

Dissertação de Mestrado

Avaliação Preliminar do Potencial de Aplicação da Tecnologia de Biopilhas para a Biorremediação do Solo de Guamaré-RN

Edmilson Pinto da Silva

Natal, junho de 2004

SILVA, Edmilson Pinto – Avaliação Preliminar do Potencial de Aplicação da Tecnologia de Biopilhas para a Biorremediação do Solo de Guamaré-RN. Dissertação de Mestrado, UFRN, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Programa de Recursos Humanos – PRH 14/ANP. Áreas de Concentração: Engenharia de Processos e Engenharia Ambiental, Natal/RN, Brasil.

Orientadora: Prof. Dra. Gorete Ribeiro de Macedo

Co-orientadora: Prof. Dra. Márcia Maria Lima Duarte

RESUMO: Biopilhas são usadas para reduzir as concentrações de constituintes do petróleo em solos escavados através do uso da biodegradação. Esta tecnologia envolve o empilhamento do solo contaminado em pilhas ou células e a estimulação da atividade microbiana dentro da pilha através da aeração e adição de minerais, nutrientes e umidade. O aumento da atividade microbiana resulta na biodegradação dos produtos do petróleo adsorvidos no solo através da respiração microbiana. Este trabalho objetivou a avaliação da utilização da tecnologia de Biopilhas para biorremediação de solo obtido dos arredores da Lagoa de Estabilização da PETROBRAS na cidade de Guamaré-RN-Brasil. A avaliação foi realizada através da caracterização física, química e microbiológica do solo, por meio de ensaios de biodegradação em escala de laboratório e usando um planejamento experimental fatorial completo 2^3 com repetição em triplicata no ponto central. As variáveis de entrada foram: (1) concentração de Nitrogênio; (2) concentração de óleo diesel no solo e (3) concentração de inóculo. A variável de resposta utilizada para avaliação dos resultados do planejamento foi a porcentagem de perda de matéria orgânica. As análises de importância estatística das variáveis de entrada e das suas interações na variável de resposta foram feitas mediante a avaliação das curvas de nível, diagrama de Pareto e resultado da Tabela ANOVA, obtidos mediante o uso do software STATISTICA for Windows, versão 5.5. Os resultados obtidos mostraram que a tecnologia de biopilhas pode ser utilizada de forma satisfatória para remediação de eventuais áreas contaminadas naquela região.

Palavras Chaves: biorremediação; hidrocarbonetos; solo; biopilhas.

BANCA EXAMINADORA:

Presidente:

Prof^ª. Dra. Gorete Ribeiro de Macedo (UFRN)

Membros:

Prof^ª. Dra. Márcia Maria Lima Duarte (UFRN)

Prof^ª. Dra. Sueli Rodrigues (UFC)

Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos (UFRN)

DATA DA DEFESA: 21 de junho de 2004.

ABSTRACT

Biopiles are used to reduce concentrations of petroleum constituents in excavated soils by the use of biodegradation. This technology involves heaping contaminated soils into piles (or “cells”) and stimulating aerobic microbial activity within the soils by the aeration and/or addition of minerals, nutrients, and moisture. The enhanced microbial activity results in degradation of adsorbed petroleum-product constituents by microbial respiration. The aim of this work was to evaluate the use of biopiles to the bioremediation of the soil of Stabilization Station of Guamaré-RN-Brazil. The evaluation was performed by the characterization of the soil, tests of biodegradation in laboratory scale and by the use of a complete 2^3 factorial design with triplicate at the central point. The input variables were: (1) Nitrogen concentration; (2) diesel-oil concentration; and (3) Inoculum concentration. The response variable was the percentage gravimetric loss of organic matter. Statistical analyses of the main factors and their interactions on the response variable were performed using contour curves, Pareto diagram and ANOVA table results, obtained from the software STATISTICA for Windows, Release 5.5. The results showed that biopiles technology can be used to remediate eventual contaminated areas in that region.

Key-words: bioremediation; hydrocarbons; soil; biopiles

DEDICATÓRIA

Esta dissertação é dedicada:

A Deus, por ter me proporcionado a oportunidade de realizar e concluir este trabalho.

À minha mãe Francisca Maria da Conceição pelo apoio em todos os momentos sempre do meu lado durante a minha vida.

E a minha querida Iranete pela compreensão e apoio nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Às professoras Gorete Ribeiro de Macedo e Márcia Maria Lima Duarte pela amizade, orientação e dedicação no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Afonso Avelino Dantas Neto, coordenador do PRH 14 – ANP, pelos conselhos, críticas quando necessário e pelo seu bom humor nos momentos de descontração.

Aos amigos do Laboratório de Engenharia Bioquímica, Albina, Andréa, Laerte, Franklin, Márcio, Sanderson, Fabiana, Eliane, Júlio, Ângela e Raimundo, que de alguma forma me auxiliaram nesta jornada.

Aos funcionários Mazinha, Medeiros e ao técnico de laboratório Thyrone pelo apoio.

A Alex pela grande colaboração, o qual não poupou esforços nem tempo em me ajudar na realização dos experimentos em laboratório.

À Dra. Márcia Pedrini pelas sugestões fornecidas, as quais representaram uma grande contribuição para o melhoramento da parte escrita.

Ao Laboratório de Engenharia Ambiental da UFRN por ceder sua estrutura para realização de algumas análises físico-químicas do solo.

Ao professor João Bosco e ao Engenheiro Químico Willaci pelo auxílio na análise granulométrica do solo.

Aos professores Everaldo Silvino e Damião Nóbrega que me ajudaram na análise estatística.

À Agência Nacional de Petróleo – ANP através do Programa de Recursos Humanos – PRH 14 por apoiar financeiramente a realização deste trabalho.

Aos meus amigos mestrandos e doutorandos do Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, que durante os vários dias que precederam esta caminhada estiveram sempre presentes durante as aulas e também, nos laboratórios realizando e acompanhando experimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
NOMENCLATURA	xii
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO II– ASPECTOS TEÓRICOS	6
2.1. O Processo de biodegradação	7
2.1.1. Biodisponibilidade	7
2.1.2. Etapas do processo de biodegradação	7
2.1.2.1. Dessorção dos contaminantes do solo	8
2.1.2.2. Dissolução dos contaminantes	9
2.1.2.3. Deslocamento de microgotas	9
2.1.2.4. Mobilização dos contaminantes.....	10
2.1.2.5. Transporte	10
2.1.2.6. Captura dos contaminantes pelas bactérias.....	11
2.1.2.7. Metabolismo	11
2.2. Remediação de solos	12
2.2.1. Tecnologias de remediação de solos	12
2.2.2. Biorremediação de solos	13
2.2.2.1. Mercado mundial de biorremediação	14
2.3. A compostagem através de biopilhas	15
2.3.1. Avaliação da efetividade da biopilha	18
2.3.1.1. Características do solo	19
2.3.1.1.1. Densidade da população microbiana	19
2.3.1.1.2. pH do solo.....	21
2.3.1.1.3. Teor de umidade	21
2.3.1.1.4. Temperatura do solo	22
2.3.1.1.5. Concentração dos nutrientes	23
2.3.1.1.6. Textura do solo	24
2.3.2. Características dos contaminantes	24
2.3.2.1. Volatilidade.....	24
2.3.2.2. Estrutura química.....	25
2.3.2.3. Concentração e toxicidade	27
2.3.3. Condições climáticas.....	28

2.3.3.1. Temperatura ambiente	28
2.3.3.2. Precipitação.....	29
2.3.3.3. Vento.....	29
2.3.4. Avaliação da biotratabilidade.....	29
2.3.5. Avaliação do projeto da biopilha	32
2.3.6. Avaliação da operação e progresso do planejamento de monitoramento	34
2.3.6.1. Planejamentos de operação	34
2.3.6.2. Monitoramento do progresso da remediação.....	35
2.4. Execução do projeto da biopilha	35
CAPÍTULO III – ESTADO DA ARTE	37
CAPÍTULO IV – MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1. Introdução	44
4.2. Caracterização do solo.....	44
4.2.1. Preparo da amostra.....	44
4.2.2. Teor de umidade total	45
4.2.3. pH.....	45
4.2.4. Carbono orgânico e matéria orgânica	46
4.2.4.1 Método de Walkley e Black modificado	46
4.2.5. Nitrogênio total	47
4.2.6. Fósforo total.....	48
4.2.7. Densidade do solo	48
4.2.8. Granulometria	49
4.2.9. Condutividade elétrica	49
4.2.10. Acidez do solo	50
4.2.11. Contagem microbiana	50
4.2.11.1. Bactérias heterotróficas totais	50
4.3. Ensaio de biodegradação em escala de laboratório	51
4.3.1. Preparo do inóculo	51
4.3.1.1. Microrganismo.....	51
4.3.1.2. Meios de cultivo	52
4.3.1.3. Manutenção da cultura.....	52
4.3.1.4. Adaptação do MIPB ao óleo diesel como fonte de carbono	53
4.3.1.5. Determinação da concentração celular por massa seca	54
4.3.2. Ensaio de biodegradação utilizando frascos Erlenmeyer	54
4.3.2.1. Ensaio em frascos sem adição de nutrientes e inóculo	55

4.3.2.2. Ensaio em frascos com adição de inóculo	55
4.3.3. Ensaio de biodegradação utilizando bandejas de alumínio	56
4.3.3.1. Monitoramento da biodegradação nos ensaios em bandejas	57
4.4. Planejamento experimental	58
CAPÍTULO V – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
5.1. Características do solo de Guamaré-RN.....	61
5.2. Biodegradação em frascos	64
5.3. Biodegradação em bandejas	66
5.3.1. Contagem bacteriana.....	68
5.3.2. Análise do pH.....	69
5.4. Planejamento experimental: análise estatística	70
CAPÍTULO VI - CONCLUSÕES	83
CAPÍTULO VII - REFERÊNCIAS	87
ANEXOS.....	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processos envolvidos na biodegradação de contaminantes inicialmente presentes no solo.....	8
Figura 2. Modelo típico de uma biopilha.....	15
Figura 3. Estrutura de uma biopilha típica.....	16
Figura 4. Biodegradação da matéria orgânica nos ensaios em frascos	64
Figura 5. Reatores 1-4 e reator de controle 13, após 60 dias de tratamento	66
Figura 6. Biodegradação nos ensaios em bandejas de alumínio.....	67
Figura 7. pH do solo nos experimentos do planejamento experimental.	69
Figura 8. Gráfico de Pareto.....	72
Figura 9. Análise do efeito do inóculo.....	73
Figura 10. Análise do efeito do óleo.....	74
Figura 11. Análise do efeito da interação óleo X inóculo.	75
Figura 12. Análise do efeito da interação inóculo X Nitrogênio.	76
Figura 13. Análise do efeito da interação óleo X Nitrogênio.	77
Figura 14. Resíduos em função dos valores preditos.	79
Figura 15. Valores preditos em função dos valores observados.....	80
Figura 16. Efeito da concentração de inóculo e da concentração de Nitrogênio na biodegradação do óleo diesel para a concentração de óleo no nível alto.....	81
Figura 17. Efeito da concentração de inóculo e da concentração de Nitrogênio na biodegradação do óleo diesel para o óleo no nível baixo.	82
Figura 18. Procedimentos de repique.	93
Figura 19. Perfil granulométrico do solo de Guamaré-RN.....	95
Figura 20. Reatores 5-8 e reator de controle 12, após 60 dias de tratamento	96
Figura 21. Reatores 9-11 e reator de controle 14, após 60 dias de tratamento	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mercado mundial de biorremediação (1994-2005) em milhões de dólares.....	14
Tabela 2. Vantagens e desvantagens das biopilhas.	17
Tabela 3. Fatores que afetam a efetividade da biopilhas	18
Tabela 4. Relação entre a contagem total de bactérias heterotróficas e a efetividade da biopilha.....	20
Tabela 5. Efeito do pH do solo na efetividade da biopilha.....	21
Tabela 6. Teor de umidade do solo e efetividade da biopilha.	22
Tabela 7. Efeito da temperatura na efetividade da biopilha.	23
Tabela 8. Estrutura química dos contaminantes e biodegradabilidade	26
Tabela 9. Concentração dos contaminantes e efetividade da biopilha.	27
Tabela 10. Requisitos de limpeza e efetividade da biopilha.....	28
Tabela 11. Parâmetros físicos e químicos para os estudos de biotratabilidade.	30
Tabela 12. Composição do meio “Tryptic Soy Agar”.....	51
Tabela 13. Concentração de óleo diesel nos ensaios de adaptação do MIPB ao óleo diesel.	53
Tabela 14. Concentração de óleo nos reatores.....	56
Tabela 15. Matriz de planejamento com os fatores na forma real.	59
Tabela 16. Granulometria e densidade do solo de Guimarães/RN.....	61
Tabela 17. pH, condutividade e acidez do solo de Guimarães/RN.	62
Tabela 18. Umidade e capacidade de campo do solo de Guimarães/RN.....	63
Tabela 19. Quantidade de nutrientes no solo de Guimarães/RN.....	63
Tabela 20. Quantidade de bactérias heterotróficas no solo de Guimarães/RN.	64
Tabela 21. Quantidade de bactérias heterotróficas após 60 dias nos experimentos do planejamento experimental.	68
Tabela 22. Matriz do planejamento experimental 2 ³ com ponto central na forma codificada com os respectivos resultados de biodegradação.....	70
Tabela 23. Perdas abióticas verificadas nos ensaios de controle	71
Tabela 24. Tabela ANOVA	98
Tabela 25. Efeitos principais e interações	98
Tabela 26. Coeficientes de regressão.....	99
Tabela 27. Resumo dos estudos de tratabilidade.	100
Tabela 28. Constituintes do óleo diesel nº 2.....	101

Tabela 29. Quadro de especificações do óleo diesel padrão para ensaios de consumo e emissões.	102
Tabela 30. Relação de acidentes ambientais com derramamento de óleo ocorridos no mundo.	103
Tabela 31. Parâmetros físicos e químicos para os estudos de biotratabilidade.	104
Tabela 32. Gêneros de microrganismos hábeis na degradação de hidrocarbonetos de petróleo	105
Tabela 33. Constituintes do óleo combustível nº 2.	106

NOMENCLATURA

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
- AET – acceptor de elétrons terminal
- ANOVA – analysis of variance (análise de variância)
- a_{nw} – área interfacial específica FLNA-água ($\text{cm}^2 \text{cm}^{-3}$)
- ASTM – American Society for Testing & Materials
- C.F.P.P. – ponto de entupimento de filtro
- C_{aq} – concentração de um contaminante dissolvido (g/L)
- C_{cel} – concentração celular (g/mL)
- cmol – centimol
- CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente
- CNP – Conselho Nacional de Petróleo
- COV – compostos orgânicos voláteis
- C_{sat} – solubilidade de um contaminante (g/L)
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- EPA – Environmental Protect Agency (Agência Ambiental Americana)
- EVS – extração de vapor do solo
- FLNA – fase líquida não-aquosa
- HTE – hidrocarbonetos totais extraíveis
- HTP – hidrocarbonetos totais de petróleo
- IBP – Instituto Brasileiro de Petróleo
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
- J – velocidade de dissolução da FLNA ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)
- k_1 – coeficiente de transferência de massa (cm h^{-1})
- K_{ow} – coeficiente de partição 1-octanol/água
- MB – Métodos Brasileiros
- MIPB – microrganismo produtor de biosurfactante
- MO_f – matéria orgânica final (g/kg solo) descontadas as perdas abióticas
- MO_i – matéria orgânica inicial (g/kg solo)
- m_{seca} – massa da amostra após a obtenção de peso constante (g)
- $m_{solo\ seco}$ – massa de solo obtida após secagem da amostra em estufa a 100°C por 48 horas (g)
- $m_{solo\ úmido}$ – massa de solo amostrada (g)
- N – normalidade do NaOH (N)

NBR – Normas Brasileiras Registradas

P – peso da amostra (g)

PCA – plate count agar (agar de contagem padrão)

pH – potencial hidrogeniônico

ppm – partes por milhão

QAV – querosene de aviação

RMO – remoção de matéria orgânica (%)

rpm – rotações por minuto

SNEDP – Sistema Nacional de Eliminação de Descarga de Poluição

UFC – unidade formadora de colônias

V – volume de NaOH gasto na titulação (mL)

Va – volume de ácido 0,01 N na titulação da amostra (mL)

Vb – volume de ácido 0,01 N na prova em branco (mL)

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO GERAL

Derramamentos de óleo têm o potencial de causar significativos efeitos ambientais e econômicos sobre uma grande variedade de recursos naturais e serviços. A extensão de tais efeitos depende de onde a descarga ocorre, do tipo e volume da descarga, da época do ano e das condições ambientais na época da descarga (MICHEL & REINHARZ, 1994).

Os vários casos de poluição ambiental promovidos por petróleo e derivados (vide Anexo IX) impulsionaram esforços da comunidade técnica e científica visando o entendimento e o desenvolvimento de técnicas para recuperação de ambientes degradados (OLIVEIRA, 2001).

O mercado de tecnologias ambientais disponíveis hoje é bastante amplo, sendo que uma atenção maior tem sido dispensada aos tratamentos e remediação de solos e águas subterrâneas. Isto pode ser entendido pelo fato da geração de resíduos sólidos estar sendo cada vez maior e também pela existência de políticas ambientais cada vez mais restritivas nos últimos anos. Com isso, os pesquisadores que atuam na área se vêem obrigados a desenvolver técnicas, de um lado menos dispendiosas, e de outro tão eficientes quanto às tecnologias já consolidadas como, por exemplo, a incineração.

Embora seja largamente reconhecido que a maioria dos constituintes do petróleo são altamente biodegradáveis, a taxa natural de degradação pode ser extremamente lenta. Isto é mais bem exemplificado pelas reservas de petróleo que existem há milhões de anos sem substancial biodegradação, devido exclusivamente às limitações de nutrientes. Os nutrientes limitantes incluem oxigênio, nitrogênio, fósforo e elementos traços. O favorecimento do processo de biodegradação é denominado biorremediação e consiste na adição de nutrientes de modo prescrito e definido ao solo e aquífero (FOGEL *et al*, 1991).

A degradação de diferentes resíduos depende das condições locais e regionais como clima, tipo de solo, vegetação, fauna e microrganismos decompositores. A diversidade bioquímica de substratos macromoleculares indica que os microrganismos devem possuir amplo espectro de enzimas extracelulares para convertê-los em metabólitos assimiláveis. As propriedades do solo, tais como, teor de argila, pH, concentração de matéria orgânica, tensão de água e aeração atuam como fatores ambientais do processo de decomposição (TAUK, 1990).

Entende-se por biorremediação a estimulação dos processos naturais de biodegradação para retirar rejeitos adicionados ao meio ambiente pela atividade humana (MARTÍN, 1999 *apud* OLIVEIRA, 2001).

A biorremediação é uma técnica que vem alcançando importância mundial, uma vez que o aumento da atividade industrial está degradando cada vez mais os ecossistemas naturais. O emprego de microrganismos conhecidos no tratamento de rejeitos potencialmente tóxicos, incluindo hidrocarbonetos de petróleo, é uma prática habitual em países desenvolvidos. Muitos contaminantes podem adversamente causar impacto sobre a saúde e a qualidade do meio ambiente, tornando a remediação necessária (NOORDMAN, 1999).

Na biorremediação “in situ”, ou seja, a biorremediação realizada no local onde ocorreu a contaminação, assim como na “ex situ”, a contribuição externa de microrganismos deve ser avaliada de acordo com o tipo de solo, do equipamento a ser empregado e, principalmente, dos tipos de contaminantes orgânicos presentes. Assim sendo, vários estudos de laboratório e de campo mostram que, para se obter bons resultados na biorremediação, faz-se necessário, a aplicação de duas ou mais tecnologias em associação como, por exemplo, a tecnologia de biopilhas associada à tecnologia de bioventilação.

A determinação desta ou daquela tecnologia a ser aplicada dependerá das características dos contaminantes e principalmente do local onde ocorreu a contaminação. Essas respostas podem ser obtidas mediante ensaios em escala piloto e, principalmente, no estudo detalhado das várias características envolvidas no processo.

A remediação biológica de solo contaminado com compostos orgânicos pode ser limitada pela velocidade de transferência de massa. Quando esta é baixa, os contaminantes apresentam uma baixa degradabilidade. A biodisponibilidade dos contaminantes pode ser aumentada pelos biosurfactantes, que são surfactantes produzidos por microrganismos tais como bactérias e leveduras. Para otimizar o uso de biosurfactantes na remediação de solos, um melhor entendimento do efeito dos biosurfactantes sobre a biodisponibilidade do contaminante é requerido. É necessário determinar quais processos são estimulados pelos biosurfactantes e por que a biodegradação por certas bactérias é estimulada enquanto que por outras é negativamente afetada (NOORDMAN, 1999).

Uma das técnicas de biorremediação de solos bastante utilizada é a tecnologia de biopilhas, a qual envolve a construção de células ou pilhas de solo contaminado de forma a estimular a atividade microbiana aeróbica dentro da pilha através da aeração. A atividade microbiana é aumentada pela adição de umidade e nutrientes como Nitrogênio e Fósforo ou matéria orgânica. As bactérias presentes degradam os hidrocarbonetos adsorvidos nas partículas de solo, reduzindo assim suas concentrações (EPA, 1994).

O uso de biopilhas vem sendo adotado com grande sucesso por ser uma alternativa menos onerosa e mais efetiva que as técnicas convencionais para reduzir a poluição subterrânea gerada por contaminantes orgânicos, um problema que está em crescimento em todo o mundo. Trata-se de uma tecnologia de construção e manutenção simples e que apresenta reduzido custo de implementação e tempo de tratamento relativamente baixo: de três semanas a seis meses para hidrocarbonetos leves. Segundo estudos realizados, a aplicação de biopilhas tem-se mostrado efetiva, também, para contaminantes com baixa taxa de biodegradação. Ressalte-se, também, que as biopilhas não requerem grande área e podem ser projetadas como um sistema fechado que possibilite a coleta e tratamento de vapores (EPA, 1994).

Neste trabalho foi realizada a avaliação preliminar do potencial de utilização da tecnologia de biopilhas para a biorremediação do solo dos arredores da Lagoa de Estabilização da PETROBRAS em Guamaré-RN-Brasil. Esta avaliação foi feita mediante a caracterização física, química e microbiológica do referido solo, por meio de ensaios de biodegradação em escala de laboratório utilizando frascos Erlenmeyer e bandejas de alumínio e através de um planejamento experimental fatorial 2^3 com repetições em triplicata no ponto central.

Este trabalho visa dar uma contribuição importante para o estado do Rio Grande do Norte, uma vez que o mesmo é o maior produtor de petróleo em terra do Brasil, apresentando, portanto, áreas passíveis de contaminação com hidrocarbonetos, como por exemplo, as áreas próximas aos poços de petróleo na cidade de Mossoró. Além disso, o Rio Grande do Norte apresenta, na maior parte do ano, baixa precipitação e temperatura ambiente acima de 20 °C, condições climáticas que são favoráveis à utilização da tecnologia de biopilhas para a biodegradação dos hidrocarbonetos presentes nos solos contaminados.

Para uma melhor compreensão, a presente dissertação foi dividida em sete capítulos.

No capítulo I apresenta-se uma introdução geral do tema em estudo.

O capítulo II apresenta um levantamento de vários conceitos importantes para o entendimento do tema em estudo. Portanto, neste capítulo são apresentados os aspectos teóricos referentes ao processo de biodegradação, às técnicas de remediação de solos e à utilização de biopilhas para remediação de solos contaminados com hidrocarbonetos.

O capítulo III apresenta o estado da arte relativo à biorremediação de solos contaminados. Descreve-se, neste capítulo, vários estudos realizados por diversos autores, as metodologias empregadas e os respectivos resultados obtidos.

No capítulo IV, por sua vez, descrevem-se as metodologias incluindo os materiais utilizados, os equipamentos e as condições experimentais empregados na realização deste trabalho.

No capítulo V são apresentados os resultados e a discussão da caracterização física, química e microbiológica do solo de Guamaré, dos ensaios de biodegradação do óleo diesel e da análise estatística obtida por meio da aplicação do planejamento experimental.

As conclusões obtidas são apresentadas no capítulo VI.

Por fim, apresentam-se as referências bibliográficas citadas ao longo da presente dissertação e dados anexos como complementação dos assuntos abordados no corpo do texto.

CAPÍTULO II
ASPECTOS TEÓRICOS

2.1. O Processo de biodegradação

2.1.1. Biodisponibilidade

Do ponto de vista de biorremediação do solo, o termo biodisponibilidade é usado para descrever a extensão com que as limitações à transferência de massa determinam uma reação ou um efeito. A biodisponibilidade dos contaminantes do solo aos microrganismos que degradam estes compostos é, portanto, determinada pelos processos que estão envolvidos na transferência dos contaminantes do solo para as enzimas que catalisam a primeira etapa da conversão (NOORDMAN, 1999).

2.1.2. Etapas do processo de biodegradação

O processo de biodegradação consiste de várias etapas conforme mostrado na Figura 1. Considere-se um substrato que inicialmente está presente no solo ou numa matriz porosa onde ele está inacessível aos microrganismos. O substrato pode estar (ad) sorvido à matriz porosa ou presente na fase sólida ou na fase líquida. Inicialmente, este substrato tem que ser transferido aos sítios onde ele possa entrar em contato com os microrganismos. Isto pode ocorrer pela dessorção, dissolução ou mobilização do contaminante da “fase solo” para a fase aquosa, e eventualmente por transporte, ou seja, convecção e dispersão. Subseqüentemente, o substrato tem que ser capturado pelas células. Após esta etapa, o substrato é finalmente convertido (NOORDMAN, 1999).

