



PROGRAMA EQ-ANP

**Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria
do Petróleo e Gás Natural**



**UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO**
UFRJ



**Processo de *Landfarming* para Tratamento
de Resíduos Oleosos**

Leonardo Jordão da Silva

Dissertação de Mestrado

Orientadores

**Profa. Francisca Pessôa de França, D.Sc.
Fernando Jorge Santos de Oliveira, D.Sc.**

Junho de 2009

PROCESSO DE *LANDFARMING* PARA TRATAMENTO DE RESÍDUOS OLEOSOS

Leonardo Jordão da Silva

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

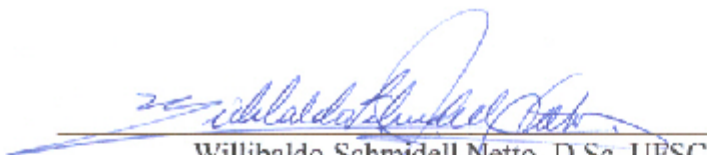
Aprovado por:



Francisca Pessoa de França, D.Sc. EQ-UFRJ
(Orientadora – Presidente da banca)



Fernando Jorge Santos de Oliveira, D.Sc. PETROBRAS
(Co-orientador)



Willibaldo Schmidell Netto, D.Sc. UPSC



Maria Cristina Moreira Alves, D.Sc. POLI-UFRJ



Magali Christe Cammarota, D.Sc. EQ-UFRJ

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Junho de 2009

Ficha catalográfica

Silva, Leonardo Jordão da.

Processo de *Landfarming* para Tratamento de Resíduos Oleosos

Leonardo Jordão da Silva. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2009.

xvi, 91 p.; il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2009. Orientadores: Francisca Pessôa de França / Fernando Jorge Santos de Oliveira.

1. *Landfarming*. 2. Biorremediação. 3. Resíduos. 4. Dissertação. (Mestrado – UFRJ/EQ).

5. Francisca Pessôa de França / Fernando Jorge Santos de Oliveira. I. Título.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais pela idealização
de todos os momentos de minha vida.

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório E-109 do Departamento de Engenharia Bioquímica - Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Aos meus pais Luiz Carlos Baiense da Silva e Helena Maria Jordão Silva, verdadeiros amigos e companheiros de todos os momentos. Aos meus irmãos Flávio e Gustavo fundamentos para tudo o mais na vida. À Andrea Ribeiro pelos momentos de compreensão e carinho.

À Profa. Francisca Pessôa de França, pela orientação sábia e experiente conferida para o desenvolvimento de todas as etapas deste trabalho. Agradeço, também, a disponibilidade de infra-estrutura.

Ao D.Sc. Fernando Oliveira, pela orientação e colaboração indispensáveis para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço, também, pelo exemplo de sabedoria e perseverança.

Ao M.Sc. Aike Costa da Silva pelos conselhos e pela amizade construída.

Aos amigos (Camila Gonzalez, Diogo Dias, Rafael Bittencourt, Ulrich, Jamile, Flávia e Paulo Cesar) do Laboratório E-109 pelos bons momentos.

À Refinaria Isaac Sabbá (REMAN-PETROBRAS) pelo suporte logístico e operacional. Aos engenheiros Antonio Lindolpho de Lima, Carlos Enrique e Ivan Marquezini da REMAN pela disponibilidade de infra-estrutura.

À Agência Nacional do Petróleo – ANP – e à Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP – por meio do Programa de Recursos Humanos da ANP para o Setor de Petróleo e Gás – PRH-ANP/MCT, em particular ao PRH 13, à Escola de Química - Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria do Petróleo e Gás Natural pelo apoio financeiro.

Ao CNPq, FAPERJ e CAPES pelo auxílio financeiro.

Resumo de Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química/UFRJ como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências, com ênfase na área de Petróleo e Gás Natural.

PROCESSO DE *LANDFARMING* PARA TRATAMENTO DE RESÍDUOS OLEOSOS

Leonardo Jordão da Silva
Junho, 2009

Orientadores: Profa. Francisca Pessoa de França, D.Sc.
Fernando Jorge Santos de Oliveira, D.Sc.

As diversas atividades da indústria do petróleo (perfuração, produção, transporte, processamento e distribuição) geram consideráveis quantidades de resíduos sólidos, contendo diversas classes de hidrocarbonetos. A disposição desses resíduos no meio ambiente pode acarretar sérios problemas ambientais. Segundo a Resolução n.º 001/86 do CONAMA, impacto ambiental é definido como a alteração das propriedades físico-químicas e biológicas do meio. Portanto, o tratamento desses resíduos é essencial para promover uma gestão sustentável de exploração e aproveitamento dos recursos minerais. As alternativas de tratamento são variadas, incluindo processos físico-químicos e biológicos, com objetivo de remover poluentes orgânicos a concentrações que sejam indetectáveis ou, se detectáveis, a concentrações inferiores aos limites estabelecidos como seguros ou aceitáveis pelas legislações. Entre as opções biotecnológicas, o processo de *landfarming* apresenta um destaque considerável em função do baixo custo operacional e disponibilidade de tratamento de grandes volumes de resíduos oleosos. Fundamenta-se no potencial de organismos e/ou dos seus produtos em auxiliar na remoção de hidrocarbonetos, dispostos na camada reativa do solo. Este trabalho avalia o tratamento de resíduos oleosos em uma área de 1.000 m² de um *landfarming*. Para tal foram empregadas metodologias operacionais de bioestimulação através de umidificação, fertilização e aeração. Paralelamente foi isolada uma área denominada de célula controle. Para avaliar o desempenho do bioprocessamento foram monitorados parâmetros relevantes, tais como: pH, umidade, teores de carbono orgânico total, fósforo, nitrogênio, elementos químicos (Sb, As, Ba, Be, Cd, Pb, Cu, Cr, Fe, Mn, Hg, Ni, Ag, Se, V e Zn), hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP); hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA); bactérias aeróbias heterotróficas (BAE), fungos filamentosos e bactérias anaeróbias heterotróficas (BAN). Os resultados obtidos, em 225 dias de tratamento, foram promissores considerando o tempo e a concentração inicial de contaminantes. O teor de HTP decresceu 89,6% no solo tratado com uma produtividade média de degradação de 25,8 mg.Kg⁻¹.dia⁻¹, enquanto o solo controle apresentou 22,4% de degradação (6,5 mg.Kg⁻¹.dia⁻¹). A concentração de HPA reduziu em 88,7% (0,13 mg.Kg⁻¹.dia⁻¹) no solo tratado e no controle a degradação atingiu 25,8% (0,04 mg.Kg⁻¹.dia⁻¹). Assim, as técnicas de bioestimulação como fertilização, umidificação e aeração foram fundamentais para o aumento da biodegradação de hidrocarbonetos. A população de BAE, fungos filamentosos e BAN apresentou valor médio de 1,4x10⁷, 2,6x10⁵ UFC.g⁻¹ e 2,2x10⁶ Cels.g⁻¹, respectivamente. O teste de ecotoxicidade no solo tratado foi um indicativo da eficiência do bioprocessamento que pode ser comprovado pela degradação de compostos policíclicos aromáticos. Assim foi possível tratar aproximadamente 387 toneladas de resíduo sólido em 7 meses.

Abstract of a Thesis presented to Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - EQ/UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science with emphasis on Petroleum and Natural Gas.

**LANDFARMING PROCESS FOR TREATMENT
OF OILY SLUDGES**

Leonardo Jordão da Silva

June, 2009

Supervisors: Profa. Francisca Pessôa de França, D.Sc.
Fernando Jorge Santos de Oliveira, D.Sc.

Various activities of the oil industry such as, drilling, production, processing and distribution generate significant volumes of solid waste, containing various classes of hydrocarbons. Provision of such wastes in the environment may lead to serious environmental problems. According to Resolution No. 001/86 of CONAMA, environmental impact is defined as the change of physico-chemical and biological characteristics of the area. Therefore, treatment of wastes is essential to promote sustainable management of exploration and exploitation of mineral resources. Alternatives of treatment are varied processes including physical, chemical and biological agents in order to remove organic pollutants at concentrations that are undetectable or, if detectable, the concentrations below the limits established as well as acceptable by the laws. Among biotechnologies, process of landfarming presents a considerable emphasis on the basis of the low operational cost, and availability of treatment of large volumes of oily wastes. Landfarming is based on the potential of organisms and/or their products to assist in the removal of hydrocarbons, reactive layer in the prepared soil. This work aims the treatment of oily wastes at an area of 1,000 m². Methodologies were used for this operational biostimulation through humidification, fertilization and aeration. Along side was an isolated area known as ground control. To evaluate the performance of the bioprocess were monitored relevant parameters such as pH, humidity, levels of total organic carbon, phosphorus, nitrogen, chemical elements (Sb, As, Ba, Be, Cd, Pb, Cu, Cr, Fe, Mn, Hg, Ni, Ag, Se, V e Zn), total petroleum hydrocarbons (TPH), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), heterotrophic aerobic bacteria (BAE), filamentous fungi and heterotrophic anaerobic bacteria (BAN) during 225 days. Results of work were promising by considering the time and initial concentration of contaminants. Content of TPH decreased 89.6% (25,8 mg.Kg⁻¹.dia⁻¹ of degradation) in the treated soil, while the control soil was negligible degradation of the order of 22.4% (6,5 mg.Kg⁻¹.dia⁻¹). The concentration of PAH decreased 88.7% (0,13mg.Kg⁻¹.dia⁻¹) in the treated soil and control the degradation reached 25.8% (0,04mg.Kg⁻¹.dia⁻¹). Thus, the techniques of biostimulation, i.e. humidification, fertilization and aeration were essential for increasing biodegradation of hydrocarbons. Population of BAE, fungi and BAN showed the average value of 1.4x10⁷CFU.g⁻¹, 2.6x10⁵ CFU.g⁻¹ and 2.2x10⁶ Cels.g⁻¹, respectively. The test of ecotoxicity in treated soil was an indication of efficiency of the process can be proved by the degradation of polycyclic aromatic. Thus it was possible of treated about 387 tonnes of solid waste in 7 months.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Matriz energética mundial	5
Figura 2.2: Estrutura química de alguns compostos presentes no petróleo	6
Figura 2.3: Sistema de <i>Landfarming</i> – Perspectiva superior	19
Figura 2.4: Via metabólica de degradação de hidrocarbonetos lineares	24
Figura 2.5: Rota de biodegradação do ciclohexano por <i>Pseudomonas</i> sp. e <i>Nocardia</i> sp.	25
Figura 2.6: Estrutura química de alguns HPA	26
Figura 2.7: Via degradativa dos hidrocarbonetos aromáticos e policíclicos aromáticos	27
Figura 3.1: Foto de satélite do <i>Landfarming</i>	37
Figura 3.2: Identificação das células do <i>landfarming</i>	38
Figura 3.3: Sistema de umidificação do solo	39
Figura 3.4: Sistema de aeração do solo	40
Figura 4.1: Aspecto inicial do solo submetido a etapa de revolvimento	48
Figura 4.2: Aparência do solo após adequação do sistema	49
Figura 4.3: Curva granulométrica do solo	51
Figura 4.4: Perfil da umidade nas células tratadas e controle	52
Figura 4.5: Perfil dos valores de pH das células tratadas e controle	54
Figura 4.6: Perfil de Carbono Orgânico Total (COT) nas células tratadas	58
Figura 4.7: Perfil de Fósforo (P) e Nitrogênio (N) nas células tratadas e controle	59
Figura 4.8: Relações C:N e C:P nas células tratadas e controle	60
Figura 4.9: Degradação de hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP) nos solos tratados e controle	62
Figura 4.10: Produtividade de degradação de hidrocarbonetos totais do petróleo	63
Figura 4.11: Degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) nos solos tratados e controle	65
Figura 4.12: Produtividade de degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	67

Figura 4.13: Degradação dos 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos segundo a USEPA	68
Figura 4.14: Quantificações de microrganismos nos solos tratados e controle durante o processo de <i>landfarming</i>	72
Figura 4.15: Microscopia do solo em preparação a fresco	74
Figura 4.16: Microscopia de preparações coradas pelo método de Gram	75
Figura 4.17: Microscopia de preparações coradas pelo método de Gram de microrganismos crescidos em meio nutriente	75

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Resíduos perigosos e fontes geradoras de hidrocarbonetos	8
Tabela 2.2: Vantagens e desvantagens do processo <i>landfarming</i>	17
Tabela 2.3: Distribuição da população microbiana em solos e água subterrânea	20
Tabela 2.4: Gêneros microbianos hidrocarbonoclásticos	22
Tabela 2.5: Relação entre a forma de respiração microbiana, aceptores de elétrons e potencial redox	30
Tabela 3.1: Composição do meio Ágar Nutriente	45
Tabela 3.2: Composição do meio Sabouraud	45
Tabela 3.3: Composição da Solução Redutora	46
Tabela 3.4: Composição do meio Fluido ao Tioglicolato	46
Tabela 4.1: Comparativo dos valores de intervenção e de referência de qualidade com os resultados obtidos	55
Tabela 4.2: Concentração de elementos químicos no solo tratado	56
Tabela 4.3: Relação entre número de anéis benzênicos do HPA e respectiva degradação	70
Tabela 4.4: Organismos vivos no ensaio de ecotoxicologia	80

LISTA DE SIGLAS

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANP: Agência Nacional do Petróleo

API: *American Petroleum Institute*

BAE: Bactérias Aeróbias Heterotróficas

BAN: Bactérias Anaeróbias Heterotróficas

CESTEB: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo

CONAMA: Conselho Nacional de Meio Ambiente

COT: Carbono Orgânico Total

EPI: Equipamentos de Proteção Individual

EQ: Escola de Química

HPA: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

HTP: Hidrocarbonetos Totais do Petróleo

MMA: Ministério do Meio Ambiente

MME: Ministério de Minas e Energia

OECD: *Organization for Economic Cooperation and Development*

PCB: Bifenilas Policloradas

PETROBRAS: Petróleo Brasileiro S.A.

UFC: Unidades Formadoras de Colônias

UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro

USEPA: *United States Environmental Protection Agency*

VOC: Compostos Orgânicos Voláteis

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xii
LISTA DE SIGLAS	xiii
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações Gerais	1
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Objetivo Geral	3
1.2.2 Objetivos Específicos	3
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 O Petróleo	4
2.1.1 Origem e Aspectos Gerais	4
2.1.2 Composição Química do Petróleo	5
2.1.3 Atividades Petrolíferas relacionadas a Resíduos Sólidos	7
2.2 Processos de Tratamento de Resíduos Sólidos	9
2.3 Biorremediação de Áreas Contaminadas com Resíduos Sólidos	10
2.3.1 Tecnologias de Biorremediação <i>In Situ</i>	12
2.3.2 Tecnologias de Biorremediação <i>Ex Situ</i>	13
2.3.2.1 <i>Landfarming</i>	13
2.3.2.2 Biopilhas	13
2.3.2.3 Compostagem	14
2.3.2.4 Biorreatores	15
2.4 Processo de <i>Landfarming</i>	15
2.4.1 Histórico e Aspectos Gerais	15
2.4.2 Metodologias de Construção e Operação de <i>Landfarming</i>	18
2.5 Microrganismos Envolvidos em Processos de Biorremediação	19
2.5.1 Mecanismos de Biodegradação de Hidrocarbonetos	23
2.5.1.1 Hidrocarbonetos Alifáticos Lineares e Ramificados	23
2.5.1.2 Hidrocarbonetos Cíclicos	25
2.5.1.3 Hidrocarbonetos Aromáticos	25
2.6 Fatores que influenciam a Biodegradação	28
2.6.1 Propriedades Físico-químicas do Substrato e Adaptação Microbiana	28

2.6.2	Aceptores de Elétrons	29
2.6.3	Teor de Umidade	31
2.6.4	Temperatura	31
2.6.5	pH	32
2.6.6	Nutrientes	33
2.6.7	Concentração de Microrganismos Degradadores de Hidrocarbonetos	34
2.6.8	Biodisponibilidade do Contaminante	35
CAPÍTULO 3: METODOLOGIA		37
3.1	Metodologias Operacionais	37
3.2	Amostragens do Solo	40
3.3	Análises Físicas	41
3.3.1	Umidade	41
3.3.2	pH	41
3.3.3	Granulometria	41
3.4	Análises Químicas	42
3.4.1	Teores de Carbono Orgânico Total (COT), Nitrogênio e Fósforo	42
3.4.2	Hidrocarbonetos Totais do Petróleo (HTP)	43
3.4.3	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA)	43
3.4.4	Elementos Químicos	43
3.5	Análises Biológicas	44
3.5.1	Quantificação de Microrganismos	44
3.5.1.1	Bactérias Aeróbias Heterotróficas (BAE)	44
3.5.1.2	Fungos Filamentosos	45
3.5.1.3	Bactérias Anaeróbias Heterotróficas (BAN)	46
3.5.2	Avaliação Ecotoxicológica	47
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO		48
4.1	Condicionamento do <i>Landfarming</i>	48
4.2	Determinações Físico-Químicas	51
4.2.1	Curva Granulométrica	51
4.2.2	Umidade e pH	52
4.2.3	Elementos Químicos	55

4.2.4 Nutrientes: Fósforo (P), Nitrogênio (N) e Carbono Orgânico Total (COT)	58
4.2.5 Degradação de Hidrocarbonetos Totais do Petróleo (HTP)	62
4.2.6 Degradação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA)	65
4.3 Monitoramento Microbiológico e Ensaio Toxicológico	71
4.3.1 Monitoramento Microbiológico	72
4.3.2 Avaliação Ecotoxicológica	79
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES E SUGESTÕES	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Na indústria do petróleo e derivados é crescente a preocupação com os impactos ambientais decorrentes de suas atividades, que geram volumes consideráveis de resíduos sólidos, dentre os quais solos contaminados por hidrocarbonetos (CASTRO *et al.*, 2005). Portanto, a busca por soluções que apresentem alto desempenho técnico, bem como custos compatíveis com a sua escala de aplicação é uma necessidade urgente dentro do setor de petróleo e gás.

Solos contaminados com hidrocarbonetos podem ser tratados por diversos processos biológicos, físicos, químicos, físico-químicos ou térmicos (MARIANO, 2005). A aplicação de processos biológicos ao tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo é de interesse das comunidades científica e industrial. Os bioprocessos de tratamento utilizam organismos, tais como bactérias e fungos, e/ou vegetais para reduzir ou eliminar compostos perigosos ao meio ambiente (PICADO *et al.*, 2001).

Entre as principais vantagens do emprego dos processos biológicos está o seu baixo custo quando comparado com os processos convencionais. Destaca-se que o processo ocorre com baixo consumo de energia e que causa poucas mudanças nas características físicas, químicas e biológicas no local onde são aplicados (URURAHY, 1998).

Dentre as tecnologias biológicas de tratamento de solos contaminados, enfatiza-se o processo de *landfarming*. Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency* – USEPA), este método consiste em dispor o resíduo na camada reativa do solo, de forma que a microbiota

autóctone atue como agente de biodegradação de hidrocarbonetos. Este processo apresenta diferentes designações, como: *land spreading*, *land application*, *sludge farming*, *soil farming*, *soil incorporation*, *land disposal* e *soil cultivation*.

As técnicas operacionais de um *landfarming* incluem: aeração do solo; umidificação; adição de nutrientes (nitrogênio, fósforo e potássio – macronutrientes); e, em alguns casos, bioaugmentação com microrganismos previamente selecionados. Os microrganismos responsáveis pela biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo são as bactérias (aeróbias e anaeróbias), os fungos e as microalgas (MPHEKGO & CLOETE, 2004).

De acordo com Hamdi *et al.* (2007a), a tecnologia *landfarming* apresenta excelente relação custo-benefício quando comparada aos demais processos de tratamento de resíduos sólidos. No entanto, alguns requisitos operacionais devem ser rigorosamente obedecidos a fim de obter significativa biodegradação de hidrocarbonetos e a formação de metabólitos não tóxicos (ABNT NBR ISO 13.894).

As diversas classes de hidrocarbonetos apresentam diferenciada susceptibilidade ao ataque microbiano. Os hidrocarbonetos mais simples, ou seja, os alifáticos de cadeia curta não ramificada são os mais facilmente decompostos. Por outro lado, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos requerem maior tempo para a decomposição (OLIVEIRA & de FRANÇA, 2004), embora alguns hidrocarbonetos heterocíclicos ramificados, às vezes, sejam mais recalcitrantes que os hidrocarbonetos aromáticos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Adequar o processo de *landfarming*, em escala industrial, às condições de biorremediação conforme norma técnica ABNT NBR ISO 13894 (Tratamento no Solo – *Landfarming*).

