PDO (NMP g^{-1})	$1,10 \times 10^5$	$4,3 \times 10^3$	$4,6 \times 10^4$
Teste de mortalidade <i>E. andrei</i> , 14 dias (%)	3,3	23,3	100,0
Teste de mortalidade <i>E. andrei</i> , 28 dias (%)	3,3	80,0	100,0
Teste de mortalidade <i>E. andrei</i> , 42 dias (%)	3,3	100,0	100,0
Teste de mortalidade <i>E. andrei</i> , 56 dias (%)	3,3	100,0	100,0

As taxas nutricionais e pH iniciais estão com valores aproximados do pré-estabelecido em estudos anteriores, C:N:P (100:1:0,5) e pH = 7,5. Na Tabela 6 pode-se ainda observar que, ao início do experimento, os valores dos HTP nos tratamentos (BIOS e BIOA) apresentam valores de alerta (T) e os valores de intervenção (I) indicados na Lista Holandesa.

Os valores dos 16 HPA prioritários nos tratamentos BIOS e BIOA estavam abaixo dos valores relacionados na Lista Holandesa, porém em ambos os tratamentos alguns compostos aromáticos apresentam valores acima da Resolução COMANA N^o 420 e da Lista Canadense.

Indicadores microbiológicos ao longo dos tratamentos

Segundo U.S. EPA (1994), para que a biodegradação seja efetiva, a quantificação mínima de microrganismos heterotróficos no solo deve ser de 10^3 UFC g solo⁻¹. Os tratamentos CONT, BIOS e BIOA apresentaram inicialmente uma população de microrganismos heterotróficos totais (PHT), de fungos (PF) e de microrganismos degradadores de óleo cru (PDO) em níveis satisfatórios ao processo de biorremediação (Tabela 7). Quanto à avaliação da toxicidade aguda (ensaio de letalidade) nos tratamentos iniciais foi observada a mortalidade de *E. andrei*, ao logo de 56 dias, período necessário para o ciclo reprodutivo da minhoca, realizando leitura quanto à mortalidade e reprodução (número de ovos e juvenis aos 14, 28, 42 e 56 dias). Nas amostras dos tratamentos BIOS e BIOA, no tempo 0, os organismos expostos ao solo contaminado tiveram alta mortalidade (100%) quando comparados ao controle (3,33% de mortalidade). No entanto, o tratamento que recebeu inóculo (BIOA) apresentou 100% de mortalidade aos 14 dias, e o tratamento bioestimulado (BIOS) foi observado 80% de mortalidade. Os microrganismos PHT, PF e PDO nos tratamentos BIOS e BIOA, nos dias 0, 24^o, 59^o e 121^o de tratamento são vistos nas tabelas 8, 9 e 10. Ao longo do período de incubação as quantificações de microrganismos apresentaram variação ampla.

Tabela 7 - Microrganismos heterotróficos totais PHT (UFC g solo⁻¹) nos tratamentos CONT, BIOS e BIOA aos 0, 24°, 59° e 121° dias de incubação.

Dias	Microcosmos			Biorreatores		
	CONT	BIOS	BIOA	CONT	BIOS	BIOA
0	5,7 x 10 ⁶	6,3 x 10 ⁵	7,2 x 10 ⁸	5,7 x 10 ⁶	6,3 x 10 ⁵	7,2 x 10 ⁸
24	3,3 x 10 ²	3,0 x 10 ⁴	3,5 x 10 ⁵	1,3 x 10 ³	2,7 x 10 ²	1,2 x 10 ⁴
59	2,3 x 10 ³	3,5 x 10 ⁵	4,5 x 10 ⁶	6,5 x 10 ⁴	2,1 x 10 ³	4,5 x 10 ⁵
121	1,2 x 10 ²	5,6 x 10 ³	7,8 x 10 ⁴	3,4 x 10 ³	3,4 x 10 ²	5,8 x 10 ³

A Figura 2 apresenta as quantificações de população de microrganismos heterotróficos totais PHT nos diferentes tratamentos adotados ao longo do período de realização do experimento, expressos em unidades formadoras de colônia por grama de solo (UFC g solo⁻¹). Como esperado, a PHT nos solos bioaumentados era superior (de duas a três ordens de grandeza) às PHT presentes nos demais solos. Aos 121 dias, a superioridade já não era tão evidente.

Figura 2 - População de microrganismos heterotróficos totais (PHT) em diferentes fases do experimento (de 0, 24, 59 e 121 dias).