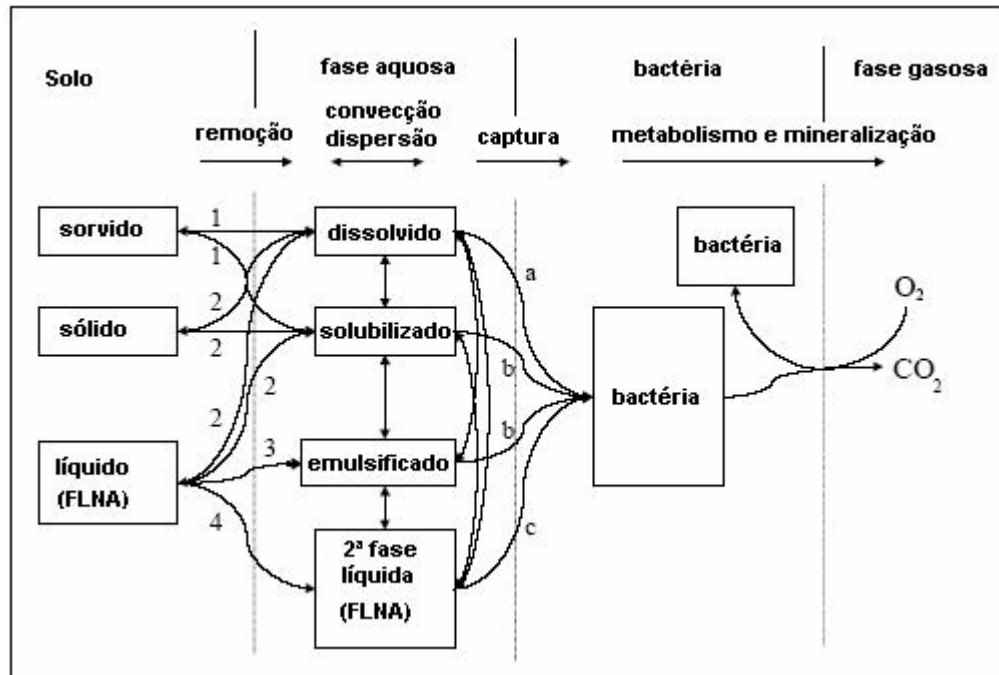


Figura 1. Processos envolvidos na biodegradação de contaminantes inicialmente presentes no solo.

¹ Dessorção

² Dissolução

³ Deslocamento

⁴ Mobilização

^a captura do substrato dissolvido,

^b captura do substrato por ligação direta do organismo às gotas do substrato (líquido)

^c captura do substrato "pseudo-solubilizado".

Essas etapas são mais bem descritas nos itens que se seguem.

2.1.2.1. Dessorção dos contaminantes do solo

Contaminantes orgânicos hidrofóbicos são sorvidos fortemente ao solo. O teor e velocidade da sorção estão correlacionados ao teor de matéria orgânica do solo e à hidrofobicidade ($\log K_{ow}$) do contaminante, indicando que a matéria orgânica exerce uma função dominante na determinação da sorção e da cinética de sorção (BRUSSEAU; RAO, 1989; BRUSSEAU, 1993 *apud* NOORDMAN, 1999).

O estabelecimento da cinética de sorção permite a estimativa dos tempos de limpeza e dos riscos ambientais. Além do mais, o estudo da cinética de sorção pode ajudar na obtenção do mecanismo do processo de sorção (NOORDMAN, 1999).

A dessorção dos contaminantes hidrofóbicos do solo é caracterizada freqüentemente pela existência de etapas rápidas e lentas, indicando a ocorrência de diversos processos em escalas de tempo diferentes. Um aumento no tempo de contato entre um composto orgânico hidrofóbico e o solo resulta em um aumento na fração do composto para o qual a dessorção seria lenta (STEINBERG *et al.*, 1987; PIGNATELLO *et al.*, 1993 *apud* NOORDMAN, 1999).

2.1.2.2. Dissolução dos contaminantes

Os contaminantes podem estar presentes no solo como fases líquidas não aquosas (FLNA). A remoção destas FLNA pode ser muito lenta devido à baixa velocidade de dissolução e à alta quantidade de massa que pode estar presente. Nestes casos, os tempos de tratamento podem ser muito longos (NOORDMAN, 1999).

A velocidade de dissolução da FLNA pode ser calculada pelo uso da Equação (1):

$$J = k_1 a_{nw} (C_{aq} - C_{sat}) \quad (1)$$

A Equação (1) indica que a velocidade de dissolução é maior para um composto com maior solubilidade e para uma FLNA com maior área interfacial específica, a_{nw} (NOORDMAN, 1999).

2.1.2.3. Deslocamento de microgotas

Um terceiro mecanismo de remoção da FLNA do solo é a liberação de microgotas ou emulsões da FLNA imóvel chamado deslocamento, dispersão ou, quando há a presença de surfactantes, emulsificação (OKUDA *et al.*, 1996; BAI *et al.*, 1997; FORTIN *et al.*, 1997; *apud* NOORDMAN, 1999). Ela se distingue da solubilização pelo fato da quantidade de contaminante na fase aquosa poder exceder o limite de solubilidade do contaminante e se

distingue da mobilização pelo fato da FLNA não se comportar como uma verdadeira segunda fase móvel e de não haver formação de emulsão durante a mobilização (BAI *et al.*, 1997 *apud* NOORDMAN, 1999). Contudo, a distinção entre deslocamento e mobilização pode ser gradual (NOORDMAN, 1999).

2.1.2.4. Mobilização dos contaminantes

Sob certas condições uma FLNA pode ser deslocada em estado não dissolvido e se comportar como uma segunda fase móvel. Esta mobilização ocorre quando as forças de fluabilidade e viscosas que agem para deslocar um glóbulo de uma FLNA superam as forças capilares (e cisalhantes) que retêm o glóbulo no meio poroso (PENNELL *et al.*, 1996 *apud* NOORDMAN, 1999). O efeito das forças de fluabilidade sobre a mobilização da FLNA depende da direção do fluxo. Uma análise das forças viscosas, de fluabilidade e capilares leva a uma expressão que descreve a condição crítica onde a FLNA se torna móvel. Esta condição crítica é determinada, entre outros fatores, pela diferença de densidade entre a FLNA e a água e pela tensão interfacial entre a FLNA e a fase aquosa (PENNELL *et al.*, 1996 *apud* NOORDMAN, 1999). A tensão interfacial pode ser reduzida usando-se compostos tais como surfactantes (PENNELL *et al.*, 1996; SARIPALLI *et al.*, 1997 *apud* NOORDMAN, 1999). Portanto, os surfactantes podem aumentar a mobilização. A diferença de densidade entre as fases aquosas e não-aquosas pode ser modificada, por exemplo, usando-se uma salmoura para aumentar a densidade da fase aquosa ou usando-se álcoois que particionam as FLNA (densas) diminuindo a densidade destas (IMHOFF *et al.*, 1995 *apud* NOORDMAN, 1999).

2.1.2.5. Transporte

Quando existe uma separação espacial entre o contaminante no solo e a bactéria que degrada este contaminante, o mesmo deve ser transportado até as células (HARMS, 1997; HERMAN *et al.*, 1997; ANGELOVA & SCHMAUDER, 1999 *apud* NOORDMAN, 1999). A velocidade de transporte de um composto é determinada pela convecção, difusão, dispersão e sorção do contaminante (NOORDMAN, 1999).

2.1.2.6. Captura dos contaminantes pelas bactérias

Conforme mostrado na Figura 1, existem três maneiras de captura do substrato pelos microrganismos (NAKAHARA *et al.*, 1977; SINGER & FINNERTY, 1984; HOMMEL, 1990; GOSWAMI & SINGH, 1991; MILLER, 1995; BOUCHEZ-NAÏTALI *et al.*, 1999 *apud* NOORDMAN, 1999): (1) captura do substrato dissolvido; (2) captura do substrato por ligação direta do organismo às gotas do substrato (líquido) que são muito maiores do que as células; e (3) a captura do substrato “pseudo-solubilizado”. O termo substrato “pseudo-solubilizado” é usado para descrever o substrato que é solubilizado, emulsificado ou ligado ao surfactante. Para muitos substratos hidrofóbicos, as solubilidades aquosas são muito baixas em comparação às taxas de crescimento observadas quando apenas o substrato dissolvido é capturado. (MILLER, 1995 *apud* NOORDMAN, 1999). Isto indica que estes substratos são capturados por um dos dois outros modos de captura (MILLER, 1995 *apud* NOORDMAN, 1999). Compostos sólidos não podem ser capturados por ligação da bactéria à superfície sólida, indicando que a priori o substrato tem que ser dissolvido (VOLKERING *et al.*, 1998 *apud* NOORDMAN, 1999). Contaminantes sorvidos também têm que se desorver antes que sejam capturados (VOLKERING *et al.*, 1998 *apud* NOORDMAN, 1999). Contudo, vários estudos sugerem que compostos sorvidos podem ser diretamente capturados (SHIMP & YOUNG, 1988; GUERIN & BOYD, 1992; CALVILLO & ALEXANDER, 1996; TANG *et al.*, 1998 *apud* NOORDMAN, 1999). Entretanto, é mais comum, nestes casos, a bactéria realizar a captura do substrato da fase aquosa diretamente na interface sólido-água, criando, portanto, um elevado gradiente de concentração que proporciona a dessorção do substrato que não está localizado na superfície (GUERIN & BOYD, 1992 *apud* NOORDMAN, 1999).

2.1.2.7. Metabolismo

Depois que o substrato entra na célula, ele é então convertido. Ele pode ser usado como substrato de crescimento ou pode ser convertido co-metabolicamente. Muitas pesquisas são devotadas ao metabolismo de contaminantes orgânicos, aos organismos envolvidos e aos caminhos pelos quais os contaminantes são degradados. (NOORDMAN, 1999).

2.2. Remediação de solos

A introdução antropogênica excessiva de matéria ao solo causa a sua contaminação. Esta contaminação pode ser química, física ou biológica. Atualmente, estas fontes de contaminação são cada vez mais abundantes devido ao aumento da atividade industrial e da concentração urbana (OLIVEIRA, 2001).

Segundo Oliveira (2001), a remediação de solos pode ser classificada de várias formas como segue:

- Quanto à ação de tratamento:

Passiva – caracterizada pelo tratamento via ação natural, ou seja, de fenômeno de dissolução, ação microbiana nativa, entre outros.

Ativa – caracterizada pelo uso de ação técnico-científica no tratamento da área contaminada.

- Quanto ao local de tratamento:

“In situ” – realizada no local onde ocorreu a contaminação.

“Ex situ” – realizada fora do local onde ocorreu a contaminação.

2.2.1. Tecnologias de remediação de solos

Existem diversas tecnologias de remediação de solos, entre as quais citam-se:

Bioventilação – Consiste na injeção de Oxigênio ao solo a fim de aumentar a biodegradação aeróbica dos contaminantes.

Incineração – Consiste na queima com a finalidade de destruir os contaminantes pela volatilização e combustão.

Atenuação Natural – Consiste em permitir que a própria natureza se encarregue de reduzir o nível dos contaminantes do solo. São exemplos de atenuação natural a biodegradação, diluição, dispersão ou adsorção ao solo.

Disposição – O solo é escavado e disposto em um determinado local que obedeça aos requisitos impostos pela legislação.

Extração de Vapor do Solo (EVS) – Método para remover contaminantes voláteis e semivoláteis do solo não saturado pela aplicação de um vácuo ao solo através de tubos de extração.

Lavagem do solo – O solo é escavado e lavado com água para remover os contaminantes. Podem ser adicionados aditivos à água para aumentar a remoção dos contaminantes.

Biodegradação ou Biorremediação – Consiste na quebra dos contaminantes por fungos, bactérias e outros microrganismos. Os microrganismos usam os contaminantes como fonte de alimento, produzindo tipicamente Dióxido de carbono, água e células como subproduto da degradação. Alguns contaminantes podem ser apenas degradados parcialmente, gerando outras substâncias. Algumas destas substâncias podem ser mais tóxicas do que os contaminantes originais. Neste processo, os microrganismos podem ser introduzidos no solo ou podem ser microrganismos nativos.

2.2.2. Biorremediação de solos

Pode-se definir a biorremediação como o uso inteligente das potencialidades dos microrganismos em degradar compostos poluentes, reduzindo o grau de contaminação ou mesmo descontaminando ambientes poluídos (OLIVEIRA, 2001).

A biorremediação pode ser executada seguindo duas técnicas: o bioenriquecimento e a bioestimulação.

O bioenriquecimento se fundamenta na adição de novos consórcios microbianos ou culturas puras ao ambiente contaminado a fim de que estes executem a degradação que os microrganismos nativos não foram capazes de realizar. O Anexo XI apresenta uma relação dos gêneros de microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos do petróleo.

A desvantagem desta técnica reside na incerteza de que nas condições do ambiente em que serão adicionados, os microrganismos possam decompor o contaminante, ou mesmo sobreviver à competição com os microrganismos nativos.

A bioestimulação se fundamenta no favorecimento da microbiota nativa para degradar mais facilmente o contaminante em questão. Dentre as vantagens deste tipo de técnica de tratamento destacam-se a certeza de que os microrganismos nativos já estão adaptados às condições climáticas do local, que pode ser determinante no sucesso do tratamento (OLIVEIRA, 2001).

2.2.2.1. Mercado mundial de biorremediação

O mercado mundial de aplicação de modelos denominados biorremediação segue uma rota direcionada pelas agências ambientais dos próprios países (BROETZMAN *et al.* 1997, JENNINGS 1997, GLASS *et al.* 1997, PARKER & ISLAM 1997, FERNANDES 1998) que utilizam as Tecnologias Inovativas de Tratamento. É sabido que o maior mercado mundial na área de remediações é o norte-americano, responsável por 35 a 40 % do mercado, sendo o mesmo detentor do mais completo modelo de controle ambiental em execução.

Segundo levantamento realizado pela EPA – ENVIROMENTAL PROTECT AGENCY (EUA), em seu estudo denominado “Innovative Technology Evaluation Report” (EPA, 1995), mais de 95 % dos processos de biorremediação são empregados para descontaminação de solos e águas subterrâneas.

A Tabela 1 mostra como têm crescido os investimentos em tecnologias de biorremediação nos anos de 1994, 1997 e 2000 e as perspectivas de investimentos em biorremediação para o ano de 2005.

Tabela 1. Mercado mundial de biorremediação (1994-2005) em milhões de dólares.

	1994	1997	2000	2005
EUA	160-210	220-270	400-500	500-700
EUROPA	105-175	180-270	450-550	600-800
MUNDO	430-460	500-600	1.000-1.300	1.300-1.600

Fonte: EPA - Innovative Technology Evaluation Report (1995)

Considerando o exposto anteriormente, e segundo o modelo difundido pelas agências ambientais norte-americanas, faz-se necessário salientar que a execução de estudos de tratabilidade, em qualquer escala de aplicação para a remediação específica, deverá preceder obrigatoriamente sua aplicação em escala de campo (TASK GROUP, 1996).

2.3. A compostagem através de biopilhas

Biopilhas, também conhecidas como biocélulas e pilhas compostas, são usadas para reduzir as concentrações de constituintes do petróleo em solos escavados, através do uso da biodegradação. Esta tecnologia consiste no empilhamento do solo contaminado em pilhas ou células e estimulação da atividade microbiana dentro da pilha através da aeração e adição de minerais, nutrientes e umidade. O aumento da atividade microbiana resulta na biodegradação dos produtos do petróleo adsorvidos no solo através da respiração microbiana. As biopilhas são similares a “landfarms”, pois são técnicas superficiais que usam Oxigênio, geralmente do ar, para estimular o crescimento e reprodução das bactérias aeróbias que, por sua vez, degradam os constituintes do petróleo adsorvidos ao solo. Enquanto “landfarms” são aeradas geralmente pelo cultivo ou aragem, as biopilhas são aeradas forçando-se o ar a se mover por meio da injeção ou extração através de tubos perfurados colocados por toda a pilha (EPA, 1994). Uma célula típica de biopilhas é mostrada na Figura 2.

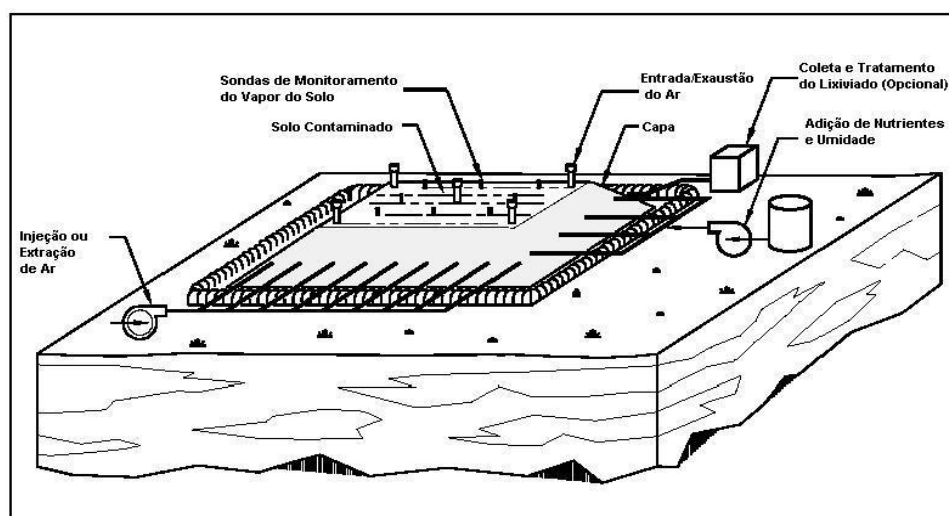


Figura 2. Modelo típico de uma biopilha.

As biopilhas são construídas sobre uma base impermeável para reduzir o potencial de migração dos lixiviados para o ambiente subsuperficial. Uma malha de dutos perfurados instalados na base da pilha e conectados a um compressor garante a perfeita aeração do conjunto. Em alguns casos, constrói-se um sistema de coleta para o lixiviado, principalmente quando do uso de sistema de adição de umidade. As pilhas são, geralmente, recobertas por plástico para evitar a liberação de contaminantes para a atmosfera, bem como para protegê-las das intempéries (EPA, 1994).

A estrutura de uma biopilha típica é mostrada na Figura 3.

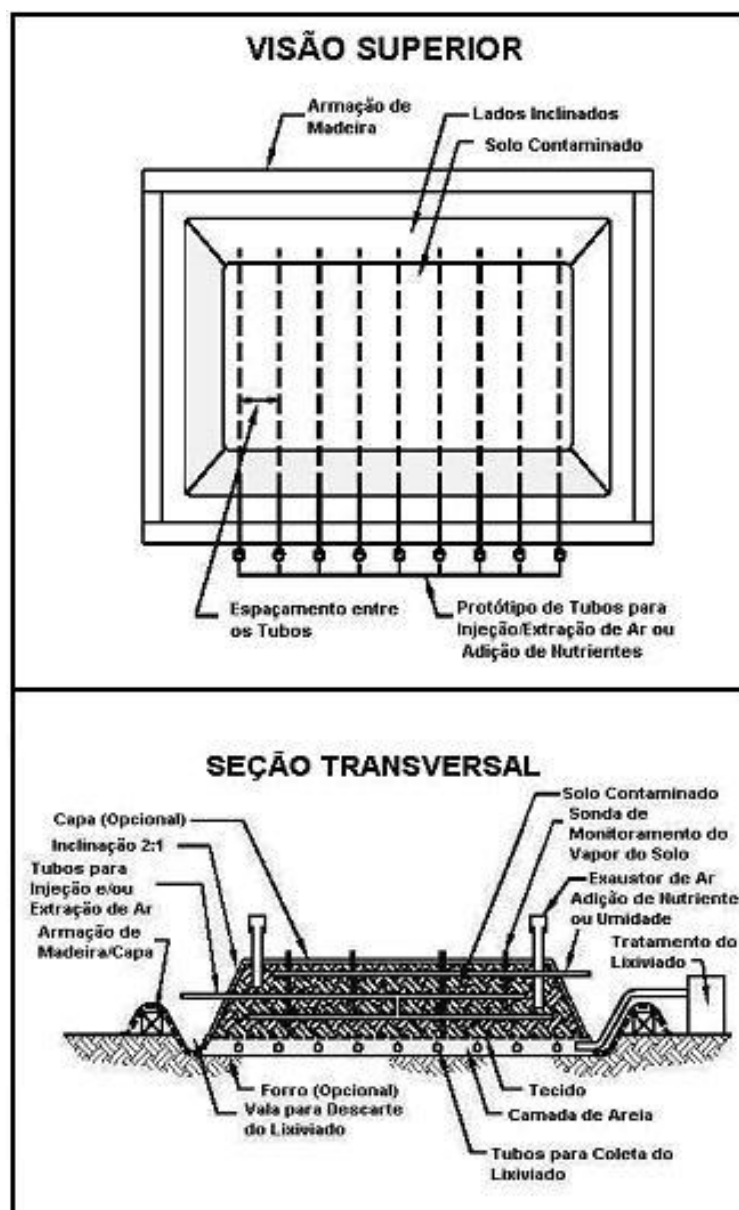


Figura 3. Estrutura de uma biopilha típica.

Biopilhas, assim como “landfarms” têm-se mostrado efetivas na redução das concentrações de quase todos os constituintes do petróleo tipicamente encontrados em sítios de armazenagem do petróleo. Produtos do petróleo mais voláteis, por exemplo, a gasolina, tendem a ser removidos por evaporação durante os processos de aeração (ou seja, injeção/extração de ar ou revolvimento da pilha) e em menor proporção degradados pela respiração microbiana. Dependendo das regulamentações do estado quanto às emissões de compostos orgânicos voláteis (COVs), necessita-se controlar as emissões destes compostos. O controle envolve a captura dos vapores antes que eles sejam emitidos para a atmosfera. Os hidrocarbonetos intermediários (por exemplo, diesel e querosene) contêm menor percentagem de constituintes mais leves do que a gasolina. A biodegradação destes produtos é mais significativa do que a evaporação. Constituintes mais pesados (por exemplo, óleos de aquecimento e óleo lubrificante) não evaporam durante a aeração da biopilha; o mecanismo dominante que quebra estes constituintes do petróleo é a biodegradação. Contudo, constituintes do petróleo de pesos moleculares mais altos tais como aqueles encontrados em óleos lubrificantes e de aquecimento, e em menor quantidade, no diesel e querosene, requerem um período de tempo maior para se degradarem do que os constituintes da gasolina (EPA, 1994). Um resumo das vantagens e desvantagens das biopilhas é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Vantagens e desvantagens das biopilhas.

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> ❑ Relativamente simples de projetar e implementar 	<ul style="list-style-type: none"> ❑ Reduções da concentração > 90% e concentração de contaminantes < 0,1 ppm são muito difíceis de atingir
<ul style="list-style-type: none"> ❑ Curtos tempos de tratamento 	<ul style="list-style-type: none"> ❑ Pode não ser efetiva para altas concentrações dos contaminantes (> 50.000 ppm de HTP)
<ul style="list-style-type: none"> ❑ Efetiva em constituintes orgânicos com baixa taxa de biodegradação 	<ul style="list-style-type: none"> ❑ Concentrações de metais pesados (> 2.500 ppm) podem inibir o crescimento microbiano
<ul style="list-style-type: none"> ❑ Requer menor área do que “landfarms” 	<ul style="list-style-type: none"> ❑ Constituintes voláteis tendem a evaporar ao invés de ser biodegradado durante o tratamento
<ul style="list-style-type: none"> ❑ Pode ser projetada para ser um sistema fechado. As emissões de vapores podem ser controladas 	<ul style="list-style-type: none"> ❑ Requer grande área para tratamento embora menor que “landfarms” ❑ A geração de vapor durante a aeração pode requerer tratamento antes do descarte ❑ Pode requerer uma base linear se o lixiviado da biopilha for uma preocupação

2.3.1. Avaliação da efetividade da biopilha

A efetividade de uma biopilha depende de muitos parâmetros, os quais são listados na Tabela 3.

Tabela 3. Fatores que afetam a efetividade das biopilhas.

Características do solo	Características dos contaminantes	Condições climáticas
Densidade da população microbiana	Volatilidade	Temperatura ambiente
pH do solo	Estrutura química	Precipitação
Teor de umidade	Concentração e toxicidade	Vento
Temperatura do solo		
Concentrações dos nutrientes		
Textura do solo		

Os parágrafos seguintes contêm descrições de cada parâmetro incluindo:

1. Por que é importante;
2. Como pode ser determinado e
3. Qual a faixa apropriada.

Durante a avaliação deve-se considerar que, como o uso de biopilha é uma técnica de tratamento de superfície, muitos parâmetros (exceto as condições climáticas) podem ser controlados durante seu projeto e operação. Portanto, durante a avaliação, deve-se identificar aqueles parâmetros que estão fora da faixa efetiva e verificar se o projeto do sistema e as especificações de operação corrigem as condições do sítio que estão abaixo daquelas consideradas ótimas (EPA, 1994).