1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a granulometria do solo;
- Estabelecer sistemática de aeração, fertilização e umidificação do solo;
- Monitorar as variáveis: umidade e pH no período de tratamento;
- Quantificar no resíduo sólido: carbono orgânico total (COT), nitrogênio, fósforo, elementos químicos (Sb, As, Ba, Be, Cd, Pb, Cu, Cr, Fe, Mn, Hg, Ni, Ag, Se, V e Zn), hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA);
- Avaliar a biodegradação de resíduos sólidos contendo hidrocarbonetos alifáticos, cíclicos e aromáticos, através do processo de *landfarming*;
- Comparar os resultados obtidos com as legislações americana (USEPA), brasileira (CETESB) e holandesa;
- Quantificar os microrganismos autóctones: bactérias aeróbias heterotróficas, fungos e bactérias anaeróbias heterotróficas.

CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O PETRÓLEO

2.1.1 Origem e Aspectos Gerais

A origem do petróleo está relacionada com a decomposição biológica da matéria orgânica sob ação de microrganismos quando em condições que não permitam sua oxidação completa. A interação de condições termo-químicas apropriadas e microbiológicas é fundamental para o processo que leva à formação do petróleo (OLLIVIER & MAGOT, 2005).

Os registros mais antigos da utilização do petróleo datam de períodos anteriores à Era Cristã onde este era obtido de exudações naturais. A exploração comercial do petróleo começou a partir de 1859 com a primeira perfuração de um poço na Pensilvânia, Estados Unidos, por Edwin L. Drake. Ao longo do século XIX surgiu o motor a combustão interna, que foi utilizado em larga escala e promoveu forte impulso na indústria petrolífera. Estes fatos tornaram o petróleo a principal fonte de energia da época, promovendo o desenvolvimento econômico de alguns países (THOMAS *et al.*, 2001).

Segundo dados do Ministério de Minas e Energia (MME), no ano base de 2007, o petróleo e gás natural corresponderam a 54,9% da matriz energética mundial (Figura 2.1). Somando com carvão mineral, as principais fontes fósseis representam 80,9%, com forte potencial de geração de efluentes a base de hidrocarbonetos, os quais impactam o ar, solo e água.

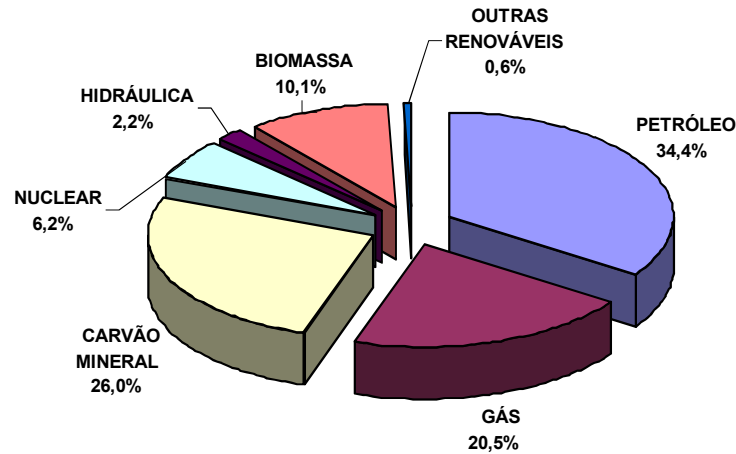


Figura 2.1: Matriz energética mundial (Fonte: MME, 2007)

A indústria do petróleo e gás natural gera poluentes desde as etapas de exploração até a distribuição dos produtos comercializáveis. Por esta razão, o setor tem investido na elaboração de processos de prevenção aos lançamentos inadequados de material no meio ambiente, bem como em pesquisas relacionadas com o tratamento de seus resíduos (MARIANO, 2005). Além disso, as operações de mitigação e de controle do aporte de óleo no meio ambiente visam ampliar a margem de lucro, diminuindo os custos relacionados com a imagem negativa e com o pagamento de multas pela indústria (OLIVEIRA & de FRANÇA, 2004).

2.1.2 Composição Química do Petróleo

Do latim *petra* (pedra) e *oleum* (óleo), o petróleo no estado líquido é uma substância oleosa, inflamável, menos densa que a água, com cheiro característico e cor variando entre o negro e o castanho-claro. Na sua composição química são predominantes as moléculas de hidrocarbonetos e, em menor proporção, compostos oxigenados, nitrogenados e sulfurados e metais pesados como o vanádio, o níquel e outros. Suas propriedades físicas e químicas dependem do sistema petrolífero inerente à bacia sedimentar de formação (THOMAS *et al.*, 2001).

Os compostos orgânicos constituintes do petróleo e a divisão a que pertencem, além de exemplos de estruturas químicas são observados na Figura 2.2

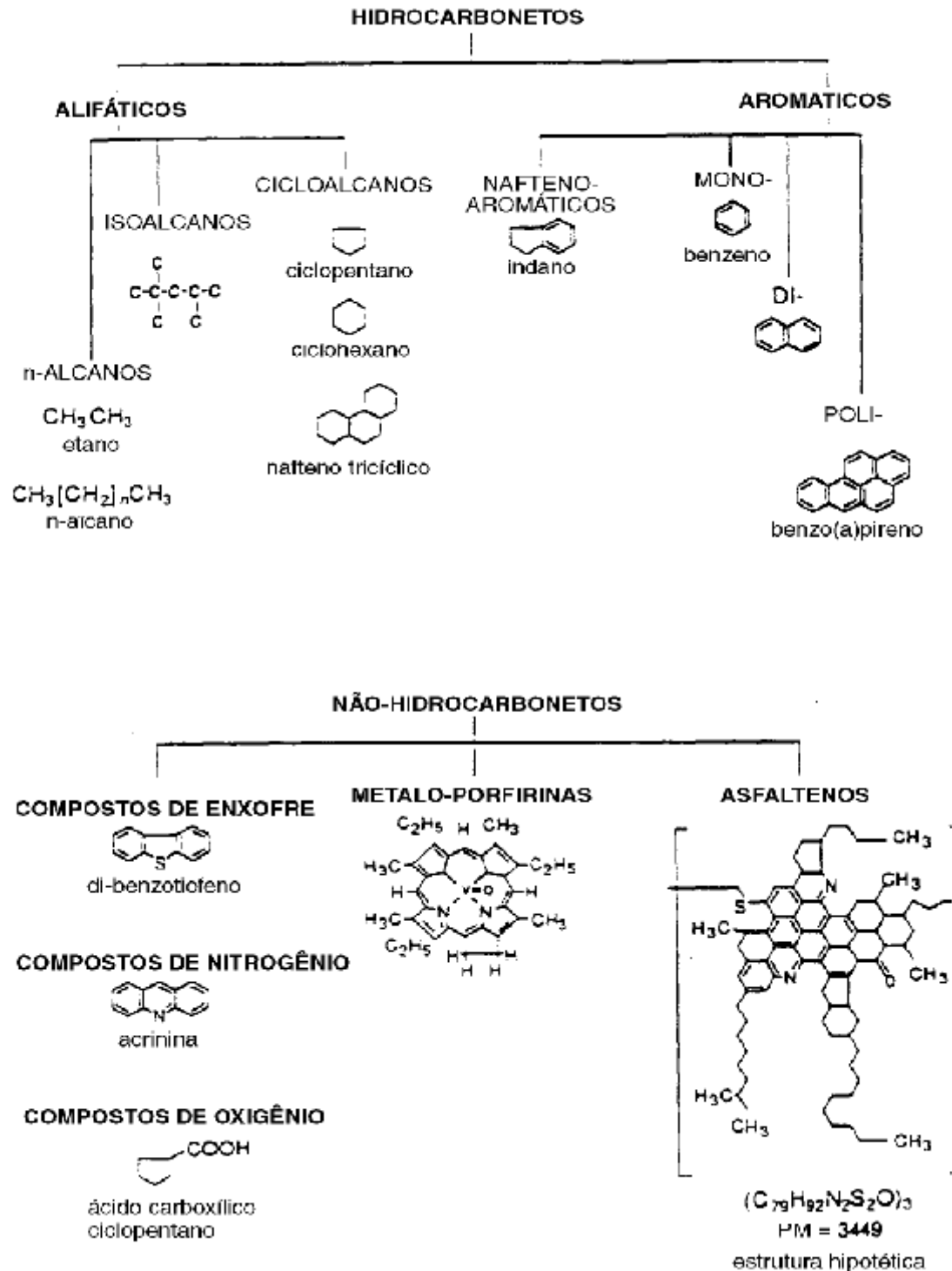


Figura 2.2: Estrutura química de alguns compostos presentes no petróleo.
(Fonte: SEABRA, 2006)

A proporção destes compostos na composição do petróleo determina a sua classificação: parafínicos, naftênicos, aromáticos intermediários, parafínico-naftênicos, aromático-naftênicos e aromático-asfálticos (THOMAS *et al.*, 2001).

Em função dessa classificação, pode-se dimensionar a quantidade das diversas frações que podem ser obtidas, assim como sua possível composição e propriedades físico-químicas. Durante o processamento, o petróleo sofre uma série de beneficiamentos para a obtenção de frações desejadas, que posteriormente serão submetidas a processos de tratamentos visando à obtenção de diferentes produtos finais (MARIANO, 2005).

2.1.3 Atividades Petrolíferas relacionadas a Resíduos Sólidos

As diversas atividades da indústria do petróleo (perfuração, produção, transporte, processamento e distribuição) geram resíduos sólidos e líquidos na forma de lamas, borras, efluentes líquidos, gasosos, etc. (OLLIVIER & MAGOT, 2005).

Os resíduos oleosos gerados nas operações de perfuração e produção incluem: fluidos de perfuração; óleo cru; produtos químicos; filtros usados; areia produzida; água produzida contaminada com hidrocarbonetos; borras de separadores de água-óleo-gás; resíduos de desidratação; fluidos hidráulicos e lubrificantes. Na etapa de transporte e distribuição, o óleo e os combustíveis podem ser decorrentes de vazamentos de oleodutos e gasodutos assim como da limpeza de tanques de armazenamento (USEPA, 2009).

Na etapa de processamento do petróleo em refinarias ocorre geração de resíduos sólidos nas unidades de separação (colunas de destilação – atmosférica e à vácuo –, separadores de água-óleo, dessalinizadores, etc.), nas operações de conversão (craqueamento térmico e catalítico, coqueamento, alquilação, hidrotreatamento, etc.), no tratamento de efluentes (Tratamento Bender, Merox, DEA, etc.) e nas operações

auxiliares (trocadores de calor, tanques de estocagem, torres de resfriamento, etc.) (MARIANO, 2005).

Os resíduos gerados nas refinarias, de acordo com a ABNT NBR ISO 10.004, assim como seus constituintes perigosos estão listados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Resíduos perigosos e fontes geradoras de hidrocarbonetos em refinarias de petróleo

Fonte: ABNT NBR ISO 10.004

Resíduo perigoso	Constituintes perigosos
Sedimento do tanque de armazenamento de óleo cru, das operações de refino de petróleo	Benzeno
Borra clarificada do resíduo do tanque de óleo e/ou sólidos dos separadores/filtros de linha das operações de refino de petróleo	Benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, *, **
Catalisador gasto proveniente do hidrotreatamento das operações de refino de petróleo, incluindo leitos usados para dessulfurizar as alimentações para outros reatores catalíticos	Benzeno, arsênio
Lodo resultante da separação secundária de água/óleo emulsificado de refinaria de petróleo. Qualquer lodo e/ou material flotante gerado da separação física e/ou química de água/óleo no processo de efluentes líquidos oleosos de refinarias de petróleo.	Benzeno, benzo[a]pireno, criseno, chumbo, cromo
Resíduos de fundo de destilador	Benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, dibenzo[a,h]antraceno, indeno[1,2,3-cd]pireno

* metilbenzilciclopentaaantraceno; ** 7,12-dimetilbenzo[a]antraceno

De acordo com Paudyn *et al.* (2007), as refinarias, além dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), geram outros compostos tóxicos tais como cádmio, bário, mercúrio, selênio e prata, compostos orgânicos como as bifenilas policloradas (PCB) e hidrocarbonetos halogenados.

O mecanismo de formação de HPA deve-se à repolimerização de fragmentos de hidrocarbonetos formados durante o craqueamento sob condição de baixa oxigenação. Os fragmentos perdem, com frequência, uma pequena quantidade de hidrogênio, que forma água após combinar-se com oxigênio durante as etapas da reação. Os fragmentos

ricos em carbono combinam-se para formar os HPA, que são moléculas mais estáveis com razão C:H elevada (HARMSSEN *et al.*, 2007).

A disposição desses resíduos no meio ambiente pode acarretar sérios problemas ambientais. Segundo a Resolução n.º 01/1986 do CONAMA, impacto ambiental é definido como a alteração das propriedades físico-químicas e biológicas do meio ambiente, alteração esta provocada direta ou indiretamente por atividades humanas, as quais afetam a saúde, segurança, bem-estar da população, atividades sócio-econômicas, biota, condições estéticas e sanitárias do meio. Portanto, o tratamento desses resíduos é essencial para promover uma gestão sustentável de exploração e aproveitamento dos recursos naturais.

2.2 PROCESSOS DE TRATAMENTO DE RESÍDUOS SÓLIDOS

O objetivo do tratamento de resíduos sólidos é degradar poluentes a concentrações que sejam indetectáveis ou, se detectáveis, a concentrações inferiores aos limites estabelecidos como seguros ou aceitáveis pelas legislações. Técnicas biológicas, físicas e químicas podem ser usadas em série ou em paralelo para reduzir a contaminação ambiental por hidrocarbonetos do petróleo a níveis aceitáveis (RISER-ROBERT, 1998).

Os processos físico-químicos geralmente baseiam-se nas diferentes propriedades dos contaminantes, tais como acidez, temperatura, potencial de precipitação e solubilidade. São exemplos desses processos: neutralização, oxidação, precipitação, estabilização/solidificação, adsorção em carvão ativo, destilação, troca iônica, eletrólise, osmose inversa e extração por solvente (URURAHY, 1998).

Atualmente as Tecnologias Verdes (*Green Technologies*), onde estão inseridos os processos biológicos, apresentam maior aceitabilidade do que os métodos físico-

químicos de remediação, visto que apresentam baixo custo, possibilidade de aplicação para tratamento *in situ*, e eficiência elevada para a biodegradação de diversos contaminantes (PEREIRA, 2008).

2.3 BIORREMEDIAÇÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS COM RESÍDUOS OLEOSOS

A biorremediação baseia-se na capacidade de alguns organismos (microrganismos e/ou plantas) crescerem na presença de contaminantes, removendo estas substâncias devido à ação de seu metabolismo ou mesmo acumulando tais compostos (VIDALLI, 2001).

O uso de microrganismos na biorremediação pode ocorrer por espécies autóctones, alóctones ou combinação de ambos, que através do metabolismo correspondente podem formar compostos menos tóxicos ou promoverem total mineralização do contaminante produzindo dióxido de carbono e água. Por ser uma técnica aplicada em diferentes tipos de ambientes, a biorremediação envolve diversas áreas do conhecimento humano como a Microbiologia, Engenharia, Ecologia, Geologia e Química (BOOPATHY, 2000).

De acordo com Ollivier & Magot (2005) existem alguns métodos aplicados à biorremediação para acelerar a biodegradação de hidrocarbonetos. Estes métodos podem ser divididos em bioestimulação e bioaumentação:

1. Bioestimulação: é definida como a melhoria dos fatores ambientais e, dentre eles, destacam-se o pH, o teor de umidade, a temperatura, a correção de nutrientes (fontes de carbono orgânico, fósforo, nitrogênio, etc.) e de aceptores finais de elétrons;

2. Bioaugmentação: aceleração e aumento da eficiência de degradação do poluente pela inserção de linhagens hidrocarbonoclásticas alóctones que vão agir concomitantemente com os microrganismos autóctones.

Segundo Bento *et al.* (2005), a melhor performance da bioaugmentação pode ser atingida pelo emprego dos microrganismos previamente selecionados aumentando assim a população e diversidade microbiana. A partir desse pressuposto, o aumento da comunidade microbiana específica, em conjunto com a adição de nutrientes, promove uma redução substancial no tempo de tratamento. Neste artigo foi obtido, através da bioaugmentação, uma maior degradação de hidrocarbonetos das frações leves (75,2%) e pesadas (72,7%) para um solo contaminado com óleo diesel.

Por outro lado, Del'Arco & de França (1999) utilizaram um consórcio microbiano obtido de um *landfarming* e associado aos microrganismos autóctones para o processo de biorremediação de um sedimento arenoso, contendo óleo árabe leve. A adição do inóculo, no começo do experimento, resultou num aumento de 31% da eficiência de remoção da fração pesada do óleo, quando comparada à amostra sem bioaugmentação. Isto demonstra que a introdução de uma cultura exógena também pode estimular o processo de biodegradação.

As tecnologias de biorremediação podem ser divididas em duas categorias, *in situ* e *ex situ*. Os processos são classificados como *in situ* quando as operações são realizadas nos locais contaminados, ou seja, sem que haja a remoção do material. Quando o tratamento ocorre fora do local atingido, classifica-se o processo como *ex situ* (USEPA, 2009).

2.3.1 Tecnologias de Biorremediação *In Situ*

O *bioventing* e o *biosparging* são tratamentos semelhantes, usando injeção de ar atmosférico. A aeração objetiva o suprimento de oxigênio ao ambiente, favorecendo o crescimento de microrganismos aeróbios que utilizam este elemento como aceptor final de elétrons, viabilizando a biodegradação do poluente (TRINDADE *et al.*, 2005). A diferença entre as duas técnicas está relacionada com o local onde o ar é injetado; na zona saturada do solo, no caso do *bioventing*, e na zona insaturada, no caso do *biosparging*. Essas técnicas apresentam baixo custo, requerem o uso de poucos equipamentos e técnicos. No entanto, apresentam a dificuldade de aplicação em solos argilosos, principalmente quando estes têm elevado grau de compactação e elevado teor de umidade, o que dificulta a passagem do ar devido ao aumento da perda de carga (BOOPATHY, 2000).

A fitorremediação é definida como o uso de vegetais superiores para facilitar a aeração do local, degradar, reter ou eliminar os contaminantes do solo. Neste processo pode atuar o vegetal e/ou microrganismos colonizadores. No primeiro caso, o crescimento das raízes e sua penetração no solo favorecem a aeração, podendo ocorrer a adsorção do contaminante em seus tecidos (ALEXANDER, 1999), assim como metabolização das substâncias tóxicas.

A atenuação natural ou a biorremediação intrínseca é uma técnica que consiste na opção de não se intervir no local impactado, deixando que os fenômenos naturais atuem como agentes de remediação. Embora pareça um método cômodo, a biorremediação intrínseca requer constante monitoramento e adequação das análises requeridas ao acompanhamento do processo que auxiliam na avaliação da eficácia do tratamento (VIDALLI, 2001).

2.3.2 Tecnologias de Biorremediação *Ex Situ*

2.3.2.1 *Landfarming*

O *landfarming* é o processo de biorremediação onde os resíduos contaminados com hidrocarbonetos são misturados na camada superficial do solo, em local previamente preparado. Esta tecnologia visa favorecer a biorremediação por viabilizar a redução da concentração dos contaminantes no solo por ação de microrganismos através de operações adequadas de manejo e gestão do solo (PAULA *et al.*, 2006).

Para que este processo apresente a eficiência requerida, faz-se necessário a adição de nutrientes, especialmente fósforo, nitrogênio e potássio, pois o aumento da concentração de carbono orgânico no solo aumenta a demanda de nutrientes pelos microrganismos (PAUDYN *et al.*, 2007).

Além disso, podem ser feitas outras adequações no solo que incluem a adição de água para aumentar a umidade, e a adição de óxidos de cálcio e/ou magnésio para corrigir o pH. Em geral, ocorre maior degradação de hidrocarbonetos em solo de pH neutro, pois as bactérias são reconhecidas como principais agentes da biodegradação (MPHEKGO & CLOETE, 2004). Considerando-se que nosso trabalho refere-se ao processo de *landfarming*, o mesmo será descrito com mais detalhes no item 2.4.

2.3.2.2 Biopilhas

O processo de biopilha é uma variante do *landfarming*, onde estão incluídos também sistemas de adição de água e nutrientes, aeração e impermeabilização da área de disposição do material contaminado com materiais sintéticos; além disso, a disposição de material é feita em forma de pilha, havendo sistemas para coleta da lixívia e para tratamento dos gases gerados (ALEXANDER, 1999).

De acordo com Seabra (2006), as biopilhas são construídas de tal forma que passe, sob elas, um duto perfurado com a finalidade de recolher o material lixiviado e succionar o ar das colunas do solo promovendo vácuo, que força, por sua vez, a renovação do ar no interior do sistema, através da entrada de uma nova corrente. Esta tecnologia pode incluir, ainda, um sistema de irrigação com o objetivo de manter as condições ideais de umidade e até mesmo adicionar populações hidrocarbonoclásticas alóctones, aumentando a eficiência do tratamento.