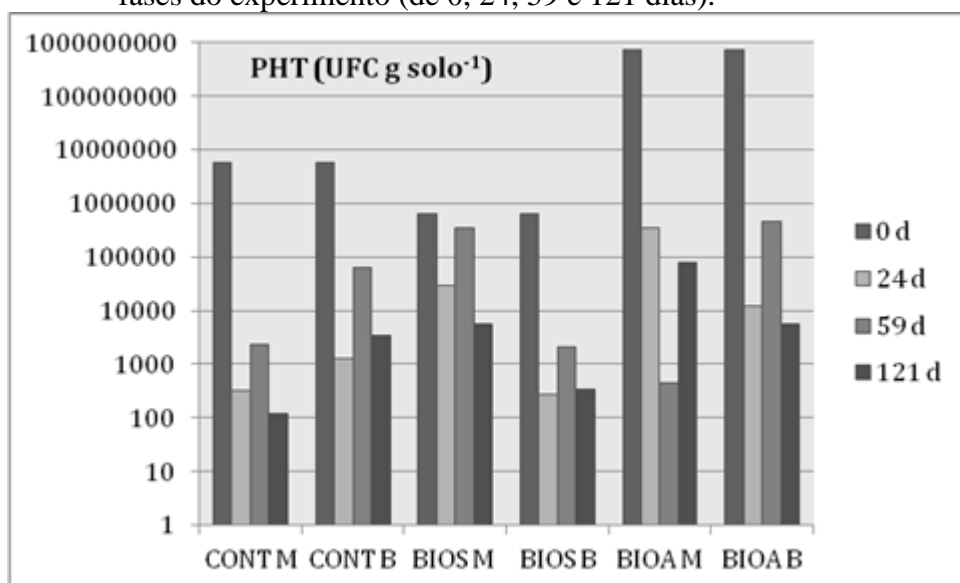


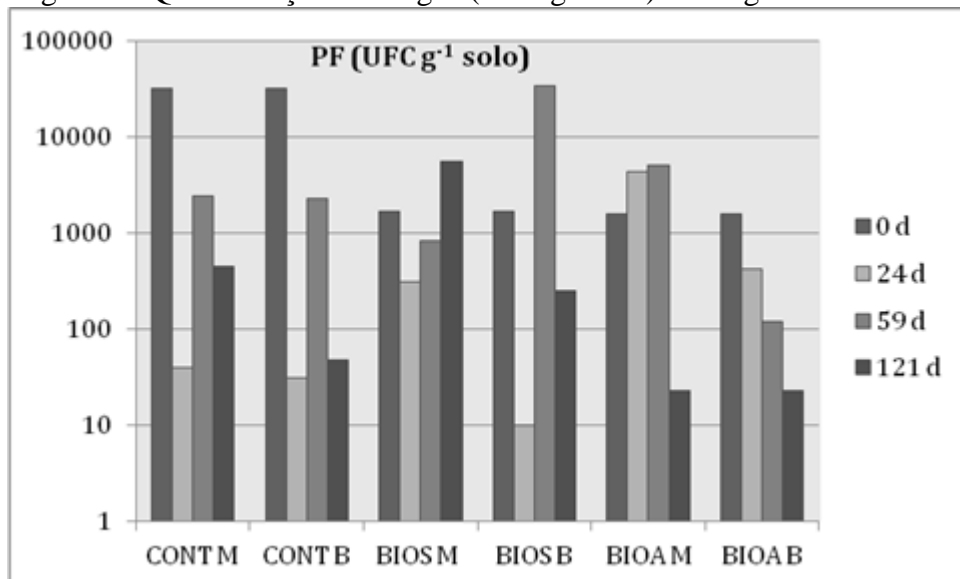
Tabela 8 - População de fungos PF (UFC g solo⁻¹) nos tratamentos CONT, BIOS e BIOA aos 0, 24°, 59° e 121° dias de tratamento.

Dias	Microcosmos			Reatores		
	CONT	BIOS	BIOA	CONT	BIOS	BIOA
0	3,2 x 10 ⁴	1,7 x 10 ³	1,6 x 10 ³	3,2 x 10 ⁴	1,7 x 10 ³	1,6 x 10 ³
24	4,0 x 10 ¹	3,1 x 10 ²	4,3 x 10 ³	3,1 x 10 ¹	1,0 x 10 ¹	4,2 x 10 ²
59	2,4 x 10 ³	8,3 x 10 ²	5,0 x 10 ³	2,3 x 10 ³	3,4 x 10 ⁴	1,2 x 10 ²
121	4,5 x 10 ²	5,6 x 10 ³	2,3 x 10 ²	4,8 x 10 ¹	2,5 x 10 ²	2,3 x 10 ²

A Figura 3 apresenta as populações de fungos nos diferentes tratamentos adotados ao longo do período de realização do experimento. As mesmas foram expressas em unidades formadoras de colônia por grama de solo (UFC g solo⁻¹). Ao longo do período de incubação as quantificações de microrganismos apresentaram uma ampla variação. Sendo assim, os

dados foram ajustados para log na base 10. Em todos os tratamentos, observou-se uma tendência de diminuição da PHT com o passar do tempo.

Figura 3 - Quantificação de fungos (UFC g solo⁻¹) ao longo do tratamento.



No início do experimento, a população de fungos (PF) era superior (em mais de uma ordem de grandeza) nos solos controle (CONT) e similar nos demais tratamentos. Ao longo do experimento (Figura 2), não houve diferença aparente entre os tratamentos CONT, BIOS e BIOA. Com exceção do BIOS M, observou-se uma tendência de decaimento da PF com o passar do tempo.

Tabela 9 - Microrganismos degradadores de petróleo (PDO) (NMP g solo⁻¹) nos tratamentos CONT, BIOS e BIOA aos 0, 24°, 59° e 121° dias.