2.3.1.1. Características do solo

2.3.1.1.1. Densidade da população microbiana

O solo normalmente contém grande número de diversos microrganismos incluindo bactérias, algas, fungos, protozoários e actinomicetos. Em solos bem drenados, que são mais apropriados para as biopilhas, estes microrganismos são geralmente aeróbios. Destes organismos, as bactérias são os mais numerosos e bioquimicamente ativos, particularmente a baixos níveis de Oxigênio. As bactérias requerem uma fonte de Carbono para o crescimento celular e uma fonte de energia para sustentar as funções metabólicas requeridas para o crescimento. As bactérias também requerem Nitrogênio e Fósforo para o crescimento celular. Embora a variedade e quantidades de microrganismos estejam usualmente presentes para “landfarming”, aplicações recentes de tratamento do solo “ex-situ” incluem a adição de microrganismos aculturados ou esterco animal (tipicamente de galinhas ou vacas). A incorporação de esterco serve tanto para aumento da população microbiana como para fornecer nutrientes adicionais. Recentemente, o uso de fungos para biodegradação de contaminantes orgânicos tem sido proposto baseado em testes de laboratório promissores (EPA, 1994).

Os processos metabólicos usados pelas bactérias para produzir energia requerem um aceptor de elétrons terminal (AET) para enzimaticamente oxidar a fonte de Carbono a Dióxido de Carbono. Os micróbios são classificados pelas fontes de Carbono e AET que usam para realizar os processos metabólicos. Bactérias que usam compostos orgânicos (por exemplo, constituintes do petróleo ou outro composto orgânico) como fonte de Carbono são chamadas heterotróficas; aquelas que usam compostos inorgânicos de Carbono (por exemplo, Dióxido de Carbono) são chamadas autotróficas. Bactérias que usam Oxigênio como seu AET são chamadas aeróbias; aquelas que usam um composto diferente de Oxigênio (por exemplo, nitrato, sulfato) são chamadas anaeróbias e aquelas que podem tanto utilizar o Oxigênio ou outros compostos como AETs são chamadas facultativas. Para aplicações diretas na limpeza de produtos de petróleo, apenas bactérias que são aeróbias (ou facultativas) e heterotróficas são importantes para os processos de degradação (EPA, 1994).

A fim de avaliar a presença e a população de bactérias que ocorrem naturalmente e que contribuirão para a degradação de constituintes do petróleo, deve-se realizar análises de laboratório de amostras do solo contaminado. Tais análises, no mínimo, devem incluir

contagem de placas para bactérias heterotróficas totais. Os resultados da contagem de placas são normalmente relatados em unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de solo. A densidade de população microbiana em solos típicos varia de 10^4 a 10^7 UFC/grama de solo. Para que as biopilhas sejam efetivas a contagem de placas heterotróficas mínima deve ser de 10^3 UFC/grama de solo. Contagem de placas inferior a 10^3 pode indicar a presença de concentrações de componentes orgânicos ou inorgânicos tóxicos (como por exemplo, metais). Nesta situação, as biopilhas podem ser ainda efetivas se o solo for condicionado ou corrigido para reduzir as concentrações de componentes tóxicos e aumentar a densidade de população microbiana. Testes de laboratório mais elaborados devem algumas vezes ser conduzidos para identificar as espécies de bactérias presentes. Isto pode ser desejável se houver incerteza quanto à capacidade dos micróbios degradarem hidrocarbonetos específicos do petróleo que ocorrem naturalmente no solo. Se os tipos de microrganismos e suas quantidades forem insuficientes, a densidade de população microbiana pode ser aumentada pela introdução de microrganismos pré-cultivados (EPA, 1994). A Tabela 4 estabelece a relação entre a contagem total de bactérias heterotróficas e a efetividade da biopilha.

Tabela 4. Relação entre a contagem total de bactérias heterotróficas e a efetividade da biopilha.

Total de bactérias heterotróficas	Efetividade da biopilha
> 1.000 UFC/grama de solo seco	Geralmente efetiva
< 1.000 UFC/grama de solo seco	Pode ser efetiva, necessita melhor avaliação para determinar se condições tóxicas estão presentes

O uso de fungos (especificamente *White rot*) está emergindo como uma tecnologia de remediação que pode ser efetiva em muitos tipos de contaminantes orgânicos. Estes fungos não metabolizam contaminantes; a degradação ocorre fora de suas células. Os fungos degradam a lignina e excretam outros produtos químicos que degradam os contaminantes orgânicos. Este processo é chamado co-metabolismo. Embora a tecnologia não tenha sido ainda sujeita a um extensivo teste de campo, os testes de laboratório mostram que ela pode ser usada para degradar produtos orgânicos a níveis não detectáveis (EPA, 1994).

2.3.1.1.2. pH do solo

Para suportar o crescimento bacteriano, o pH do solo deve estar na faixa entre 6,0 e 8,0, com um valor ótimo de aproximadamente 7,0 (neutro). Solos com pH fora desta faixa necessitarão de ajuste durante a construção e operação da biopilha. O pH do solo dentro da biopilha pode ser aumentado através da adição de soluções básicas e diminuído através da adição de enxofre ou soluções ácidas durante a sua construção. Contudo, a mistura com o solo durante a construção resulta em uma distribuição mais uniforme. A Tabela 5 mostra um resumo do efeito do pH do solo na efetividade da biopilha. Se o pH do solo é menor que 6 ou maior que 8, pode-se afirmar que ajustes de pH devem ser incluídos nos planejamentos de construção da biopilha e que o planejamento de operação inclui o monitoramento do pH (EPA, 1994).

Tabela 5. Efeito do pH do solo na efetividade da biopilha.

pH do solo	Efetividade da biopilha
$6,0 \leq \text{pH} \leq 8,0$	Geralmente efetiva
$\text{pH} < 6,0$ ou $\text{pH} > 8,0$	As biopilhas de solo necessitarão de ajuste para corrigir o pH para uma faixa efetiva

2.3.1.1.3. Teor de umidade

Os microrganismos do solo requerem condições de umidade no solo para atingirem o crescimento adequado. Umidade excessiva no solo, contudo, restringe o movimento do ar através da subsuperfície reduzindo, assim, a disponibilidade de Oxigênio, o qual é essencial para os processos metabólicos aeróbios das bactérias. Em geral, os solos devem ser úmidos, mas não devem ser molhados. A faixa ideal para a umidade do solo deve estar entre 40 e 85 % da capacidade de retenção de água (capacidade do campo) do solo ou de aproximadamente 12 a 30 % em peso. Periodicamente, umidade deve ser adicionada à biopilha porque o solo se torna seco como resultado da evaporação, que é aumentada durante as operações de aeração. Excessivo acúmulo de umidade pode ocorrer dentro das biopilhas em áreas com alta precipitação ou drenagem pobre. Estas condições devem ser consideradas no projeto da

biopilha. Por exemplo, uma capa impermeável pode mitigar o excesso de infiltração e a potencial erosão da biopilha. A Tabela 6 mostra a faixa ótima para o teor de umidade (EPA, 1994).

Tabela 6. Teor de umidade do solo e efetividade da biopilha.

Umidade do Solo	Efetividade da Biopilha
40% ≤ capacidade do campo ≤ 85%	Efetiva
Capacidade do campo < 40 %	Adição de umidade periódica é necessária para manter o crescimento bacteriano apropriado
Capacidade do campo > 85 %	O projeto da biopilha deve incluir considerações especiais de drenagem da água ou capa impermeável

2.3.1.1.4. Temperatura do solo

A taxa de crescimento das bactérias é função da temperatura. Tem-se mostrado que a atividade microbiana no solo diminui significativamente a temperaturas abaixo de 10 °C e, essencialmente cessam, abaixo de 5 °C. A atividade microbiana da maioria das bactérias importantes para a biodegradação dos hidrocarbonetos do petróleo também diminui a temperaturas maiores do que 45 °C. Dentro da faixa de 10 °C a 45 °C, a taxa de atividade microbiana tipicamente dobra para cada aumento de 10 °C na temperatura. Como a temperatura do solo varia com a temperatura do ambiente, haverá certos períodos do ano em que o crescimento microbiano e, portanto, a degradação dos constituintes diminuirá. Quando a temperatura retornar à faixa ótima de crescimento, a atividade bacteriana será gradualmente restaurada. A Tabela 7 mostra como a temperatura do solo afeta a operação da biopilha (EPA, 1994).

Tabela 7. Efeito da temperatura na efetividade da biopilha.

Temperatura do Solo	Efetividade da Biopilha
10 °C ≤ temperatura do solo ≤ 45°C temperatura do solo > 45 °C ou temperatura do solo < 10 °C	Efetiva Geralmente não é efetiva; a atividade microbiana diminui durante temperaturas sazonais extremas, mas é restaurada durante os períodos dentro da faixa efetiva Procedimentos de controle de temperatura, injeção de ar aquecido (ou resfriado), ou bactérias especiais são requeridos para áreas com temperaturas extremas

2.3.1.1.5. Concentração dos nutrientes

Os microrganismos requerem nutrientes tais como Nitrogênio e Fósforo para suportar o crescimento celular e manter os processos de biodegradação. Estes nutrientes podem estar disponíveis em quantidades suficientes no local, porém, freqüentemente, precisam ser adicionados à biopilha para manter as populações microbianas. Contudo, quantidades excessivas de certos nutrientes (por exemplo, fosfato e sulfato) podem reprimir o metabolismo microbiano. A relação típica Carbono: Nitrogênio: Fósforo necessária para a biodegradação está na faixa de 100:10:1 a 100:1:0,5; dependendo dos constituintes específicos e dos microrganismos envolvidos nos processos de biodegradação (EPA, 1994).

Os teores de Fósforo e Nitrogênio disponíveis naturalmente no solo, bem como a quantidade que precisa ser adicionada deve ser determinada por análise físico-química das amostras coletadas no local. Estes tipos de testes são rotineiramente conduzidos em laboratórios agrônômicos que testam a fertilidade do solo para fazendeiros. Estas concentrações podem ser comparadas com o Nitrogênio e Fósforo requeridos, calculados a partir das razões estequiométricas do processo de biodegradação. Uma aproximação da quantidade de Nitrogênio e Fósforo requeridos para a degradação ótima dos produtos do petróleo pode ser determinada admitindo-se que a massa total de hidrocarboneto no solo representa a massa de Carbono disponível para a biodegradação. Esta suposição simplificadora é válida porque o teor de Carbono dos hidrocarbonetos do petróleo comumente encontrados nos locais é de aproximadamente 90 % em peso de Carbono (EPA, 1994).

Se for necessária a adição de nutrientes, fontes de lançamento lentas devem ser usadas. A adição de Nitrogênio pode diminuir o pH, dependendo da quantidade e tipo de Nitrogênio adicionado (EPA, 1994).

2.3.1.1.6. Textura do solo

A textura do solo afeta a permeabilidade, teor de umidade e a densidade “bulk” do solo. Para assegurar que a regulagem do teor de Oxigênio (por injeção ou extração de ar), a distribuição dos nutrientes e o teor de umidade do solo possam ser mantidos dentro de faixas efetivas, deve-se considerar a textura do solo. Por exemplo, solos que tendem a se aglomerar (como argilas) são difíceis de aerar e resultam em baixas concentrações de Oxigênio. É também difícil de distribuir uniformemente os nutrientes através desses solos. Eles também retêm água por extensos períodos após uma eventual precipitação (EPA, 1994).

Deve-se identificar se os solos do local proposto para tratamento através de biopilhas são argilosos. Para ajustar os solos argilosos, a gipsita e materiais volumantes (serragem ou palha) devem ser misturados ao solo quando da construção da biopilha para assegurar que o meio tenha uma quebra ou divisão na textura. Por outro lado, solos com partículas de grandes dimensões podem necessitar de uma quebra dessas partículas ou outro meio de pré-tratamento durante a construção da biopilha para permitir que a biorremediação seja efetiva (EPA, 1994).

2.3.2. Características dos contaminantes

2.3.2.1. Volatilidade

A volatilidade dos contaminantes propostos para tratamento em biopilhas é importante porque constituintes voláteis tendem a se evaporar a partir da biopilha junto com o ar durante a injeção ou extração, em vez de serem biodegradados pelas bactérias. Os vapores dos constituintes no ar que é injetado na biopilha se dissiparão para a atmosfera a menos que a biopilha seja coberta e tubos de coleta desses vapores sejam instalados próximo à capa. Se o ar for adicionado à pilha por meio da aplicação de um vácuo aos tubos de aeração, o vapor

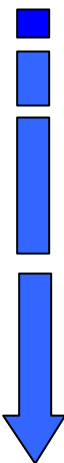
dos constituintes voláteis passará na corrente de ar extraído, os quais poderão ser tratados, se necessário. Em alguns casos (onde permitido), pode ser aceitável reinjetar os vapores extraídos de volta à pilha de solo para degradação adicional. É importante otimizar a taxa de aeração da biopilha. A evaporação de constituintes voláteis pode ser reduzida pela minimização da taxa de injeção ou extração de ar, a qual reduz também as taxas de degradação pela redução do suprimento de Oxigênio às bactérias (EPA, 1994).

Os produtos do petróleo geralmente encontrados em locais contaminados variam desde hidrocarbonetos com uma significativa fração volátil, tais como a gasolina, àqueles que são primariamente não-voláteis, tais como óleos de queima e lubrificantes. Produtos do petróleo geralmente contêm mais de uma centena de diferentes constituintes, por isso possui uma larga faixa de volatilidade. Em geral, gasolina, querosene e diesel contêm constituintes com suficiente volatilidade para evaporar na biopilha. Dependendo das regulamentações específicas do estado para as emissões de compostos orgânicos voláteis (COVs), este controle pode ser requerido. O controle envolve a captura dos vapores seguido do seu tratamento de forma apropriada antes que sejam ventilados para a atmosfera (EPA, 1994).

2.3.2.2. Estrutura química

A estrutura química dos contaminantes presentes no solo proposto para tratamento por biopilhas é importante na determinação da taxa na qual ocorrerá a biodegradação. Embora quase todos os constituintes nos produtos do petróleo, tipicamente encontrados em locais contaminados, sejam biodegradáveis, quanto mais complexa a estrutura molecular do constituinte, mais difícil e menos rápido é o tratamento biológico. Constituintes alifáticos de peso molecular mais baixo (nove ou menos átomos de Carbono) e monoaromáticos são mais facilmente biodegradados do que constituintes alifáticos de peso molecular mais altos ou constituintes orgânicos poliaromáticos. A Tabela 8 lista alguns constituintes do petróleo, em ordem decrescente de potencial de biodegradabilidade (EPA, 1994).

Tabela 8. Estrutura química dos contaminantes e biodegradabilidade.

Biodegradabilidade	Constituintes	Produtos em que os constituintes são encontrados
Mais degradável	n-butano, 1-pentano n-octano Nonano	<input type="checkbox"/> Gasolina <input type="checkbox"/> Diesel
	Metil butano Dimetilpentanos Metil octanos	<input type="checkbox"/> Gasolina
	Benzeno, tolueno, Etilbenzeno, xilenos Propilbenzenos	<input type="checkbox"/> Gasolina <input type="checkbox"/> Diesel, Querosene
	Decanos Dodecanos Tridecanos Tetradecanos	<input type="checkbox"/> Diesel <input type="checkbox"/> Querosene <input type="checkbox"/> Combustíveis de aquecimento <input type="checkbox"/> Óleos lubrificantes
	Naftalenos Fluorantenos Pirenos Acenaftenos	<input type="checkbox"/> Diesel <input type="checkbox"/> Querosene <input type="checkbox"/> Óleo de aquecimento <input type="checkbox"/> Óleos lubrificantes
	Menos degradável	

A avaliação da estrutura química dos constituintes propostos para redução através de biopilhas no local permite determinar quais constituintes serão mais difíceis de serem degradados. Deve-se verificar o tempo de remediação por meio de estudos de biotratabilidade, estudos em escala piloto (se aplicável) e planejamentos de operação e monitoramento da biopilha baseados nos constituintes que são mais difíceis de ser degradados (ou limitantes da velocidade) no processo de biodegradação (EPA, 1994).

2.3.2.3. Concentração e toxicidade

Altas concentrações de produtos orgânicos do petróleo ou de metais pesados no solo podem ser tóxicas ou inibir o crescimento e reprodução das bactérias responsáveis pela biodegradação em biopilhas. Por outro lado, concentrações muito baixas de material orgânico resultarão em baixos níveis de atividade microbiana (EPA, 1994).

Em geral, concentrações de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) na faixa de 10.000 a 50.000 ppm, ou metais pesados excedendo a 2.500 ppm, são considerados inibitórios e/ou tóxicos para muitos microrganismos. Se a concentração de HTP for maior do que 10.000 ppm ou a concentração de metais pesados maior que 2.500 ppm, então o solo contaminado deve ser rigorosamente misturado com solo limpo para diluir os contaminantes, de modo que a concentração média fique abaixo dos níveis tóxicos. A Tabela 9 fornece o critério geral para a concentração dos constituintes e a efetividade da biopilha (EPA, 1994).

Tabela 9. Concentração dos contaminantes e efetividade da biopilha.

Concentração dos contaminantes	Efetividade da Biopilha
Constituintes do petróleo \leq 50.000 ppm e metais pesados \leq 2.500 ppm	Efetiva, contudo, se a concentração do contaminante é $>$ 10.000 ppm, então o solo deve ser misturado com solo limpo para reduzir a concentração dos contaminantes
Constituintes do petróleo $>$ 50.000 ppm ou metais pesados $>$ 2.500 ppm	Inefetiva; condições tóxicas ou inibitórias para o crescimento bacteriano. Será necessária a diluição dos contaminantes

Além dessas considerações, deve-se levar em conta ainda os objetivos de limpeza propostos no uso de biopilhas. Abaixo de uma certa concentração “limite” dos contaminantes, as bactérias não podem obter Carbono suficiente (a partir da degradação dos contaminantes) para manter atividade biológica adequada. Este limite pode ser determinado a partir de estudos de laboratório e deve estar abaixo do nível requerido para limpeza. Embora este limite varie significativamente dependendo da bactéria específica e das características específicas dos contaminantes, geralmente concentração dos contaminantes abaixo de 0,1 ppm não é atingida apenas por tratamentos biológicos. Além do mais, a experiência mostra que reduções

nas concentrações de HTP maiores do que 95 % podem ser muito difíceis de se atingir devido à presença de espécies “recalcitrantes” ou hidrocarbonetos não degradáveis incluídos entre os HTPs. Se for requerido um nível de limpeza menor do que 0,1 ppm para qualquer contaminante individual ou uma redução nos HTPs maior do que 95 %, deve-se considerar ou um estudo em escala piloto para demonstrar a habilidade da biopilha atingir estas reduções no sítio ou uma outra tecnologia deve ser considerada. A Tabela 10 mostra a relação entre os requisitos de limpeza e a efetividade da biopilha (EPA, 1994).

Tabela 10. Requisitos de limpeza e efetividade da biopilha.

Nível de limpeza	Efetividade da Biopilha
Concentração dos contaminantes > 0,1 ppm e redução dos HTPs < 95 %	Efetiva
Concentração dos contaminantes ≤ 0,1 ppm e redução dos HTPs ≥ 95 %	Potencialmente inefetiva; estudos pilotos são necessários para demonstrar redução dos contaminantes

2.3.3. Condições climáticas

2.3.3.1. Temperatura ambiente

A temperatura ambiente é importante porque ela influencia a temperatura do solo. Como descrito previamente, a temperatura dos solos na biopilha afeta a atividade microbiana e, conseqüentemente, a biodegradação. A faixa de temperatura ótima para as biopilhas é de 10 a 45 °C. Considerações especiais (por exemplo, aquecimento, cobertura ou isolamento) no projeto da biopilha pode superar os efeitos de climas mais frios e estender o período da biorremediação (EPA, 1994).

2.3.3.2. Precipitação

Alguns projetos de biopilha não incluem capas, deixando a biopilha exposta a fatores climáticos incluindo chuva, neve e vento, bem como temperatura ambiente. A água da chuva que cai sobre a biopilha aumentará o teor de umidade do solo e causará a erosão. Como descrito anteriormente, a operação efetiva da biopilha requer uma faixa apropriada de teor de umidade. Durante e após uma precipitação significativa, o teor de umidade do solo pode ficar temporariamente em excesso em relação àquele necessário para a atividade efetiva das bactérias. Por outro lado, durante períodos de seca, o teor de umidade pode ficar abaixo da faixa efetiva e será necessário adicionar umidade (EPA, 1994).

Se o sítio está localizado em uma área sujeita a precipitação maior do que 76 mm durante a utilização da biopilha, uma proteção contra a chuva (como uma capa ou lona plástica) deve ser considerada no projeto da biopilha. Além do mais, as correntes de entrada e saída de água da biopilha devido à precipitação devem ser controladas usando-se valas no perímetro da biopilha. Um sistema de coleta do lixiviado na base da biopilha e um sistema de tratamento do lixiviado podem também ser necessários para prevenir a contaminação da água superficial da biopilha (EPA, 1994).

2.3.3.3. Vento

A erosão do solo da biopilha pode ocorrer durante períodos de ventania. A erosão pelo vento pode ser limitada pela aplicação de umidade periodicamente à superfície da biopilha ou pelo isolamento ou cobertura da biopilha (EPA, 1994).

2.3.4. Avaliação da biotratabilidade

Estudos de biotratabilidade são especificamente desejáveis se a toxicidade é uma preocupação ou se as condições do solo não são condutivas à atividade biológica. Estudos de biotratabilidade são usualmente realizados no laboratório e devem ser planejados assim que os parâmetros apropriados para o projeto e implemento do sistema da biopilha tenham sido determinados com sucesso. Se os estudos de biotratabilidade não demonstrarem efetividade,

tentativas de campo ou estudos em escala piloto serão necessários antes da implementação, ou outra técnica de remediação deve ser avaliada. Se o solo, os constituintes e as condições climáticas estiverem dentro da faixa de efetividade para as biopilhas, deve-se rever os estudos de biotratabilidade para confirmar o potencial das biopilhas e verificar se os parâmetros necessários para a biopilha em escala real foram obtidos. Estudos de biotratabilidade devem fornecer os dados sobre a biodegradabilidade dos contaminantes, a habilidade dos microrganismos nativos degradarem os contaminantes, as condições ótimas de crescimento, a velocidade de biodegradação e a suficiência de nutrientes e minerais (EPA, 1994).

Há dois tipos de estudos de biotratabilidade geralmente usados para demonstrar a efetividade da biopilha: (1) estudos em frascos e (2) estudos em recipientes. Ambos os estudos começam com a determinação das propriedades físicas e químicas dos solos a serem tratados na biopilha. Análises físicas e químicas necessárias em amostras de solo do sítio para os estudos de biotratabilidade são listadas na Tabela 11.

Tabela 11. Parâmetros físicos e químicos para os estudos de biotratabilidade.

Parâmetro	Propriedades Medidas
Toxicidade do Solo	Tipo e concentração do contaminante e/ou metais presentes, pH
Textura do Solo	Granulometria, teor de argila, teor de umidade, porosidade, permeabilidade e densidade bulk
Nutrientes	Nitrato, fosfato, outros ânions e cátions
Biodegradabilidade do contaminante	Carbono orgânico total, volatilidade, estrutura química

Fonte: EPA, 1994.

Os objetivos específicos da análise desses parâmetros são:

- Determinar os tipos e as concentrações dos contaminantes do solo que serão usados nos estudos de biotratabilidade.
- Avaliar as concentrações iniciais dos contaminantes presentes nas amostras em estudo de modo que reduções na concentração possam ser avaliadas.

- Determinar se nutrientes (Nitrogênio e Fósforo) estão presentes em concentrações suficientes para suportar níveis elevados de atividade bacteriana.
- Avaliar os parâmetros que podem inibir o crescimento microbiano (concentrações tóxicas de metais, valores de pH menor que 6 ou maior que 8).

Depois que a caracterização das amostras de solo tiver sido feita deve-se realizar estudos de bancada para avaliar a efetividade da biodegradação. Estudos em frascos, que são simples e baratos, são usados para testar a biodegradação em águas e solos usando microcosmos de solo/água. Os estudos em frascos podem usar um único microcosmo que é amostrado várias vezes ou podem ter uma série de microcosmos, cada um amostrado uma única vez. Estudos em frascos são menos desejáveis que estudos em recipientes para a avaliação da efetividade da biopilha, pois são primariamente mais usados para avaliação de tecnologias de biorremediação em fase aquosa. Estudos em recipientes usam solos em um “slurry” aquoso, colocados em recipientes de metal, vidro ou plástico que se aproximam de biopilhas (EPA, 1994).

Nos estudos em frascos ou recipientes, a degradação é medida pelo controle na redução da concentração do contaminante, variações na população bacteriana e outros parâmetros, com o tempo. Segundo a EPA (1994) uma avaliação típica do tratamento usando estudos em frascos ou recipientes pode incluir os seguintes tipos de estudos:

- Estudos de controle, sem tratamento: mede a velocidade com que as bactérias existentes podem degradar os constituintes sob condições oxigenadas sem a adição de nutrientes suplementares.
- Estudos de ajuste de nutrientes: determina a razão ótima de C:N:P para atingir a máxima velocidade de degradação usando microcosmos preparados com diferentes concentrações de nutrientes.
- Estudos de inoculação: são realizados se a contagem de placas bacterianas indica que a atividade bacteriana natural é insuficiente para promover uma degradação satisfatória. Os microcosmos são inoculados com bactérias conhecidas para degradar os constituintes no local e são analisados para determinar se a degradação pode ser aumentada através da inoculação.

– Estudos estéreis de controle: medem a velocidade de degradação devido a processos abióticos (incluindo a volatilização) como uma base de comparação com outros estudos que examinam os processos biológicos. Os solos nos microcosmos são esterilizados para eliminar a atividade bacteriana. As taxas de degradação abiótica são, então, medidas com o tempo.