Convém destacar que o emprego de materiais orgânicos oriundos dos resíduos sólidos urbanos pode favorecer a degradação de hidrocarbonetos nas biopilhas, por aumentar a população microbiana. No entanto, no primeiro momento, pode ocorrer a degradação preferencial de carboidratos ao invés de hidrocarbonetos (SEMPLE *et al.*, 2001).

2.3.2.3 Compostagem

Outra variante do *landfarming* é a compostagem. Nesta tecnologia ocorre a adição de um agente estruturante ao solo, a fim de aumentar a sua permeabilidade, conseqüentemente promovendo maior velocidade de transferência de oxigênio. Normalmente, utilizam-se os seguintes materiais como agentes estruturantes: palha, pedaços de grama e madeira, folhas, bagaço de cana e serragem. Devido à natureza orgânica destes materiais, os agentes estruturantes atuam como fontes de carbono capazes de favorecer o rápido estabelecimento de uma população numerosa (RISER-ROBERT, 1998). Porém, às vezes, a biodegradação do poluente é prejudicada pela utilização destes agentes pelos microrganismos lignolíticos, levando a problemas de competição entre os grupos microbianos (SEMPLE *et al.*, 2001).

2.3.2.4 Biorreatores

Biorreatores de vários tipos têm sido desenvolvidos principalmente para o tratamento de efluentes líquidos, entretanto tais sistemas atualmente também estão sendo usados para resíduos sólidos (URURAHY, 1998). Os custos são mais altos do que os tratamentos *in situ*, pois há gastos adicionais com o transporte do material contaminado, construção de equipamentos para uma particular descontaminação, mão-de-obra adicional e energia. Podem ser extremamente úteis em degradar compostos altamente recalcitrantes (RISER-ROBERT, 1998).

Geralmente, nos biorreatores os microrganismos podem ser utilizados de duas formas distintas: livres ou imobilizados. No entanto, somente a primeira forma tem sido utilizada para tratar resíduos sólidos. Nela, os microrganismos são mantidos em suspensão, podendo crescer livremente no seio do meio líquido ou aderidos ao solo que está em suspensão. Estes biorreatores podem ser agitados mecanicamente ou por injeção contínua de ar (ALEXANDER, 1999).

O tipo mais comum no tratamento de solo contaminado consiste em sistemas que operam em fase semi-sólida, com uma porcentagem de água variando entre 40 e 90% (v/v) (URURAHY, 1998).

2.4 PROCESSO DE *LANDFARMING*

2.4.1 Histórico e Aspectos Gerais

A utilização do solo para o tratamento de resíduo teve início na Europa no final do século XIX com a técnica de irrigação de áreas cultivadas com águas residuárias sanitárias. No início dos anos 50, o processo de tratamento no solo despertou interesse nas empresas de refino de petróleo dos Estados Unidos, sendo as primeiras a

desenvolver e praticar o tratamento no solo para seus resíduos e, para este processo de tratamento específico, elas deram o nome de *landfarming* (GENOUW *et al.*, 1994).

Outro país que desenvolveu o tratamento no solo foi a Alemanha, sendo que no ano de 1960 já estavam em operação 60 áreas para tratamento de resíduo no solo, e até o ano de 1987 esse processo ocupava uma área de 20.000 hectares (LINE *et al.*, 1996).

No Brasil, o *landfarming* foi introduzido pela PETROBRAS quando, no ano de 1982, colocou em funcionamento uma unidade na Refinaria Henrique Lage, na cidade de São José dos Campos, Estado de São Paulo. Desde então, a PETROBRAS iniciou a implantação de *landfarming* em outras refinarias (CASTRO *et al.*, 2005).

No ano de 1984, a Central de Tratamento de Efluentes Líquidos (CETREL), em Camaçari (BA), implantou duas unidades de *landfarming* em uma área de 20 hectares para o pós-tratamento do resíduo originado dos tratamentos químico e biológico dos efluentes gerados no complexo industrial de Camaçari (ALVES *et al.*, 1996).

De acordo com o *American Petroleum Institute* (API), em 1983, pelo menos um terço das refinarias norte-americanas operava com *landfarming* em escala industrial.

A Holanda, em 1989, iniciou o funcionamento do primeiro *landfarming* para tratar 500 m³ de resíduo contaminado com HPA e óleo mineral. Nesse país a legislação vigente prescreve as medidas de prevenção contra a percolação de contaminantes para o subsolo, lençol freático e águas superficiais (MARIJKE & van VLERKEN, 1998).

Jatar *et al.* (1993) avaliaram a aplicação de *landfarming* em condições de clima tropical, na Venezuela. Trabalharam em uma área de 1 hectare e usaram técnicas de umidificação, homogeneização, bioaugmentação e fertilização. O teor de HTP reduziu em 80% após um período de 9 meses de tratamento.

Segundo Al-Awadhi *et al.* (1996), durante a crise do Golfo, o Kuwait sofreu ataques bélicos, resultando em perdas de seus poços de petróleo, o que levou à formação

de 300 lagos de óleo em uma área de 49 km², com penetração no subsolo até a profundidade de 2,5 m. Foi estimado um derrame de 9x10⁶ m³ de óleo, equivalente a 25x10⁶ m³ de solo contaminado. A recuperação via biorremediação da área contaminada com óleo iniciou-se em novembro de 1992, com a implantação de 16 unidades de *landfarming*. Após 15 meses de operação, a redução da carga poluente atingiu 80%.

Castro *et al.* (2005) estudaram a otimização do *landfarming* da RPBC (Refinaria Presidente Bernardes), e a correção do pH do solo e fertilização da camada reativa resultaram em aumento da população microbiana, e consequente maximização da biodegradação de hidrocarbonetos.

Paudyn *et al.* (2007) estabeleceram quatro sistemáticas de operação em um *landfarming* canadense, sob condição de baixa temperatura: atenuação natural; aeração em intervalos de quatro dias; aeração diária; e adição de fertilizante mais aeração em intervalos de 4 dias. O resultado do efeito sinérgico de adição de fertilizante acrescida de aeração foi a redução de 90% de HTP em 700 dias. Ressaltam ainda que compostos orgânicos recalcitrantes como pristano e fitano foram degradados.

Os aspectos positivos e negativos relacionados ao processo de *landfarming* estão apresentados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2: Vantagens e desvantagens do processo *landfarming*

Fonte: MPHEKGO & CLOETE, 2004

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> - Requer pequeno capital para implantação e operação; - Possibilidade tratar grande volume de resíduo sólido; - Pode ser aplicado <i>ex situ</i>; - Resulta em pequeno impacto ao meio ambiente; - Eficiência energética. 	<ul style="list-style-type: none"> - Limitado em relação à remoção de compostos orgânicos recalcitrantes; - Necessidade de grande área; - Pode acarretar problemas de emissão de compostos orgânicos voláteis e contaminação do lençol freático; - Presença de metais pesados pode inibir as atividades de biodegradação.

Em função desses fatos, a tecnologia *landfarming* fomenta o interesse das comunidades científica e industrial, com o objetivo de maximizar a eficiência do processo.

2.4.2 Metodologias de Construção e Operação de *Landfarming*

O *landfarming* é uma tecnologia de biorremediação na qual os resíduos são espalhados e misturados à camada reativa do solo, de forma controlada, a fim de que a própria microbiota do solo atue como agente de degradação. O processo é realizado em grandes áreas, já que a biodegradação se dá na camada superior do solo, onde a aerobiose é garantida. Os hidrocarbonetos no solo podem sofrer volatilização e biodegradação (MPHEKGO & CLOETE, 2004).

A norma ABNT NBR ISO 13.894 (Tratamento no Solo – *Landfarming*) estabelece que o projeto, construção, operação e manutenção da unidade devem ser realizados de forma a elevar ao máximo a degradação, a transformação e/ou imobilização de contaminantes da camada reativa do solo.

Esta norma preconiza, ainda, alguns requisitos relativos à topografia, solos e geologia, recursos hídricos, vegetação, vias de acesso, distância a núcleos populacionais, entre outros aspectos.

Portanto, todo um preparo da área é exigido, a fim de que se reduzam, ao máximo, os riscos de contaminação de lençóis freáticos por lixiviação de poluentes (USEPA).

A construção de um *landfarming* previne ou minimiza a transferência de contaminantes para áreas adjacentes devido a existência de uma barreira lateral e camada impermeabilizante, que pode ser de polietileno de alta densidade ou argila compactada. A Figura 2.3 apresenta o sistema sob perspectiva superior.

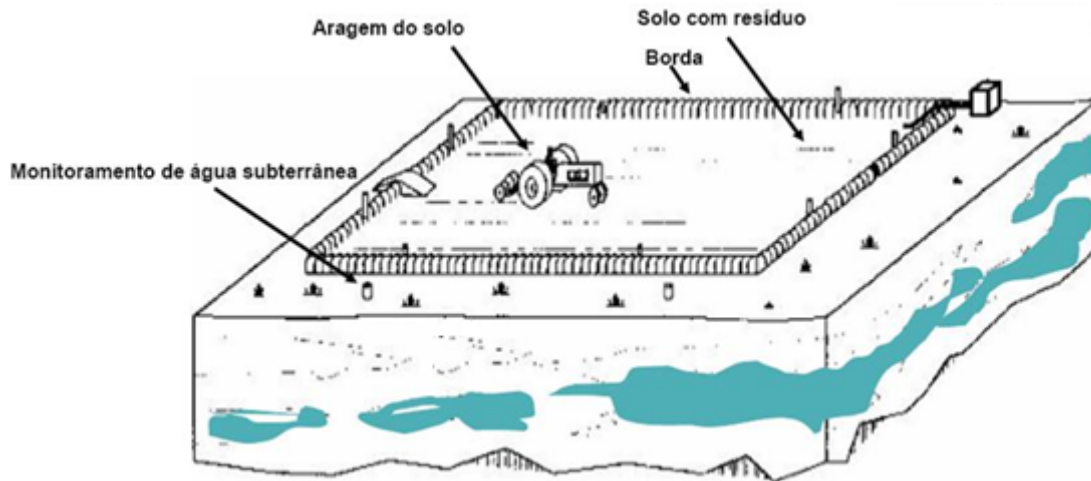


Figura 2.3: Sistema de *Landfarming* – Perspectiva superior
Fonte: Adaptado de MPHEKGO & CLOETE, 2004

As técnicas operacionais envolvem adição de nutrientes, umidificação, aeração e correção do pH do solo. Os macronutrientes adicionados são compostos a base de nitrogênio, fósforo e potássio sob a forma de fertilizantes comerciais e/ou uréia (MPHEKGO & CLOETE, 2004). A correção do pH do solo pode ser feita pela adição de óxidos de cálcio e magnésio. A aeração do solo é viabilizada através de arado acoplado a trator (MARIN *et al.*, 2005).

A USEPA desenvolveu um guia para implantação, operação e monitoramento de *landfarming*. Este algoritmo contempla questões relativas às características físico-químicas e biológicas do sistema, assim como condições climáticas do local de instalação.

2.5 MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS EM PROCESSOS DE REMEDIAÇÃO

A microbiota altamente heterogênea do solo inclui a presença de um grande número de microrganismos capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia. Dentre os vários agentes que possuem a habilidade de degradar hidrocarbonetos

estão as bactérias e fungos. Porém, a contribuição de cada um varia com os fatores ambientais e as propriedades físico-químicas do solo (OLLIVIER & MAGOT, 2005).

A distribuição da população microbiana no solo está tipicamente associada ao conteúdo de matéria orgânica natural, a qual serve como estoque de micronutrientes (ferro, manganês, zinco, cobre, molibdênio, cloro e boro) e macronutrientes (carbono, nitrogênio, potássio, cálcio, magnésio, fósforo e enxofre). À medida que a profundidade aumenta, a população e a diversidade microbiana reduzem devido à diminuição dos teores de matéria orgânica e oxigênio (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). Essa tendência pode ser observada pela Tabela 2.3.

Quando a população microbiana é exposta aos compostos orgânicos do poluente ocorrem mudanças genéticas e um crescimento seletivo desta população em relação aos microrganismos degradadores os quais se apresentam em maiores proporções. Em ambientes não poluídos, geralmente os microrganismos degradadores constituem menos do que 1% da população microbiana. Já em ambientes contaminados esta proporção é de 1 a 10% (ATLAS, 1995).

Tabela 2.3: Distribuição da população microbiana em solos e água subterrânea

Microrganismos	Densidade Microbiana
	Superfície (Cels/g)
Bactérias	$10^8 - 10^9$
Actinomicetos	$10^7 - 10^8$
Fungos	$10^5 - 10^6$
Algas	$10^4 - 10^5$
	Subsolo (Cels/g)
Bactérias	$10^3 - 10^7$
	Água Subterrânea (Cels/mL)
Bactérias	$10^2 - 10^5$

Fonte: TRINDADE, 2002

A diversidade metabólica e o curto tempo de geração das bactérias caracterizam-nas como boas iniciadoras das reações de biodegradação de hidrocarbonetos. Dentre os

gêneros de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos (hidrocarbonoclasticas) predominam *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Nocardia*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* e *Micrococcus* (BOOPATHY, 2000).

Os fungos são considerados mais eficientes sob condições adversas do processo, como valores extremos de pH, limitação de nutrientes e baixo teor de umidade. Adicionalmente estes não apresentam prioridade quanto ao ataque ao substrato, embora os mecanismos de biodegradação sejam praticamente idênticos ao bacteriano. Dentre os fungos filamentosos, algumas linhagens de *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. são citadas como sendo capazes de degradar uma maior quantidade de hidrocarbonetos (ATAGANA *et al.*, 2006).

Em alguns estudos envolvendo a utilização de hidrocarbonetos de petróleo por leveduras, relatou-se que diferentes espécies do gênero *Candida* demonstraram preferência em degradar hidrocarbonetos de cadeias lineares. Outros trabalhos relevaram que leveduras pertencentes aos gêneros *Sporobolomyces* e *Rhodotorula* foram capazes de degradar hidrocarbonetos alifáticos, cíclicos e aromáticos (DEL'ARCO & de FRANÇA, 1999). Atlas (1995) citou outros gêneros de leveduras com esta mesma habilidade: *Saccharomyces* e *Trichosporium*.

Oliveira (2001) verificou que um consórcio microbiano constituído por linhagens dos gêneros *Pseudomonas*, *Serratia*, *Bacillus*, *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Streptomyces* foi capaz de degradar 100% dos *n*-alcanos, compreendidos entre o decano e o eicosano, e 40% dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos avaliados (1-metil-naftaleno, 2-metil-naftaleno, fluoreno, pireno, criseno, fenantreno, benzo(a)antraceno e benzo(b)fluoretano).

Lima (2002) avaliou a biodegradação de hidrocarbonetos em processos de *landfarming* e identificou os seguintes gêneros microbianos: *Proteus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Shigella*, *Klebsiella* e *Enterobacter*.

A partir do exposto, torna-se clara a habilidade de utilização de hidrocarbonetos por diversas espécies de microrganismos. A Tabela 2.4 apresenta os principais gêneros potencialmente degradadores de petróleo e seus derivados.

Tabela 2.4: Gêneros microbianos hidrocarbonoclasticos

Bactérias	Fungos			
	Actinomicetos	Leveduras	Bolors	
<i>Achromobacter</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Candida</i>	<i>Acremonium</i>	<i>Graphium</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Endomyces</i>	<i>Debaryomyces</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Humicola</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>Aureobasidium</i>	<i>Lulworthia</i>
<i>Agrobacterium</i>		<i>Sporobolomyces</i>	<i>Beauveria</i>	<i>Mortierella</i>
<i>Alcaligenes</i>		<i>Yarrowia</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Mucor</i>
<i>Arthrobacter</i>		<i>Picchia</i>	<i>Ceriporiopsis</i>	<i>Oxyoirus</i>
<i>Bacillus</i>			<i>Chrysosporium</i>	<i>Paecilomyces</i>
<i>Brevibacterium</i>			<i>Cladosporium</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Burkholderia</i>			<i>Cochliobolus</i>	<i>Phialophora</i>
<i>Chromobacterium</i>			<i>Colorospora</i>	<i>Phoma</i>
<i>Comamonas</i>			<i>Coniothyrium</i>	<i>Pleurotus</i>
<i>Corynebacterium</i>			<i>Corioloopsis</i>	<i>Rhizopus</i>
<i>Cytiphaga</i>			<i>Cryphonectria</i>	<i>Scolecobasidium</i>
<i>Flavobacterium</i>			<i>Cylindrocarpon</i>	<i>Scopulariopsis</i>
<i>Gluconobacter</i>			<i>Dendosporium</i>	<i>Sprotrichum</i>
<i>Micrococcus</i>			<i>Dendryphiella</i>	<i>Spicaria</i>
<i>Mycobacterium</i>			<i>Drechslera</i>	<i>Tolypocladium</i>
<i>Pasteurella</i>			<i>Fusarium</i>	<i>Trametes</i>
<i>Proteus</i>			<i>Geotrichum</i>	<i>Trichoderma</i>
<i>Pseudomonas</i>			<i>Glicocladium</i>	<i>Varicosporina</i>
<i>Rhodococcus</i>			<i>Gongronella</i>	<i>Verticilium</i>
<i>Sarcina</i>				
<i>Serratia</i>				
<i>Streptomyces</i>				
<i>Vibrio</i>				
<i>Xanthomonas</i>				

Fonte: URURAHY, 1998; CRAVO, 1998; DEL'ARCO, 1999; OLIVEIRA, 2001; TRINDADE, 2002; SILVA, 2005; PEREIRA, 2008.

2.5.1 Mecanismos de Biodegradação de Hidrocarbonetos

A biodegradabilidade dos componentes do petróleo é dependente primeiramente de sua estrutura química, sendo influenciada também pelo estado físico e pela toxicidade dos compostos. O aumento das cadeias implica em uma maior complexidade estrutural e, conseqüentemente, em uma diminuição do número de microrganismos capazes de degradar estes compostos. Algumas das maiores estruturas moleculares são insolúveis e a maioria das bactérias pode somente utilizar os compostos dissolvidos em água (ATLAS, 1995).

A degradação pode ocorrer através do metabolismo de respiração aeróbia ou anaeróbia. Na primeira atuam inicialmente as enzimas oxigenases para inserir átomos de oxigênio na molécula de hidrocarboneto e, posteriormente, este elemento funciona como acceptor final de elétrons, sendo os produtos finais do metabolismo dióxido de carbono, água ou compostos resultantes da degradação parcial dos hidrocarbonetos (OLLIVIER & MAGOT, 2005).

A degradação anaeróbia utiliza outros compostos como sulfato e nitrato como aceptores finais de elétrons, podendo ocorrer a formação de metano, sulfeto e nitrito (STREVETT *et al.*, 2002).

Diante da evidência de se encontrar um número extenso de microrganismos capazes de consumir hidrocarbonetos, estudos mais aprofundados envolvendo aspectos bioquímicos e mecanismos de degradação vêm sendo desenvolvidos. A seguir serão abordados alguns destes mecanismos.

2.5.1.1 Hidrocarbonetos Alifáticos Lineares e Ramificados

Os hidrocarbonetos alifáticos são os compostos do petróleo preferencialmente degradados pelos microrganismos. O início do processo se dá por ação de enzimas

monoxigenases, capazes de oxidá-los aos alcoóis correspondentes que são posteriormente transformados em aldeídos e ácidos graxos (RISER-ROBERT, 1998).

Del'Arco (1999) ressalta que existem outras rotas menos importantes como a que transforma *n*-alcanos em produtos hidroxilados, que depois são convertidos em álcoois correspondentes. Outra via metabólica consiste em oxidações subterminais que geram álcoois secundários, que são oxidados a ésteres e depois clivados, formando um ácido e um álcool que depois serão novamente oxidados. Estes compostos são metabolizados através do ciclo de Lynen ou β -oxidação. A Figura 2.4 apresenta a rota bioquímica de degradação de hidrocarbonetos lineares.