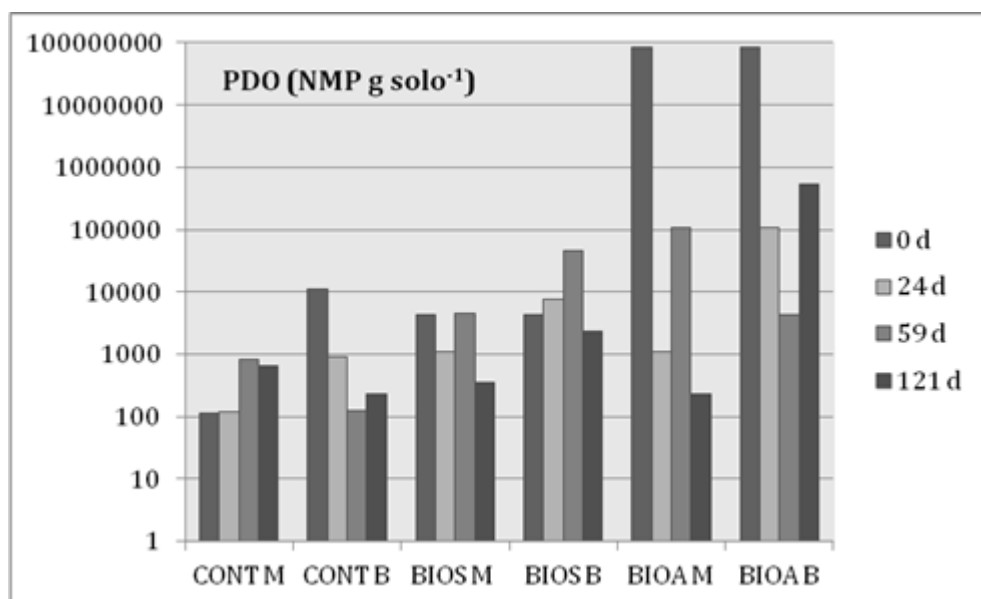
Dias	Microcosmos			Biorreatores		
	CONT	BIOS	BIOA	CONT	BIOS	BIOA
0	$1,1 \times 10^4$	$4,3 \times 10^3$	$8,6 \times 10^7$	$1,1 \times 10^4$	$4,3 \times 10^3$	$8,6 \times 10^7$
24	$1,2 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$9,2 \times 10^2$	$7,5 \times 10^3$	$1,1 \times 10^5$
59	$7,8 \times 10^4$	$4,6 \times 10^3$	$1,1 \times 10^5$	$1,3 \times 10^2$	$4,6 \times 10^4$	$4,3 \times 10^3$
121	$6,5 \times 10^2$	$3,5 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$2,34 \times 10^3$	$5,4 \times 10^2$

A Figura 4 apresenta os microrganismos degradadores de óleo (PDO) nos diferentes tratamentos adotados ao longo do período de realização do experimento. As mesmas foram expressas em número mais provável por grama de solo (NMP g solo⁻¹).

Assim como o observado com a PHT e ao contrário do observado com a PF, a PDO (Figura 4) inicial era muito superior nos solos bioaumentados. Observou-se uma tendência de decaimento ao longo do tempo, com exceção do CONT M. As populações que iniciaram com densidades semelhantes no solo bioaumentado nos microcosmos (biopilha dinâmica) e nos reatores (biopilha estática com aeração forçada), aos 121 dias, eram bem superiores nos reatores (cerca de 3 ordens de grandeza).

Portanto, ao final do experimento, a atividade de degradação de óleo era mais intensa nos sistemas simulando biopilhas estáticas (BIOA B), comparados com os sistemas simulando biopilhas dinâmicas (BIOA M).

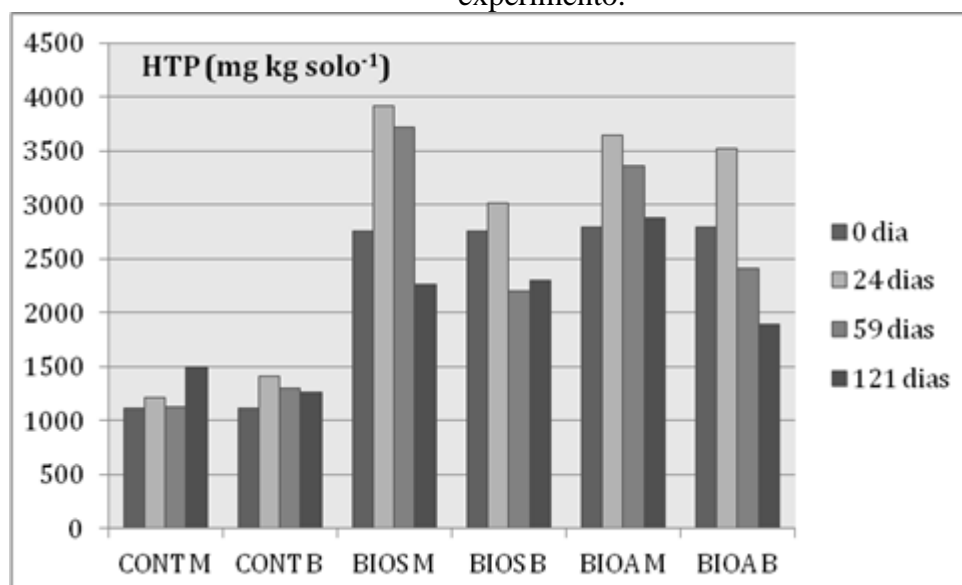
Figura 4 - Microrganismos degradadores de óleo (PDO) em NMP g solo⁻¹ ao longo Experimento



Avaliação do decaimento de HTP e HPA

A Figura 5 mostra a evolução dos teores extraíveis de HTP de solo argiloso nos tempos 0, 24, 59 e 121 dias.