2.3.5. Avaliação do projeto da biopilha

Uma vez verificado que as biopilhas têm potencial para ser efetiva, deve-se avaliar o projeto do sistema da biopilha. O planejamento deve incluir a discussão da racionalidade para o projeto e apresentar o projeto de engenharia. Documentos de projetos de engenharia podem também ser incluídos, dependendo dos requisitos do estado (EPA, 1994). Detalhes adicionais que devem ser colocados em discussão no projeto da biopilha são mostrados abaixo:

– Requisitos de terreno: pode ser determinado dividindo a quantidade de solo a ser tratado pela altura da biopilha proposta. A altura típica da biopilha varia entre 1 e 3 m. Uma área de terra ao redor das biopilhas será necessária para a inclinação dos lados da pilha, para a capa e para o acesso. O comprimento e profundidade das biopilhas geralmente não são restritivos a menos que a aeração tenha de ocorrer manualmente pelo revolvimento do solo. Em geral, quando se usa o revolvimento das biopilhas, estas não devem ter profundidade maior que 1,8 a 2,4 m.

– “Layout” da biopilha: é usualmente determinado pela sua configuração e o acesso disponível. O sistema da biopilha pode incluir pilhas simples ou múltiplas.

– A construção da biopilha inclui: preparação do local (roçar, limpar); capas (se necessário); injeção de ar, arranjo dos tubos de extração e/ou coleta; coleta e tratamento do lixiviado; métodos de pré-tratamento e facilidades apropriadas para o tratamento dos vapores (quando necessário).

– Equipamento de aeração: usualmente inclui sopradores ou ventiladores que serão acoplados aos tubos de aeração, a menos que a aeração seja feita manualmente através do revolvimento do solo.

- Sistemas de gerenciamento de água: o controle das correntes de entrada e saída de água da biopilha devido à precipitação é necessário para evitar a saturação da área de tratamento ou a lavagem do solo na área da biopilha. A corrente de entrada de água é geralmente controlada por camadas de terra ou valas que interceptem e desviem o fluxo das tempestades. A corrente de saída de água pode ser controlada pelo desvio dentro da camada da área de tratamento para uma lagoa de retenção onde esta pode ser armazenada, tratada, ou lançada sob permissão do Sistema Nacional de Eliminação de Descarga de Poluição (SNEDP), no caso, do Brasil deve-se levar em consideração os padrões estabelecidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).

- Controle de erosão do solo a partir do vento e da água: geralmente inclui a inclinação das laterais da pilha, cobrindo-a, construindo sistemas de gerenciamento de água, e aspergindo-a para minimizar a poeira.

- Ajuste do pH, adição de umidade e suprimento de nutrientes: são métodos que geralmente incluem a incorporação de fertilizantes sólidos, soda ou enxofre ao solo quando da construção da biopilha ou injeção de nutrientes líquidos, água e soluções ácidas/alcalinas preferencialmente através de uma tubulação durante a operação da biopilha. A composição dos nutrientes e dos sólidos/soluções alcalinos ou ácidos para controle do pH são desenvolvidos nos estudos de biotratabilidade, e a frequência de sua aplicação é modificada durante a operação da biopilha quando necessário.

- Segurança do local: pode ser necessária para evitar que estranhos ultrapassem a área de tratamento. Se a biopilha for acessível ao público, recomenda-se a construção de uma cerca ou outro meio de segurança para deter o contato do público com o material contaminado dentro da área da biopilha.

- Controle da emissão de ar: pode ser requerido se contaminantes voláteis estiverem presentes no solo das biopilhas. Para obedecer às leis de controle de qualidade do ar, as emissões de constituintes voláteis orgânicos devem ser estimadas baseando-se na concentração inicial dos constituintes do petróleo presentes. Os vapores no ar extraído ou injetado devem ser monitorados durante as fases iniciais de operação da biopilha para estar de acordo com os limites regulamentares de permissão de descargas atmosféricas. Se requerido, uma tecnologia

de tratamento apropriado do vapor deve ser especificada, incluindo parâmetros de operação e monitoramento.

2.3.6. Avaliação da operação e progresso do planejamento de monitoramento

É importante ter certeza de que o sistema de operação e os planejamentos de monitoramento tenham sido desenvolvidos para a operação da biopilha. O monitoramento regular é necessário para assegurar a otimização da taxa de biodegradação, para observar a redução na concentração dos constituintes, monitorar a emissão de vapores e a migração dos constituintes para o solo dos arredores da biopilha e a qualidade da água subterrânea. Se apropriado, assegurar o monitoramento para determinar se as descargas estão de acordo com a legislação (EPA, 1994).

2.3.6.1. Planejamentos de operação

Deve-se assegurar que o planejamento de operação da biopilha inclui a frequência de aeração, adição de nutrientes e umidade. O planejamento deve ser flexível e pode ser modificado baseado nos resultados do monitoramento regular do solo da biopilha. O planejamento deve também levar em conta as variações sazonais na temperatura ambiente e na precipitação. Em geral, a aeração e a aplicação de umidade e nutrientes deve ser mais freqüente em meses mais quentes e secos. Se a biopilha é coberta com uma capa impermeável, as condições da cobertura devem ser checadas periodicamente para assegurar que a mesma permanece no local e que está livre de rasgões ou buracos. Deve-se realizar a substituição da capa quando esta não estiver mais em condições de uso efetivo na biopilha (EPA, 1994).

2.3.6.2. Monitoramento do progresso da remediação

Deve-se ter certeza de que o planejamento de monitoramento para o sistema da biopilha foi descrito em detalhes e incluiu o monitoramento do solo da biopilha para a redução dos contaminantes e suas condições de biodegradação (por exemplo, CO₂, O₂, CH₄, H₂S), o monitoramento do ar para emissão dos vapores se houver constituintes voláteis, o monitoramento do solo e da água superficial para detectar o potencial de migração dos contaminantes para além da área da biopilha e a amostragem da corrente de saída de água, para obedecer aos limites de descargas permitidos. Deve-se assegurar de que o número de amostras coletadas, os locais de amostragem e os métodos de coleta estão de acordo com os padrões do órgão competente (EPA, 1994), no caso do Brasil deve-se levar em consideração os padrões do CONAMA.

O solo dentro da biopilha deve ser monitorado pelo menos quinzenalmente durante o tratamento para determinar o pH, teor de umidade, população bacteriana, teor de nutrientes e concentração dos contaminantes. Para biopilhas que usam extração de ar ou para aquelas que usam injeção de ar e coleta de gás, as condições de biodegradação podem ser rastreadas pela medição da concentração do Oxigênio e Dióxido de Carbono no vapor extraído da biopilha. Essas medidas devem ser tomadas semanalmente durante os primeiros três meses de operação. Os resultados dessas análises, que podem ser feitas usando instrumentos eletrônicos, kits de teste de campo ou em laboratório, são críticos para a ótima operação da biopilha. Os resultados devem ser usados para ajustar o fluxo de injeção ou extração de ar, taxa de aplicação de nutrientes, frequência e quantidade de adição de umidade e pH. As faixas ótimas para esses parâmetros devem ser mantidas para atingir taxas máximas de degradação (EPA, 1994). Os Anexos VI e X mostram, respectivamente, os parâmetros a serem analisados em estudos de tratabilidade e um planejamento do monitoramento do progresso da remediação.

2.4. Execução do projeto da biopilha

A altura típica de uma biopilha varia entre 1 m e 3 m. Uma área ao redor da pilha é necessária para acesso, transporte e manutenção. O comprimento e a largura das pilhas não são restritivos. As biopilhas são construídas em camadas. Os dutos de aeração são montados e

em seguida o solo contaminado, já devidamente homogeneizado e acrescido de agentes corretivos é depositado sobre a malha de tubos. Uma malha adicional pode ser necessária em função da altura da pilha e do tipo de solo. Durante a homogeneização do solo, é comum a adição de substâncias que melhoram suas características como, por exemplo, areia e serragem para aumentar a permeabilidade e facilitar a chegada de água e nutrientes às bactérias; fertilizantes, para fornecimento de N, P, K; agentes corretivos de pH (6 – 8); esterco para aumentar a concentração de microrganismos e induzir a um processo fermentativo que eleve a temperatura e acelere a biorremediação. Quando os contaminantes são hidrocarbonetos leves, é necessário um sistema para coleta e tratamento dos vapores, pois a injeção de ar força a saída dos contaminantes leves para a atmosfera (EPA, 1994).

CAPÍTULO III
ESTADO DA ARTE

Vários autores estudaram a biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos da indústria do petróleo através de várias técnicas, associadas ou não, em escala de laboratório ou em escala real. Na maioria destes estudos foram analisadas propriedades do solo, tais como textura, pH, teor de umidade, concentração de nutrientes tais como Carbono, Nitrogênio, Fósforo e Potássio, bem como enumeração das bactérias presentes no solo.

Brown, Guha e Jaffé (1990) estudaram a biodegradação do fenantreno em reatores “slurry” na presença e ausência de uma solução de surfactante Triton N-101. Os resultados mostraram que a presença do surfactante diminuiu a velocidade de biodegradação inicial do fenantreno, porém aumentou em 30 % a massa total de fenantreno degradado em um período de quatro dias. Os autores desenvolveram um modelo matemático para simular a biodegradação dos hidrocarbonetos de baixa solubilidade na presença de solos e surfactantes levando em conta a biodisponibilidade em diferentes fases do sistema. O modelo foi capaz de simular os resultados experimentais usando parâmetros e coeficientes de velocidade obtidos através de experimentos independentes.

Cho *et al.* (1997) estudaram a biorremediação de solo contaminado com hidrocarbonetos do petróleo em escala de laboratório, usando esterco (nutriente básico para os microrganismos) e doze tipos de materiais (diatomita ressecada, vidro microporoso, carvão vegetal obtido a partir de coco, uma mistura de bactérias degradadoras do petróleo e oito tipos de surfactantes) para acelerar a biodegradação dos hidrocarbonetos do petróleo. As amostras do solo contaminado foram coletadas em novembro de 1994 a partir de três locais no campo de petróleo de Burgan. O pH do solo foi determinado através da extração do solo com 2,5 volumes de água destilada e medido usando um potenciômetro digital do fabricante Toa Denpa, modelo HM-30S. A condutividade elétrica foi determinada pela extração do solo com 5 volumes de água destilada. O sobrenadante foi filtrado e a condutividade medida usando um medidor de condutividade. Os teores de Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} e K^+ foram determinados pela extração do solo com uma solução de acetato de amônio 2 M e medidos através de um espectrômetro de absorção atômica. As concentrações de Cl^- , SO_4^{2-} e NO_3^- solúveis foram determinados através da extração do solo com 5 volumes de água destilada e medidos por um cromatógrafo iônico. Os experimentos de biorremediação foram realizados usando uma mistura dos solos de três locais na razão de 1:1:1. Cada amostra do solo foi peneirada (< 5 mm) e misturadas rigorosamente antes do uso. Os solos com os materiais corretivos foram incubados em colunas de vidro com um volume de aproximadamente 5 litros ou em recipientes de vidro de 2 litros. Este experimento foi realizado para avaliar a influência do

esterco, diatomita ressecada, vidro microporoso, carvão vegetal e da mistura de bactérias degradadoras do petróleo na biorremediação. Ar foi fornecido a cada coluna, por meio de um compressor, a partir da sua base durante uma hora por dia a 3 litros por minuto. Água destilada a 15 % do total em peso da mistura do solo foi fornecida a cada coluna antes da incubação. Após a incubação, 50 mL de água destilada foi fornecida a cada semana à superfície da mistura de solo. O teor de umidade foi medido a cada três semanas e água destilada foi fornecida à amostra acima de 15 % do peso total e a mesma foi misturada rigorosamente com uma espátula. O teor de umidade foi determinado através da secagem a 60 °C durante 16 horas. A temperatura de incubação foi de 30 °C. Durante a incubação, 100 g das amostras do solo eram coletadas uma vez a cada duas ou três semanas durante os seis primeiros meses e uma vez a cada 5 ou nove semanas após seis meses. Antes da coleta das amostras, misturou-se o solo com uma espátula. As amostras foram armazenadas a -20 °C até a realização das análises. Os hidrocarbonetos foram extraídos com 150 mL de diclorometano a partir de aproximadamente 30 g das amostras de solo secas em um extrator soxhlet numa faixa de temperatura de 80-85 °C, por 14 horas, e foram concentrados através de um evaporador. Os teores de hidrocarbonetos totais extraíveis (HTE) foram determinados através da pesagem dos HTE. Um segundo experimento foi realizado para avaliar o efeito da adição dos surfactantes. Os oito tipos de surfactante, a 0,1 %, foram adicionados à mistura de solos contidas em seis colunas. Cada mistura do solo de 1 kg foi adicionada a um recipiente de 2 litros, água destilada foi fornecida a 15 % e a mistura foi incubada a 30 °C. O teor de umidade foi mantido a 15 % por meio da adição de um volume de água destilada apropriado, duas vezes por semana. O solo foi misturado com uma espátula uma vez por semana. Os teores de hidrocarbonetos totais extraíveis (HTE) foram determinados através da pesagem dos HTE. Os resultados mostraram que 15 a 33 % do óleo foi decomposto em 43 semanas de incubação. Entre os materiais testados, o carvão vegetal obtido a partir de coco aumentou a biodegradação. Por outro lado, a adição da mistura de bactérias degradadoras do petróleo impediu a biodegradação. Os efeitos dos outros materiais foram pequenos.

Margesin e Schinner (1997) estudaram a biorremediação de dois solos alpinos contaminados com óleo diesel em laboratório mediante experimentos em laboratório a 10 °C após suplementação com um fertilizante aniônico. A contaminação inicial de diesel foi de 4000 mg de óleo diesel por kg de solo seco, a qual foi reduzida para 380-400 mg/kg solo após 155 dias de incubação. Em ambos os solos, aproximadamente 30 % da contaminação (1200 mg/kg) foi eliminada por processos abióticos e 65 % da descontaminação residual foi atribuída à degradação microbiana.

Cravo Jr. (1998) estudou a biodegradação do querosene de aviação (QAV) usando dez culturas mistas, das quais quatro culturas foram obtidas de solos da “landfarming” da REDUC – RJ, uma cultura obtida dos solos do Campo de Estreito e Alto do Rodrigues no Rio Grande do Norte e duas culturas obtidas em praias contaminadas com óleo. Utilizou-se ainda uma cultura pura de *Pseudomonas aeruginosa* obtida da coleção de culturas ATCC 27853. Utilizou-se como meio de cultura um meio inorgânico adicionado de 10% de querosene de aviação. Os ensaios foram conduzidos em recipientes hermeticamente fechados, para evitar a evaporação do QAV, sob agitação de 150 rpm e temperatura controlada de 30 ± 1 °C. As perdas abióticas foram determinadas através de experimentos de controle nas mesmas condições dos ensaios de biodegradação, porém sem a adição de inóculo. O monitoramento da biodegradação foi realizado através da quantificação e identificação dos hidrocarbonetos por cromatografia gasosa e espectrometria de massas. Os resultados obtidos mostraram que, entre as culturas estudadas, uma das culturas obtidas em praias contaminadas com óleo apresentou a maior potencialidade de metabolização dos hidrocarbonetos atingindo entre 67 e 75 % de degradação.

Jørgensen, Puustinen e Sourti (2000) estudaram a biorremediação de solo contaminado com óleo lubrificante e óleo diesel através de compostagem em biopilhas em escala de campo (5x40 m³). Na compostagem do solo contaminado com óleo lubrificante foram usadas duas culturas mistas de inóculo disponíveis comercialmente, de nomes comerciais “PRC 107 DTX” e “Oilbac”. Cascas de batata foram usadas como agente volumante, e o efeito da adição de nutrientes (N, P, K) foi avaliado. A compostagem do solo contaminado com óleo diesel foi realizada com a adição de nutrientes e sem inóculo. Foi verificado que houve um declínio distinto nas concentrações do óleo mineral durante a compostagem. O solo contaminado com óleo lubrificante e óleo diesel foi peneirado em peneiras vibratórias de malha 65 mm, a fim de evitar que pedras e outros materiais brutos pudessem causar problemas durante a mistura, e em seguida foi empilhado juntamente com o agente volumante em pilhas de aproximadamente 1,5-1,7 m de altura e 3,5 m de largura. Cinco pilhas de 15-20 m de comprimento foram construídas com o solo contaminado. O solo contaminado com óleo diesel foi colocado primeiro em duas pilhas de 45 m de comprimento e, depois, combinadas em uma única após um mês de compostagem, devido a limitação de espaço no local. A temperatura ambiente durante o trabalho de preparação foi de 15-20 °C. Nas quatro pilhas contaminadas com óleo lubrificante foi adicionado aproximadamente 1 kg de fertilizante contendo 26 % de N, 3% de P, 3% de K, 1,5 % de S, 0,5 % de Mg, 0,03 % de B e 0,0006% de Se, por metro cúbico de matriz composta. Na pilha de controle não foi realizada

a adição de nutrientes. Em uma das pilhas (pilha 5) a dosagem inicial foi duas vezes maior que nas outras pilhas. Após 60 e 95 dias de mistura, metade da dosagem original foi aplicada à pilha 5. Tais nutrientes foram adicionados manualmente, no topo das pilhas, antes da mistura. A análise dos hidrocarbonetos presentes no solo foi realizada por cromatografia gasosa a partir de amostras de campo úmidas, secas quimicamente usando sulfato de sódio (Na_2SO_4) e extraídas usando-se um solvente não-polar. Os resultados mostraram que houve um declínio distinto nas concentrações do óleo mineral durante a compostagem. Dois terços do óleo mineral natural foi degradado. A intensidade máxima de degradação foi atingida durante os dois primeiros meses. Houve aproximadamente o mesmo padrão de degradação, ou seja, um modelo de primeira ordem, para os hidrocarbonetos presentes nos solos contaminados com óleo diesel e óleo lubrificante. Foi observado, ainda, que não houve efeito significativo de aumento na biodegradação devido ao tipo de inóculo usado, uma vez que a comunidade microbiana natural do solo é usualmente capaz de degradar hidrocarbonetos do petróleo, além do que muitas das bactérias degradadoras dos hidrocarbonetos do petróleo são encontradas no solo.

Márquez Rocha, Hernández-Rodríguez e Lamela (2001) estudaram a biodegradação do óleo diesel usando um consórcio microbiano, tanto em escala de laboratório como em escala piloto. A concentração do óleo diesel no solo tratado com o consórcio bacteriano foi reduzida a menos de 15 % da concentração inicial, dentro de um período de cinco semanas em ambas escala de laboratório (135 para 19,32 g de diesel/kg de solo seco) e em escala piloto (118 para 17,5 g de diesel/kg de solo seco). Nos experimentos sem adição do consórcio microbiano a redução na concentração de óleo diesel (testes de controle) foi respectivamente de apenas de 5 e 15 %. A taxa de biodegradação de óleo diesel com o consórcio microbiano foi de 2,13 g de diesel/kg de solo seco e foi ligeiramente aumentada pela adição de NH_4NO_3 na presença do consórcio microbiano.

Oliveira (2001) estudou a biodegradação de n-parafinas de C_{10} até C_{20} como função das relações Carbono:Nitrogênio (C:N) de 100:1, 100:2, 100:5 e 100:10 empregadas no processo de biorremediação de solo contaminado por óleo cru. Os experimentos foram conduzidos em reatores de cloreto de polivinila com dimensões de 0,32 m x 0,22 m x 0,12 m, preenchidos com 5,0 kg de solo arenoso contaminado com 70,0 g de óleo cru. Os resultados mostraram que em 56 dias ocorreu degradação total dos alcanos estudados e a melhor relação Carbono:Nitrogênio encontrada foi de 100:2.

Pala, Freire e Sant'Anna Jr. (2002) realizaram experimentos para avaliar a biodegradabilidade do petróleo presente num solo argiloso. Os experimentos foram realizados

utilizando reatores de lama e reatores de leito fixo. Nos reatores de lama avaliaram-se as variáveis teor de Nitrogênio, pH e massa de solo. Nos ensaios em reatores de leito fixo foram avaliados os efeitos das variáveis teor de Nitrogênio, pH e taxa de aeração. Com os resultados obtidos nos ensaios em leito fixo os autores realizaram um planejamento experimental 2^3 completo para avaliar a influência dos fatores estudados na eficiência de remoção de matéria orgânica. Os autores verificaram que o teor de Nitrogênio foi a variável que mais influenciou o processo de biodegradação e que a variável pH isoladamente não foi significativa. Nos reatores de lama, eficiência de até 45 % de remoção de matéria orgânica foi atingida em 13 dias de experimentos, nos reatores de leito fixo, por sua vez, atingiu-se eficiência de 80 % em 30 dias.

CAPÍTULO IV
MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Introdução

Neste capítulo são apresentados os métodos utilizados para avaliação preliminar da aplicação da tecnologia de biopilhas para biorremediação do solo de Guamaré/RN contaminado com óleo diesel comercial. Este capítulo está dividido em dois tópicos. No primeiro, são descritas as técnicas utilizadas para caracterização do solo. O segundo tópico apresenta o relato das metodologias empregadas nos ensaios de biodegradação em escala de laboratório. Neste trabalho não foi realizada a caracterização do óleo utilizado, porém os Anexos VII, VIII e XII, apresentam especificações padrões de um óleo diesel comercial.

4.2. Caracterização do solo

O solo utilizado nesta pesquisa foi obtido dos arredores da lagoa de estabilização de Guamaré/RN, fornecido pela PETROBRAS/RN. Foram obtidos cerca de 50 kg de solo, que foram acondicionados em sacos plásticos devidamente lacrados, introduzidos em latas de latão, as quais, por sua vez, foram acondicionadas em caixas de madeira devidamente fechadas.

4.2.1. Preparo da amostra

O preparo da amostra é uma etapa importante na realização de análises físicas e químicas. Para se ter uma amostra mais homogênea, a amostra bruta de solo foi inicialmente passada em peneira de 9 mesh e o material passante foi coletado e separado para realização de todos os ensaios de caracterização, bem como para todos os ensaios de biodegradação. Para se ter maior representatividade, as amostras foram sucessivamente alongadas em pilhas e reduzidas por quarteamento, retirando-se alíquotas para utilização nos ensaios.

4.2.2. Teor de umidade total

Os microrganismos requerem condições mínimas de umidade para seu crescimento. A água forma parte do protoplasma bacteriano e serve como meio de transporte através do qual os compostos orgânicos e nutrientes são mobilizados para o interior da célula (ARROYO & QUESADA, 2002).

A determinação do teor de umidade do solo foi realizada com a finalidade de avaliar se o mesmo se encontrava na faixa considerada efetiva para a biorremediação. Para isso, utilizou-se a metodologia descrita no Manual de Métodos de Análise de Solo (EMBRAPA, 1997). O teor de umidade foi obtido pela Equação (2):

$$\text{Umidade Total (\%)} = \left(\frac{m_{\text{solo úmido}} - m_{\text{soloseco}}}{m_{\text{solo úmido}}} \right) \times 100 \quad (2)$$

4.2.3. pH

O pH afeta significativamente a atividade microbiana. O crescimento da maior parte dos microrganismos é máximo dentro de um intervalo entre 6 e 8 (ARROYO & QUESADA, 2002). A determinação do pH foi realizada para verificar se o mesmo se encontrava neste intervalo ou se seria necessário realizar ajustes antes da biorremediação.

Para determinação do pH real do solo, colocaram-se em béquer de 100 mL, 23,5 g de solo pesado em balança analítica e com auxílio de proveta de capacidade 100 mL, adicionaram-se 80 mL de água. Agitou-se a amostra com bastão de vidro e deixou-se em repouso por uma hora. Decorrido este intervalo de tempo, agitou-se a amostra com bastão de vidro e mergulhou-se o eletrodo na suspensão homogeneizada procedendo-se a leitura do pH por meio de potenciômetro digital (marca DIGIMED). Para determinação do pH potencial seguiu-se esta mesma metodologia substituindo-se a água por uma solução de KCl 1 N, conforme descrito no Manual de Métodos de Análise de Solo (EMBRAPA, 1997).

4.2.4. Carbono orgânico e matéria orgânica

Os microrganismos requerem nutrientes para o seu crescimento. Os nutrientes necessários, em ordem decrescente, para o crescimento celular são: Nitrogênio, Fósforo, Potássio, Enxofre, Magnésio, Cálcio, Manganês, Ferro, Zinco, Cobre e elementos traços. Se os nutrientes não estão disponíveis em quantidade suficiente, a atividade microbiana ficará limitada (MESQUITA, 2004). A quantidade de nutrientes necessários geralmente depende da quantidade de Carbono disponível no solo.

No caso de Nitrogênio e Fósforo, a relação adequada C:N:P depende do sistema de tratamento a ser empregado, sendo de modo habitual 100:10:1 (ARROYO & QUESADA, 2002).

4.2.4.1 Método de Walkley e Black modificado

A determinação de carbono orgânico e matéria orgânica são importantes para a avaliação da relação Carbono:Nitrogênio:Fósforo durante a biorremediação. A caracterização do solo quanto ao Carbono orgânico e matéria orgânica foi realizada usando-se o método de Walkley e Black modificado descrito no Manual de Métodos de Análise de Solo (EMBRAPA, 1997), cujas etapas são relatadas a seguir.