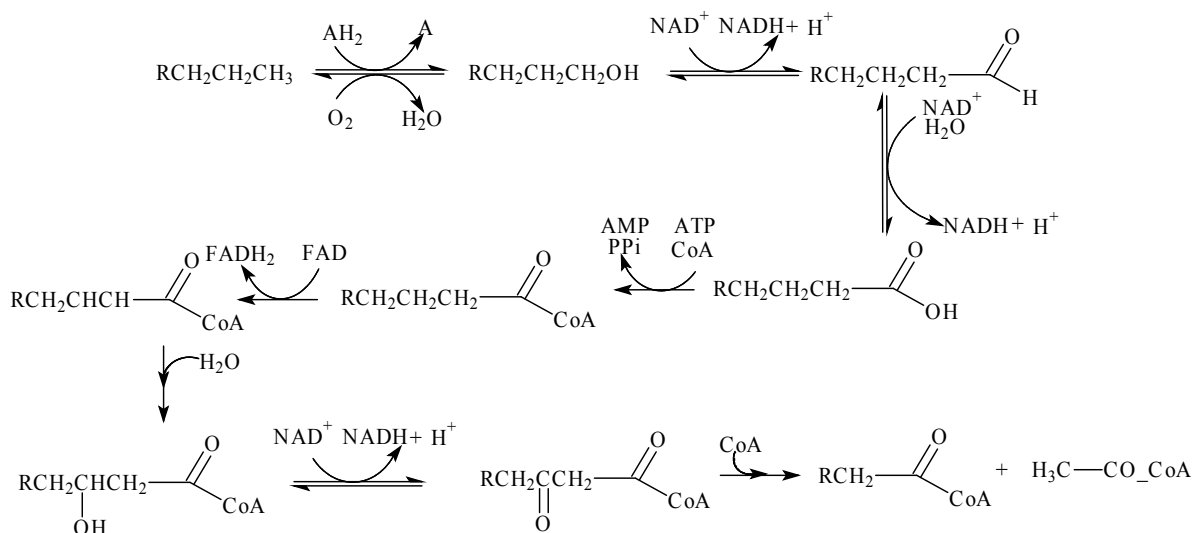


Figura 2.4: Via metabólica de degradação de hidrocarbonetos lineares
Fonte: RISER-ROBERT, 1998

Segundo Oliveira (2001), iso-alcanos de cadeia ramificada são menos susceptíveis ao ataque microbiano do que os *n*-alcanos equivalentes devido ao impedimento estérico oferecido às enzimas oxidativas, em especial quando estas ramificações ocorrem em posição β e constituem compostos ramificados quaternários.

2.5.1.2 Hidrocarbonetos Cíclicos

A degradação de formas não substituídas de cicloalcanos ocorre mais facilmente do que as formas substituídas e quanto maior o número de anéis condensados, maior a recalcitrância do cicloalcano. A degradação das cicloparafinas se dá por meio da ação de enzimas monoxigenases com a formação de um intermediário hidroxilado, que é subsequentemente oxidado a cetonas, lactonas e ácidos carboxílicos, como exemplificado na Figura 2.5.

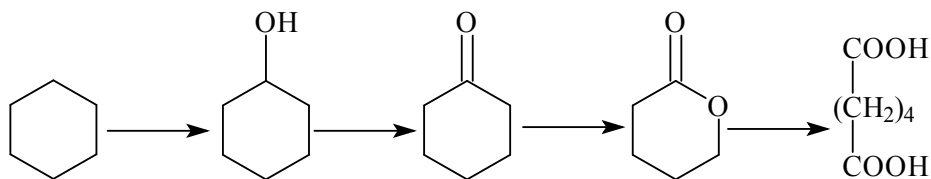


Figura 2.5: Rota de biodegradação do ciclohexano por *Pseudomonas* sp. e *Nocardia* sp.
Fonte: OLLIVIER & MAGOT, 2005

Numa etapa posterior, o ácido carboxílico é convertido em acetil CoA (coenzima A), que será percurso para as vias metabólicas do ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa (MADIGAN *et al.*, 2008).

2.5.1.3 Hidrocarbonetos Aromáticos

Os hidrocarbonetos aromáticos são constituintes de quase todas as frações do refino de petróleo e alguns destes compostos são largamente usados como solventes e outros constituem importantes matérias-primas para a indústria petroquímica. Benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos (isômeros orto-, meta- e para-) (BTEX) constituem os mais significativos componentes desta classe de hidrocarbonetos, que devido a sua elevada toxicidade levam a preocupações ambientais (OLIVEIRA, 2001).

Os hidrocarbonetos aromáticos não são tão facilmente biodegradáveis como os alcanos, posto que apresentam elevada estabilidade termodinâmica devido à significativa energia de ressonância do anel (ALEXANDER, 1999).

Dentre os aromáticos, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são os compostos mais preocupantes, pois levam a afeitos carcinogênicos e mutagênicos, além de apresentarem elevada recalcitrância (PICADO *et al.*, 2001). A Figura 2.6 apresenta a estrutura química de alguns HPA.

Nomenclatura (IUPAC)	Estrutura	Nomenclatura (IUPAC)	Estrutura
Naftaleno		Fluoranteno	
1-metilnaftaleno		Pireno	
2-metilnaftaleno		Benzo(a)fluoranteno	
Bifenil		Criseno	
2,6-dimetilnaftaleno		Benzo(b)fluoranteno	
Acenafileno		Benzo(k)fluoranteno	
Acenafeno		Benzo(e)pireno	
2,3,5-trimetilnaftaleno		Benzo(a)pireno	
Fluoreno		Perileno	
Fenantreno		Indeno[1,2,3-cd]pireno	
Antraceno		Dibenzo(ah)antraceno	
1 metil fenantreno		Benzo(ghi)perileno	

Figura 2.6: Estrutura química de alguns HPA
Fonte: PEREIRA, 2008

A degradação abrangente dos HPA se dá pela clivagem de um, dois ou mais anéis. Os grupos substituintes laterais do anel são modificados inicialmente por hidroxilação, desmetilação ou descarboxilação para produção de uma ou duas moléculas básicas. Essas são, então, clivadas por um segundo grupo de enzimas e, posteriormente, são degradadas a moléculas que serão percussoras de outras vias metabólicas.

As bactérias, geralmente, empregam dioxigenases para incorporar duas moléculas de oxigênio no substrato para formar dióxetanos, que são então oxidados a *cis*-dihidrodióis formando produtos dihidroxilados. Os fungos produzem monooxigenases para incorporar um átomo de oxigênio no substrato formando óxidos arenos, o que é seguido de atuação enzimática para produzir *trans*-dihidrodióis e fenóis (RISER-ROBERT, 1998). Essa degradação é apresentada na Figura 2.7.

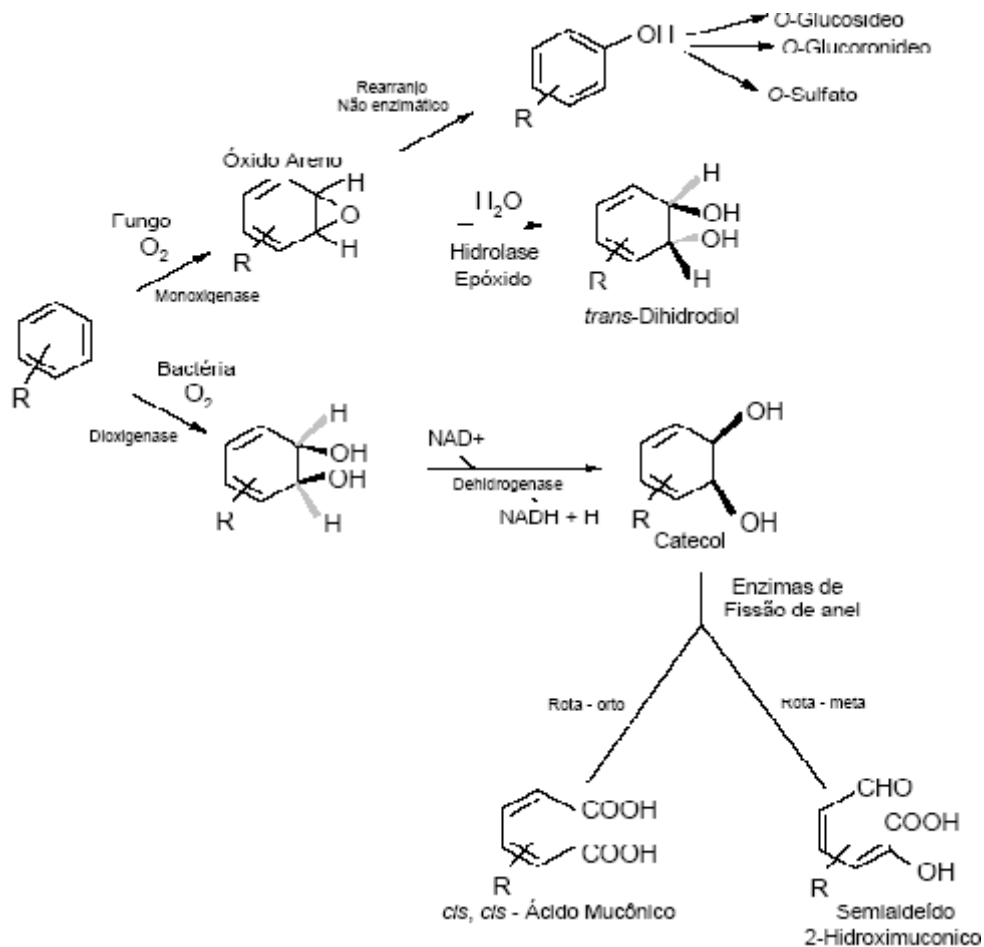


Figura 2.7: Via degradativa de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Fonte: RISER-ROBERT, 1998

Posteriormente, ocorrem dois mecanismos de clivagem do anel: na posição orto ou meta. O mecanismo mais comum é o que envolve a posição orto, seguido por uma série de reações enzimáticas até chegar aos produtos finais: ácidos orgânicos de baixo peso molecular e aldeídos (que são incorporados ao ciclo dos ácidos tricarbóxicos) (PEREIRA, 2008).

2.6 FATORES QUE INFLUENCIAM A BIODEGRADAÇÃO

As condições ambientais são de fundamental importância para a sobrevivência e crescimento microbiano. Se condições tais como pH, temperatura, umidade e aeração não são adequadas, o desempenho da microbiota é afetado de modo adverso (BOOPATHY, 2000). A manipulação e a otimização destes fatores são fundamentais para a obtenção de bons resultados.

2.6.1 Propriedades Físico-químicas do Substrato e Adaptação Microbiana

O acúmulo de um dado composto no meio ambiente poderá ser influenciado pela sua estrutura, concentração e toxicidade. Os compostos que não podem ser transformados tenderão a persistir no ambiente (ALEXANDER, 1999).

A biodegradabilidade relativa dos hidrocarbonetos em ordem decrescente de degradabilidade é dada por: Alcanos lineares (C_{10} a C_{19}); Gases (C_2 a C_4); Alcanos (C_5 a C_9); Alcanos Ramificados; Alcenos; Alcenos Ramificados; Aromáticos; Cicloalcanos; Poliaromáticos; e Asfaltenos (RISER-ROBERT, 1998).

Os produtos da biodegradação geralmente são transientes, mas alguns deles podem se acumular no ambiente. Os alcanos C_2 a C_6 podem ter efeito inibitório para alguns microrganismos, pois os hidrocarbonetos de baixo peso molecular solvatam e destroem as estruturas da membrana celular e pericelular lipídica dos microrganismos.

O acúmulo de compostos lipofílicos na membrana de microrganismos apresenta efeitos nas propriedades estruturais e funcionais, ocorrendo a perda de sua integridade e um aumento na permeabilidade de íons (MARIN *et al.*, 2005).

Observações quanto ao efeito tóxico de aromáticos, cicloalcanos, alcanos, álcoois e fenóis podem ser explicados pela interação desses compostos com os constituintes da membrana celular (HEJAZI *et al.*, 2003).

Uma forma de viabilizar a biodegradação é a adaptação dos microrganismos à fonte de carbono. Este processo visa reduzir o tempo de tratamento, aumentar a eficiência de remoção e evitar inibição do crescimento (OLLIVIER & MAGOT, 2005).

Oliveira & de França (2004) relacionaram o sucesso da biorremediação de um solo arenoso contaminado com óleo cru ao uso de cultivo microbiano que havia sido adaptado por um período de cinco anos ao óleo. Os autores reportaram que a adaptação microbiana foi capaz de selecionar linhagens mais resistentes ao óleo e que podiam degradar os hidrocarbonetos alifáticos e policíclicos aromáticos com maior velocidade.

2.6.2 Aceptores de Elétrons

Um dos principais fatores que governam a biodegradação é o tipo e a biodisponibilidade de aceptores de elétrons. Na Tabela 2.5 é apresentada a relação entre a forma de respiração microbiana, os aceptores de elétrons, as características e o potencial de oxi-redução. O potencial de oxi-redução mede a tendência de uma substância doar ou receber elétrons e, por conseguinte, é uma medida quantitativa da energia livre envolvida na transferência de elétrons. Doadores e aceptores de elétrons são denominados redutores e oxidantes, respectivamente (MADIGAN *et al.*, 2008).

Tabela 2.5: Relação entre a forma de respiração microbiana, aceptores de elétrons e potencial redox

Forma de Respiração	Aceptor de Elétrons	Produto	Característica	Potencial Redox (mV)
Aeróbia	O ₂	H ₂ O	Aeróbios facultativos e estritos	+400
Redução de Ferro III	Fe ³⁺	Fe ²⁺	Aeróbios, facultativos e anaeróbios estritos	+77 (em pH 2-3)
Redução do Nitrato	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻ , N ₂ O, N ₂	Aeróbios facultativos	-100
Redução de Sulfato	SO ₄ ²⁻	HS ⁻	Anaeróbios estritos	-160 a -200
Metanogênica	CO ₂	CH ₄	<i>Archaea</i> metanogênica	-300

Fonte: MADIGAN *et al.*, 2008

O oxigênio molecular atua como aceptor de elétrons durante a biodegradação aeróbia, enquanto nitrato, sulfato ou dióxido de carbono é o aceptor de elétrons para a biodegradação anaeróbia. Quando o oxigênio molecular está disponível como aceptor de elétrons, tende a ser preferencialmente utilizado em relação aos outros possíveis aceptores presentes, pois é a opção termodinamicamente mais favorável (STREVETT *et al.*, 2002). Na Tabela 2.5, verifica-se que O₂/H₂O é o mais eletropositivo; mais energia é disponibilizada quando o O₂ é usado do que quando outro aceptor de elétrons é empregado.

Em ambiente rico em matéria orgânica, os processos aeróbios consomem rapidamente o oxigênio, estabelecendo uma condição de anaerobiose. Se mais de um aceptor de elétrons está presente, somente um predominantemente suprirá mais energia aos microrganismos nativos e estes tenderão a dominar o ambiente. Essa sucessão de espécies microbianas é função do pH e do potencial redox. À medida que o potencial

diminui, ocorre transição da predominância de aeróbios para facultativos e, em seguida, anaeróbios (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

2.6.3 Teor de Umidade

A umidade do solo é essencial para a biodegradação uma vez que a maioria dos mecanismos de degradação ocorre na interface água-hidrocarboneto. A água é importante para o movimento dos microrganismos unicelulares que, por isso, são restritos aos filmes de água, enquanto fungos filamentosos e actinomicetos podem atravessar os vazios insaturados, através do crescimento micelial (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). Ademais, a água serve como meio de transporte para alguns nutrientes e compostos orgânicos que se difundem para a célula microbiana e através da qual os produtos metabólicos são processados.

O teor de umidade também influencia a aeração e o pH, pois quando a matriz do solo está completamente preenchida com água, a difusão dos gases é severamente restringida, comprometendo as atividades metabólicas dos microrganismos aeróbios, visto que condições anóxicas são criadas (HARSEM *et al.*, 2007).

2.6.4 Temperatura

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que afetam o desenvolvimento de microrganismos. Para a maioria dos microrganismos, mesófilos, a medida que a temperatura aumenta, as reações enzimáticas e químicas na célula ocorrem em maiores taxas e o crescimento torna-se mais rápido, enquanto que em temperaturas mais baixas há um declínio da velocidade das reações químicas e bioquímicas (MADIGAN *et al.*, 2008).

Em ambientes de baixa temperatura a volatilização de hidrocarbonetos é desfavorecida, assim, os compostos de menor cadeia carbônica tendem a permanecer no solo e, por conseguinte, viabilizar a solubilização da membrana dos microrganismos, o que diminui a eficiência do processo. Em temperaturas mais elevadas pode ocorrer a inativação de enzimas e/ou inviabilidade de alguns microrganismos, o que também limita o tratamento por biorremediação (ATLAS, 1995). Não se podem determinar valores adequados de temperatura, pois existem relatos da biodegradação eficiente em ambientes glaciais, tropicais, temperados e desérticos (PAUDYN *et al.*, 2007; HEJAZI *et al.*, 2003), e isto se deve a presença de microrganismos autóctones que atuam nas condições ambientais oferecidas.

2.6.5 pH

O pH é um fator determinante da taxa de crescimento dos microrganismos. Além disso, esse parâmetro pode influenciar a solubilidade de micro e macronutrientes, a mobilidade do material tóxico e a reatividade dos minerais. O ferro, o alumínio e o manganês apresentam características tóxicas em pH abaixo de 5,0. O fósforo está menos biodisponível em valores extremos de pH (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

As bactérias são consideradas agentes iniciadores da biorremediação e sua atividade metabólica situa-se na faixa de pH de 6,5 a 8,0. O controle desse parâmetro no solo pode maximizar a biodegradação (OLLIVIER & MAGOT, 2005).

Del'Arco (1999) descreve que o pH é um parâmetro de seleção de grupos microbianos, além de um fator de otimização da biorremediação. A autora descreve que valores de pH ácido favoreceram o crescimento de fungos filamentosos e leveduras, e valores de pH na faixa de 6,0 a 7,0 favoreceram o crescimento de bactérias.

Em processos de biorremediação *in situ*, a microbiota nativa pode ser o agente do tratamento. Neste caso, estes microrganismos estão adaptados ao pH do local, viabilizando a biodegradação por técnicas de bioestimulação que não necessariamente incluem a correção do pH. No entanto, cabe destacar que durante o metabolismo de hidrocarbonetos ocorre a formação de intermediários ácidos que podem alterar o pH do meio, desfavorecendo a biodegradação.

2.6.6 Nutrientes

Os microrganismos são formados da combinação de elementos que são os componentes de seu material genético, moléculas estruturais, enzimas e plasma intracelular. O metabolismo microbiano e o crescimento são dependentes da disponibilidade de nutrientes essenciais (ALEXANDER, 1999).

Devido à grande diversidade de bactérias, a proporção de elementos nutricionais requeridos para crescimento varia muito, sendo carbono, hidrogênio, enxofre, nitrogênio e fósforo os principais elementos necessários. Os compostos orgânicos biodegradáveis são fontes de carbono que os microrganismos podem utilizar como recurso energético para o crescimento. Outros nutrientes (cálcio, nitrogênio, fósforo, etc.) são geralmente encontrados em concentrações adequadas em muitos solos (PELTOLA *et al.* 2006).

A introdução de hidrocarbonetos no solo promove o aumento da concentração de carbono orgânico e a sua remoção por ação microbiana exige a presença de nutrientes essenciais para o crescimento microbiano, como o nitrogênio e o fósforo. Oliveira & de França (2004) relatam que a adição de nutrientes é bastante frequente em processos de biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, pois viabilizam a síntese de fosfolipídios e ácidos nucleicos. Além disso, os autores

destacam que as fontes de nutrientes devem ser usadas em concentrações limitadas para que não haja inibição do crescimento microbiano e nem aumento do custo do processo.

As fontes mais comuns de nutrientes são sais de fósforo e nitrogênio encontrados em fertilizantes agrícolas, e até mesmo em subprodutos da indústria petroquímica. A adição de nutrientes é feita de modo a se estabelecer relações carbono e nitrogênio (C:N) e/ou carbono e fósforo (C:P) adequadas à biodegradação (HAMDI, *et al.*, 2007a). No entanto, uma adição descontrolada pode promover a eutrofização do local, contribuindo para o desequilíbrio ambiental.

2.6.7 Concentração de Microrganismos Degradadores de Hidrocarbonetos

O sucesso da biorremediação é dependente da diversidade da população de microrganismos presentes, mais especificamente da disponibilidade de microrganismos hidrocarbonoclásticos (PAUDYN *et al.*, 2007). Existe uma relação direta entre a taxa de degradação e o concentração da população microbiana, já que quanto maior o número de microrganismos capazes de degradar o composto, mais rápida será a sua degradação. O tamanho da população microbiana é maior na superfície do solo, visto que nesta região a temperatura, umidade, aeração e energia são relativamente mais favoráveis para o desenvolvimento dos microrganismos (VIDALLI, 2001).

De acordo com Oliveira (2001), em ecossistemas não contaminados, os microrganismos degradadores de hidrocarbonetos geralmente constituem menos do que 0,1% da população microbiana. No entanto, em ambientes contaminados, eles podem representar a totalidade da comunidade microbiana presente. Entretanto, quando a concentração da população microbiana degradadora de compostos orgânicos é baixa em determinados solos, uma opção para o aumento desta é a adição de microrganismos

autóctones (endógenos) ou alóctones (exógenos) adaptados às condições do solo a ser tratado (PAULA *et al.*, 2006).

Os actinomicetos também desempenham importante papel na biodegradação de hidrocarbonetos. Sob o ponto de vista nutricional, são microrganismos pouco exigentes e capazes de utilizar uma grande variedade de substâncias como fonte de carbono, inclusive hidrocarbonetos aromáticos (MADIGAN *et al.*, 2008).