Figura 5 - Teores de HTP nos microcosmos e nos reatores ao longo do experimento.

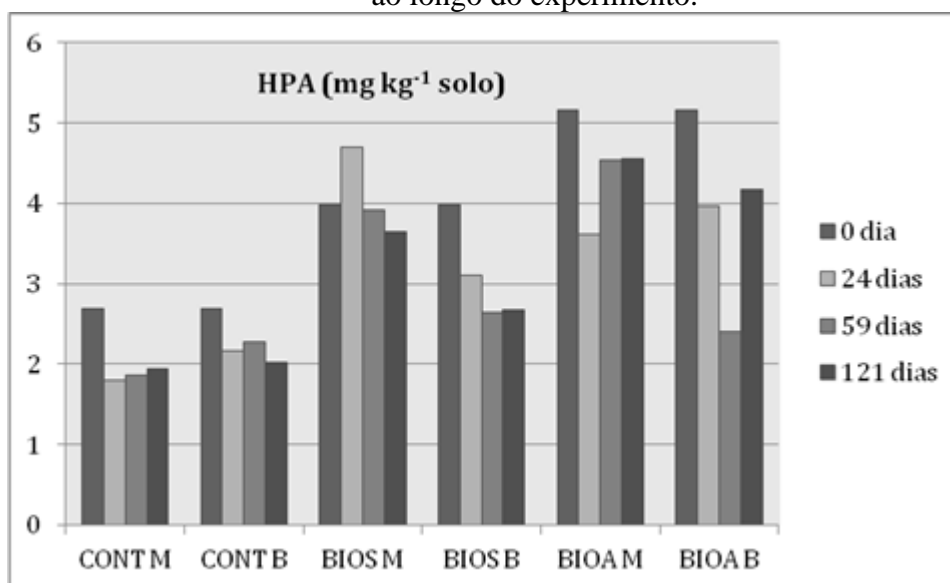


HTP: Pode-se observar que todos os tratamentos bioestimulados e bioaumentados, tanto em simulação de biopilha dinâmica quanto estática houve elevação da concentração de HTP ao longo do tratamento, com decaimento final aos 121 dias. No entanto, ainda assim, aos 121 dias todos os tratamentos apresentavam valores maiores do que os controles (CONT M e B). Aparentemente, o BIOA B foi o que promoveu a melhor remoção de HTP. Tal resultado

sugere que a aeração forçada apresenta uma maior velocidade de biodegradação, quando comparada à técnica de aeração por revolvimento.

HPA: A Figura 6 mostra a evolução dos HPA extraíveis nos dias 0, 24, 59 e 121 de tratamento. Os teores de HPA extraídos dos solos, nos tratamentos simulando biopilha dinâmica apresentaram uma tendência de aumento. Permanece inexplicável o fato de que os teores de HPA extraídos do solo bioaumentado no início do experimento se encontravam superiores aos teores extraíveis do solo bioestimulado, tendo em vista que ambos receberam a mesma quantidade de óleo e ambos os solos são provenientes do mesmo lote que compõem os controles (CONT M e CONT B).

Figura 6 - Teores de HPA nos microcosmos e reatores ao longo do experimento.