Pesaram-se aproximadamente 20g de solo, trituraram-se em gral e em seguida passaram-se em peneira de 100 mesh. Do solo triturado, colocou-se 0,5 g em Erlenmeyer de 250 mL. Adicionaram-se 10 mL de solução de dicromato de potássio 0,4 N. Colocou-se um condensador de refluxo na boca do Erlenmeyer. 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 N até a mudança da cor azul para a cor verde e anotou-se o volume gasto. Incluiu-se um branco com 10 mL da solução de dicromato de potássio. A quantidade de carbono orgânico total foi determinada segundo a Equação (3):

$$C \text{ (g/kg)} = (40 - \text{volume gasto}) \times f \times 0,6 \quad (3)$$

Em que:

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

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

4.2.5. Nitrogênio total

O teor de Nitrogênio no solo foi determinado com o objetivo de se avaliar a necessidade de adição deste nutriente ao solo. A técnica utilizada foi o método Kjeldhal por destilação a vapor descrito no Manual de Métodos de Análise de Solo (EMBRAPA, 1997), cujas etapas são relatadas logo em seguida.

Pesou-se 0,7 g de solo e colocou-se em balão Kjeldhal de 100 mL, pesado com aproximação de 0,001 g. Adicionaram-se 15 mL de mistura ácida de sulfatos de sódio e cobre e procedeu-se a digestão fervendo-se o conteúdo até completa destruição da matéria orgânica. Deixou-se esfriar e adicionaram-se 25 mL de água, agitando para homogeneizar, e em seguida, adicionaram-se duas gotas de solução “xaroposa” de cloreto férrico. Uma solução de NaOH a 30 % foi adicionada gradativamente até que a solução apresentasse coloração castanho claro e deixou-se esfriar e, em seguida, adicionou-se água até se obter o peso do balão mais 60,35 g, misturando-se bem a solução. Transferiram-se 10 mL da solução para microdestilador Kjeldhal. Paralelamente, colocaram-se em Erlenmeyer de 125 mL, 25 mL de ácido bórico a 4 % e cinco gotas do indicador misto (verde de bromocresol + vermelho de metila). Inseriu-se a extremidade livre do destilador na solução, tendo-se o cuidado de mantê-la sempre imersa até o final da destilação. Adicionaram-se à solução parcialmente neutralizada 2 mL de NaOH 30 % e procedeu-se a destilação da amônia, a vapor, durante cinco minutos. Titulou-se o volume destilado, depois de frio, com solução padronizada de HCl 0,01 N, até mudança da cor roxa ou azulada para cor rósea. O teor de Nitrogênio no solo foi determinado através da Equação (4):

$$N \text{ (g/kg)} = V_a - V_b \quad (4)$$

4.2.6. Fósforo total

O teor de Fósforo no solo foi determinado com o objetivo de se avaliar a necessidade de adição deste nutriente ao solo. A técnica utilizada foi o método do Fósforo no extrato sulfúrico descrito no Manual de Métodos de Análise de Solo (EMBRAPA, 1997), cujas etapas são relatadas logo em seguida.

Preparou-se o extrato sulfúrico colocando-se 1 g de solo em Erlenmeyer de 500 mL e adicionando-se 20 mL de ácido sulfúrico diluído 1:1 e fervendo-se durante meia hora, usando-se condensador de refluxo para evitar a evaporação. Deixou-se esfriar, adicionaram-se 50 mL de água e filtrou-se para balão de 250 mL, lavando-se o resíduo com água até completar o volume.

Pipetaram-se 10 mL do extrato sulfúrico para balão de 50 mL. Adicionaram-se 10 mL de solução de molibdato de amônio. Adicionou-se água até aproximadamente 35 mL e uma pitada de ácido ascórbico. Agitou-se até completa dissolução do ácido ascórbico e completou-se o volume. Determinou-se a leitura do Fósforo em espectrofotômetro de absorção molecular a 660 nm utilizando-se padrões de 0,1; 0,3 e 0,5 ppm de P_2O_5 (EMBRAPA, 1997).

4.2.7. Densidade do solo

A análise da densidade do solo em estudo foi realizada com a finalidade de se avaliar a necessidade da realização da redução do tamanho de partícula, uma vez que solos muito densos dificultam a aeração e o transporte de nutrientes durante a biorremediação. A técnica utilizada para determinação da densidade do solo foi a picnometria, relatada em seguida.

Determinou-se com precisão o volume do picnômetro. Colocou-se cuidadosamente no seu interior cerca de 3 g do material sólido, determinando-se sua massa com precisão. Colocou-se água até cerca da metade do volume do picnômetro e mergulhando-o em um béquer contendo água destilada em ebulição removendo-se, assim, as bolhas de ar que ficaram aderidas à superfície do sólido. Esfriou-se o picnômetro mergulhando-o em um béquer com água à temperatura ambiente durante 10 min e trocando-se a água do béquer algumas vezes. Retirou-se o picnômetro do béquer, completou-se o seu volume com água destilada, e secou-se a sua superfície. Pesou-se o picnômetro contendo a água e o sólido e determinou-se a

massa de água por diferença. O volume de água foi determinado dividindo-se a sua massa por sua densidade. O volume de sólido foi determinado como a diferença entre o volume do picnômetro e o volume da água. Determinou-se a densidade do sólido dividindo-se a sua massa pelo seu volume (SILVA, 2002).

4.2.8. Granulometria

A granulometria do solo foi determinada com a finalidade de identificar o tipo de solo, se argiloso ou arenoso, e verificar a necessidade de adição de materiais tais como a gipsita e materiais volumantes (serragem ou palha) para assegurar que o meio tenha uma quebra ou divisão na textura.

A distribuição granulométrica do solo, assim como o diâmetro médio de partícula foram determinados no Laboratório de Tecnologia dos Materiais do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, utilizando-se um Granulômetro a Laser modelo 1180L do fabricante Cilas, tendo sido usado o programa The Particle Expert, com água como meio de dispersão. O perfil granulométrico do solo é mostrado no Anexo III.

A classificação do solo foi feita seguindo-se a norma ABNT NBR 7181.

4.2.9. Condutividade elétrica

A condutividade elétrica foi determinada para se obter uma estimativa da salinidade do solo, uma vez que o metabolismo microbiano pode ser afetado pela presença de altas concentrações de sais solúveis no solo. As etapas de determinação da condutividade elétrica do solo são descritas logo em seguida.

Em béquer de plástico de 400 mL adicionaram-se 200 g de solo e em seguida 25 mL de água. Amassou-se a amostra com espátula de aço inoxidável e continuou-se a adição de água, pouco a pouco, por meio de bureta. Deu-se como concluída esta operação quando a massa do solo apresentou aspecto brilhante. Anotou-se a quantidade de água utilizada e deixou-se a amostra em repouso durante 4 horas. Decorrido esse tempo, verificou-se que a massa do solo apresentava saturação de água, portanto não se adicionou mais água ou solo à

amostra. Filtrou-se a amostra a vácuo (EMBRAPA,1997). Realizou-se a leitura do filtrado em condutivímetro digital da marca DIGIMED.

4.2.10. Acidez do solo

A acidez do solo foi determinada para se confirmar o resultado do pH do solo. Foi utilizada a técnica da acidez trocável – método do KCl descrita no Manual de Métodos de Análise de Solo (EMBRAPA, 1997), cujas etapas são relatadas logo em seguida.

Em Erlenmeyer de 125 mL colocaram-se 10 g de solo e adicionaram-se 50 mL de KCl 1N. Agitou-se e deixou-se em repouso durante 30 minutos. Filtrou-se em papel de filtro Whatman nº 42, adicionando-se duas porções de 10 mL de KCl 1N. Em seguida, adicionaram-se ao filtrado 6 gotas de fenolftaleína a 0,1 % e titulou-se com NaOH 0,1 N até o aparecimento da cor rosa. A acidez trocável foi determinada usando-se a Equação (5):

$$\text{Acidez trocável (cmol/kg)} = \left(\frac{V \times N \times 100}{P} \right) \quad (5)$$

4.2.11. Contagem microbiana

A contagem microbiana foi realizada a fim de avaliar a presença e a densidade de bactérias heterotróficas que ocorrem naturalmente no solo de Guimarães e que poderiam contribuir para a degradação do óleo.

4.2.11.1. Bactérias heterotróficas totais

A densidade de população microbiana em solos típicos varia de 10^4 a 10^7 UFC/grama de solo. Para que as biopilhas sejam efetivas a contagem de placas heterotróficas mínima deve ser de 10^3 UFC/grama de solo (EPA, 1994). A análise microbiana foi realizada com a finalidade de avaliar se o solo em estudo apresentava densidade microbiana suficiente para a biodegradação natural ou se havia a necessidade de inoculação durante a biorremediação.

A avaliação da densidade total de bactérias heterotróficas totais foi feita pela técnica “pour plate”. Uma amostra inicial de solo foi adicionada a 100 mL de uma solução salina (0,85% NaCl) e colocada sob agitação em “shaker” a 200 rpm e 30°C por 30 minutos para a extração das bactérias presentes. Em seguida, com o sobrenadante foram preparadas diluições em solução salina (0,85% NaCl) variando de 10^{-1} a 10^{-7} e, a partir de cada diluição, alíquotas de 1 mL foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura TSA (Tryptic Soy Agar). Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 30°C durante 48 horas e após este período, as colônias foram contadas e os resultados expressos em UFC (unidade formadora de colônia)/g de solo. A Tabela 12 mostra a composição do meio TSA utilizado.

Tabela 12. Composição do meio “Tryptic Soy Agar”.

Reagente	Conc. (g/L)
Hidrolisado enzimático de caseína	5,0
Extrato de levedura	2,5
Dextrose	1,0
Agar	9,0

4.3. Ensaio de biodegradação em escala de laboratório

Uma vez caracterizada as amostras de solo, foram realizados estudos de bancada para avaliar a efetividade da biodegradação, como sugerido pela EPA (1994).

4.3.1. Preparo do inóculo

4.3.1.1. Microrganismo

Utilizou-se neste trabalho a cepa AP-O29/GLVIIA (microrganismo produtor de biosurfactante – MIPB) isolada de poços de petróleo da PETROBRAS na zona AÇU100,

Mossoró-RN, pertencente à UN-RNCE e mantido pela coleção de culturas do Departamento de Antibiótico da Universidade Federal de Pernambuco.

4.3.1.2. Meios de cultivo

Para os preparos dos meios de cultivo foram usados:

- Extrato de levedura;
- Agar-agar;
- Óleo Diesel Comercial (Posto Ponta Negra – Natal/RN);
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
- EDTA;
- MnSO_4 ;
- FeSO_4 ;
- CaCl_2 ;
- CoCl_2 ;
- ZnSO_4 .

Usou-se também o meio formulado Agar de Contagem Padrão (PCA), para a manutenção das culturas.

4.3.1.3. Manutenção da cultura

A cultura era mantida em tubos de ensaio contendo meio sólido inclinado composto por PCA e 25% de Agar-Agar. A renovação das células era feita periodicamente através de repique das células no meio A (ANEXO II) seguido de incubação em estufa à 38 °C durante 48 horas. Após esta incubação a cultura era estocada em geladeira a 5 °C (LOBATO, 2003). A metodologia de repique das células é descrita em maiores detalhes no ANEXO I.

4.3.1.4. Adaptação do MIPB ao óleo diesel como fonte de Carbono

Está bem estabelecido que a etapa de adaptação contribui significativamente no bom desempenho de comunidades microbianas em degradar hidrocarbonetos, sendo esta etapa de suma importância nos processos de biodegradação (CRAVO JR., 1998).

Nesse sentido, realizou-se a adaptação do microrganismo ao óleo diesel com o intuito de verificar a capacidade de utilização do óleo diesel como fonte de Carbono pelo MIPB. A metodologia de adaptação à fonte de Carbono está descrita nos próximos parágrafos.

Foram utilizados frascos Erlenmeyer com capacidade para 500 mL, contendo 150 mL do meio de cultura (Meio A, ANEXO II) com diferentes concentrações de óleo diesel, conforme mostrado na Tabela 13. Os frascos eram lacrados com rodilhões de algodão e gazes e eram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Após a esterilização, deixava-se atingir a temperatura ambiente. Posteriormente, os frascos contendo o meio de cultura eram levados à câmara de fluxo laminar, onde alçadas de células oriundas do meio de manutenção eram transferidas asepticamente para os mesmos. Os frascos eram colocados em “shaker” a 38 °C, por 24 horas, sob agitação de 250 rpm (LOBATO, 2003).

A partir desses ensaios e por meio de inspeção visual, analisando-se a maior turbidez do líquido nos frascos, escolheu-se a concentração de óleo diesel para determinação da concentração celular. Esta concentração foi quantificada através da determinação da concentração celular – massa seca, conforme descrito no item 4.3.1.5.

Tabela 13. Concentração de óleo diesel nos ensaios de adaptação do MIPB ao óleo diesel.

Ensaio	Meio para preparo do inóculo	Agitação (rpm)	Temp. (°C)
1	Meio A + 1% Óleo diesel	250	38
2	Meio A + 2% Óleo diesel	250	38
3	Meio A + 3% Óleo diesel	250	38
4	Meio A + 4% Óleo diesel	250	38
5	Meio A + 5% Óleo diesel	250	38

4.3.1.5. Determinação da concentração celular por massa seca

A partir dos experimentos de adaptação do MIPB ao óleo diesel, verificou-se visualmente que o ensaio 5 foi o que apresentou melhor crescimento do microrganismo. Portanto, realizaram-se dois ensaios nestas condições para medir a concentração celular ao final de 24 horas de cultivo.

Na determinação da concentração celular por massa seca, após 24 horas de incubação, retiravam-se alíquotas de 2 mL das amostras e realizava-se a sua centrifugação e lavagem. Após a segunda lavagem, as amostras eram colocadas em estufa a 105 °C por 24 horas e eram pesadas periodicamente até se obter peso constante (massa seca).

A concentração celular de uma amostra para uma determinada temperatura e certas condições de ensaio é determinada pela Equação (6):

$$C_{celular} = \frac{m_{seca}}{2mL} \quad (6)$$

A condição de preparo do inóculo para os ensaios de biodegradação com inoculação foi a mesma adotada para o ensaio 5.

4.3.2. Ensaio de biodegradação utilizando frascos Erlenmeyer

Estudos em frascos são simples e baratos para testar a biodegradação em águas e solos usando microcosmos de solo/água (EPA, 1994).

Foram feitos ensaios utilizando a flora microbiana presente no próprio solo, bem como ensaios utilizando os produtores de biosurfactantes AP-O29/GLVIIA disponíveis no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Em todos os ensaios de biodegradação em frascos Erlenmeyer as perdas abióticas foram medidas através de experimentos nas mesmas condições dos ensaios de biodegradação, porém com as amostras de solo esterilizadas mediante a adição de solução de azida de sódio 2%. A umidade do solo foi ajustada periodicamente de modo que o seu teor ficasse entre 40–80 % da capacidade de retenção de umidade e a aeração foi fornecida pela agitação em “shaker” rotacional a 200 rpm e temperatura controlada de 35 °C.

O monitoramento da biodegradabilidade dos hidrocarbonetos foi realizado determinando-se a eficiência de remoção de matéria orgânica após 45 dias de incubação. A matéria orgânica foi determinada pelo método de Walkley e Black modificado descrito no item 6.2.4.1. A eficiência de remoção de matéria orgânica foi determinada através da Equação (7):

$$RMO (\%) = \frac{(MO_i - MO_f)}{MO_i} \times 100 \quad (7)$$

4.3.2.1. Ensaios em frascos sem adição de nutrientes e inóculo

Os ensaios de biodegradação sem adição de nutrientes e inóculo foram realizados para medir a velocidade com que as bactérias existentes podiam degradar os constituintes do óleo diesel sob condições naturais. Para isso, foram conduzidos experimentos em frascos Erlenmeyer de 500 mL preenchidos com 50 g solo contaminado com óleo diesel na razão de 14 g óleo/kg de solo e de 31 g de óleo/kg de solo e 100 g de solo contaminado com óleo diesel na razão de 15,5g de óleo/kg de solo, respectivamente.

4.3.2.2. Ensaios em frascos com adição de inóculo

Os ensaios de biodegradação utilizando inoculação foram realizados para observar o efeito da adição de microrganismos na biodegradação dos hidrocarbonetos presentes no solo. Para isso, foram conduzidos experimentos em frascos Erlenmeyer de 500 mL preenchidos com 50 g de solo contaminado com óleo diesel nas razões de 20g de óleo/kg de solo e 40 g de óleo/kg de solo. A inoculação foi realizada através da adição de uma suspensão líquida de concentração 146 mg de biomassa/mL contendo os microrganismos produtores de biosurfactantes e nutrientes e sais minerais residuais do meio A (Anexo II), remanescentes do cultivo do MIPB após 24 horas conforme descrito nos itens 4.3.1.4 e 4.3.1.5.

4.3.3. Ensaio de biodegradação utilizando bandejas de alumínio

Estudos em recipientes usam solos em um “slurry” aquoso, colocados em recipientes de metal, vidro ou plástico que se aproximam de biopilhas (EPA, 1994).

Os ensaios de biodegradação utilizando bandejas de alumínio foram realizados com a finalidade de verificar a influência da concentração de óleo, concentração de Nitrogênio e concentração de inóculo na biodegradação do óleo diesel presente no solo.

Os experimentos foram conduzidos em recipientes de alumínio revestidos com teflon para evitar a adsorção do solo às suas paredes. A estes recipientes chamaremos “reatores”.

A cada reator foi adicionado 500 g de solo pesado em balança da marca TOLEDO, modelo 9094-I. A concentração de óleo em cada reator é mostrada na Tabela 14.

Tabela 14. Concentração de óleo nos reatores

Reator	Conc. Óleo (mL/kg solo)
1	40
2	40
3	40
4	40
5	20
6	20
7	20
8	20
9	30
10	30
11	30
12	40
13	20
14	30

Para que os hidrocarbonetos mais voláteis pudessem evaporar, os reatores permaneceram por quinze dias sem que fosse adicionada água, inóculo nem tampouco Nitrogênio, sendo feito o revolvimento do solo diariamente para aumentar a taxa de evaporação desses constituintes. Passado esse período, foram feitas a adição de umidade, inóculo e Nitrogênio e iniciou-se o monitoramento da biodegradação dos hidrocarbonetos presentes no solo.

Os valores de umidade nos reatores foram mantidos numa faixa em relação à saturação de 40 a 80 %, considerando-se que esta faixa é reconhecidamente eficaz para biorremediação de solos usando-se biopilhas.

O monitoramento da biodegradabilidade dos hidrocarbonetos foi realizado determinando-se a eficiência de remoção de matéria orgânica após 60 dias de incubação.

Foi realizada a adição dos volumes máximo da suspensão de microrganismos e da solução de nitrato de amônio de modo que a soma desses volumes ficassem em torno de 80 % da capacidade de retenção de água. Nos reatores em que a adição de inóculo e de Nitrogênio não atingiram 80 % da capacidade de campo, adicionou-se água até atingir-se aproximadamente este valor.

As adições de óleo diesel, inóculo e Nitrogênio foram realizadas apenas no início dos experimentos. A adição de umidade foi feita periodicamente de acordo com as perdas sofridas com a evaporação e de modo que o teor de umidade ficasse entre 40 e 85 % da capacidade de campo do solo.

Nos experimentos de controle, a adição da solução de azida de sódio também foi feita periodicamente levando-se em conta a evaporação ocorrida e de modo que o teor de umidade ficasse entre 40 e 85 % da capacidade de retenção de água.

A aeração nos reatores foi feita por meio do revolvimento do solo com espátula de plástico individual.

4.3.3.1. Monitoramento da biodegradação nos ensaios em bandejas

A eficiência de remoção de matéria orgânica foi determinada através da Equação (5) descrita no item 5.3.1:

A matéria orgânica foi determinada conforme o método da incineração em mufla cujas etapas são descritas em seguida.

Pesou-se uma certa quantidade de solo em cadinho de porcelana devidamente tarado. Colocou-se em estufa a 105 °C durante duas horas. Passado esse tempo, realizou-se o resfriamento da amostra em dessecador e em seguida pesou-se o conjunto cadinho-solo com precisão de $\pm 0,0001$ g. Colocou-se o conjunto em mufla, ajustou-se a sua temperatura para 400 °C. Atingida esta temperatura, deixou-se o conjunto por oito horas. Passado esse tempo, desligou-se a mufla e esperou-se o esfriamento da amostra até 105 °C. Retirou-se a amostra,

esperou-se o seu esfriamento em dessecador e pesou-se o conjunto com precisão de $\pm 0,0001$ g (SCHULTE, 1995). O percentual de matéria orgânica foi calculado conforme a Equação (8):

$$\%MO = \left[\frac{(m_{\text{cadinho+ solo}}^{105} - m_{\text{cadinho}}) - (m_{\text{cadinho+ solo}}^{400} - m_{\text{cadinho}})}{(m_{\text{cadinho+ solo}}^{105} - m_{\text{cadinho}})} \right] \times 100 \quad (8)$$

4.4. Planejamento experimental

Um dos problemas mais comuns para quem realiza experimentos é determinar a influência de uma ou mais variáveis sobre uma outra variável de interesse (LOBATO, 2003). Este problema pode ser minimizado utilizando-se um planejamento experimental de modo a se obter uma função, ou uma aproximação satisfatória para ela, de forma que se operando sobre as variáveis de entrada produza-se como saída a resposta ou as respostas observadas.

Em um planejamento, inicialmente, devem-se definir os fatores e as respostas de interesse. Tendo-se identificado os fatores e respostas define-se o objetivo que se pretende alcançar com os experimentos para que se possa escolher o planejamento mais apropriado.

No presente trabalho os fatores estudados foram a concentração de óleo diesel no solo, a concentração de inóculo e a concentração de Nitrogênio. A variável de resposta utilizada foi a porcentagem de biodegradação da matéria orgânica. Portanto, escolheu-se um planejamento fatorial 2^3 com ponto central.

Para compor o planejamento, trabalhou-se com as seguintes variáveis:

(1) Concentração de Nitrogênio. Adicionou-se uma solução de nitrato de amônio (NH_4NO_3) 28 g de N /L. O volume máximo dessa solução foi escolhido tomando-se como referência a capacidade de retenção de umidade do solo;

(2) Concentração de inóculo. Adicionou-se uma suspensão líquida de microrganismos produtores de biosurfactantes. O volume máximo da suspensão foi escolhido tomando-se como base a capacidade de retenção de umidade do solo;

(3) Concentração de óleo diesel no solo. Concentrações escolhidas baseadas nos ensaios em frascos Erlenmeyer conforme mostrado na Tabela 14.

A temperatura ambiente e do solo, bem como a umidade do solo, não foram tomadas como variáveis de entrada no planejamento experimental, devido ser impossível manter tais parâmetros constante em campo. Por isto, executou-se a pesquisa em sala não termostalizada, visando obter resultados o mais próximo possível das condições de campo (OLIVEIRA, 2001). A umidade do solo também não foi computada como uma variável de entrada no planejamento experimental pela mesma razão.

A Tabela 15 apresenta a matriz de planejamento com os fatores na forma real. Ao todo foram realizados quatorze experimentos, sendo três deles repetições no ponto central e três experimentos de controle das perdas abióticas.

A porcentagem de biodegradação foi determinada pela porcentagem de perda de matéria orgânica nos experimentos de 1 a 11, descontadas as perdas abióticas respectivas para cada nível de óleo verificadas nos experimentos 12 a 14.

Tabela 15. Matriz de planejamento com os fatores na forma real.

Experimentos	Conc. Inóculo (mg /kg solo)¹	Conc. Nitrogênio (g/kg solo)	Conc. Óleo (mL/kg solo)
1	292	2,8	40
2	292	1,4	40
3	584	2,8	40
4	584	1,4	40
5	292	2,8	20
6	292	1,4	20
7	584	2,8	20
8	584	1,4	20
9	438	2,1	30
10	438	2,1	30
11	438	2,1	30
12		Perdas Abióticas	
13		Perdas Abióticas	
14		Perdas Abióticas	

¹Quantidade de biomassa por quilograma de solo.

CAPÍTULO V
RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Características do solo de Guamaré/RN

Os parâmetros determinados na caracterização física, química e microbiológica do solo de Guamaré/RN foram pH, umidade, capacidade de retenção de água, granulometria, Carbono orgânico e matéria orgânica, Nitrogênio, Fósforo, condutividade elétrica, acidez e quantidade de bactérias heterotróficas. Estes parâmetros foram avaliados para determinar se os mesmos se encontravam na faixa em que a biodegradação dos hidrocarbonetos adsorvidos no solo é efetiva. Os resultados obtidos na caracterização física, química e microbiológica do solo de Guamaré/RN são mostrados nas Tabelas 16 a 20.

Conforme mostra a Tabela 16, o solo apresentou um diâmetro médio de partícula considerado satisfatório para assegurar que a adição de oxigênio, por injeção ou extração de ar, possa ser mantida na faixa de efetividade. Em solos de partículas consideradas de grande dimensão, estes necessitariam de uma quebra de suas partículas ou de outro meio de pré-tratamento. Em relação à textura do solo, os resultados evidenciaram um maior teor de areia fina e areia média, superior a 80 % do teor total, o que confirma que o solo é de aspecto arenoso. Isto possibilita uma distribuição uniforme dos nutrientes, diferentemente de solos com um maior teor de argila (solo argiloso), que tendem a se aglomerar, afetando negativamente a permeabilidade do solo e a distribuição uniforme dos nutrientes. A densidade do solo também foi considerada satisfatória, pois solos muito densos dificultam os processos de aeração (EPA, 1994).

Tabela 16. Granulometria e densidade do solo de Guamaré/RN.