Os fungos promovem a biodegradação de hidrocarbonetos no solo, em especial os fungos filamentosos, que são encontrados com mais frequência no solo. Alguns grupos de bactérias associadas às cianobactérias parecem formar um consórcio eficiente para a degradação de hidrocarbonetos (ATAGANA *et al.*, 2006). As cianobactérias fornecem oxigênio e nitrogênio, assim como outros elementos essenciais para as atividades das bactérias heterotróficas aeróbias. O emprego de consórcios microbianos possibilita a biodegradação de uma variedade de compostos complexos, posto que diferentes microrganismos contribuem através de seu sistema enzimático (MARIN *et al.*, 2005).

2.6.8 Biodisponibilidade do Contaminante

A degradação de compostos orgânicos pode ser influenciada pela biodisponibilidade do contaminante à população microbiana do solo. Essa dependência pode estar relacionada tanto às propriedades químicas dos compostos orgânicos quanto às características do solo. Além disso, outro fator que influencia a biodisponibilidade é a transferência de massa do contaminante, ou seja, a taxa com que o substrato pode alcançar a célula microbiana. A textura e a estrutura do solo influenciam na biodisponibilidade do hidrocarboneto, visto que os solos que apresentam partículas

maiores resultam em maior porosidade viabilizando a dispersão dos microrganismos no interior dos poros (RIBEIRO *et al.*, 2004).

A taxa de degradação de alguns compostos orgânicos adsorvidos pode ser influenciada pela densidade da população microbiana que se encontra na superfície das partículas do solo e/ou na fase líquida. Essa taxa pode ser aumentada pela produção de biossurfactantes, uma vez que estes favorecem a biodisponibilidade permitindo maior solubilização e emulsificação do composto (BAPTISTA, 2007).

Atualmente, há uma tendência mundial para a adoção de bioprodutos, devido à sua origem natural, baixa toxicidade e fácil biodegradabilidade. Estes fatos propiciaram a execução de estudos mais aprofundados sobre os biossurfactantes, o que está alinhado com a atual política ambiental de preservação dos recursos naturais.

CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 METODOLOGIAS OPERACIONAIS

O presente trabalho foi desenvolvido em uma unidade industrial de tratamento de resíduos, localizada na Região Amazônica. O sistema é constituído por um galpão de estrutura metálica coberto, com laterais abertas, dimensões externas de 50 m de largura por 100 m de comprimento. A profundidade média da camada reativa é de $0,45 \pm 0,05$ m, depositada sobre uma camada de argila compactada, a fim de evitar a percolação de substâncias tóxicas e consequente contaminação de aquíferos subterrâneos. O galpão possui sistema de exaustão de ar e dispersores de água. O sistema foi construído obedecendo os requisitos da norma da ABNT NBR ISO 13.894 (Tratamento no Solo – *Landfarming*, 1997).

Esta unidade recebe resíduos oleosos proveniente das operações de refino de petróleo para tratamento através do processo *landfarming*. A Figura 3.1 apresenta a foto de satélite da unidade em estudo.



Figura 3.1: Foto de satélite do *Landfarming*
Fonte: Programa GoogleEarth, acessado em 9 de fevereiro de 2009

A unidade foi dividida em 25 células de limites imaginários, identificadas conforme o esquema da Figura 3.2. Cada célula apresenta dimensões de 10 m de largura por 20 m de comprimento, perfazendo uma área de 200 m². Foram escolhidas 5 células, designadas por A, B, C, D, E, para realização da pesquisa.

Z	P	O	F	E
X	Q	N	G	D
W	R	M	H	C
V	S	L	I	B
U	T	K	J	A

Figura 3.2: Identificação das células do *landfarming*

Para viabilizar o bioprocesso, todo material presente nestas células foi removido para a lateral do galpão com auxílio de pá-carregadeira. A remoção material foi feita até atingir a camada de impermeabilização. Em seguida, foram segregados materiais impróprios para o processo de *landfarming* (por exemplo: pedaços de madeira, colunas de concreto, material cerâmico diverso, material metálico, etc.). Após essa seleção e retirada de entulhos, o solo retirado foi revolvido para homogeneização e então retornado para as células de origem de modo a apresentar $0,45 \pm 0,05$ m de profundidade (ATAGANA *et al.*, 2006).

A partir da adequação do bioprocesso aos estudos pretendidos, o solo das células A, B, C, D e E foi submetido à técnica de bioestimulação através de umidificação, aeração e adição de fertilizante (Ouro Verde, N:P:K de 10:10:10). Paralelamente, foi

isolada uma área correspondente a célula P, denominada de célula controle, na qual não ocorreu a bioestimulação.

Uma rotina de procedimentos foi estabelecida através de umidificação (irrigação) e revolvimento do solo (aeração) na frequência de três e duas vezes por semana, respectivamente. A adição de fertilizante foi realizada mensalmente para atingir a concentração de $0,125\text{Kg.m}^{-2}$.

A umidificação foi realizada através de dispersores, promovendo a inserção de aproximadamente 3.500 litros de água, por aplicação, para a área em estudo (1.000 m^2), conforme apresentado na Figura 3.3.



(a) Dispersor de água



(b) Solo umedecido

Figura 3.3: Sistema de umidificação do solo

A aeração do solo foi promovida por revolvimento utilizando-se um arado acoplado a trator, e empregando movimentos circulares (Figura 3.4).



(a) Arado acoplado a trator



(b) Solo após aeração

Figura 3.4: Sistema de homogeneização do solo

A adição de fertilizante foi realizada mensalmente antes da operação de aeração.

3.2 AMOSTRAGENS DO SOLO

Para verificar o desempenho do bioprocesso foi estabelecida uma frequência mensal de amostragem da camada reativa do solo do *landfarming* seguindo a norma ABNT NBR ISO 10.007 (Amostragem de Resíduos, 2004). Em cada célula foram realizadas cinco amostragens, em 5 pontos equidistantes, correspondente a 1 Kg por ponto, seguida de mistura das amostras para homogeneização e quarteramento para obter uma amostra final significativa. Em seguida, o solo foi acondicionado em frascos de polipropileno estéreis para determinações das grandezas inorgânicas e microbiológicas, e em frascos de vidro para quantificação de compostos orgânicos. Convém enfatizar que todas as amostras foram mantidas em ambiente de baixa temperatura (aproximadamente 4°C) para preservar as propriedades físico-químicas e biológicas do solo.

Todo o pessoal envolvido nas operações estavam munidos de equipamentos de proteção individual (EPIs), tais como: máscara de vapores orgânicos; capacete; jaleco

de manga comprida; calça longa; botas; óculos de segurança; e luvas. Os aspectos ergonômicos foram obedecidos de forma a maximizar a confiabilidade humana nas atividades operacionais, conforme descrito na ABNT NBR ISO 13.894.

3.3 ANÁLISES FÍSICAS

As determinações físicas do solo, em termos de umidade e pH foram determinadas no Laboratório de Microbiologia Aplicada à Indústria do Petróleo da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.3.1 Umidade

As amostras de solo foram transferidas para placas de *Petri* previamente taradas; após a pesagem, o conjunto foi levado para estufa (Biomatic, modelo 1451) a $80\pm 1^\circ\text{C}$, por quarenta e oito horas. Em seguida, resfriou-se os conjuntos em dessecador contendo sílica gel ativa e então determinou-se o peso do solo seco. O conteúdo da umidade foi calculado pela relação da perda de massa com a massa inicial da amostra (base úmida), multiplicando-se por 100 para se obter o resultado em percentagem. As determinações de massa foram executadas em balança analítica (ADA, 210/L).

3.3.2 pH

Em um becher de capacidade de 50 mL foram transferidos 10 g de solo medido em balança analítica (ADA, 210/L). Com auxílio de uma proveta de capacidade de 50 mL, adicionou-se 25 mL de água deionizada ao becher e procedeu-se a homogeneização da suspensão através de agitador magnético (QUIMIS, Q.241-1) por um período de 20 minutos. A suspensão homogeneizada foi submetida a repouso, por um período de 30 minutos, para separação das fases, e o decantado foi transferido para um becher com

capacidade de 25 mL. Determinou-se o pH em potenciômetro (DIGIMED, DM-20) previamente calibrado com soluções tampão de pH = 4,00 e 7,00.

3.3.3 Granulometria

A distribuição granulométrica do solo foi determinada no Laboratório de Geotecnia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O ensaio foi executado seguindo-se a norma ABNT NBR ISO 7181 (Solo – Análise granulométrica, 1984), a qual compreende a homogeneização da amostra, secagem ao ar, peneiramento em uma série de peneiras, e por fim, sedimentação em solução de orto-polifosfato de sódio.

3.4 ANÁLISES QUÍMICAS

As seguintes determinações analíticas foram realizadas: teor de Carbono Orgânico Total (COT), Nitrogênio Total e Fósforo; Hidrocarbonetos Totais do Petróleo (HTP); Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA); e Elementos Químicos (Antimônio, Arsênio, Bário, Berílio, Cádmio, Chumbo, Cobre, Cromo Total, Ferro Total, Manganês, Mercúrio, Níquel, Prata, Selênio, Vanádio, e Zinco). Essas quantificações foram realizadas pelo Laboratório *Analytical Solutions SA* com base nas metodologias analíticas da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*U. S. Environmental Protection Agency – USEPA*), uma vez que esse é um órgão de referência internacional.

3.4.1 Teores de Carbono Orgânico Total (COT), Nitrogênio e Fósforo

A quantificação de COT, nitrogênio e fósforo foi determinada pelo método USEPA 9056A (*Determination of Inorganic Anions by Ion Chromatography*) usando cromatografia gasosa acoplada ao detector por ionização de chamas.

3.4.2 Hidrocarbonetos Totais do Petróleo (HTP)

A quantificação de Hidrocarbonetos Totais do Petróleo (HTP) foi realizada pelo método USEPA 8015B (*Nonhalogenated organics using GC/FID*) de cromatografia gasosa acoplada ao detector por ionização de chamas. Os compostos alvos para análise de HTP compreendem *n*-alcanos na faixa de C₁₀ a C₃₆ incluindo pristano e fitano, demais hidrocarbonetos resolvidos do petróleo (HRP) e mistura complexa não resolvida (UCM – *Unresolved Complex Mixture*).

A extração e preparação dos extratos para análise cromatográfica foram executadas de acordo com os métodos USEPA 3540C (*Soxhlet Extraction*) e USEPA 3630C (*Silica Gel Column Cleanup*), respectivamente.

3.4.3 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA)

Para determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) foram utilizadas as metodologias USEPA 3540C (*Soxhlet Extraction*) e USEPA 3630C (*Silica Gel Column Cleanup*) e USEPA 8270C (*Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry - GC/MS*). Esses métodos viabilizam a extração, preparação e quantificação de HPA.

Os compostos analisados foram: Naftaleno, Acenaftileno, Acenafteno, Fluoreno, Fenantrano, Antraceno, Fluoranteno, Pireno, Benzo[a]antraceno, Criseno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[a]pireno, Indeno[1,2,3-cd]pireno, Dibenzo[a,h]antraceno e Benzo[ghi]perileno.

3.4.4 Elementos Químicos

A concentração dos elementos químicos (Antimônio, Arsênio, Bário, Berílio, Cádmio, Chumbo, Cobre, Cromo Total, Ferro Total, Manganês, Níquel, Prata, Selênio, Vanádio e Zinco) foi determinada por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-AES), de

acordo com o método USEPA 3050B, usando digestão ácida em microondas. O elemento químico Mercúrio foi quantificado usando a técnica analítica de vapor frio, descrita no método USEPA 7471B.

3.5 ANÁLISES BIOLÓGICAS

Foram realizadas análises microbiológicas dos microrganismos autóctones através de quantificações de Bactérias Aeróbias Heterotróficas (BAE), Fungos Filamentosos e Bactérias Anaeróbias Heterotróficas (BAN).

Foi realizada uma avaliação ecotoxicológica, ao fim do período de tratamento. Este ensaio foi realizado no Laboratório de Tecnologia Ambiental da Escola de Química da UFRJ.

3.5.1 Quantificação de Microrganismos

3.5.1.1 Bactérias Aeróbias Heterotróficas (BAE)

A avaliação da concentração de Bactérias Aeróbias Heterotróficas (BAE) foi feita pela técnica *pour plate* (APHA, 1992). Uma amostra inicial de solo (10 g) foi adicionada a 100 mL de uma solução salina (0,85% NaCl), e colocada sob agitação em mesa oscilatória termostaticada (TECNAL, TE-420) a 150 RPM por 30 minutos. Em seguida, a partir da suspensão foram preparadas diluições em solução salina (0,85% NaCl) variando de 10^{-1} a 10^{-8} e de cada diluição alíquotas de 1mL foram transferidas para placas de *Petri* adicionando-se em seguida 20 mL do meio de cultura Ágar Nutriente (Tabela 3.1) acrescido de 50 mg.L^{-1} de Nistatina (Neo Química). As placas foram incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 horas, e após este período, as colônias foram contabilizadas e os resultados expressos em UFC (Unidades Formadoras de Colônias) por grama de solo seco. Posteriormente, os microrganismos foram visualizados através

de Microscópio Nikon Eclipse E200 Evolution VF com câmera fotográfica acoplada Cooled Color e armazenado em software Media Cybernetics.

Tabela 3.1: Composição do meio Ágar Nutriente

Componentes	g.L⁻¹
Peptona de Carne (VETEC, cód. 5115)	10,0
Extrato de Carne (MERCK, 1.03979)	3,0
K ₂ HPO ₄ (VETEC, cód. 135)	1,0
Agar Agar (Reagen, 10366)	20,0
NaCl (VETEC, cód. 106)	8,5

* pH = 7,0 ; Esterilização a 110°C por 20 minutos

3.5.1.2 Fungos Filamentosos

A quantificação de Fungos Filamentosos foi realizada pela técnica *pour plate* (APHA, 1992), seguindo a mesma metodologia apresentada no item anterior (item 3.5.1.1). Entretanto foi utilizado o meio de cultura Sabouraud (Tabela 3.2) acrescido de 0,1 g.L⁻¹ de Cloranfenicol. As placas foram incubadas a 37±1°C durante 72 horas, e os resultados expressos em UFC por grama de solo seco.

Tabela 3.2: Composição do meio Sabouraud

Componentes	g.L⁻¹
Peptona de Carne (VETEC, cód. 5115)	10,0
Sacarose (VETEC, cód. 228)	3,0
Agar Agar (Reagen, 10366)	20,0
NaCl (VETEC, cód. 106)	8,5

* pH = 6,0 ; Esterilização a 110°C por 20 minutos

3.5.1.3 Bactérias Anaeróbias Heterotróficas (BAN)

A contagem de Bactérias Anaeróbias Heterotróficas (BAN) foi realizada através da técnica do Número Mais Provável (NMP) (HARRISON JR., 1982), e os resultados expressos em Cels.g⁻¹ de solo seco. Para tanto, alíquotas de 1 mL da suspensão (0,1 g de solo/g de água destilada) foram distribuídas em frascos do tipo penicilina com capacidade para 10 mL contendo 9 mL de solução redutora (Tabela 3.3), de modo a obter diluições de 10⁻¹ a 10⁻¹⁰. Logo após, uma alíquota de 1 mL de cada diluição foi transferida para frascos do tipo penicilina contendo 9 mL de meio de cultura Fluido ao Tioglicolato (Tabela 3.4). Os frascos foram incubados por 15 dias a 37±1°C, e o crescimento avaliado visualmente pela turvação do meio.

Tabela 3.3: Composição da Solução Redutora

Componentes	Teor
Ácido ascórbico (MERCK, 1.00127.0100)	0,18 g.L ⁻¹
Tioglicolato de Sódio (MERCK, 1.08191)	0,124 g.L ⁻¹
Resazurina (VETEC, cód. 1277)**	4,0 mL.L ⁻¹
NaCl (VETEC, cód. 106)	8,5 g.L ⁻¹

* pH = 7,0 ; Esterilização a 121°C por 15 minutos

** Solução de Resazurina na concentração de 0,025% (m/v)

Tabela 3.4: Composição do meio Fluido ao Tioglicolato

Componentes	Teor
Glicose (MERCK, 8342)	5,0 g.L ⁻¹
Peptona	4,0 g.L ⁻¹
Extrato de Levedura (MERCK, 1.03753)	1,0 g.L ⁻¹
Resazurina (VETEC, cód. 1277) **	4,0 mL.L ⁻¹
NaCl (VETEC, cód. 106)	8,5 g.L ⁻¹

* pH = 7,0 ; Esterilização a 110°C por 20 minutos

** Solução de Resazurina na concentração de 0,025% (m/v)

3.5.2 Avaliação Ecotoxicológica

Os testes foram realizados empregando um anelídeo da espécie *Eisenia foetida*, que tem sido amplamente empregada para avaliar a toxicidade de vários contaminantes em solos. O método empregado foi uma adaptação da metodologia descrita no Guia para Testes Químicos n.º 207 da OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*). Sisinni *et al.* (2006) ressaltam que este método está relacionado com as normas ISO (*International Organization for Standardization*) 11268-1 (*Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia foetida) – Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate*) e ISO 11268-2 (*Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia foetida) – Part 2: Determination of effects on reproduction*).

Os resultados são apresentados em duplicata e expressos em número de organismos vivos no sétimo e décimo quarto dia de experimento. Para tal, foram utilizados 200 g de solo, 20 g de esterco, 10 minhocas e água suficiente para proporcionar 35% de umidade. Todos os frascos foram revestidos com papel, a fim de reproduzir o ambiente natural das minhocas, visto que estas são sensíveis à luminosidade direta.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONDICIONAMENTO DO *LANDFARMING*

A adequação das células do *landfarming* contribuiu para a otimização da área útil do local e facilitou nas etapas de aeração do solo. A implantação da camada reativa com profundidade de $0,45 \pm 0,05$ m foi uma etapa fundamental. Essa espessura permitiu a incorporação da umidade e nutrientes no solo, e conseqüentemente, favoreceu a biodegradação por microrganismos aeróbios que apresentam maiores velocidades e porcentagens de biodegradação de hidrocarbonetos (OLLIVIER & MAGOT, 2005). A partir das adequações, o bioprocessos esteve de acordo com os requisitos apresentados na norma ABNT NBR ISO 13.894 (Tratamento no Solo – *Landfarming*). A Figura 4.1 apresenta o aspecto inicial do solo quando submetido a etapa de revolvimento.



Figura 4.1: Aspecto inicial do solo submetido a etapa de revolvimento

Após a etapa de condicionamento do *landfarming* às condições adequadas para o tratamento de resíduos sólidos oleosos promoveu-se os procedimentos de umidificação, aeração e fertilização do solo das células A, B, C, D e E (células tratadas) de acordo com a sistemática apresentada no item 3.1. A Figura 4.2 apresenta a aparência da camada reativa do bioprocessos.



Figura 4.2: Aparência do solo após adequação do sistema

Os resultados apresentados a seguir compreendem os valores médios com respectivos desvios-padrões das células, perfazendo uma área de 1.000 m² sob tratamento. A densidade do solo do *landfarming* foi de $0,86 \pm 0,11 \text{ g.cm}^{-3}$, determinada pela pesagem do solo em volume pré-definido. As 5 células apresentaram $0,45 \pm 0,05 \text{ m}$ de profundidade equivalente a 387 toneladas de solo.

A literatura reporta um número significativo de trabalhos envolvendo tratamento de hidrocarbonetos em escala industrial pelo processo de *landfarming*. Castro *et al.*

(2005) viabilizaram a otimização do *landfarming* da RPBC (Refinaria Presidente Bernardes) para o tratamento de resíduo sólido contido numa área de 24.000 m² através das seguintes atividades: recuperação topográfica; caracterização química, física e biológica do solo; correção do pH; fertilização; aeração; e monitoramento da camada reativa do solo (variáveis físico-químicas e biológicas).

Atagana (2004) tratou uma área de 9.375 m² contaminada com creosoto (derivado do processamento do alcatrão de hulha contendo alta concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) aplicando operações de aeração, umidificação, controle de pH e adição de fertilizantes NPK.

Na maioria dos trabalhos desenvolvidos em *landfarming* são aplicadas técnicas de bioestimulação (aeração, umidificação, controle do pH e adição de nutrientes) e/ou bioaugmentação (inserção de microrganismos alóctones e/ou autóctones). A norma ABNT NBR ISO 13.894 preconiza a necessidade de monitoramento dos fatores ambientais para avaliar o desempenho do bioprocessamento e, caso necessário, aplicar as ações corretivas.

Neste trabalho foram empregadas operações de umidificação, aeração e fertilização por um período de 225 dias. Nesse tempo, o sistema não sofreu acentuadas interferências climáticas como chuva e incidência direta da radiação solar porque o galpão tem cobertura metálica.

Os resultados físico-químicos e biológicos finais, que serão apresentados nos itens seguintes, indicaram sucesso no tratamento dos resíduos sólidos. Posteriormente, o solo pode ser utilizado para técnicas de fitorremediação a fim de promover uma remoção e aproveitamento dos compostos remanescentes. Na sequência, o vegetal crescido pode ser usado como fonte de matéria-prima para produção de biodiesel através de processamento adequado do óleo vegetal extraído.