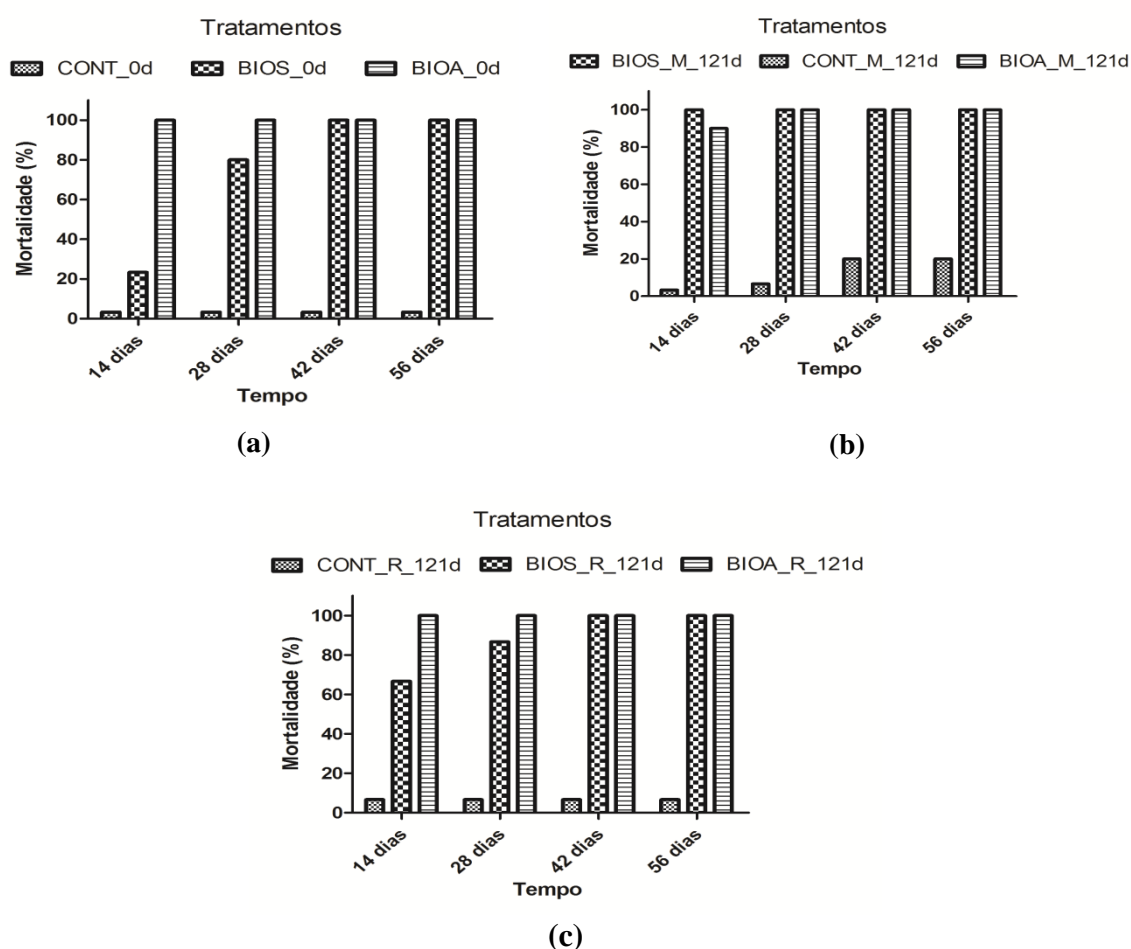
Com relação às flutuações com elevação de valores ao longo do tratamento, tanto de HTP quanto de HPA, várias hipóteses podem ser formuladas. O fenômeno pode ser decorrente da heterogeneidade da massa contaminada nos microcosmos ou reatores e, conseqüentemente, dificuldades na obtenção de uma amostra representativa ou, mais provavelmente, pode refletir o processo de biodegradação de compostos complexos e pesados gerando hidrocarbonetos de menor peso molecular, detectáveis nas faixas monitoradas. Tal fenômeno é mais provável nas contaminações com óleo cru, teores de compostos de alto peso molecular. O aumento da concentração de hidrocarbonetos ocorrido no presente experimento não é um fato comumente reportado na literatura, embora já tenha sido descrito anteriormente (CIANELLA, 2010; LÓPEZ & MUELLER, 2009; OLIVEIRA *et al*, 2007). De acordo com tais autores, o aumento dos HTP observado pode estar relacionado ao processo de degradação desses compostos, que por apresentarem cadeias hidrocarbônicas mais longas, são, primeiramente, quebrados em cadeias mais curtas, para depois serem degradados, proporcionando, inicialmente, um aumento na concentração total. Essas quebras podem dar origem a compostos intermediários que são detectados pelo método cromatográfico usado para medição dos hidrocarbonetos totais.

Como o decaimento tanto de HTP quanto HPA foi lento, recomenda-se fortemente que no futuro, seja feito uso de surfactantes para aceleração da biorremediação, particularmente de solos argilosos contaminados com óleo cru.

Avaliação da toxicidade aguda dos solos CONT, BIOS e BIOA sobre *E. andrei*

A Figura 7 mostra a toxicidade aguda (% letalidade) do solo no início e no fim do experimento, sendo observado um aumento na toxicidade do solo em todos os tratamentos. Tais resultados sugerem que o processo de degradação dos compostos orgânicos presentes no solo torna disponível alguns compostos mais tóxicos aos organismos do que os compostos originais.

Figura 7 - Taxa de mortalidade (%) de *E. andrei* exposta por 14, 28, 42 e 56 dias ao solo CONT, BIOS e BIOA



Legenda: obtido: (a) - no início do experimento (dia 0); (b) - no final do experimento (121 dias) retirado dos microcosmos CONT, BIOS e BIOA (simulando biopilha dinâmica); (c) - no final do experimento (121 dias) retirado dos reatores CONT, BIOS e BIOA (simulando biopilha estática de aeração forçada).

No ensaio de letalidade, a *E. andrei* sofreu efeito letal na taxa de 100% após apenas 14 dias em contato com o solo preparado para o bioaumento (Figura 7a). Já o solo preparado para o bioestímulo só resultou em taxa de letalidade de 100% após 42 dias de exposição da *E. andrei* (Figura 7a). Tudo indica que a degradação acelerada de hidrocarbonetos ocorrida no solo que recebeu inóculo no dia 0, mesmo nos recipientes com as minhocas gerou compostos mais tóxicos, o que é consistente com estudos realizados recentemente (GUIMARÃES *et al.*, 2012). Após 121 dias de tratamento tanto em microcosmos como em reatores, a toxicidade só

fez aumentar, sendo que em microcosmos (biopilhas dinâmicas) ela resultou em taxa de 100% mais cedo (Figura 7b) do que o observado em reatores simulando biopilha estática (Figura 7c). O ensaio de toxicidade com o solo BIOS obtido no dia 0 do experimento apresentou aos 14 dias, mortalidade de 23,3%. Porém aos 42 dias a taxa de mortalidade assim como o BIOA também atingiu aos 100%. Observou-se uma pequena diferença na toxicidade, do solo obtido de BIOS após 121 dias, quando os dois métodos de aeração são comparados. Porém não foi observada diferença significativa em nenhum dos tratamentos, mesmo quando se comparou a toxicidade no início ao final da remediação.