Parâmetro	Resultado	Unidade
Densidade bulk	2,35	g/cm ³
Diâmetro médio de partícula	639,31	µm
Composição do solo		
Argila	3,53	%
Silte	10,19	%
Areia fina	35,62	%
Areia média	45,89	%
Areia grossa	4,77	%

Para suportar o crescimento bacteriano, estudos mostram que o pH do solo deve estar na faixa entre 6 e 8, com um valor ótimo de aproximadamente 7 (EPA,1994). Portanto, tanto o pH real quanto o pH potencial do solo em estudo se encontram na faixa em que a biodegradação de hidrocarbonetos adsorvidos no solo é efetiva, conforme mostrado na Tabela 17. A condutividade elétrica mede o teor de salinidade do solo, portanto o resultado obtido foi considerado excelente, pois um alto teor salino prejudica o metabolismo dos microrganismos presentes no solo. A determinação do teor de acidez do solo foi feita para se confirmar o resultado do pH, já que o pH do solo caracterizado é considerado básico, era de se esperar que o teor acidez do mesmo fosse baixo, como mostra o resultado obtido na Tabela 17.

Tabela 17. pH, condutividade e acidez do solo de Guamaré/RN.

Parâmetro	Resultado	Unidade
pH real	7,99	-
pH potencial	6,76	-
Condutividade Elétrica	4,02	mS/cm
Acidez	0,505	cmol/kg

Os microrganismos do solo requerem certas condições de umidade para atingir um crescimento adequado, contudo excessiva umidade restringe o movimento de ar através da subsuperfície do solo, reduzindo a disponibilidade de oxigênio, o qual é indispensável para processos aeróbicos. Em geral o solo deve ser úmido, mas não molhado. Estudos mostram que a faixa ideal de efetividade para a umidade do solo deve ser de 40 a 85% da sua capacidade de campo (capacidade de retenção de água) (EPA, 1994). Portanto, como mostra a Tabela 18, a umidade não se encontra nesta faixa, o que já era de se esperar devido à pouca incidência de precipitação nesta região. Porém, este parâmetro pode ser controlado facilmente, através da adição de umidade.

Tabela 18. Umidade e capacidade de campo do solo de Guamaré/RN.

Parâmetro	Resultado	Unidade
Umidade	2,1	%
Capacidade de Retenção de Água	27,33	%

Os microrganismos requerem nutrientes tais como: Carbono, Nitrogênio e Fósforo, para seu crescimento celular e para manter os processos de biodegradação. Estes nutrientes podem estar disponíveis no local, porém frequentemente estes nutrientes precisam ser adicionados, para se manter a população microbiana. Contudo quantidades excessivas destes nutrientes podem reprimir o metabolismo microbiano. A relação típica de Carbono, Nitrogênio e Fósforo necessária para a biodegradação encontra-se na faixa de 100:10:1 ou 100:1:0,5 (EPA, 1994). Contudo, como visto na Tabela 19, os resultados da caracterização do solo de Guamaré mostram que as quantidades de nutrientes não se encontram na faixa efetiva.

Tabela 19. Quantidade de nutrientes no solo de Guamaré/RN.

Parâmetro	Resultado	Unidade
Carbono Orgânico	4,32	g/kg
Matéria Orgânica	7,45	g/kg
Nitrogênio	0,6	g/kg
Fósforo	0,025	ppm

Para que as biopilhas sejam efetivas, a contagem de placas heterotróficas mínima deve ser de 10^3 UFC/g de solo (EPA, 1994). A Tabela 20 mostra que a densidade populacional microbiana do solo selecionado de Guamaré/RN é satisfatória para a degradação natural dos hidrocarbonetos, visto que a quantidade de bactérias heterotróficas é superior a 10^3 UFC/g de solo.

Tabela 20. Quantidade de bactérias heterotróficas no solo de Guamaré/RN.

Parâmetro	Resultado	Unidade
Bactérias Heterotróficas	1×10^6	UFC/g de solo

5.2. Biodegradação em frascos

A Figura 4 mostra os resultados obtidos nos ensaios de biodegradação da matéria orgânica em frascos.

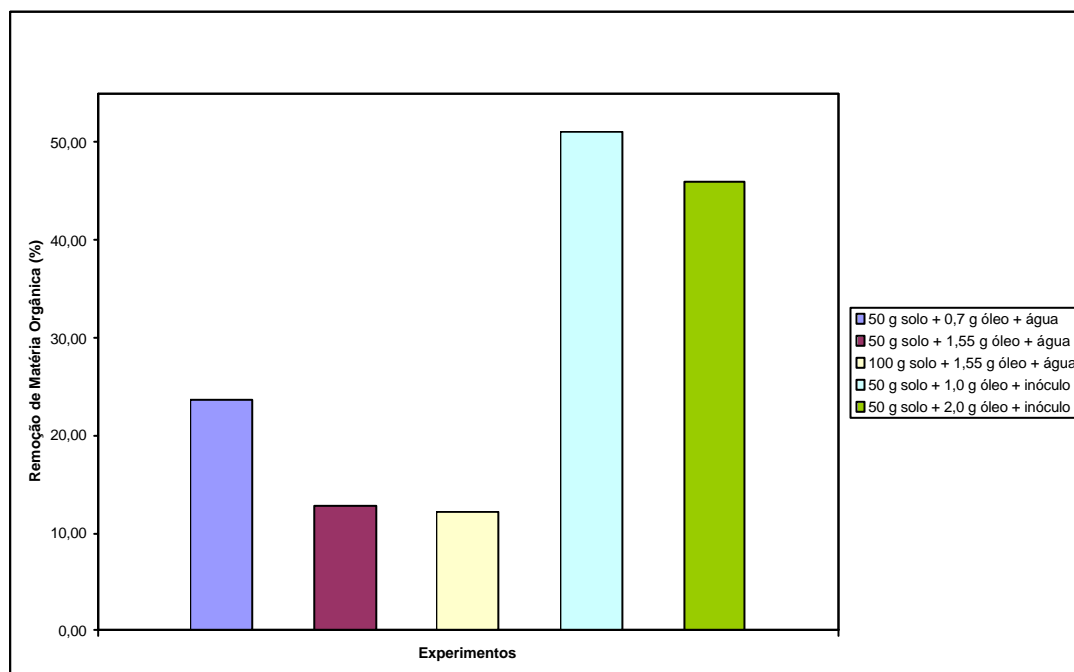


Figura 4. Biodegradação da matéria orgânica nos ensaios em frascos.

Nota-se que a utilização do inóculo provocou um aumento na biodegradação dos hidrocarbonetos, uma vez que a eficiência de remoção de matéria orgânica nos ensaios de biodegradação com inoculação foi superior em mais de duas vezes à eficiência de remoção de matéria orgânica obtida nos testes sem inoculação. Pode-se observar ainda que quando houve um aumento na concentração de óleo diesel no solo para uma mesma massa de solo (0,7 g óleo para 1,55g óleo em 50 g de solo) houve uma diminuição na eficiência de remoção de matéria orgânica. Os ensaios em frascos mostraram ainda que um aumento na massa de solo (50g para 100g de solo) mantendo-se aproximadamente a mesma concentração de óleo (0,7 g óleo/50 g de solo e 1,55g óleo/100g de solo) também provocou uma diminuição na eficiência de remoção de matéria orgânica. Isto possivelmente deve ter ocorrido porque o aumento na massa de solo dificultou a distribuição da aeração nos frascos com maior massa de solo.

Nos ensaios com adição de inóculo um aumento na massa de óleo para uma mesma massa de solo não provocou uma alteração significativa na eficiência de remoção de matéria orgânica.

Pôde-se verificar também que a utilização de microrganismos produtores de biosurfactantes é satisfatória para a biorremediação de solo contaminado com óleo diesel, uma vez que em apenas quarenta e cinco dias houve uma redução de mais de cinquenta por cento da matéria orgânica do solo.

5.3. Biodegradação em bandejas

Para ilustrar a eficiência obtida na biorremediação do solo de Guamaré, a Figura 5 mostra os reatores 1-4 e o reator 13 de controle, que correspondem ao óleo em seu nível baixo, após 60 dias de tratamento. Os reatores 5-8 e 9-11, bem como os respectivos reatores de controle, 12 e 14, são mostrados no Anexo IV.



Figura 5. Reatores 1-4 e reator de controle 13, após 60 dias de tratamento.

Percebe-se que a clarificação do solo nos reatores 1-4, em relação ao reator 13 de controle, é devida à degradação do óleo diesel.

A Figura 6 mostra os resultados da taxa de biodegradação após 60 dias obtidos nos ensaios de biodegradação da matéria orgânica em bandejas de alumínio.

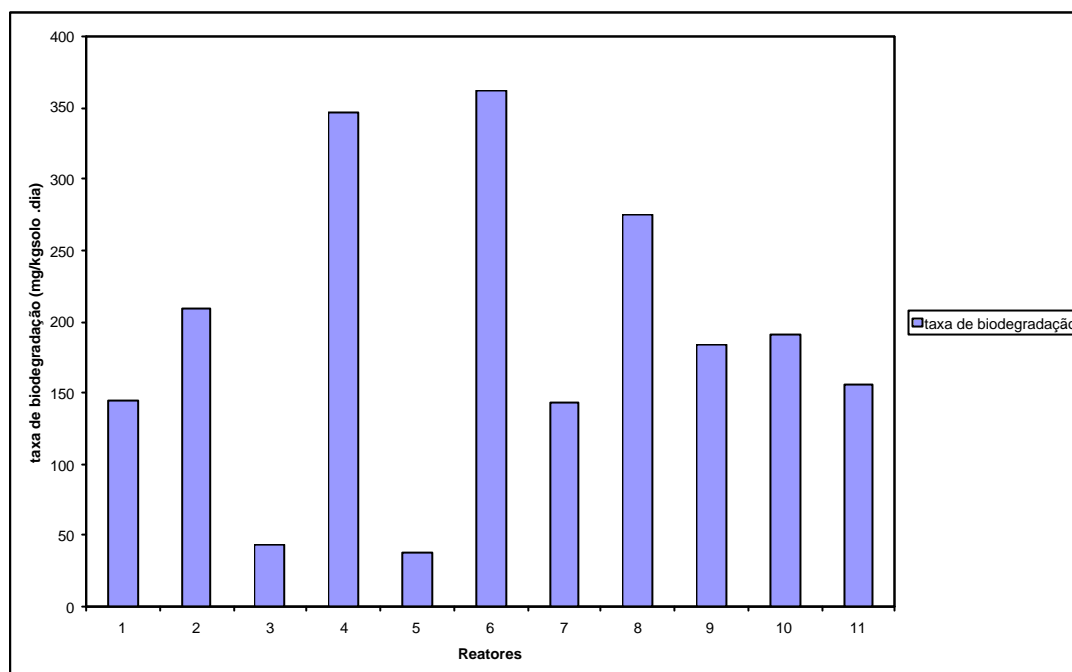


Figura 6. Biodegradação nos ensaios em bandejas de alumínio.

Analisando-se a Figura 6 percebe-se que os reatores 4, e 6 apresentaram as maiores taxas de biodegradação de matéria orgânica, de 347,3 e 361,9 mg (kg solo.dia)⁻¹, respectivamente. O ensaio 4 corresponde aos valores das variáveis concentração de óleo e concentração de inóculo em seus níveis altos e concentração de Nitrogênio em seu nível baixo e o ensaio 6 corresponde a todas as variáveis em seu nível baixo.

Os reatores 3 e 5, por sua vez foram os que apresentaram menores taxas de biodegradação de matéria orgânica, de 43,2 e 38,3 mg (kg solo.dia)⁻¹, respectivamente. O ensaio 3 corresponde a valores de todas variáveis seus níveis altos e o ensaio 5 corresponde aos valores das variáveis concentração de óleo e concentração de Nitrogênio em seus níveis baixos e concentração de inóculo em seu nível alto.

5.3.1. Contagem bacteriana

Podemos ver na Tabela 21 que a quantidade de bactérias heterotróficas nos reatores do planejamento experimental, após 60 dias de experimentos, é superior a 10^3 , quantidade limitante para que o uso de biopilhas seja efetivo (EPA, 1994), mostrando que ainda seria possível com o decorrer do tempo obter eficiências de biodegradação ainda maiores do que as obtidas neste estudo. A presença de bactérias heterotróficas nos reatores de controle pode ser justificada por contaminação com bactérias heterotróficas presentes no ar, uma vez que os reatores eram dispostos em uma sala com grande ventilação sem nenhuma capa protetora para evitar o contato desses reatores com o ar.

Tabela 21. Quantidade de bactérias heterotróficas após 60 dias nos experimentos do planejamento experimental.

Ensaio	Bactérias heterotróficas (UFC/g de solo)
1	$8,0 \times 10^5$
2	$3,2 \times 10^8$
3	$1,3 \times 10^6$
4	$5,6 \times 10^5$
5	$1,5 \times 10^6$
6	$2,4 \times 10^9$
7	$5,6 \times 10^6$
8	$2,9 \times 10^8$
9	$3,6 \times 10^6$
10	$8,1 \times 10^6$
11	$1,2 \times 10^8$
12	$1,9 \times 10^3$
13	$8,6 \times 10^3$
14	$1,1 \times 10^3$

5.3.2. Análise do pH

A Figura 7 mostra que o pH do solo nos experimentos 1 a 11 ficou na faixa entre 5,0 e 8,0. Os baixos valores de pH iniciais possivelmente se devem ao fato da adição de Nitrogênio realizada no início dos experimentos ter provocado uma diminuição do pH. Em todos os experimentos de controle o pH apresentou-se acima de 9,5, possivelmente devido à adição de solução de azida de sódio.

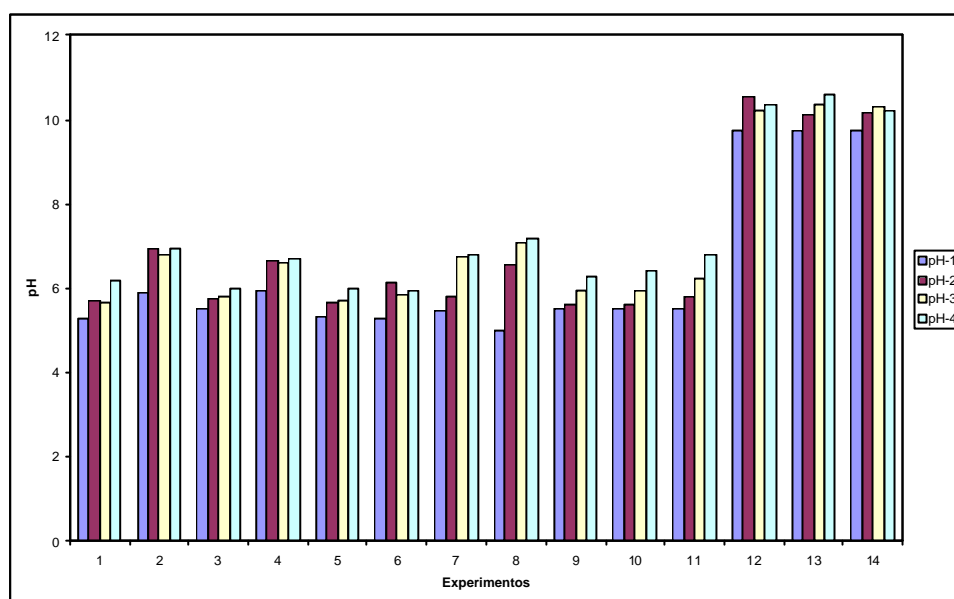


Figura 7. pH do solo nos experimentos do planejamento experimental.

PH-1: pH após quinze dias de experimentos

PH-2: pH após trinta dias de experimentos

PH-3: pH após quarenta e cinco dias de experimentos

PH-4: pH após sessenta dias de experimentos

5.4. Planejamento experimental: análise estatística

A partir dos resultados de biodegradação da matéria orgânica obtidos nos ensaios em bandejas realizou-se a análise estatística por meio de um planejamento experimental 2^3 com ponto central.

A Tabela 22 corresponde à matriz do planejamento com os fatores na forma codificada. Nela também se encontram os resultados da percentagem de remoção de matéria orgânica do solo como função das condições de operação de cada reator.

Tabela 22. Matriz do planejamento experimental 2^3 com ponto central na forma codificada com os respectivos resultados de biodegradação.

Ensaio	Conc. Inóculo	Conc. Nitrogênio	Conc. Óleo	Biodegradação ^a (%)
1	-	+	-	23,5
2	-	-	-	34,0
3	+	+	-	7,0
4	+	-	-	56,3
5	-	+	+	5,5
6	-	-	+	51,7
7	+	+	+	20,5
8	+	-	+	39,3
9	0	0	0	31,6
10	0	0	0	32,9
11	0	0	0	26,8

a: percentagem de biodegradação foi obtida como a diferença entre a degradação total do óleo diesel e a respectiva perda abiótica obtida nos testes de controle.

No caso de solos contaminados com hidrocarbonetos, as perdas abióticas são devidas principalmente à evaporação de constituintes bastante voláteis e à degradação fotoquímica. Na Tabela 23 observa-se que as perdas abióticas foram baixas comparadas às perdas nos outros experimentos. Isto já era esperado uma vez que antes do início dos experimentos permitiu-se a evaporação dos constituintes mais voláteis e também devido ao fato de a adição de solução de azida de sódio apresentar efeito esterilizante conforme relatado na literatura.

Tabela 23. Perdas abióticas verificadas nos ensaios de controle.

	Ensaio de Controle	Degradação
12	Perdas Abióticas ¹	7,5
13	Perdas Abióticas ²	6,1
14	Perdas Abióticas ³	7,3

¹Experimentos de controle conduzidos para verificar as perdas abióticas nos reatores com concentração de óleo no nível +1.

²Experimentos de controle conduzidos com o objetivo de verificar as perdas abióticas nos reatores com concentração de óleo no nível -1.

³Experimentos de controle conduzidos com o objetivo de verificar as perdas abióticas nos reatores com concentração de óleo no nível 0.

A partir da Tabela 22 e dos resultados da percentagem de biodegradação da matéria orgânica, avaliou-se o planejamento experimental utilizando-se o pacote computacional STATISTICA for Windows, Versão 5.5, a partir do qual obtiveram-se os resultados dos efeitos principais e das suas interações, dos coeficientes de regressão e da análise de variância.

A Figura 8 mostra o gráfico de Pareto, uma das formas de avaliação do planejamento experimental. A magnitude de cada efeito na Figura 8 é representada pelas colunas e a linha transversal às colunas correspondente ao valor de $p = 0,05$, indicando a magnitude do efeito para ter significado estatístico.

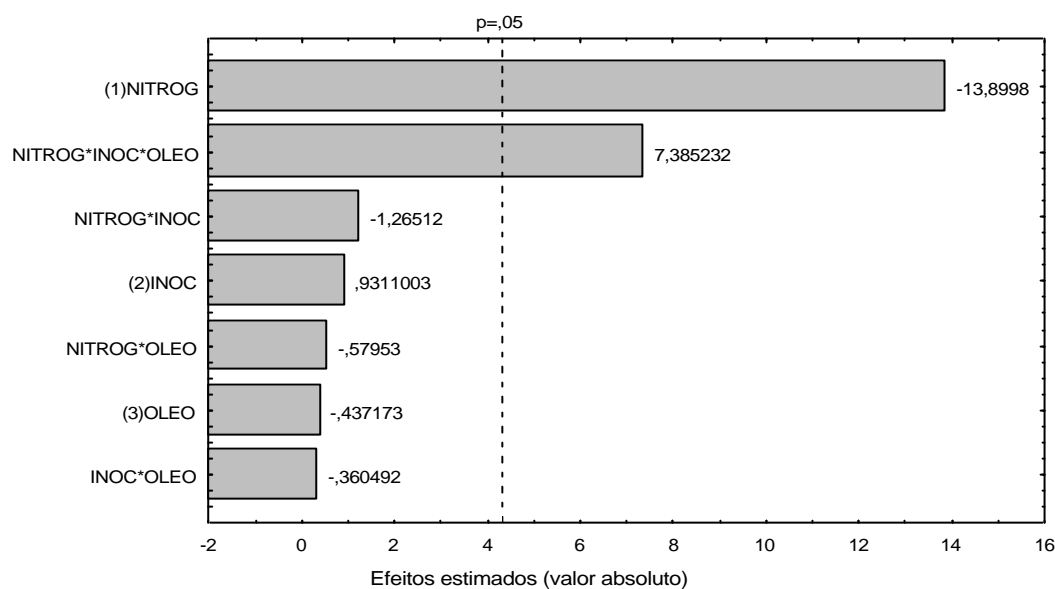


Figura 8. Gráfico de Pareto.

Analisando-se o gráfico de Pareto pode-se observar que, para um nível de confiança de 95 %, a concentração de Nitrogênio foi o fator mais importante no processo de biodegradação atingindo um efeito estimado de -13,8998. O efeito da interação entre os três fatores estudados também foi estatisticamente significativo, porém com menor magnitude, 7,3852, comparado com o ocasionado pela concentração de Nitrogênio.

A concentração de inóculo e concentração de óleo, assim como os efeitos das interações entre dois fatores parecem desprezíveis estatisticamente de acordo com o gráfico de Pareto, porém, de acordo com Montgomery (1991) uma interação significativa pode mascarar os efeitos principais. Segundo essa perspectiva, o fato da interação entre os três fatores ser significativa pode mascarar a significância da interação entre dois fatores ou mesmo dos fatores óleo e inóculo. Portanto, Montgomery sugere que na presença de interação significativa devem-se examinar os níveis de um fator, com níveis fixos de outros fatores para obter conclusões mais detalhadas sobre a significância dos fatores. Portanto, para analisar se

houve o mascaramento do efeito de alguma das variáveis em estudo foram construídos gráficos dos níveis de cada fator em relação a níveis fixos dos outros fatores conforme as Figuras 9, 10, 11,12 e 13.

De acordo com a Figura 9, quando os fatores Nitrogênio e óleo estão fixos em seu nível baixo, um aumento na concentração de inóculo provoca um aumento de 22,31 % na biodegradação da matéria orgânica. De modo semelhante, quando os fatores Nitrogênio e óleo estão fixos em seu nível alto, um aumento na concentração de inóculo provoca um aumento de 15,02 % na biodegradação da matéria orgânica. No entanto, a biodegradação atinge maiores valores para a concentração de Nitrogênio e inóculo nos níveis baixos.

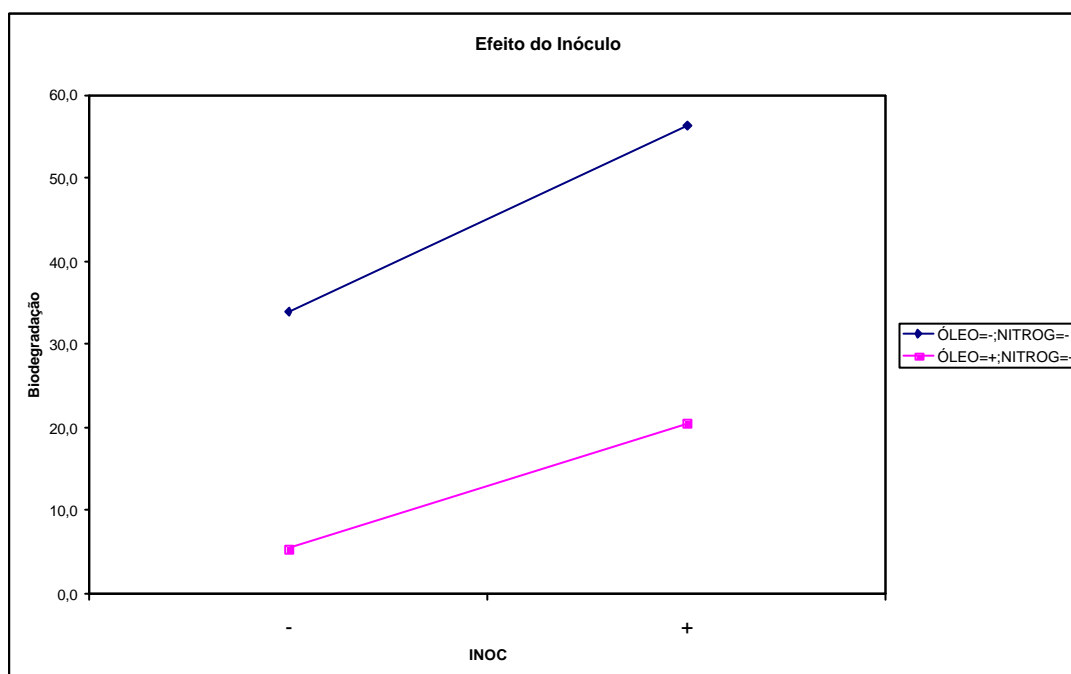


Figura 9. Análise do efeito do inóculo.

Conforme mostra a Figura 10, quando os fatores Nitrogênio e inóculo estão fixos em seu nível baixo, um aumento na concentração de óleo provoca um aumento de 17,70 % na biodegradação da matéria orgânica. Do mesmo modo, quando os fatores Nitrogênio e inóculo estão fixos em seu nível alto, um aumento na concentração de óleo provoca um aumento de 13,48 % na biodegradação da matéria orgânica.