4.2 DETERMINAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS

A partir do início dos procedimentos operacionais de umidificação, aeração e fertilização das células A, B, C, D e E do *landfarming*, implantaram-se as determinações físico-químicas e microbiológicas do solo das células estudadas.

4.2.1 Curva Granulométrica

Na etapa inicial foi realizada uma análise granulométrica do resíduo sólido presente nas células e os resultados estão apresentados na Figura 4.3.

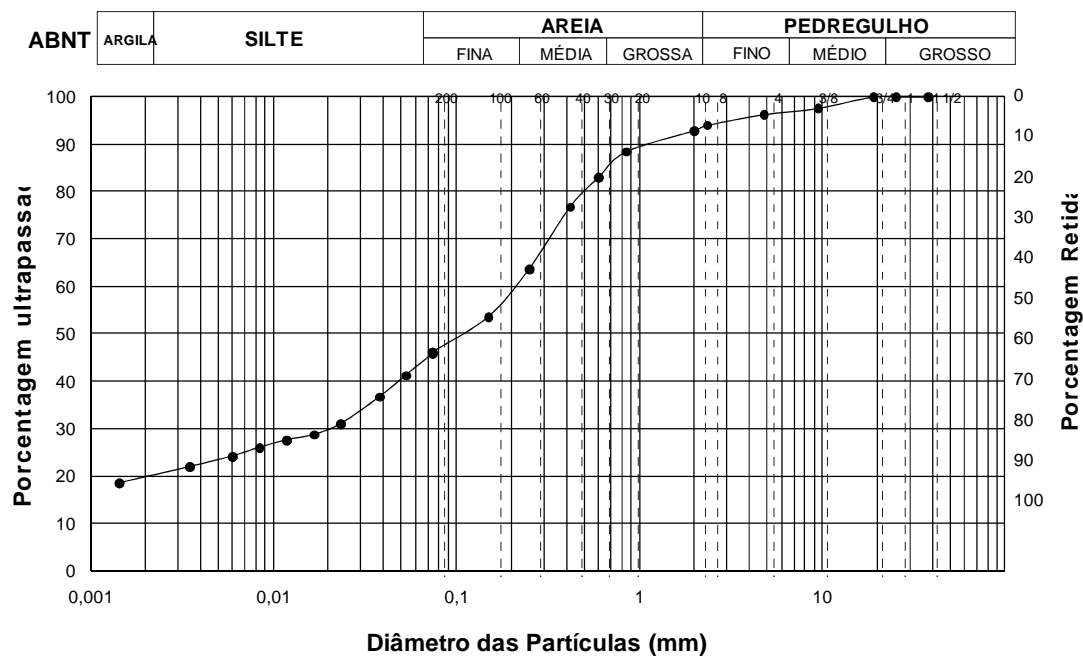


Figura 4.3: Curva granulométrica do solo

A composição granulométrica do resíduo sólido estudado mostrou 50% de areia, 23% de silte, 20% de argila e 7% de pedregulho. De acordo com a escala de Atterberg da NRCS (*Natural Resources Conservation Services*) o solo foi classificado como solo franco-argilo-arenoso.

A predominância de areia no solo indica maior permeabilidade, tendo em vista que solos arenosos apresentam poros com diâmetro maior do que 0,1mm,

consequentemente favorecendo a transferência de massa, e a disponibilidade de nutrientes, em especial o oxigênio, e permitindo o contato dos microrganismos e hidrocarbonetos (MARIN *et al.*, 2005). No entanto, os teores de finos indicam a necessidade de operações para aeração e homogeneização do solo, com vistas à melhoria da biodegradação de hidrocarbonetos.

Adicionalmente, uma maior permeabilidade no solo facilita a dispersão de água tornando o hidrocarboneto mais biodisponível aos microrganismos porque aumenta a interface hidrocarboneto-água.

4.2.2 Umidade e pH

Os teores de umidade monitorados nas células tratadas e na célula controle estão apresentados na Figura 4.4.

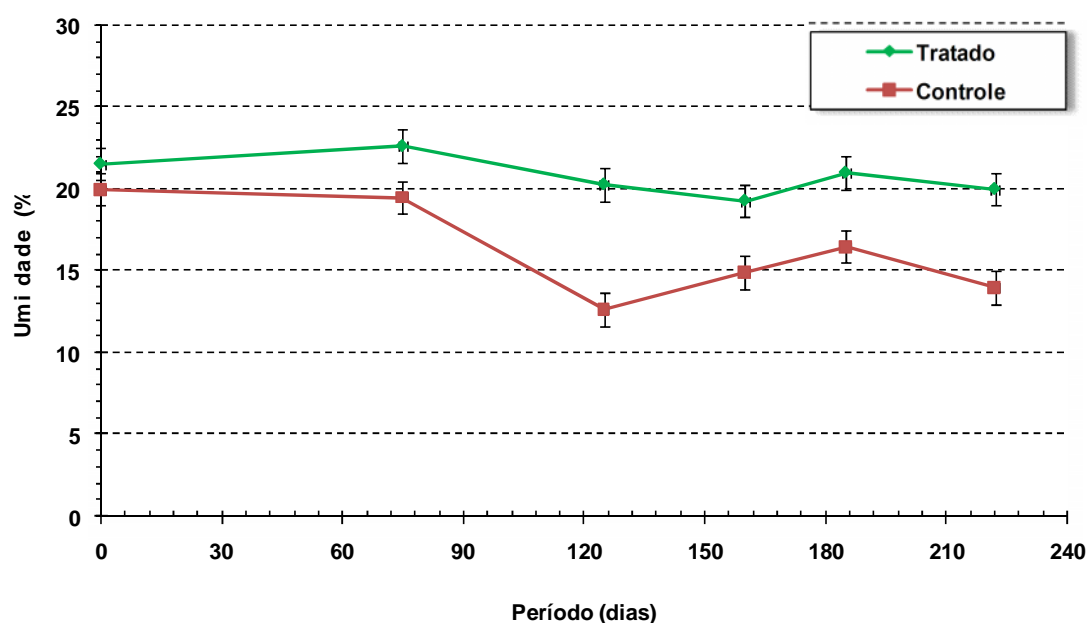


Figura 4.4: Perfil da umidade nas células tratadas e controle

Pela Figura 4.4 notamos um pequeno desvio-padrão em relação à média indicando pequena variabilidade da umidade na área estudada. A umidade das células tratadas ficou no nível de 20% a 23%, enquanto na célula controle esteve entre 13% a

19%, sendo menos expressivo porque o solo não foi umidificado. Neste processo é indicado que a umidade fique na faixa de 20 a 26%, pois este índice apresenta o melhor custo-benefício (ATAGANA *et al.* 2006).

Segundo Mphekgo & Cloete (2004), a umidade é um fator importante para a biodegradação, pois está relacionada com a biodisponibilidade do contaminante, através dos fenômenos de transferência de massa entre o hidrocarboneto e os microrganismos.

O aumento da umidade resulta em maior biodegradação de hidrocarbonetos, entretanto o excesso pode dificultar a dispersão de oxigênio (MARIN *et al.*, 2005). Além disso, a umidificação em excesso pode comprometer economicamente o processo.

Jatar *et al.* (1993) destacam as oportunidades de implantação de *landfarming* em regiões de clima tropical, ressaltando a intensa precipitação anual (índice médio de 1.020 mm.ano⁻¹) como fator auxiliar no aumento da umidade da área.

O clima da região amazônica, em estudo, é caracterizado como equatorial úmido, sendo resultante de uma combinação de vários fatores, dos quais o mais importante é a disponibilidade de energia solar. Apresenta temperatura média anual de 26,6°C, umidade relativa do ar entre 75-86% e precipitação anual variando entre 1750 a 2500 mm (LIMA, 2002).

Algumas faixas de umidade são apresentadas por Mphekgo & Cloete (2004), citando vários autores, destacando valores entre 20% a 80% de capacidade de retenção em campo.

As condições climáticas de precipitação intensa na região amazônica fomentam a necessidade deste sistema ter cobertura para evitar forte incidência de chuva, e permitir melhor controle dessa variável no bioprocessos.

O comportamento do pH das células tratadas e controle está apresentado na Figura 4.5.

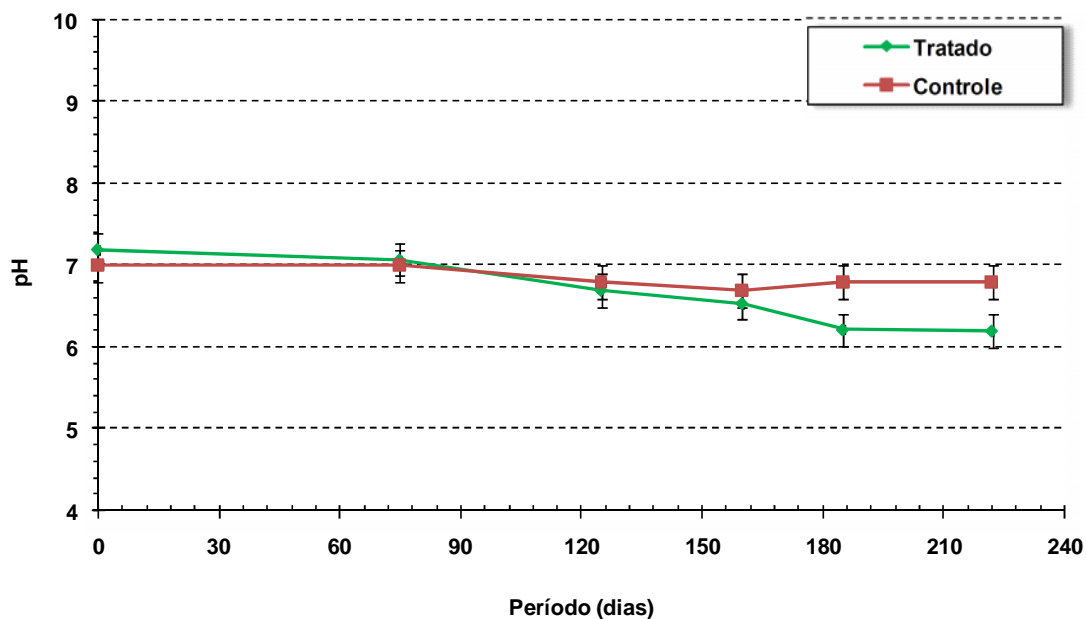


Figura 4.5: Perfil dos valores de pH das células tratadas e controle

De acordo com a Figura 4.5, o baixo desvio-padrão indica pequena variabilidade desta grandeza no sistema. O pH nas células tratadas iniciou com 7,3 e atingiu 6,2. Nota-se a ocorrência de uma redução do pH no decorrer do período de tratamento, possivelmente devido à formação de metabólitos intermediários de caráter ácido, que posteriormente poderão ser biodegradados até o nível de água e dióxido de carbono. Na célula controle, o pH variou menos.

De acordo com Oliveira & de França (2004), os microrganismos devem manter seu pH intracelular em torno de 7,5, considerando que o pH do meio influencia diretamente no metabolismo microbiano.

Em solos e em águas, a faixa ideal para que ocorra a biodegradação de forma mais efetiva é entre 6,5 a 7,5, pois permite o crescimento de bactérias, reconhecidamente mais eficientes na metabolização de hidrocarbonetos. O pH neutro é mais favorável ao crescimento de bactérias, enquanto os valores de pH ácido permitem o desenvolvimento de fungos filamentosos (OLLIVIER & MAGOT, 2005).

Nas células tratadas, com 160 dias, o pH do solo ficou ligeiramente abaixo de 6,5, ainda na faixa de biodegradação, não necessitando adicionar corretivos para aumentar esta variável.

Peltola *et al.* (2006) descrevem diversos produtos auxiliares para controle do pH em torno da neutralidade, tais como calcário, sulfato de amônio e hidróxido de cálcio.

4.2.3 Elementos Químicos

As células tratadas e controle foram submetidas à análise de metais após o período de tratamento do solo. Estes resultados estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Comparativo dos valores de intervenção e de referência de qualidade com os resultados obtidos

Elementos Químicos	Valores de intervenção para solos de área industrial		Resultados obtidos	Referência de Qualidade
	CETESB	USEPA	Células Tratadas	CETESB
	mg.Kg ⁻¹			
Antimônio	25	N.R.	2,09±0,26	<0,5
Arsênio	150	N.R.	0,52±0,11	3,5
Bário	750	N.R.	53,45±6,59	75
Berílio	N.R.	1.900	<0,1	N.R.
Cádmio	20	N.R.	0,18±0,06	<0,5
Chumbo	900	N.R.	28,69±2,94	17
Cobre	600	N.R.	281,89±15,95	35
Cromo Total	400	N.R.	25,12±3,71	40
Ferro Total	N.R.	100.000	13.252,51±722,14	N.R.
Manganês	N.R.	19.000	60,93±5,92	N.R.
Mercúrio	70	N.R.	0,13±0,02	0,05
Níquel	130	N.R.	47,92±10,28	13
Prata	100	N.R.	<0,25	0,25
Selênio	N.R.	5.100	0,69±0,08	0,25
Vanádio	N.R.	1.000	284,53±49,63	275
Zinco	2.000	N.R.	328,42±79,10	60

N.R.: Não referenciado

A Tabela 4.1 mostra que todos os metais apresentaram teores menores do que aqueles preconizados pela CETESB e USEPA para intervenção em áreas industriais. Entretanto, as concentrações dos principais metais encontrados no óleo cru como Vanádio, Níquel, Chumbo, Ferro e Cobre apresentaram valores maiores do que os valores de referência de qualidade da CETESB.

Adicionalmente, os elementos Antimônio, Mercúrio, Zinco e Selênio também estiveram acima dos valores de referência de qualidade que definem um solo natural isento de ação degradadora. A concentração desses elementos químicos no solo controle apresentou valores próximos ao solo das células tratadas.

Após o período de tratamento, o solo tratado foi submetido ao ensaio de classificação de acordo com a norma ABNT NBR ISO 10.004 (Resíduos Sólidos – Classificação, 2004), ABNT NBR ISO 10.005 (Procedimento para Obtenção de Extrato Lixiviado de Resíduos Sólidos, 2004) e ABNT NBR ISO 10.006 (Procedimento para Obtenção de Extrato Solubilizado de Resíduos Sólidos, 2004). Os resultados obtidos no lixiviado do solo tratado e os valores orientadores estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Concentração de elementos químicos no lixiviado do solo tratado

Parâmetro	Células Tratadas	Valores Padrão no Lixiviado
	mg.L ⁻¹	
Alumínio	0,116±0,024	0,200
Arsênio	<0,005	0,010
Bário	0,071±0,005	0,700
Cádmio	0,002	0,010
Chumbo	0,016	0,010
Cobre	0,098±0,040	2,000
Cromo Total	<0,01	0,050
Ferro	1,541±0,352	0,300
Manganês	1,196±0,397	0,100
Mercúrio	<0,001	0,010
Prata	<0,01	0,050
Selênio	<0,005	0,010
Zinco	4,213±0,892	5,000

De acordo com a Tabela 4.2 os elementos Bário e Chumbo estiveram ligeiramente acima do limite máximo permitido segundo a norma ABNT NBR ISO 10.004. Entretanto, os elementos Ferro e Manganês apresentaram discrepância em relação a este limite. Por este motivo o solo foi classificado como Classe IIA (Não Inerte).

Hejazi *et al.* (2003) destacam que os metais presentes nos resíduos de refinarias são provenientes principalmente de catalisadores gastos, e ressaltam ainda que alguns metais como Arsênio, Cromo, Chumbo e Níquel podem ser tóxicos para a microbiota, comprometendo o desempenho do bioprocessamento.

Baird (2002) descreve que Hg, Pb, Cd e As são perigosos nas suas formas catiônicas e também quando ligados a cadeias curtas de átomos de carbono. O mecanismo de sua ação tóxica deriva da forte afinidade dos cátions pelo enxofre dos grupos sulfidrilas das enzimas, acarretando em inativação de algumas vias metabólicas essenciais às atividades fisiológicas.

Souza *et al.* (2009) trabalharam em *landfarming* contendo as seguintes concentrações de metais: Ba (493,4), Cd (<0,01), Cr (400,2), Ni (104,5) e Pb (18,8 mg.Kg⁻¹). Os autores discutem que as elevadas concentrações desses metais foram fatores limitantes do metabolismo microbiano, resultando na degradação de apenas 27% de HTP em 108 dias. Nota-se que este solo apresentou concentrações de metais maiores do que o solo tratado através de nossos experimentos (Tabela 4.1), com exceção dos metais Chumbo e Cádmiio.

Várias células microbianas apresentam a capacidade de bioabsorção de metais. Vieira *et al.* (2007) desenvolveram processos em escala piloto (regime batelada e contínuo) para absorção de Chumbo, em altas concentrações, usando microalgas *Sargassum filipendula*. Enfatiza-se que diversos grupos de bactérias podem captar

metais pesados do meio ambiente por fenômenos de adsorção ou absorção. Os resultados obtidos mostraram tolerância da microbiota autóctone aos metais, possivelmente devido a um desses mecanismos.

4.2.4 Nutrientes: Fósforo (P), Nitrogênio (N) e Carbono Orgânico Total (COT)

Os macronutrientes são os compostos requeridos em grande quantidade pelas células microbianas como carbono, oxigênio, nitrogênio, potássio, cálcio, magnésio fósforo e enxofre (RISER-ROBERT, 1998). O monitoramento desses nutrientes, em especial fósforo, nitrogênio e carbono, é importante para avaliar o desempenho do bioprocessamento de degradação (BENTO *et al.*, 2005). O perfil desses elementos em função do tempo está apresentado nas Figuras 4.6 e 4.7.

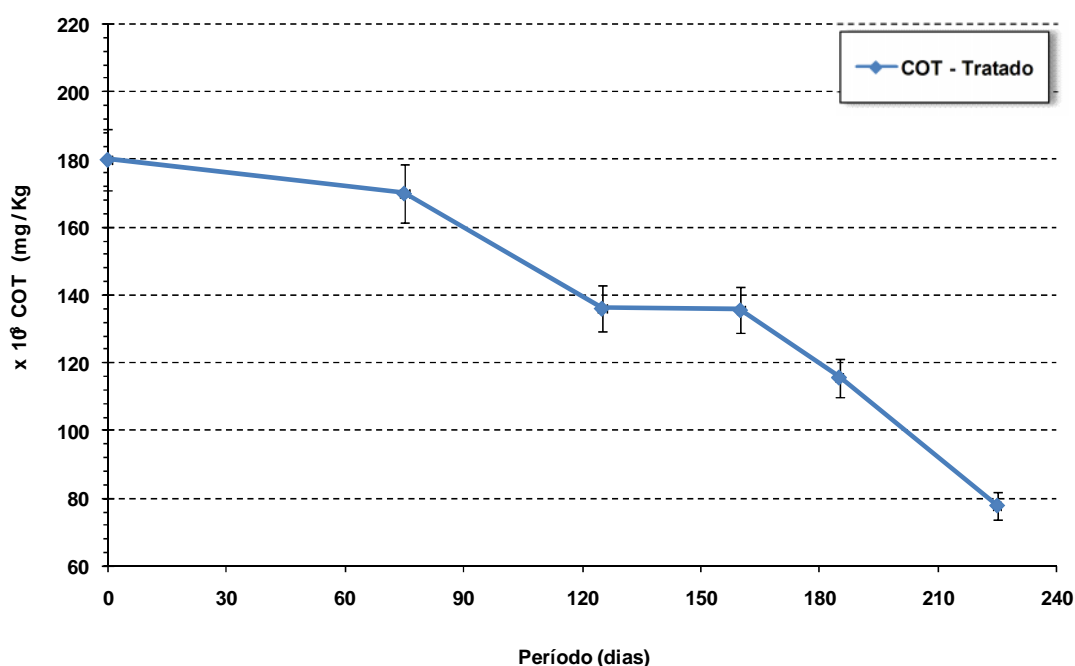


Figura 4.6: Perfil de Carbono Orgânico Total (COT) nas células tratadas

De acordo com a Figura 4.6 nota-se que a concentração de carbono orgânico total esteve na faixa de 180.000-80.000 mg.Kg⁻¹ no solo tratado. O solo controle teve comportamento semelhante ao tratado. Assim, nos dois sistemas os teores de COT

decreceram enfatizando-se que no solo tratado o decaimento foi mais acentuado, possivelmente em função dos melhores fatores ambientais oferecidos à biodegradação.