Conclusões

Apesar das flutuações nos valores aferidos, foi possível observar uma tendência de diminuição da densidade microbiana das PHT, PF e PDO quando o início (dia 0) foi comparado ao final (121 dias) dos experimentos. Tanto a densidade microbiana da PHT quanto a densidade da PDO foram claramente superiores nos solos com bioaumento, no início dos tratamentos, sendo que ao final do experimento tal superioridade foi observada apenas para o bioaumento em reator BIOA B (aeração forçada).

Para HTP, a técnica de aeração forçada mostrou-se superior na remoção de hidrocarbonetos totais de petróleo, apenas no tratamento de bioaumento (BIOA B), sendo equivalente à técnica de revolvimento manual nos demais tratamentos (CONT e BIOS). Para HPA, tal superioridade foi menos evidente, mas foi também observada tanto no tratamento de bioestímulo (BIOS B), assim como no de bioaumento (BIOA B).

Embora tais conclusões necessitem de futura confirmação, os resultados sugerem que a biopilha de aeração forçada alcança melhores resultados em termos de redução de hidrocarbonetos do solo. A estratégia de bioaumento foi aparentemente superior à de bioestímulo na remoção de HTP. Entretanto, com relação à HPA, o aumento inexplicável de dos teores desse grupo de hidrocarbonetos no tempo 0, após a inoculação com PDO dificultou a comparação entre as duas estratégias (bioestímulo x bioaumento) e requer maiores investigações para que seja elucidada.

Em linhas gerais, a biorremediação de solo argiloso contaminado por óleo cru, contendo tanto contaminação antiga quanto recente, reúne os maiores desafios à biorremediação, tanto no aspecto textural do solo quanto na natureza do contaminante. Os processos são aparentemente lentos e requerem ferramentas auxiliares para aceleração do processo.

Referências Bibliográficas

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. **Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados**. Eclét. Quím, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 17-43, Sep. 2010.

ATLAS, R. M. **Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: environmental perspective**. Microbiological Reviews. Washington, US, v. 45, n. 1, p. 180-209, Mar. 1981.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. C.; FRANKENBERGER, W. T. **Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation**. Bioresource Technology. v. 96, n. 9, p. 1049-1055, Jun. 2005.

BAPTISTA, Sandro José. **Avaliação do Emprego de Biossurfactante na Biorremediação de Solos Contaminados com Óleo Diesel**. 2007. 146 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

BECK, F. L.; BOHNEN, H.; CABEDA, M. S. V.; CAMARGO, F. A. O.; KÄMPF, N.; MEURER, E. J. Projeto pedagógico - ensino de graduação. Porto Alegre: Departamento de solos da UFRGS, 2000. Boletim técnico n. 6. In: MEURER, E. J.; **Fundamentos de química do solo**. Porto Alegre: Genesis, 2000. 174 p.

BENYAHIA, F.; ABDULKARIM, M.; ZEKRI, A.; CHAALAL, O.; HASANAIN, H. **Bioremediation of crude oil contaminated soils: A Black Art or an Engineering Challenge?** In: The 7th World Congress of Chemistry, 2005 Glasgow. Process Safety and Environmental Protection, Rugby, v. 83, n. 4, p. 364-370, July 2005.

BERGER, T. M. **Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos totais de petróleo: enfoque na aplicação do processo Terraferm**. 2005. [Tese de Doutorado]. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ecologia. 2005.

CENPES. **Biorremediação de áreas contaminadas por petróleo**. Rio de Janeiro, 2002. 77p. (Relatório Técnico RT BIO 23/2002).

CIANELLA, R. C. **Avaliação de diferentes estratégias de biorremediação no tratamento de solo contaminado por diesel B5**. 2010. [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. 2010.

COULON, F.; PELLETIER, E.; GOURHANT, L.; DELILLE, D. **Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sub-Antarctic soil**. Chemosphere, Oxford, Inglaterra, v. 58, n. 10, p. 1439-1448, Mar. 2005.

DA COSTA, G. M.; OLIVEIRA, T.B.; SODRÉ, E.D.; MARQUES, M.; CORREA, S.M. **Design, construção e operação de biorreator aeróbico em escala piloto para biorremediação de solos contaminados com petróleo e derivados**. In: Anais...24^o Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. CD p. 2006.

DELILLE, D.; COULON, F.; PELLETIER, E. **Effects of temperature warming during a bioremediation study of natural and nutrient-amended hydrocarbon-contaminated sub-Antarctic soils**. Cold Regions Science and Technology, Amsterdam, Holanda, v. 40, n. 1-2, p. 61-70, Nov. 2004.

DELILLE, D.; COULON, F.; PELLETIER, E. **The influence of temperature on bacterial assemblages during bioremediation of a diesel fuel contaminated sub Antarctic soil**. Cold Regions Science and Technology, Amsterdam, Holanda, v. 48, n. 2, p. 74-83, May. 2007.

DIBBLE, J. T.; BARTHA, R. **Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge**. Applied and environmental microbiology, Washington, Estados Unidos, v. 37, n. 4, p. 729-239, Apr. 1979.