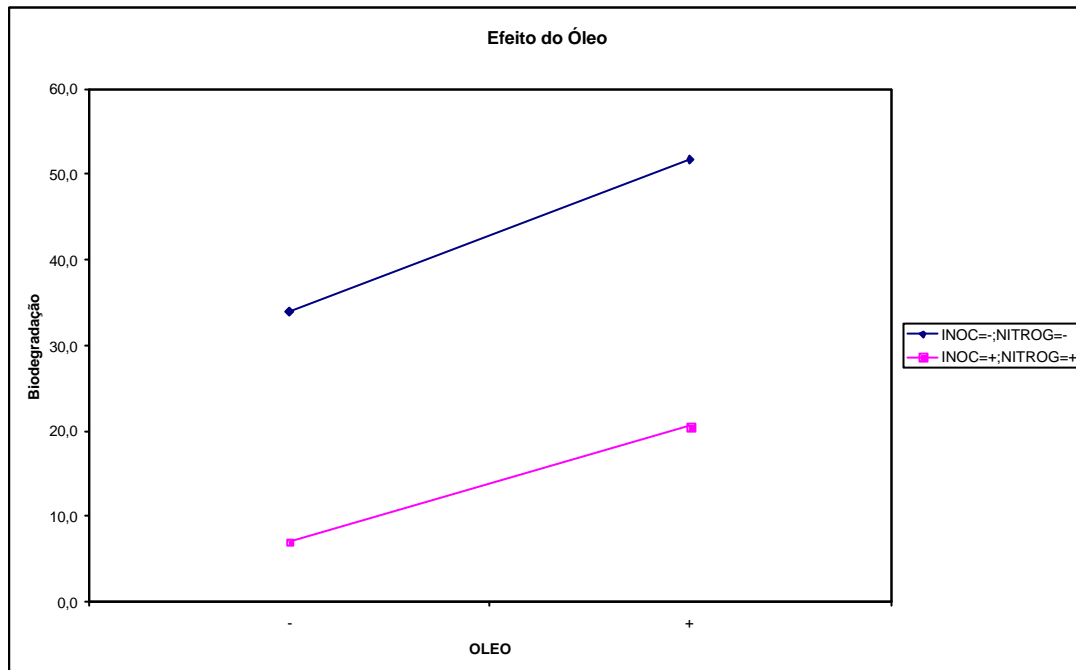


Figura 10. Análise do efeito do óleo.

Conforme a Figura 11, existe a interação entre o óleo e o inóculo e esta interação produz maiores valores de biodegradação quando o fator Nitrogênio está em seu nível baixo. Pode-se ver ainda, que para o Nitrogênio e inóculo em seus níveis baixo, um aumento na concentração de óleo provoca um aumento na biodegradação. Por sua vez, quando o Nitrogênio está em seu nível baixo e o inóculo está em seu nível alto, um aumento na concentração de óleo provoca uma diminuição da biodegradação.

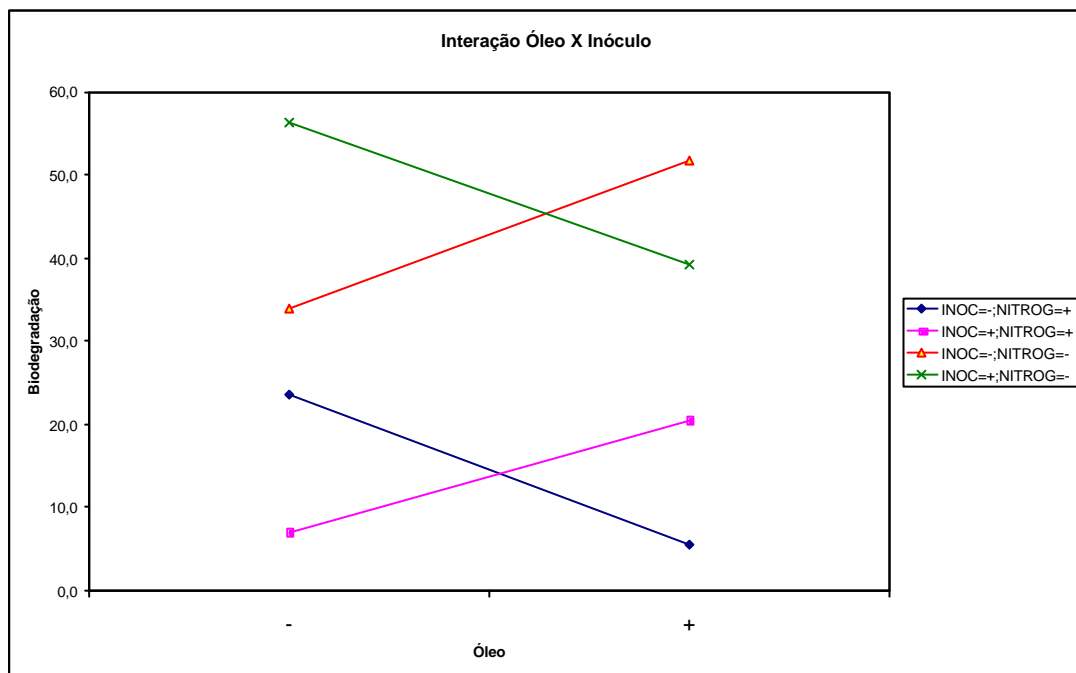


Figura 11. Análise do efeito da interação óleo X inóculo.

Conforme a Figura 12, existe a interação entre o Nitrogênio e o inóculo e esta interação produz maiores valores de biodegradação quando o fator Nitrogênio está em seu nível baixo. Podemos ver ainda, que para o Nitrogênio e óleo em seus níveis baixos, um aumento na concentração de inóculo provoca um aumento na biodegradação. Por sua vez, quando o Nitrogênio está em seu nível baixo e o óleo está em seu nível alto, um aumento na concentração de inóculo provoca uma diminuição na biodegradação.

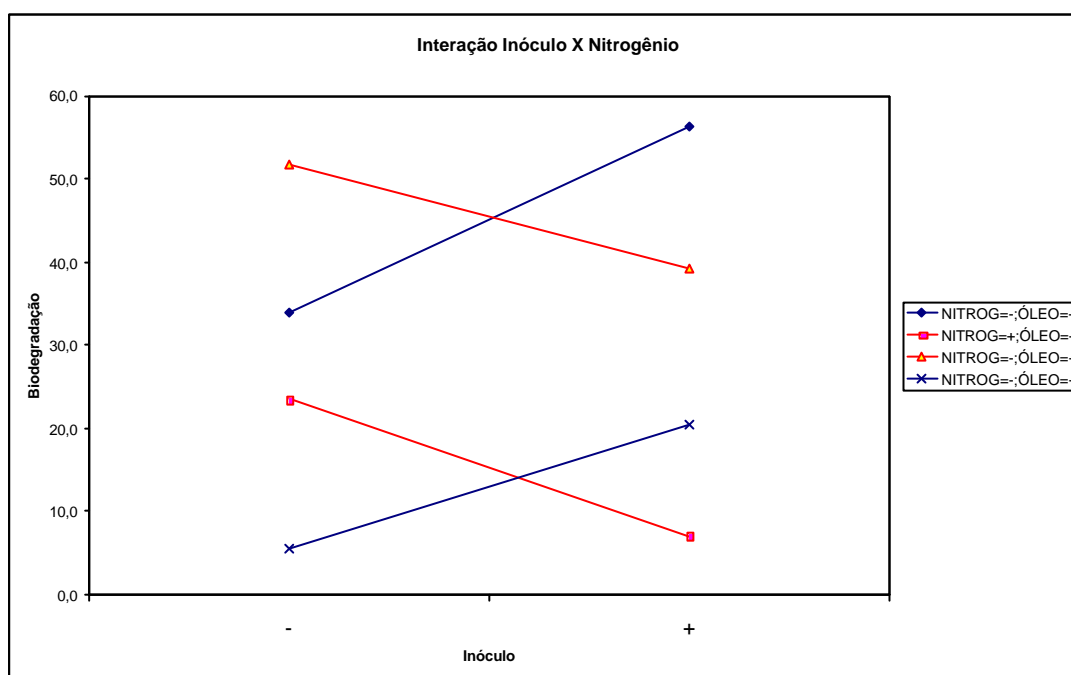


Figura 12. Análise do efeito da interação inóculo X Nitrogênio.

Analisando-se a Figura 13, percebe-se que existe a interação entre o óleo e o Nitrogênio e esta interação produz maiores valores de biodegradação quando o fator Nitrogênio está em seu nível baixo. Pode-se ver ainda, que para o Nitrogênio e inóculo em seus níveis baixos, um aumento na concentração de óleo provoca um aumento na biodegradação. Por sua vez, quando o Nitrogênio está em seu nível baixo e o inóculo está em seu nível alto, um aumento na concentração de óleo provoca uma diminuição da biodegradação.

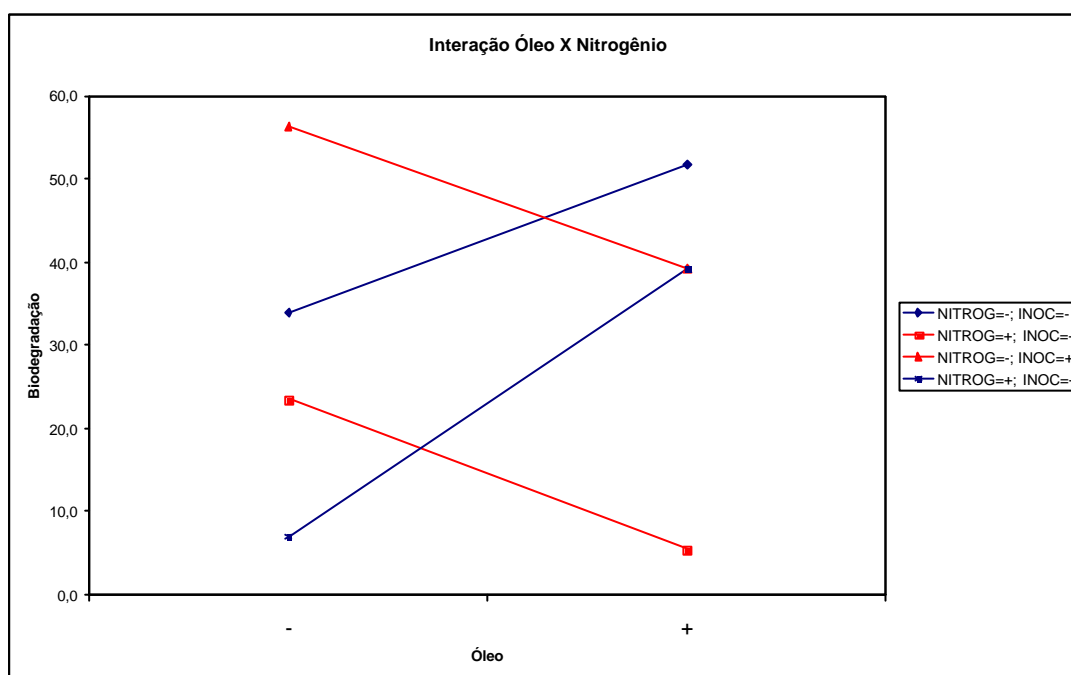


Figura 13. Análise do efeito da interação óleo X Nitrogênio.

Considerando que 95% de probabilidade é um valor satisfatório, foi possível estabelecer um modelo matemático para a função resposta Y, Equação (9), cujos valores dos coeficientes foram obtidos pelo programa computacional STATISTICA 5.5 na análise de regressão, sendo apresentados abaixo na forma codificada:

$$Y = 29,888 - 15,598X_1 + 1,04X_2 - 0,491X_3 - 1,420X_1X_2 - 0,650X_1X_3 - 0,405X_2X_3 + 8,288X_1X_2X_3 \quad (9)$$

Em que:

Y = porcentagem de biodegradação

X₁ = valor da variável adição de Nitrogênio na forma codificada;

X₂ = valor da variável adição de inóculo na forma codificada;

X₃ = valor da variável adição de óleo na forma codificada.

A Equação (10) é usada pra passar os valores da forma codificada para a forma real, ou vice-versa.

$$X = \frac{y - \frac{y(+1) - y(-1)}{2}}{\frac{y(+1) - y(-1)}{2}} \quad (10)$$

Em que:

X = valor da variável na forma codificada;

y = valor da variável na forma real;

y(+1) = valor da variável na forma real correspondente ao nível +1;

y(-1) = valor da variável na forma real correspondente ao nível -1.

A significância estatística do modelo foi demonstrada pela análise da variância e de regressão, $R^2 = 0,99175$, o que significa que aproximadamente 99,2 % da variação total em

torno média foi explicada pela regressão, levando em conta que a Equação (9) é válida para a faixa experimental definida na Tabela 21. Os resultados da análise da regressão são mostrados no Anexo V.

Para 95% de significância o valor de F calculado para o modelo foi de 161,3989 quando o tabelado é de $F(2/8)_{\text{tabelado}} = 4,46$, verificando-se que o valor de F obtido pelo modelo foi de 36,19 vezes o tabelado. Segundo Barros Neto, Scarmínio e Bruns (2001) para que o modelo tenha validade estatística, de acordo como teste F, o valor calculado pelo modelo deve ser cerca de dez vezes o valor do ponto da distribuição F com o número apropriado de graus de liberdade. Portanto, este resultado mostra que o modelo apresenta uma boa confiabilidade estatística.

Analisando-se os dois ensaios realizados no ponto central, observou-se um baixo desvio padrão ($SQ_{\text{erro puro}}/SQ_{\text{total}} = 0,0079$), indicando que os resíduos devido ao erro aleatório (erro puro) são insignificantes na análise de regressão dos dados obtidos.

Analisando-se a Figura 14, observa-se que os resíduos flutuaram aleatoriamente em torno do valor zero sendo positivo do ponto de vista da proposta do modelo. Outro fato verificado neste gráfico é que a variância dos resíduos parece não aumentar com os valores preditos.

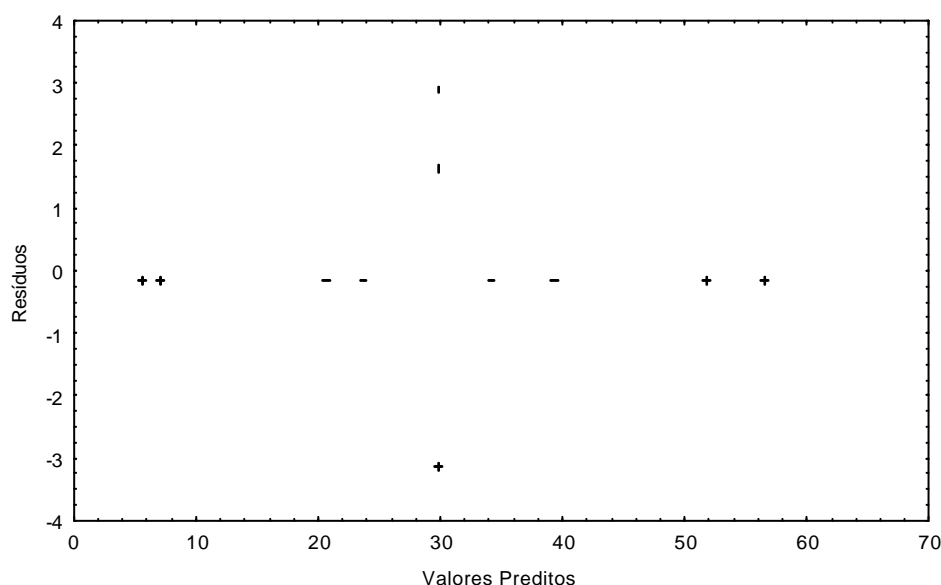


Figura 14. Resíduos em função dos valores preditos.

Outra forma de avaliação do modelo é através da observação do gráfico dos valores preditos versus os valores observados mostrados na Figura 15. Os valores preditos pelo modelo foram representados pela reta e os valores observados pelos pontos. Verifica-se que os valores observados se aproximaram dos valores preditos, o que pode ser comprovado pelo elevado valor do coeficiente de regressão obtido pelo modelo ($R^2 = 0,99175$).

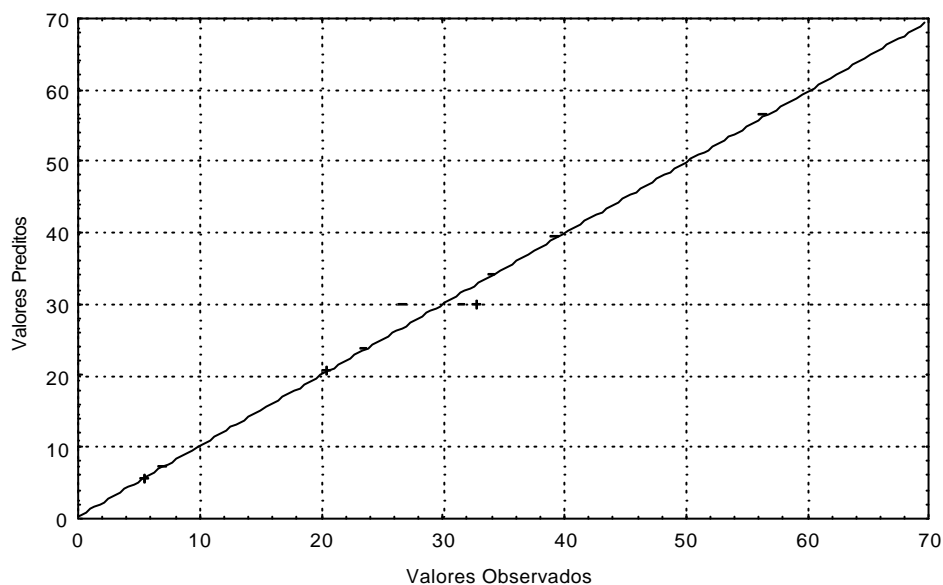


Figura 15. Valores preditos em função dos valores observados.

A Figura 16 mostra que para uma concentração de óleo elevada, ou seja, uma maior contaminação, a biodegradação do óleo diesel aumenta com a diminuição da concentração de Nitrogênio. Observa-se que, quando o Nitrogênio está próximo ao seu limite inferior (-1), os maiores valores de biodegradação foram obtidos com concentrações de inóculo em valores próximos ao seu limite inferior (-1). Este fato pode ser devido a uma possível inibição da atividade microbiana na presença de elevadas concentrações de Nitrogênio. Pode-se ressaltar ainda a possibilidade de competição entre os microrganismos existentes no próprio solo e o MIPB.

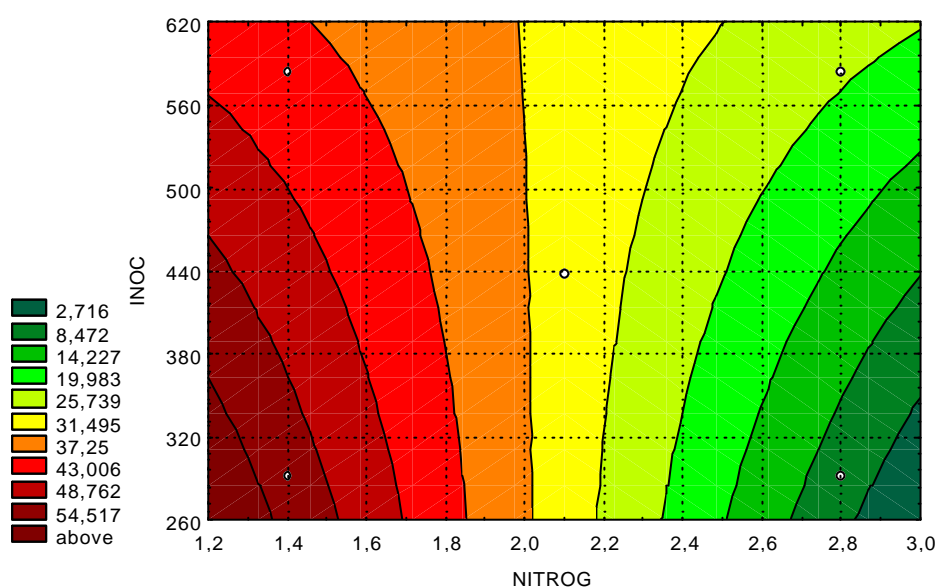


Figura 16. Efeito da concentração de inóculo e da concentração de Nitrogênio na biodegradação do óleo diesel para a concentração de óleo no nível alto.

A análise da Figura 17 mostra que para uma baixa concentração de óleo, obteve-se um comportamento semelhante ao obtido para uma elevada concentração de óleo em relação à variável concentração de Nitrogênio, ou seja, a biodegradação do óleo diesel aumenta com a diminuição da concentração de Nitrogênio. Possivelmente, a inibição da atividade microbiana na presença de elevadas concentrações de Nitrogênio também tenha ocorrido. Com relação à variável concentração de inóculo observa-se, porém, um comportamento inverso ao obtido para uma elevada concentração de óleo, ou seja, quando o Nitrogênio está próximo ao seu limite inferior (-1), os maiores valores de biodegradação foram obtidos com concentrações de inóculo em valores próximos ao seu limite superior (+1). Isto explica o fato de a variável concentração de inóculo não ter sido considerada significativa no gráfico de Pareto.

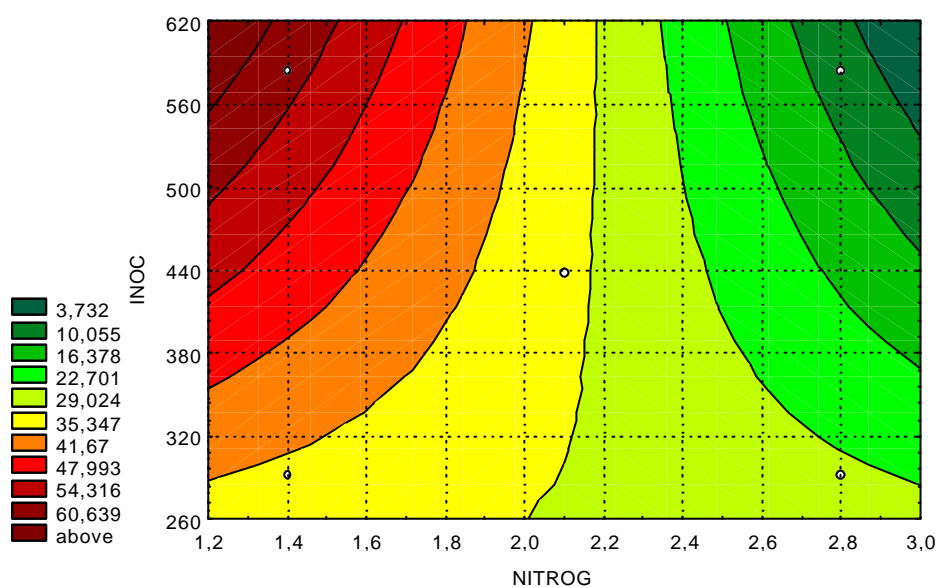


Figura 17. Efeito da concentração de inóculo e da concentração de Nitrogênio na biodegradação do óleo diesel para o óleo no nível baixo.

CAPÍTULO VI
CONCLUSÕES

Caracterização do solo

– Os resultados da caracterização do solo de Guamaré/RN mostraram que o mesmo possui características que possibilitam a utilização da biorremediação de modo efetivo para descontaminação de um possível derramamento de óleo naquela região.

Ensaio em frascos sem adição de nutrientes e inóculo

– Os ensaios de biodegradação em frascos Erlenmeyer sem adição de nutrientes e inóculo mostraram que os microrganismos presentes no solo de Guamaré/RN são capazes de degradar os hidrocarbonetos do óleo diesel.

– Quando se aumentou a concentração de óleo diesel no solo, mantendo-se constante a massa de solo, houve uma diminuição na eficiência de remoção de matéria orgânica.

– Verificou-se ainda que um aumento na massa de solo de 50 g para 100 g, mantendo-se aproximadamente a mesma concentração de óleo provocou uma diminuição significativa na eficiência de remoção de matéria orgânica.

Ensaio em frascos com adição de inóculo

– Nos ensaios em Erlenmeyer com inoculação, a adição de microrganismos produtores de biosurfactantes no solo contaminado com óleo diesel provocou um aumento na biodegradação dos hidrocarbonetos comparados com os ensaios em Erlenmeyer sem adição de nutrientes e inóculo, uma vez que a eficiência de remoção de matéria orgânica nos testes de biodegradação com inoculação foi superior em mais de duas vezes à eficiência de remoção de matéria orgânica obtida nos testes sem inoculação.

– Nos ensaios com adição de inóculo um aumento na massa de óleo para uma mesma massa de solo não provocou uma alteração significativa na eficiência de remoção de matéria orgânica.

– A utilização de microrganismos produtores de biosurfactantes mostrou-se satisfatória para a biorremediação de solo contaminado com óleo diesel, uma vez que em apenas quarenta e cinco dias de incubação houve uma redução de mais de cinquenta por cento da matéria orgânica do solo.

Ensaio de biodegradação em bandejas de alumínio

– Os reatores 4 e 6 apresentaram as maiores taxas de biodegradação de matéria orgânica, de 347,3 e 361,9 mg (kg solo.dia)⁻¹, respectivamente. Os reatores 3 e 5, por sua vez apresentaram as menores taxas de biodegradação de matéria orgânica, de 43,2 e 38,3 mg (kg solo.dia)⁻¹, respectivamente.

– Os reatores 1 a 11, após 60 dias de experimentos, apresentaram quantidades de bactérias heterotróficas superiores a 10³, mostrando que ainda seria possível com o decorrer do tempo obter eficiências de biodegradação ainda maiores do que as obtidas neste estudo.

– Os reatores de controle das perdas abióticas apresentaram crescimento de bactérias heterotróficas, o que pode ser justificado por contaminação com bactérias heterotróficas presentes no ar, visto que os reatores eram dispostos em uma sala com grande ventilação sem nenhuma capa protetora para evitar o contato desses reatores com o ar.

– O pH do solo nos experimentos 1 a 11 ficou na faixa entre 5,0 e 8,0. Os baixos valores de pH iniciais possivelmente se devem ao fato da adição de nitrogênio realizada no início dos experimentos ter provocado uma diminuição do pH e a elevação dos valores de pH com o decorrer do tempo talvez tenha ocorrido devido ao consumo de nitrogênio pelos microrganismos. Em todos os experimentos de controle o pH apresentou-se acima de 9,5, possivelmente devido à adição de solução de azida de sódio.