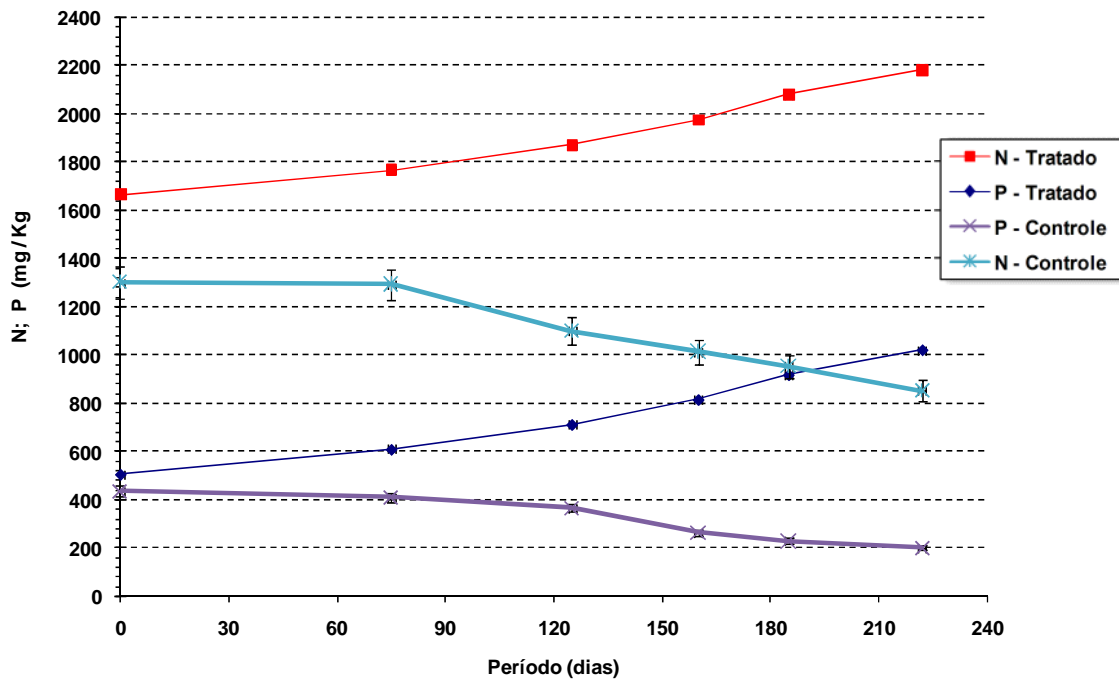


Figura 4.7: Perfil de Fósforo (P) e Nitrogênio (N) nas células tratadas e controle

Pela Figura 4.7 observa-se que a concentração de fósforo esteve na faixa de 506-1.020 mg.Kg^{-1} e 435-202 mg.Kg^{-1} para os solos tratados e controle, respectivamente. O teor de nitrogênio ficou no intervalo de 1.665-2.180 mg.Kg^{-1} e 1.306-852 mg.Kg^{-1} para os solos tratados e controle, respectivamente.

Nas células tratadas, as concentrações de nitrogênio e fósforo aumentaram em função da adição de $0,125 \text{ Kg.m}^{-2}.\text{mês}^{-1}$ de fertilizantes NPK com suprimento maior do que a demanda pelos microrganismos. Entretanto, no solo controle os teores de N e P decresceram decorrentes do consumo pelos microrganismos.

O nitrogênio no solo é representado naturalmente pelas formas iônicas: amônio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-) e raramente nitrito (NO_2^-). A assimilação de NO_3^- e NO_2^- pelos microrganismos conduz à redução desses compostos com formação de amônia, envolvendo as enzimas nitrato redutase e nitrito redutase. Nas demais rotas bioquímicas

sequenciais o nitrogênio é precursor de vias metabólicas para formação de aminoácidos, peptídeos ou peptonas (OLLIVIER & MAGOT, 2005).

O fósforo é assimilado pelos microrganismos sob a forma de ânion fosfato, o qual é importante por fazer parte de moléculas como DNA (*Deoxyribonucleic Acid*), RNA (*Ribonucleic Acid*), fosfolipídios, NAD, FAD, coenzima A e de algumas vitaminas (MADIGAN *et al.*, 2008).

MARIN *et al.* (2005) descrevem que a quantificação de enzimas dos ciclos do carbono (*-glucosidase*), nitrogênio (*urease* e *protease*) e fósforo (*fosfatase*) são medidas importantes para estimar a atividade microbiana, assim como avaliar o grau de contaminação da área impactada.

As relações C:N e C:P são variáveis de processo importantes para verificar a disponibilidade desses nutrientes essenciais para as atividades metabólicas dos microrganismos (SOUZA *et al.*, 2009).

A Figura 4.8 apresenta o comportamento das relações C:N e C:P dos solos tratado e controle.

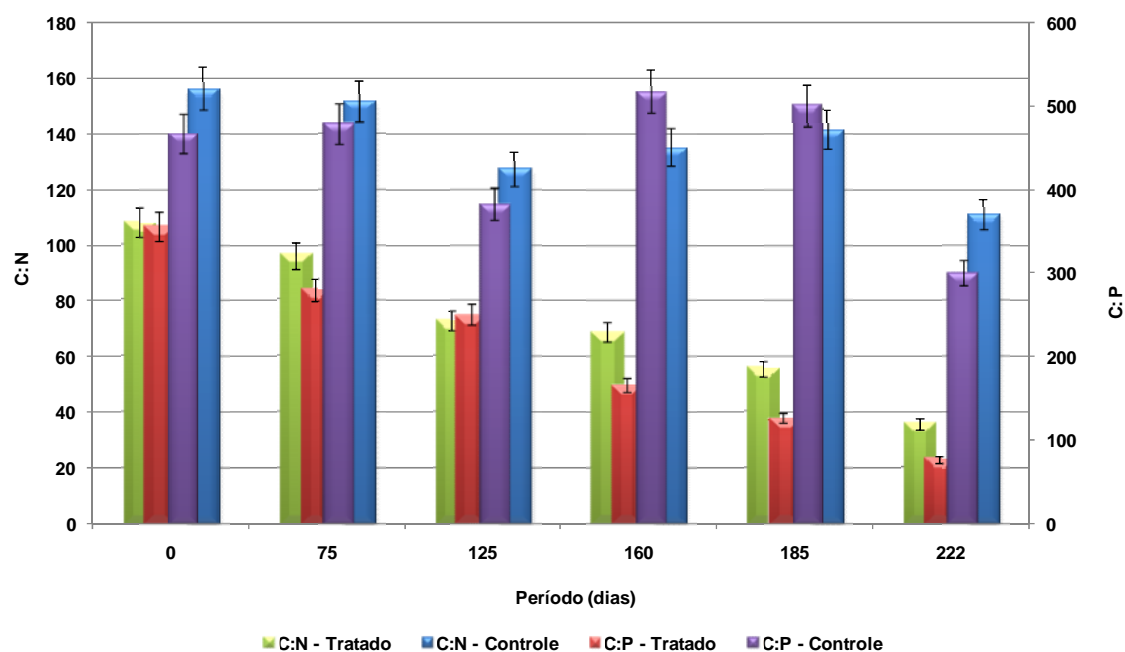


Figura 4.8: Relações C:N e C:P nas células tratadas e controle

Pela Figura 4.8 nota-se que a relação C:N variou de 108 a 35 (redução de 66,98%) e 156 a 110 (decréscimo de 29,12%) para os solos tratado e controle, respectivamente. Enquanto a relação C:P variou de 355 a 76 (redução de 78,57%) e 466 a 300 (redução de 35,62%) para os solos tratado e controle, respectivamente. Observa-se que estas razões reduziram no solo tratado em consequência da utilização dos hidrocarbonetos, principal fonte de carbono orgânico, pelos microrganismos.

No mercado existe uma grande variedade de fontes nutricionais para tratamento de solos no sistema de *landfarming*. Line *et al.* (1996) avaliaram a adição de sulfato de amônio e superfosfato para atingir as razões 28:1 (C:N) e 200:1 (C:P) obtendo redução de HTP de 4.644 mg.Kg⁻¹ para menos de 100 mg.Kg⁻¹ em 12 meses.

Atagana (2004) aplicou 0,25 Kg.m⁻² de calcário e 0,20 Kg.m⁻² de fosfato de amônio. Essas concentrações foram baseadas em trabalhos em escala piloto, e permitiram alcançar a relação C:N:P de 25:1:1, possibilitando o tratamento de uma grande área contaminada com creosoto.

A otimização do sistema *landfarming* desenvolvida por Castro *et al.* (2005) envolveu adições de calcário (1,12), sulfato de amônio (0,178), fertilizante NPK (0,083), cloreto de potássio (0,159) e superfosfato triplo (0,0853 Kg.m⁻²). As concentrações de COT, fósforo e nitrogênio obtidas foram semelhantes às obtidas neste trabalho, permitindo um aumento considerável da população microbiana.

A adição controlada de nutrientes deve ser obedecida para evitar a eutrofização do local. Peltola *et al.* (2006) estudaram o efeito da atividade nitrificante após fertilização com uréia e metileno de uréia. Os resultados mostraram que a fertilização prolongada por um período de 20 anos levou à acumulação de NH₄⁺, acarretando em inibição de uma parcela significativa da microbiota. Os autores reportam ainda que a adição de metileno de uréia teve melhores resultados por permitir melhor absorção de

amônia pelos microrganismos agilizando as etapas metabólicas de consumo de nitrogênio.

A adição de nutrientes e co-substratos (por exemplo, biodiesel e óleos graxos) em escala industrial requer uma análise preliminar das propriedades físico-químicas e biológicas do solo para dimensionar o tipo e a quantidade de nutrientes.

4.2.6 Degradação de Hidrocarbonetos Totais do Petróleo (HTP)

Para acompanhar o desempenho do bioprocessamento foi monitorada a concentração de Hidrocarbonetos Totais do Petróleo (HTP) durante o período de tratamento. Esses resultados constam na Figura 4.9.

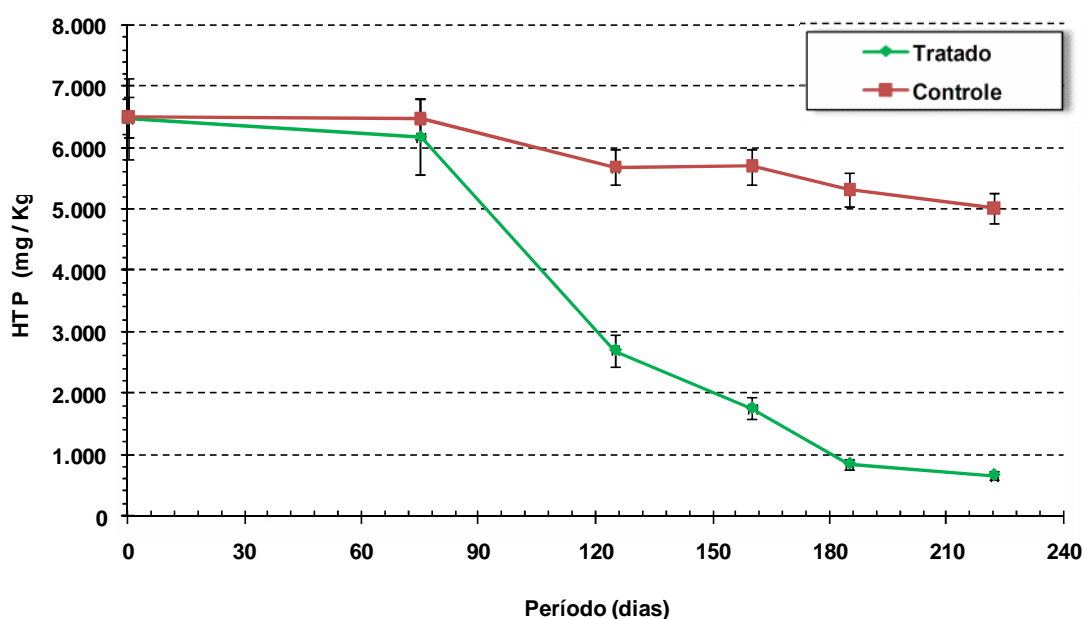


Figura 4.9: Degradação de hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP) nos solos tratados e controle

Pela Figura 4.9 nota-se que no solo tratado a concentração de HTP iniciou com $6.475 \pm 385 \text{ mg.Kg}^{-1}$ e atingiu $670 \pm 25 \text{ mg.Kg}^{-1}$ em 225 dias de tratamento, equivalente a 89,6% de degradação. Enquanto no solo controle a concentração de HTP iniciou com 6.479 mg.Kg^{-1} e atingiu 5.026 mg.Kg^{-1} perfazendo 22,4% de degradação.

Nos dois sistemas a degradação de HTP foi caracterizada por fenômenos físico-químicos de volatilização e microbiológicos de biodegradação, entretanto nas células tratadas esses fatores foram mais intensos devido às adequadas fontes nutricionais, sobretudo de nitrogênio e fósforo, alinhadas com as condições ambientais oferecidas de aeração e umidificação.

De acordo com a legislação holandesa, um solo merece intervenção quando o teor de HTP exceder a 5.000 mg.Kg^{-1} . Com base na Figura 4.9, no solo tratado a concentração de HTP ficou abaixo desse limite de intervenção em apenas 90 dias, em contrapartida o solo controle permaneceu fora dos padrões mesmo após 225 dias.

O sucesso desse tratamento (89,6% de degradação no solo tratado) não se deve somente à microbiota autóctone presente no solo mas, sobretudo, às técnicas aplicadas de aeração, fertilização e umidificação que permitiram estimular o crescimento dos microrganismos.

Outra forma de visualizar a eficiência do bioprocessamento é através da produtividade, conforme apresentado na Figura 4.10.

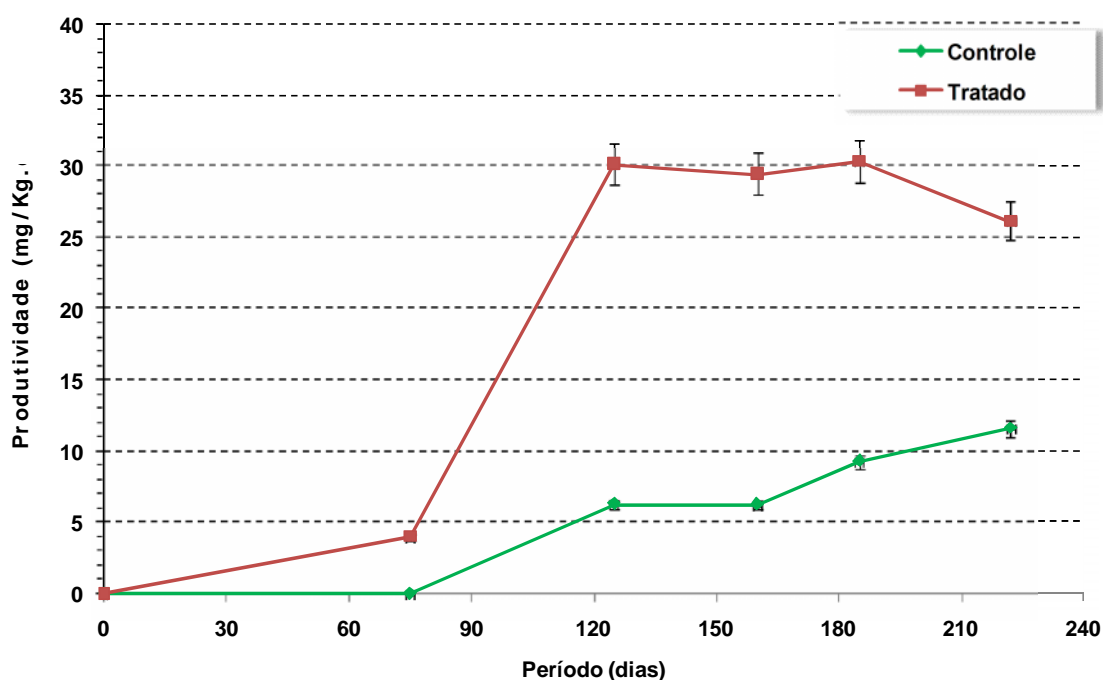


Figura 4.10: Produtividade de degradação de hidrocarbonetos totais do petróleo

De acordo com a Figura 4.10 nota-se que a produtividade de degradação de HTP foi maior no solo tratado em relação ao solo controle. A velocidade de degradação foi mais expressiva no período de 75 a 120 dias, e se manteve estável em $30 \text{ mg.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ no período de 120 a 190 dias, embora após 190 dias tendo apresentado ligeiro decréscimo, provavelmente devido a efeitos ocasionados por metabólitos formados. A produtividade média no solo tratado foi de $25,8 \text{ mg.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ enquanto o controle apresentou apenas $6,5 \text{ mg.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$.

Line *et al.* (1996), estudando o processo de *landfarming* através de técnicas de umidificação e aeração, obtiveram uma produtividade de degradação de HTP de $12 \text{ mg.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Por outro lado, Paudyn *et al.* (2007) trabalhando em região de clima ártico (localizado no Canadá) observaram uma redução de HTP de 2.800 ppm para menos de 200 ppm em 700 dias de tratamento ($3,71 \text{ mg.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$).

Balba *et al.* (1998) aplicaram a tecnologia de *landfarming* para o tratamento de resíduos oleosos na região desértica do Kuwait, e obtiveram uma redução de HTP de 40.000 mg.Kg^{-1} para 7.000 mg.Kg^{-1} em 12 meses ($91,67 \text{ mg.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$). Os experimentos de Souza *et al.* (2009) resultaram na redução de HTP de 13.500 mg.Kg^{-1} para 9.800 mg.Kg^{-1} em 108 dias ($34,25 \text{ mg.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$).

Comparando os resultados obtidos com os dados reportados na literatura verifica-se que o bioprocessamento em estudo teve excelente desempenho na degradação de HTP, considerando as técnicas empregadas, a concentração inicial de hidrocarbonetos e o período de tratamento.

Segundo Hejazi *et al.* (2003), o teor de HTP não pode ser empregado como resposta para quantificar o risco à saúde humana e ao meio ambiente, visto que engloba diferentes tipos de hidrocarbonetos em distintas proporções. No entanto, pode ser

empregado como uma ferramenta útil para identificação do grau de contaminação, assim como avaliar o desempenho de um processo de remediação.

Mesmo após o solo se enquadrar abaixo do limite preconizado pela legislação holandesa, em termos de HTP, o monitoramento se manteve até que o teor de HPA também alcançasse os níveis permitidos para descomissionamento.

4.2.6 Degradação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA)

Para avaliar a biodegradação foram monitoradas, também, as concentrações de compostos mais recalcitrantes, os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA).

Esses resultados estão apresentados na Figura 4.11.

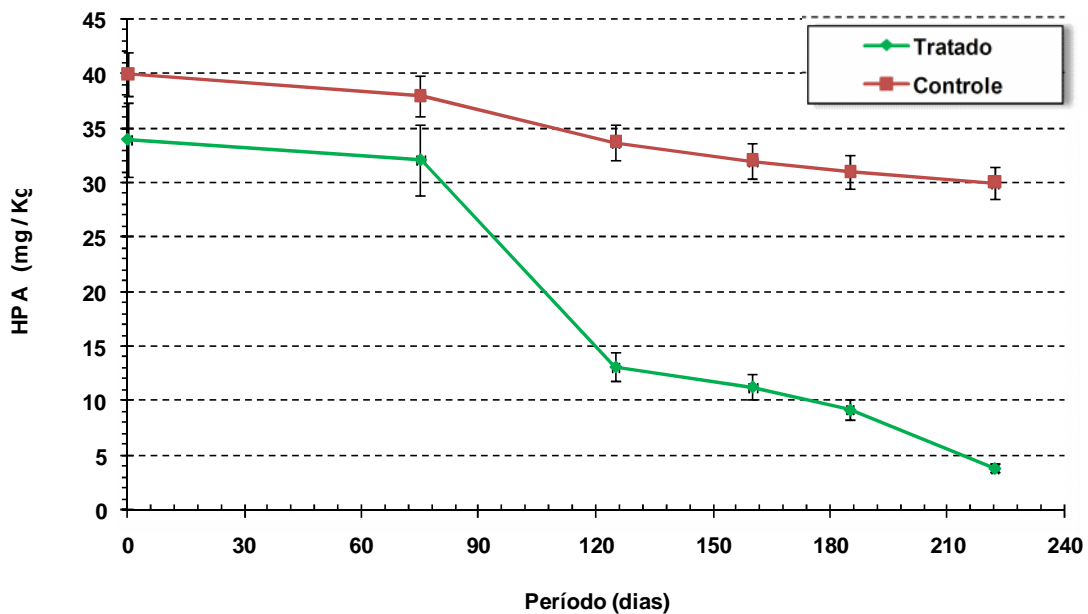


Figura 4.11: Degradação dos 16 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) prioritários da USEPA, nos solos tratados e controle

Pela Figura 4.11 nota-se que no solo tratado o somatório dos 16 HPA prioritários segundo a USEPA iniciou com $34,17 \pm 3,25 \text{ mg.Kg}^{-1}$ e atingiu $3,87 \pm 1,13 \text{ mg.Kg}^{-1}$ após 225 dias de tratamento, equivalente a 88,7% de degradação. A velocidade de biodegradação foi mais acentuada entre 75 e 130 dias. No solo controle a concentração

de HPA iniciou com $40,17 \text{ mg.Kg}^{-1}$ e alcançou $29,79 \text{ mg.Kg}^{-1}$ perfazendo 25,8% de degradação.