DIPLOCK, E. E.; MARDLIN, D. P.; KILLHAM, K. S.; PATON, G. I. **Predicting bioremediation of hydrocarbons: Laboratory to field scale.** Environmental Pollution, v.157, p.1831–1840, 2009.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY U. S. EPA. **Method 8015D: Nonhalogenated Organics using GC/FID**, Rev. Jun., 2003.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY U. S. EPA. **Method 82705D: Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS)**, Rev. Jan., 1998.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY U. S. EPA. **Method 3550C: Ultrasonic Extraction**, Rev. 3, Feb., 2007.

EWEIS, J. B.; ERGAS, S. J.; CHANG, D. P. Y.; SCHROEDER, E. D. **Bioremediation principles.** [s.l.]: McGraw-Hill, 1998. p. 296.

FANTROUSSI, S. **Bioaugmentation of a Soil Bioreactor Designed for Pilot-scale Anaerobic Bioremediation Studies.** Environ. Sci. Technol., n. 33, p. 2992-3001, 1999.

FARIA, F. D.; GONÇALVES, D. S.; VASCONCELOS, A. P. **Determinação quantitativa da distribuição dos hidrocarbonetos em petróleo e frações pesadas por cromatografia gasosa.** Boletim Técnico da Petrobras, Rio de Janeiro, v. 52, n. 1/3, p. 89-97, abr./ago./dez. 2009.

FEDERAL REMEDIATION TECHNOLOGIES ROUNDTABLE. **Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide.** Disponível em: <http://www.frtr.gov/matrix2/section4/4-42.html>. Acesso em: 17 Set 2012.

FERGUSON, S. H.; POWELL, S. M.; SNAPE, I; GIBSON, J. A. E.; FRANZMANN, P. D. **Effect of temperature on the microbial ecology of a hydrocarbon-contaminated Antarctic soil: Implications for high temperature remediation.** Cold Regions Science and Technology. n. 3, p. 115–129, 2008.

GIAROLA, N. F. B.; SILVA, A. P.; IMHOFF, S. **Relações Entre Propriedades Físicas e Características de Solos da Região Sul do Brasil.** R. Bras. Ci. Solo, n. 26, p.885-893, 2002.

GOGOIA, B. K.; DUTTA, N. N.; GOSWAMI, P.; MOHAN, T. R. K. **A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site.** Advances in Environmental Research, Berkley, California, v. 7, n. 4, p. 767-782, Jun. 2003.

HORN, R. **Aggregate strength of differently textured soils and its alteration with external stress** &n: Proc. Int. Symp. Sealing, Crusting and Hardsetting Soils, Brisbane, Qld., Australia, in press, 1994.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Soil quality- Effects of pollutants on earthworms – Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate.** ISO 11268-1. Genebra, 1993.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Soil quality – Effects of pollutants on earthworms – Part 2: Determination of effects on reproduction.** ISO 11268-2. Genebra, 1998.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Soil quality – Determination of content of hydrocarbon in the range: C10 to C40 by gas chromatography.** ISO 16703. Genebra, Suíça 2001.

JENNY, H. 1994. **Factors of Soil Formation: A System of quantitative Pedology.** New York, Dover publications. 281p.

JORGENSEN, K. S.; PUUSTINEN, J; SUORTTI, A.M. **Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles.** Environmental Pollution, v. 107, n. 2, p. 245-254, Feb., 2000.

KODRES, C. A. **Coupled water and air flows through a bioremediation soil pile.** Environmental Modelling & Software, Oxford, v. 14, n. 1, p. 37–47, Oct. 1998.

KRIIPSALU, M.; MARQUES, M.; NAMMARI, D.; HOGGLAND, W. **Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons during composting of oily sludge.** Environmental Technology, vol. 29. p. 43-53. 2007.

KRIIPSALU, M.; NAMMARI, D. **Monitoring of biopile composting of oily sludge.** Waste Management & Research. 1-9. 2009.

LUCHESE, E. B.; FAVERO, L. O. B.; LENZI, E. **Fundamentos da química do solo.** Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 2001. 182 p.

LI, L.; CUNNINGHAM, C. J.; PAS, V.; PHILP, J. C.; BARRY D. A.; ANDERSON, P. **Field of new aeration system for enhancing biodegradation in a biopile.** Waste Management, v.24, p.127 – 137, 2004.

KHAN, F. I.; HUSAIN, T.; HEJAZI, R. **An overview and analysis of site remediation Technologies.** Journal of Environmental Management, n. 71, p. 95–122, Feb 2004.

KRÄMER, Ute. **Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils.** Current opinion in biotechnology, v. 16, n. 2, p. 133-141, 2005.

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

LEPSCH, I. F. **Solos Formação e Conservação.** Melhoramentos, São Paulo, 1993.

LÓPEZ, D. A. R.; MUELLER, D. **Uso de peróxido de cálcio na biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos.** Caderno de Pesquisa série Biologia, v. 21, n. 3, p. 61-72, 2009.

MCKENZIE, B. M.; DEXTER, A. R. **Methods for studying the permeability of individual soil aggregates.** Journal of agricultural engineering research, v. 65, n. 1, p. 23-28, 1996.

MARIANO, A. P.; DANIEL D. M; ANGELIS, D. F.; PIRÔLLO, M. P. S.; CONTIERO, J. **Biodegradability of Commercial and Weathered Diesel Oils.** Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 133-142, Jan/Mar. 2008.

MUSEU DE SOLOS DO RIO GRANDE DO SUL. Disponível em: <<http://coralx.ufsm.br/msrs/textural.php>. Acesso em: 01 abril 2012>.