Planejamento experimental

– De acordo com o gráfico de Pareto, Para um nível de confiança de 95 %, a concentração de nitrogênio foi o fator mais importante no processo de biodegradação atingindo um efeito estimado de -13,8996. O efeito da interação entre os três fatores estudados também foi estatisticamente significativo, porém com menor magnitude quando comparado com o ocasionado pela concentração do nitrogênio.

– A concentração de inóculo e concentração de óleo, assim como os efeitos das interações entre os fatores dois a dois foram mascarados pela interação significativa dos três fatores. Uma análise mais detalhada mostrou que todos estes efeitos foram significativos.

– A variável concentração de nitrogênio apresentou um comportamento semelhante para uma baixa concentração de óleo e uma concentração de óleo elevada, ou seja, a biodegradação do óleo diesel aumentou com a diminuição da concentração de nitrogênio.

– Com relação à variável concentração de inóculo observou-se a ocorrência de comportamentos opostos em relação à concentração de óleo diesel, uma vez que para uma concentração de óleo elevada, quando o nitrogênio está próximo ao seu limite inferior (-1), os maiores valores de biodegradação foram obtidos com concentrações de inóculo em valores próximos ao seu limite inferior (-1) e para uma baixa concentração de óleo, os maiores valores de biodegradação foram obtidos com concentrações de inóculo em valores próximos ao seu limite superior (+1).

– A análise estatística possibilitou estabelecer um modelo matemático para a função resposta Y (porcentagem de biodegradação), em função das variáveis concentração de nitrogênio (X_1), concentração de óleo (X_2) e concentração de inóculo (X_3) dado por:

$$Y = 29,888 - 15,598X_1 + 1,04X_2 - 0,491X_3 - 1,420X_1X_2 - 0,650X_1X_3 - 0,405X_2X_3 + 8,288X_1X_2X_3$$

CAPÍTULO VII

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Solo – **NBR 7181. Análise granulométrica**. 1984.

ARROYO, M. E. M.; QUESADA, J. M. R. **Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos**. GEOCISA – DIVISIÓN DE PROTECCIÓN AMBIENTAL DE SUELOS. 2002. Disponível em: <http://www.igme.es/internet/Serv_Publicaciones/Indexc.htm>. Acesso em: 18 de março de 2004.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. São Paulo: Unicamp, 2001. 401p.

BROETZMAN, G. G.; CHACÓN, M. J.; HADLEY, P. W.; KABACK, D. S.; KENNET, R. W.; ROSENTHAL, N. J. 1997. **New approaches towards promoting the application of innovative bioremediation technologies**. In: In Situ & On-Site Bioremediation: Volume 4. Fourth International In Situ & On-Site Bioremediation Symposium. Battele Press, Columbus, Ohio. p. 323-328.

BROWN, D. G.; GUHA, S.; JAFFÉ, P. F. **Surfactant-enhanced biodegradation of PAH in soil slurry reactors**. Chemospher. 1999.35 v., Nº 7, p. 1599-1611.

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

CONSELHO NACIONAL DE PETRÓLEO. **Resolução nº 01, de 13 de fevereiro de 1990**.

CRAVO JÚNIOR, W. B. **Biodegradação de querosene de aviação (QAV) por culturas mistas e por *Pseudomonas aeruginosa***. 1998. 68p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual de métodos de análise de solo**. Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 2. ed. Rio de Janeiro, 210f. 1997.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA (EUA). **How to evaluate alternative cleanup technologies for underground storage tank sites: a guide for corrective action plan reviewers.** (EPA 510-B-94-003 and EPA 510-B-95-007) 1994. Disponível em: < <http://www.epa.gov/swerust1/pubs/tums.htm>>. Acesso em: 10 de julho de 2002.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA (EUA). **Ex-situ bioremediation technology for treatment of dinoseb-contaminated soils – innovative technology evaluation report.** EPA/540/R-94/508, September. 1995

FERNANDES, F. M. 1998. **Bioremediation: state of the art.** In Third Latin American Biodegradation & Biodeterioration Symposium. Florianópolis, 27-30 Abril.

FOGEL, S.; LEAHY, M.; JONES, M.; BUTTS, R.. Bioremediation of a nº 6 Fuel Spill: Comparison of Laboratory Treatability Data with Field Remediation Data. In: CALABRESE, J. E., KOSTECKI, P. T. **Hydrocarbon contaminated soils.** Chelsea: Lewis Publishers, 1991. p. 411-421.

GLASS, D. J.; RAPHAEL, T.; BENOIT, J. **International bioremediation: recent developments in established & emerging markets.** In: In Situ & On-Site Bioremediation: 4. v. Fourth International In Situ & On-Site Bioremediation Symposium. Battele Press, Columbus, Ohio. 1997. p. 307-314

JØRGENSEN, K. S.; PUUSTINEN, J.; SUORTI, A.-M. **Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting biopiles.** Environmental Pollution. 2000. 107, p. 245-254.

JENNINGS, O. R.. **Market overview of the bioremediation market. p. 305. in: in situ & on-site bioremediation:** Fourth International In Situ & On-Site Bioremediation Symposium. Battele Press, Columbus, Ohio. 1997. 4. v.

LOBATO, A. K. C. L. **Estudo da produção de biosurfactantes por microrganismos isolados de poços de petróleo**. 2003. 108p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. **Bioremediation of diesel-oil-contaminated alpine soils at low temperatures**. Applied Microbiological Biotechnology. 1997. 47 v., p. 462-468.

MÁRQUEZ-ROCHA, F. J.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, V.; LAMELA, M. T. **Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium**. Water, Air & Soil Pollution. 2001. 128 v. p. 313-320.

MESQUITA, A. C. **Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos orgânicos recalcitrantes**. 2004. 158f. (Tese de Doutorado) - COPPE/Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MICHEL, J.; REINHARZ, E. **Preassessment phase guidance document. national oceanic & atmospheric administration**. Office of General Counsel Damage Assessment Regulations Team. 1994.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 3. ed . Singapore: John Wiley and Sons Inc. 1991. cap. 7, p. 199.

NOORDMAN, W. H. **Biosurfactant-enhanced soil remediation: effect of rhamnolipid on the bioavailability & microbial capture of hydrophobic compounds**. University Library Groningen. 1999. Disponível em: <http://ag.udel.edu/extension/information/prod_agric/chap8-95.htm>. Acesso em: 20 de março de 2004.

OLIVEIRA, F. J. S. **Biorremediação de solo arenoso contaminado por óleo cru**. 2001. 101f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

PALA, D. M.; FREIRE, D. D. C.; SANT'ANNA Jr., G. L. **Bioremediation of clay soils impacted by petroleum**. Engenharia Térmica. 2002. 2. ed. Especial. p. 29-32.

PARKER, J. C.; ISLAM, M. **Cost effectiveness of selected remediation technologies & project protocols**. 1997. p. 341-46. In: In Situ & On-Site Bioremediation: 4. v. Fourth International In Situ & On-Site Bioremediation Symposium. Battele Press, Columbus, Ohio.

SCHULTE, E. E. **Recommended soil testing procedures for the northeastern United States Recommended soil. Chapter 8 - Recommended Soil Organic Matter Tests**. University of Delaware.1995. Disponível em <http://ag.udel/extension/information /prod _agric/chap8-95.htm>. Acesso em 05 de fevereiro de 2004.

SILVA, E. P. **Determinação de propriedades de pastas de cimento e de géis de fraturamento**. Relatório de Estágio Supervisionado. Departamento de Engenharia Química. UFRN. 2002.

STONE JÚNIOR., W. A. Assessing Health Risks Associated with Diesel Contaminated Soils & Groundwater. In: CALABRESE, J. E., KOSTECKI, P. T. **Hidrocarbon contaminated soils**. Chelsea: Lewis Publishers, 1991. p. 167-169.

TASK GROUP. **Case studies of regulatory acceptance in situ bioremediation technologies. federal advisory committee to develop on-site innovative technologies**. Colorado Center for Environmental Management. February. 1996. p. 24.

TAUK, S. M. **Biodegradação de resíduos orgânicos no solo**. Revista Brasileira de Geociências. 1990. 7. 20 v. pp 299-301.

ANEXOS

ANEXO I

Metodologia para repique da cepa

Em tubos de ensaio de 20 mL, colocava-se de 5 a 6 mL do meio de manutenção PCA (Plate Count Agar) com 25 % do meio agar-agar. Estes tubos eram autoclavados a 1,5 kgf/cm² por 15 minutos e posteriormente inclinados até atingirem a temperatura ambiente. Numa câmara de fluxo laminar e utilizando o bico de Bunsen para esterilizar a alça de platina, procedia-se o repique utilizando um tubo contendo a cepa pura. Cada tubo de ensaio contendo a cepa pura era transferido para 3 tubos contendo o meio de manutenção. Os tubos eram mantidos na estufa à 38 °C e após 48 horas à 5 °C (LOBATO, 2003).

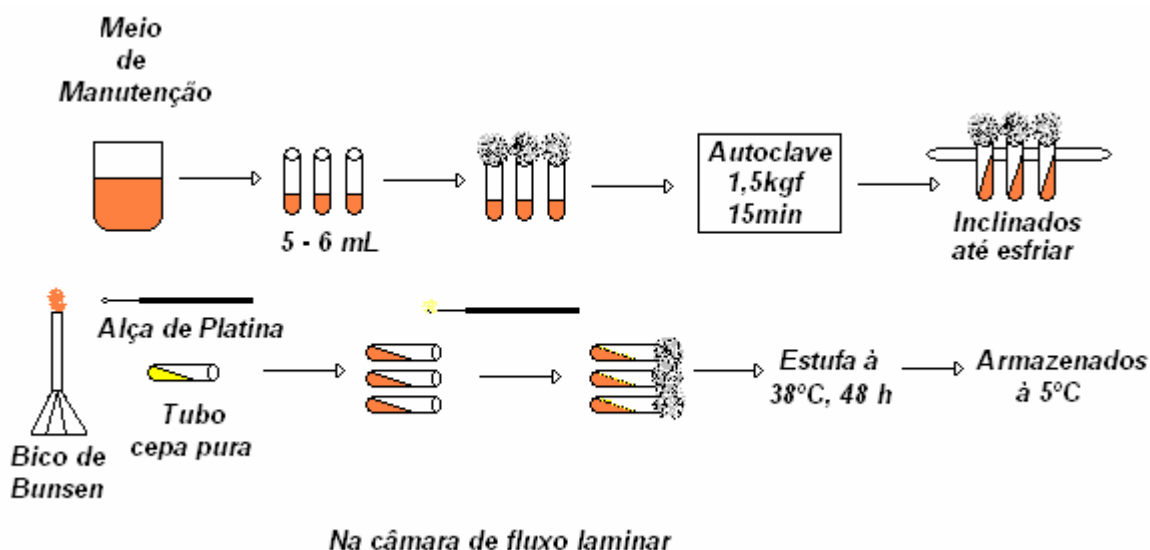


Figura 18. Procedimentos de repique.

ANEXO II

Preparação do Meio A

Em uma solução tampão de fosfato à 100 mM e pH 7,0, adicionava-se 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,25 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1 mL/L de uma solução de estoque de sais. Em que esta solução de sais era composta por: 0,01 g/100 mL de EDTA, 0,3 g/100 mL de MnSO_4 , 0,01 g/100 mL de FeSO_4 , 0,01 g/100 mL de CaCl_2 , 0,01 g/100 mL de CoCl_2 e 0,01 g/100 mL de ZnSO_4 .

ANEXO III

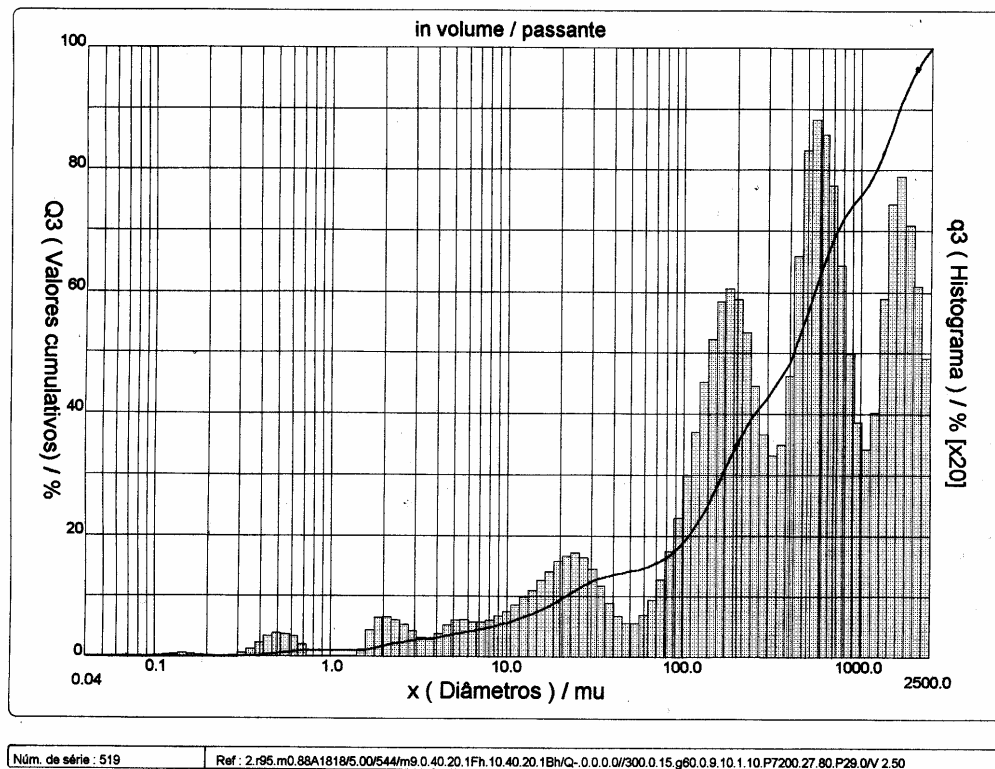


Figura 19. Perfil granulométrico do solo de Guararé/RN.

ANEXO IV



Figura 20. Reatores 5-8 e reator de controle 12, após 60 dias de tratamento.



Figura 21. Reatores 9-11 e reator de controle 14, após 60 dias de tratamento.

ANEXO V

Resultados da Análise de Regressão

Tabela 24. Tabela ANOVA

	SQ	gl	MQ	F	p
NITROG	1946,402669	1	1946,4	193,2	0,0051
INOC	8,733901	1	8,733901	1,246793	0,345541
OLEO	1,925409	1	1,925409	0,274858	0,636361
NITROG*INOC	16,1241	1	16,1241	2,301768	0,226506
NITROG*OLEO	3,383511	1	3,383511	0,483007	0,537055
INOC*OLEO	1,309205	1	1,309205	0,186893	0,694706
NITROG*INOC*OLEO	549,4695375	1	549,47	54,542	0,0178
Falta de Ajuste	32,34278882	6	5,3905	0,5351	0,7661
Erro Puro	20,14862253	2	10,074		
SQ Total	2548,363618	10			

Tabela 25. Efeitos principais e interações

Efeitos Estimados; $R^2=0,99175$; Ajuste:0,97251						
MS Erro Puro =10,07431						
	Desvio Padrão				-95, %	+95, %
	Efeito	Erro Puro	t(2)	p	Lim. Conf.	Lim. Conf.
Média/Interação	29,888	0,956999	31,23097	0,001024	25,77037	34,00563
NITROG	-31,1962	2,244361	-13,8998	0,005136	-40,8529	-21,5395
INOC	2,089725	2,244361	0,9311	0,450096	-7,56698	11,74643
OLEO	-0,98118	2,244361	-0,43717	0,704661	-10,6379	8,67553
NITROG*INOC	-2,83938	2,244361	-1,26512	0,333274	-12,4961	6,81733
NITROG*OLEO	-1,30068	2,244361	-0,57953	0,620813	-10,9574	8,35603
INOC*OLEO	-0,80907	2,244361	-0,36049	0,752992	-10,4658	8,84763
NITROG*INOC*OLEO	16,57513	2,244361	7,385232	0,017845	6,91842	26,23183

Tabela 26. Coeficientes de regressão

	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão Erro Puro	t(2)	p	Lim. Conf. -95,%	Lim. Conf. +95,%
Média/Interação	29,888	0,956999	31,23097	0,001024	25,77037	34,00563
NITROG	-15,5981	1,12218	-13,8998	0,005136	-20,4264	-10,7697
INOC	1,044863	1,12218	0,9311	0,450096	-3,78349	5,873215
OLEO	-0,49059	1,12218	-0,43717	0,704661	-5,31894	4,337765
NITROG*INOC	-1,41969	1,12218	-1,26512	0,333274	-6,24804	3,408665
NITROG*OLEO	-0,65034	1,12218	-0,57953	0,620813	-5,47869	4,178015
INOC*OLEO	-0,40454	1,12218	-0,36049	0,752992	-5,23289	4,423815
NITROG*INOC*OLEO	8,287563	1,12218	7,385232	0,017845	3,45921	13,11592

ANEXO VI

Tabela 27. Resumo dos estudos de tratabilidade.

Testes	Parâmetros						
	Seleção de Produtos	Biodegradabilidade	Toxicidade	Biocinética	Reatores	Estudos de Frascos em Shaker	Microcosmo
Velocidade de consumo de O ₂	X	X		X	X		X
Biodegradabilidade dos Compostos Alvo	X	X	X		X	X	X
Efeitos de Nutrientes	X	X		X	X	X	X
Percentagem de Remoção de Material Orgânico	X	X			X	X	
Eficiência de Remoção	X	X			X	X	
Compostos Alvo(ppm)	X				X	X	
Toxicidade EC50			X				
Concentração Tóxica			X				
Choque de Carga			X				
Eficiência de Remoção em Curto Tempo				X	X		
Parâmetros de Design para Sistemas				X			
Constante Cinética				X			
Avaliação da Qualidade do Efluente				X		X	
Configuração de Tipo de Sistemas							X
Efeitos de Condição Hidráulica							X

ANEXO VII

Tabela 28. Constituintes do óleo diesel nº 2.

Composto	Faixa de concentração(ppm)
Orgânicos voláteis	
Benzeno	6-82
Etilbenzeno	100-800
Tolueno	100-800
Xileno	100-800
Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	
Pireno	ND-41
Fluoranteno	ND-37
Benzoantraceno	0,001-1,2
Trifenileno	2,2
Criseno	1,4
Benzo(a)pireno	0,001-0,6
Benzo(e)pireno	<0,1
2-metilnaftaleno	6.700
Naftaleno	2.730
Fenantreno	1.500
Fenol	6,8
Cresol	54,3
quinolina	9,2

Fonte: (Stone Jr., 1991).

ANEXO VIII

Tabela 29. Quadro de especificações do óleo diesel padrão para ensaios de consumo e emissões.

CARACTERÍSTICAS	UNIDADES	ESPECIFICAÇÕES		MÉTODO
		ATÉ DEZ/92	A PARTIR DE JAN/93	
<u>Destilação</u>				
- P.I.E.		160-190	160-190	
- 10% evaporado		190-220	190-220	
- 50% evaporado		245-280	245-280	
- 90% evaporado		330-360	330-360	
- P.F.E.	°C	máx. 390	máx. 390	NBR 9619 (MB 45)
Índice de cetano	-	48 - 54	48 - 54	ASTM D 976
Viscosidade a 37,8°C	cSt	2,0 - 4,0	2,5 - 3,5	MB 293
Resíduo de carbono dos 10% finais da destilação	% massa	máx. 0,25	máx. 0,25	MB 290
Enxofre	% massa	máx. 0,7	0,2 - 0,5	MB 106
Ponto de fulgor	°C	mín. 50	mín. 55	MB 48
Cinzas	% massa	máx. 0,02	máx. 0,02	NBR 9842 (MB 47)
Corrosividade ao cobre, 2h a 50°C	-	máx. 2	máx. 2	MB 287
Água e sedimentos	% volume	máx. 0,05	máx. 0,05	MB 38
Cor ASTM	-	máx. 3,0	máx. 3,0	MB 351
Carbono aromático	% volume	15 - 25	15 - 25	ASTM D 3238
C.F.P.P.	°C	máx. -5	máx. -5	EN 116 ou IP 309
Densidade a 20/4°C	-	0,830 - 0,845	0,835 - 0,845	NBR 7148 (MB 104)
Aspecto	-	Líquido e isento de material em suspensão	Líquido e isento de material em suspensão	Visual

Fonte: (CNP, 1990).

ANEXO IX

Tabela 30. Relação de acidentes ambientais com derramamento de óleo ocorridos no mundo.

NAVIO	ANO	LOCALIDADE	VAZAM. (TON.)
Atlantic Empress	1979	Costa de Tobago, Antilhas	280.000
ABT Summer	1991	700 milhas náuticas da costa de Angola	260.000
Castillo de Bellver	1983	Coata da Bacia de Saldanha, África do Sul	257.000
Amoco Cadiz	1978	Costa da Bretanha, França	227.000
Haven	1991	Gênova, Itália	140.000
Odyssey	1988	700 milhas náuticas da Costa de Escócia, Canadá	132.000
Torrey Canyon	1967	Ilhas Scilly, Reino Unido	119.000
Urquiola	1976	La Coruña, Espanha	108.000
Hawaiian Patriot	1977	300 milhas náuticas da costa de Onolulu	99.000
Independent	1979	Bosphorus, Turquia	93.000
Braer	1993	Ilhas Shetland, Reino Unido	85.000
Khark 5	1989	120 milhas náuticas da costa atlântica do Marrocos	80.000
Exxon Valdez	1989	Prince Willian Sound, Alaska, EUA	37.000
Felipe Camarão	1988	Baía de Ilha Grande, Rio de Janeiro – Brasil	250
Grego Penélope	1991	Ilha Bela, São Paulo – Brasil	130
Felipe Camarão	1989	Baía de Ilha Grande, Rio de Janeiro – Brasil	50
Jacuí	1990	Baía de Ilha Grande, Rio de Janeiro – Brasil	40
Grego Katina	1991	Ilha Bela, São Paulo – Brasil	40

Fonte: CRAVO JÚNIOR, 1998

ANEXO X

Tabela 31. Parâmetros físicos e químicos para os estudos de biotratabilidade.

Meio a ser monitorado	Propósito	Frequência de Amostragem	Parâmetros a serem analisados
<input type="checkbox"/> Solo da biopilha	<input type="checkbox"/> Determinar as condições de degradação e biodegradação dos constituintes	<input type="checkbox"/> Mensalmente ou quinzenalmente durante a operação	<input type="checkbox"/> População bacteriana, concentração dos contaminantes, pH, amônia, fósforo, teor de umidade e outras condições limitantes.
<input type="checkbox"/> Ar extraído ou coletado da biopilha	<input type="checkbox"/> Determinar as condições de degradação e biodegradação dos contaminantes	<input type="checkbox"/> Semanalmente durante os três primeiros meses, depois, mensalmente	<input type="checkbox"/> CO ₂ , O ₂ , CH ₄ , H ₂ S, COVs
<input type="checkbox"/> Ar	<input type="checkbox"/> Saúde da população e do pessoal do sítio	<input type="checkbox"/> Duas vezes durante as duas primeiras semanas de operação, depois semanalmente.	<input type="checkbox"/> Constituintes voláteis particulados
<input type="checkbox"/> Corrente de saída de água	<input type="checkbox"/> Constituintes solúveis e suspensos	<input type="checkbox"/> Quando requerido pelo SNEDP	<input type="checkbox"/> Conforme especificado pelo SNEDP;
<input type="checkbox"/> Solo ao redor da biopilha	<input type="checkbox"/> Migração dos contaminantes	<input type="checkbox"/> Quinzenalmente ou duas vezes no ano	<input type="checkbox"/> Constituintes perigosos
<input type="checkbox"/> Água superficial da biopilha	<input type="checkbox"/> Migração de constituintes solúveis	<input type="checkbox"/> Anualmente	<input type="checkbox"/> Constituintes solúveis ou perigosos

Fonte: (EPA, 1995).

ANEXO XI

Tabela 32. Gêneros de microrganismos hábeis na degradação de hidrocarbonetos de petróleo

Bactérias	Fungos	
	Fungos Filamentosos	Leveduras
Achromobacter	Aspergillus	Cândida
Acinetobacter	Cladosporium	Debaryomyces
Alcaligenes	Dendryphela	Rhodotorula
Arthrobacter	Geotichum	Sporobolomyces
Bacillus	Humicola	
Chomobacterium	Mortierella	
Flavobacterium	Penicilium	
Micrococcus	Phoma	
Mycobacterium	Sprotichun	
Nocardia	Tolypocladium	
Pseudomonas	Verticillium	
Rhodococcus		
Sarcina		
Serratia		
Streptomyces		
Vibrio		
Xanhomonas		

Fonte: (DE'L ARCO, 1999 e CRAVO JR., 1996 *apud* OLIVEIRA, 2001)

ANEXO XII

Tabela 33. Constituintes do óleo combustível n° 2.

Composto	Amostra N° 1 (% peso)	Amostra N° 2 (% peso)
Parafinas	42,70	41,70
Cicloparafinas		
Mono	23,40	18,80
Di	8,00	9,30
Tri	2,00	2,80
Total	33,40	30,90
Aromáticos	9,70	8,40
Alquilbenzenos	4,80	5,30
Indans+tetralins	1,30	1,10
Alquilnaftalenos	5,30	7,60
Bifenilas, etc	1,30	2,50
Fluorenos, etc	0,70	1,10
Tricíclicos aromáticos	0,80	1,40
Benzenos	47.000 ppm v/v	-
Total	23,90	27,40

Fonte: (Stone Jr., 1991).