OLIVEIRA, D. S.; BAISCH, P. R. M.; MACHADO, M. I. **Degradação do petróleo em ambiente estuarino da lagoa dos Patos através de um derrame induzido**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS, 4, 2007, Campinas, SP. Anais... Campinas: DPETRO, 2007.

PORTIER, R. J.; IQBAL, J.; METOSH-DICKEY, C. A.; DAVIS, T. M. **Managing Bioremediation of a Creosote-Contaminated Superfund Site by Optimizing Moisture and Temperature in a Biopile**: Wiley Interscience. Wiley Periodicals, 2007.

POZDNYAKOVA, Larisa; POZDNYAKOV, Anatoly; ZHANG, Renduo. **Application of geophysical methods to evaluate hydrology and soil properties in urban areas**. Urban Water, v. 3, n. 3, p. 205-216, 2001.

RIKE, A.G.; HAUGEN, K.B.; ENGENE, B. **In situ biodegradation of hydrocarbons in arctic soil at sub-zero temperatures**: field monitoring and theoretical simulation of the microbial activation temperature at a Spitsbergen contaminated site. Cold Regions Science and Technology, Amsterdam, v. 41, n. 3, p. 189– 209, Mar. 2005.

RIZZO, A. C. L., RAIMUNDO, R. S. **Utilização de Biorreatores no Tratamento de Solos Contaminados por Hidrocarbonetos de Petróleo**. Contribuição Técnica à X Jornada de Iniciação Científica do CETEM, Rio de Janeiro, Jul. 2002.

RIZZO, A. C. L.; CUNHA, C. D.; SANTOS, R. L. C.; SANTOS, R. M.; MAGALHÃES, H. M.; LEITE, S. G. F.; SORIANO, A. U. **Preliminary identification of the bioremediation limiting factors of a clay bearing soil contaminated with crude oil**. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 19, n. 1, 169-174, 2008.

SANSCARTIER, D. *et al.* **Bioremediation of diesel-contaminated soil by heated and humidified biopile system in cold climates**. Cold Regions Science and Technology, v. 55, p. 167–173, 2009.

SANSCARTIER, D. *et al.* **Bioremediation of weathered petroleum hydrocarbon soil contamination in the Canadian high arctic**: laboratory and field studies. Chemosphere, v. 77, p. 1121–1126, 2009.

SANTOS, R. M. **Avaliação da adição do pó da casca de coco verde, como material estruturante, na biorremediação de solo contaminado por petróleo**. 2007. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

SCHOEFS, O.; DESCHÊNES, L.; SAMSON, R. **Efficiency of a new covering system for the environmental control of biopiles used for the treatment of contaminated soils**: Industrial Chair In Site Bioremediation. Montreal. Ecole Polytechnique de Montreal, 1998.

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

SHUKLA, K.; SINGH, N. K.; SHARMA, S. **Bioremediation: Developments, Current Practices and Perspectives**. Genetic Engineering and Biotechnology Journal, 2010.

SUSARLA, Sridhar; MEDINA, Victor F.; MCCUTCHEON, Steven C. **Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination**. Ecological Engineering, v. 18, n. 5, p. 647-658, 2002.

YANG, Si-Zhong *et al.* **Bioremediation of oil spills in cold environments: a review**. Pedosphere, Pequim, v. 19, n. 3, p. 371–381, 2009.

CHAGAS-SPINELLI, A. C. O. C. **Biorremediação ao de solo argiloso contaminado por hidrocarbonetos poliaromáticos provenientes de derrame de óleo diesel**. 2007. Tese (Doutorado em Geociências) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2007.

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T.; BANAL, I. M. **Biosurfactant production by Corynebacterium kutscheri from waste motor lubricant oil and peanut oil cake**. Letters in Applied Microbiology, 45: 686–691, 2007.

TRINDADE, P. V. O. **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.

TRUAX, D. D.; BRITTO, R.; SHERRARD, J. H. **Bench-scale studies of reactor-based treatment of fuel-contaminated soils**. Waste Management, Oxford, Inglaterra, v. 15, n. 5-6, p. 351-357, 1995.

URURAHY, A.; MARTINS, M. D. M.; PEREIRA JUNIOR, N. **Desempenho de um biorreator do tipo CSTR no processo de degradação de borra oleosa**. In: Bol. Téc. PETROBRAS, v. 41, n. 3/4, p. 125-132, jul./dez. 1998.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY USEPA **Biopiles Available**. in: http://www.epa.gov/oust/pubs/tum_ch4.pdf.

YERUSHALMI, L.; ROCHELEAU, S.; CIMPOIA, R.; SARRAZIN, M.; SUNAHARA, G.; PEISAJOVICH, A.; LECLAIR, G.; GUIOT, S. R. **Enhanced biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated soil**. Bioremediation Journal, vol. 7, p. 37 51, 2003.

ZHOU, E.; CRAWFORD, R. **Effects of oxygen, nitrogen, and temperature on gasoline biodegradation in soil**. Biodegradation, Dordrecht, v. 6, n. 2, p. 127-140, 1995.

ZÍLIO, E. L.; PINTO, U. B. **Identificação e Distribuição dos Principais Grupos de Compostos Presentes nos Petróleos Brasileiros**. In: Bol. Téc. Petrobrás, v. 45, n. 1, p. 21-25, jan./mar. 2002.