A análise da eficiência do bioprocesso através da quantificação de HPA se deve à reconhecida recalcitrância desses compostos.

Enfatiza-se a elevada mutagenicidade e carcinogenicidade causada por esses compostos (HARSEM *et al.*, 2007). Hejazi *et al.* (2003) destacam que a intoxicação pode ocorrer pelas vias dérmicas e aéreas, e os efeitos mais comuns são: alterações no DNA, troca de cromátídeos irmãos, aberrações cromossomiais e síntese descontrolada do DNA. Segundo Baird (2002), o mecanismo carcinógeno dos HPA envolve reações metabólicas de epoxidação por meio de monooxigenases (dependentes do citocromo P 450) formando moléculas estáveis capazes de se ligar ao DNA, induzindo, assim, a mutações e câncer.

Em vista desta problemática, as legislações ambientais estão cada vez mais severas em relação aos compostos policíclicos aromáticos. A legislação holandesa estabelece os seguintes valores máximos de HPA em solos semelhantes aos estudados nesse trabalho: $1,0 \text{ mg.Kg}^{-1}$ como referência de qualidade; $20,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ para alerta; e 40 mg.Kg^{-1} para intervenção em área industrial. Comparando-se com os resultados apresentados na Figura 4.11, nota-se que os solos tratados e controle estiveram abaixo do limite de intervenção em área industrial.

De acordo com a Figura 4.11, o solo tratado apresentou valores próximos ao padrão de referência de qualidade segundo a legislação holandesa. Entretanto o solo controle pode ser classificado como área de alerta, decorrente da concentração de HPA remanescente ser maior do que $20,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$, o que implica no estabelecimento de pelo menos um plano de monitoramento para o local.

A Figura 4.12 apresenta a produtividade de degradação de HPA.

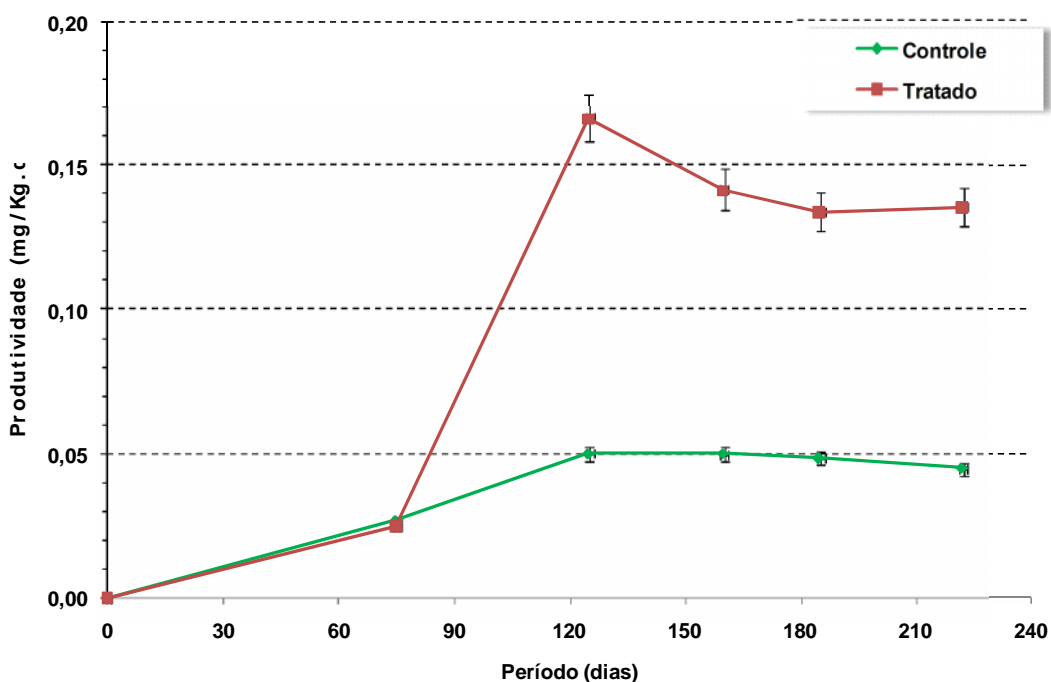


Figura 4.12: Produtividade de degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

De acordo com a Figura 4.12, nota-se que a produtividade de degradação de HPA foi maior no solo tratado em relação ao solo controle. A velocidade de degradação foi mais expressiva no período de 75 a 120 dias, e se manteve estável em $0,14 \text{ mg.Kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ no período de 150 a 225 dias. A produtividade média no solo tratado foi de $0,13 \text{ mg.Kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$, enquanto o controle teve apenas $0,04 \text{ mg.Kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$, três vezes menor, o que revela a importância das ações implementadas.

Picado *et al.* (2001) estudaram o tratamento de resíduo de coque pelo processo de *landfarming* contendo alta concentração de HPA (1.140 mg.Kg^{-1}), e após 3 meses obtiveram 63% de degradação, sendo mais acentuada para os compostos com 2 e 3 anéis benzênicos, e com uma produtividade média de $7,98 \text{ mg.Kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$.

Sayles *et al.* (1999) avaliaram a degradação de HPA em *landfarming* em escala piloto. A concentração de HPA total variou de 2.800 mg.Kg^{-1} (início) para 1.160 mg.Kg^{-1} (final) em 175 dias, equivalente a uma produtividade de $9,37 \text{ mg.Kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$. A avaliação toxicológica feita pelos autores indicou significativa redução do caráter carcinogênico e mutagênico no solo tratado.

Atagana (2004) viabilizou o tratamento de solo contaminado com creosoto (derivado do processamento do alcatrão de hulha) pelo processo de *landfarming* numa área contendo alta concentração de HPA ($1.229,9 \text{ mg.Kg}^{-1}$), e após um período de 10 meses observou a redução de HPA para $92,4 \text{ mg.Kg}^{-1}$, equivalente a uma produtividade média de $3,79 \text{ mg.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, sendo mais acentuada para HPA contendo 2 e 3 anéis benzênicos, embora os compostos com 4 e 5 anéis foram 81,5% degradados.

Comparando com os resultados reportados na literatura verifica-se que o bioprocessamento em estudo apresentou excelente desempenho na degradação de HPA, considerando as técnicas empregadas e o período de tratamento.

Na Figura 4.13 está detalhado o percentual de degradação dos 16 HPA prioritários segundo a USEPA nos solos tratado e controle.

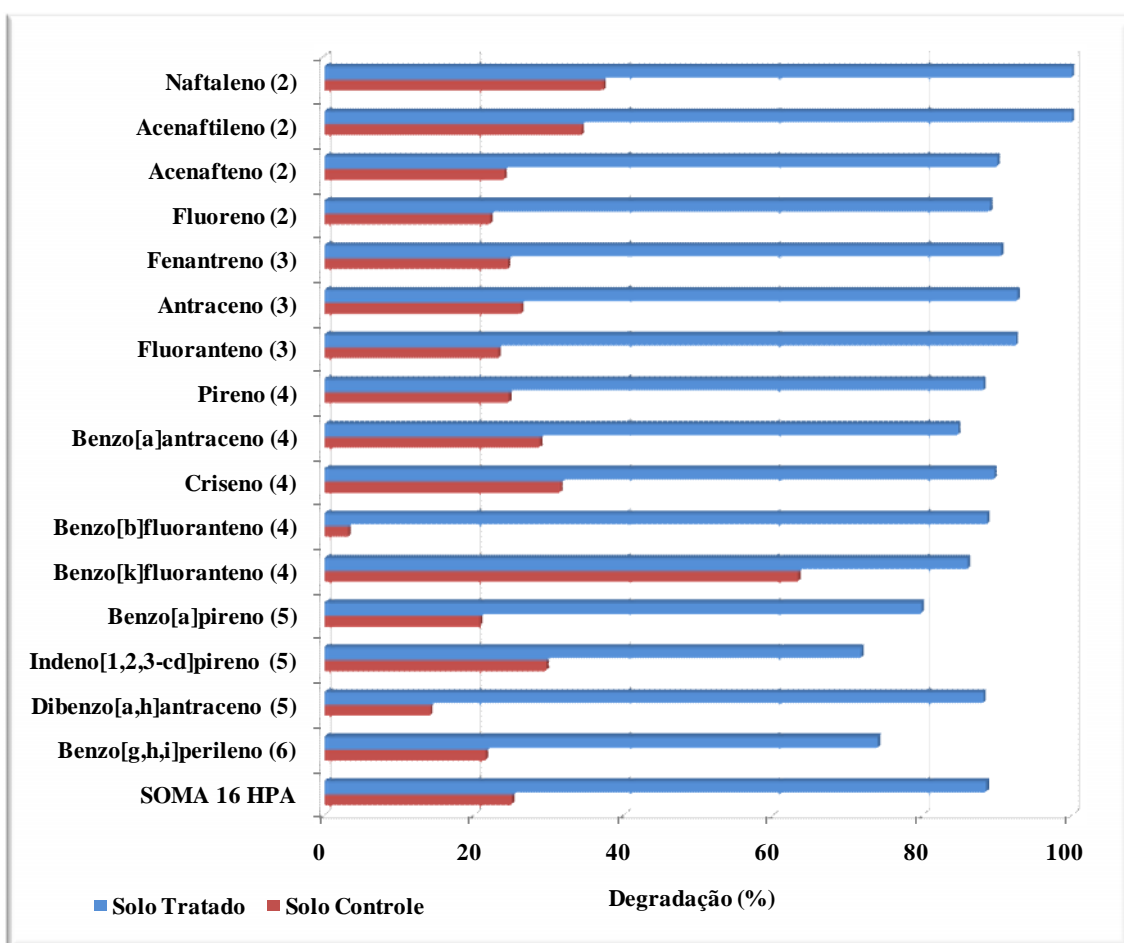


Figura 4.13: Degradação dos 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos da USEPA

A comparação da biodegradação dos compostos policíclicos aromáticos (Figura 4.13) indica que houve maior degradação desses compostos no solo tratado, embora houvesse remoção também no solo controle.

No solo tratado, Naftaleno e Acenaftileno foram totalmente degradados. Mesmo o composto sendo altamente recalcitrante como o Benzo[g,h,i]perileno apresentou 74% de degradação.

Oliveira e de França (2005) trataram solo arenoso contaminado com 14.000 mg.Kg⁻¹ de óleo árabe leve, e aplicaram técnicas de fertilização, correção do pH e bioaugmentação. Os autores reportam os seguintes valores de degradação: Naftaleno (40%), Fenantreno (35%), Criseno (33%), Benzo[a]antraceno (30%) e Benzo[b]fluoranteno (29%) em 56 dias de tratamento.

Segundo Xia *et al.* (2006) a eficiência da biodegradação de compostos como Benzo[g,h,i]perileno foi menor em relação a Criseno e Benzo[a]pireno. As eficiências de biodegradação para Criseno, Benzo[a]pireno e Benzo[g,h,i]perileno foram de 95%, 79% e 49%, respectivamente.

Os nossos resultados estão de acordo com os estudos reportados na literatura indicando que HPA com menor complexidade estrutural tende a ser mais facilmente biodegradado.

Sayles *et al.* (1999) descrevem que os compostos mais carcinogênicos são Benzo[a]antraceno, Criseno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[a]pireno, Dibenzo[a,h]antraceno e Indeno[1,2,3-cd]pireno. Os autores trataram HPA pelo processo de *landfarming* e obtiveram 59% de remoção de HPA totais, mas somente 26% de degradação da classe dos HPA carcinogênicos, que tendem a ser mais recalcitrantes.

A CESTEB prevê intervenção em solos de áreas industriais se as concentrações de Benzo[a]pireno e Benzo[g,h,i]perileno ultrapassarem 3,5 e 1,3 mg.Kg⁻¹, respectivamente. No período monitorado, o solo tratado apresentou concentrações desses compostos abaixo do limite de intervenção. Entretanto, no solo controle o Benzo[g,h,i]perileno permaneceu acima dos padrões devido à elevada recalcitrância em função do número de anéis benzênicos constituintes na estrutura molecular.

De acordo com os limites de intervenção da USEPA, a concentração limite do Benzo[b]fluoranteno é de 2,1 mg.Kg⁻¹. No solo tratado, em apenas 75 dias foi possível reduzir esta concentração para valores abaixo desse limite, entretanto o solo controle ficou fora dos padrões mesmo após 225 dias de tratamento.

A Tabela 4.3 apresenta a degradação das diferentes classes de HPA para os solos de controle e tratado.

Tabela 4.3: Relação entre número de anéis benzênicos do HPA e respectiva degradação

Solo	Nº de Anéis Benzênicos				
	2	3	4	5	6
	Degradação (%)				
Tratado	93,84 ± 5,23	91,88 ± 1,20	87,42 ± 1,98	79,92 ± 2,18	74,34
Controle	29,50 ± 7,47	24,72 ± 1,53	23,37 ± 2,96	21,57 ± 2,77	21,61

Pela Tabela 4.3 nota-se que quanto menor o número de anéis benzênicos na molécula, mais facilmente ocorre a biodegradação. O solo tratado apresentou degradação aproximadamente 3 vezes maior do que o controle para todas as classes de HPA.

Byss *et al.* (2008) avaliaram a remediação de uma área contaminada com creosoto (alta concentração de HPA) usando bioaugmentação com linhagens de basidiomicetos previamente selecionadas e isoladas. A concentração de HPA inicial foi

de 200mg.Kg⁻¹, e após 120 dias de tratamento obtiveram 96%, 72%, 49% e 38% de biodegradação de compostos contendo 2, 3, 4 e 5 anéis benzênicos, respectivamente.

Hamdi *et al.* (2007a) avaliaram a biodegradação específica de Antraceno (ANT), Pireno (PYR) e Benzo[a]pireno (B[a]P), e empregaram técnicas de bioestímulo e bioaumento para a remoção desses compostos. Os autores observaram completa degradação de ANT e PYR em apenas 30 dias, mas B[a]P reduziu de 1.000 mg.Kg⁻¹ para 420 mg.Kg⁻¹ em 90 dias. A velocidade de biodegradação foi coerente com o número de anéis benzênicos, sendo maior para o ANT e PYR, que possuem 3 e 4 anéis respectivamente, e mais lenta para o B[a]P, que pode estar relacionada com a forte interação dos 5 anéis benzênicos com a matriz sólida, resultando em baixa transferência de massa para os microrganismos.

Dentre os HPA estudados, o Benzo[a]pireno é o mais preocupante porque acumula na cadeia alimentar com propriedades físico-químicas semelhantes as de muitos inseticidas organoclorados como DDT, dieldrin e antrazina (BAIRD, 2002).

Os resultados obtidos neste trabalho resultaram na remoção de 83,4% e 20,5% de Benzo[a]pireno nos solos tratado e controle, respectivamente; no lixiviado do solo tratado não foi detectado este composto. A ABNT NBR ISO 10.004 estabelece o valor de 0,07 mg.L⁻¹ de Benzo[a]pireno como limite máximo permitido no lixiviado.

4.3 MONITORAMENTO MICROBIOLÓGICO E ENSAIO TOXICOLÓGICO

A microbiota do solo foi avaliada no período de tratamento do solo. No final, o solo tratado foi submetido a ensaio ecotoxicológico para verificar a eficiência de remoção de contaminantes tóxicos.

4.3.1 Monitoramento Microbiológico

Os resultados da concentração de microrganismos, em termos de Bactérias Aeróbias Heterotróficas (BAE), Fungos Filamentosos e Bactérias Anaeróbias Heterotróficas (BAN), estão apresentados na Figura 4.14 para os solos tratados e controle.

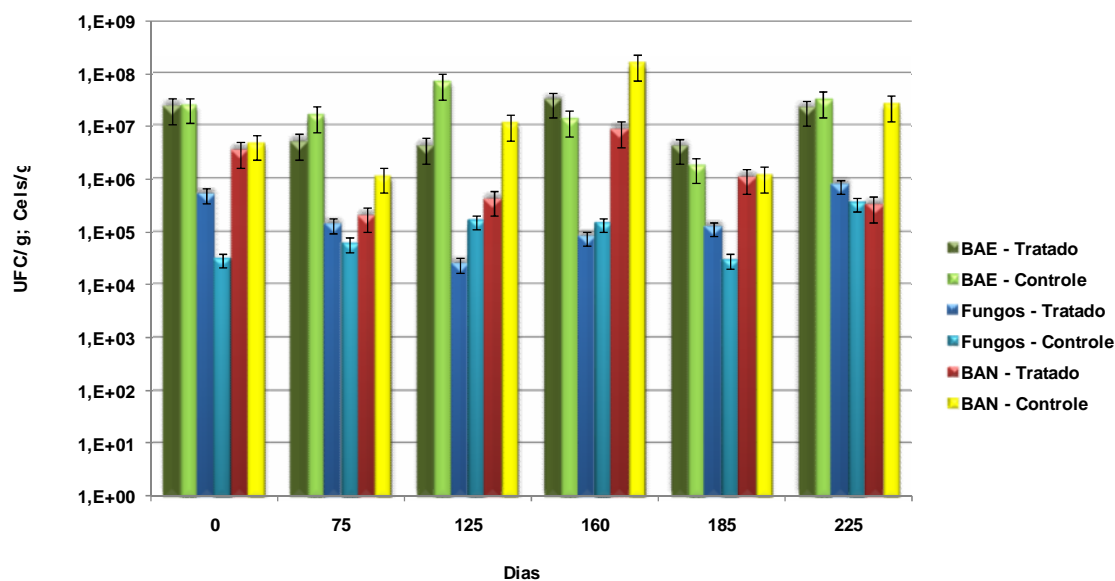


Figura 4.14: Quantificações de microrganismos nos solos tratados e controle durante o processo de *landfarming*.
BAE bactérias aeróbias; BAN Bactérias Anaeróbias

Pela Figura 4.14, observa-se que no solo tratado as populações de BAE, Fungos e BAN apresentaram valores médios de $1,4 \times 10^7$ UFC.g⁻¹, $2,7 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ e $2,2 \times 10^6$ Cels.g⁻¹, respectivamente. Essas concentrações estão compatíveis com os dados reportados pela literatura como efetivos para biodegradação de hidrocarbonetos (OLLIVIER & MAGOT, 2005).

Mphekgo & Cloete (2004) reportam que a população e diversidade da microbiota são informações importantes para avaliar o potencial de biorremediação, assim como o grau de contaminação do local.

Na célula controle, a população microbiana esteve na mesma ordem de grandeza em relação às células tratadas. Entretanto, observou-se maior concentração de BAN

neste solo devido à inexistência de técnicas de aeração que proporcionaram condições anóxicas mais acentuadas.

A performance da microbiota autóctone está associada ao solo da região amazônica que é considerado um ambiente complexo com ampla diversidade genética, resultante da interação de múltiplas variáveis, as quais incluem pH, umidade, composição do solo, variações climáticas e sinergismo da atividade biótica (BATISTA, 2007). Os principais gêneros de bactérias encontradas nos solos da região amazônica são:

- Anaeróbias e aeróbias facultativas: *Acetovibrio*, *Bacterioides*, *Butyrivibrio*, *Caldocellum*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Eubacterium*, *Micromonospora*, *Pseudonocardia*, *Ruminococcus* e *Thermoanaerobacter*.

- Aeróbios e anaeróbios facultativos: *Acidothermus*, *Actinoplanes*, *Actinopolyspora*, *Archangium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Celvibrio*, *Corynebacterium*, *Cytophaga*, *Frankia*, *Herpetosiphon*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces*, *Thermonospora* e *Xanthomonas*.

Ollivier & Magot (2005) relacionaram alguns gêneros microbianos degradadores de compostos aromáticos, tais como: **Naftaleno** (*Acidocella*, *Clavibacter*, *Neptunomonas*, *Polaromonas*, *Coccochloris*, *Nostoc*, *Basidiobolus*, *Choanephora*, *Circinella*, *Claviceps*, *Cokeromyces*, *Conidiobolus*, *Cunninghamella*, *Emericellopsis*, *Epicoccum*, *Gilbertella*, *Helicostylum*, *Hyphochytrium*, *Linderina*, *Neurospora*, *Panaeolus*, *Pestlotia*, *Phytochytrium*, *Phycomyces*, *Phytophthora*, *Rhizophlyctis*, *Rhizopus*, *Saccharomyces*, *Saprolegnia*, *Smittium*, *Sordaria*, *Syncephalastrum*, *Thamnidiu* e *Zygorhynchus*); **Fenantreno** (*Acidovorax*, *Beijerinckia*, *Comomonas*, *Lutibacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardioides*, *Paenibacillus*, *Rhodococcus*, *Vibrio*, *Agmenellum*, *Irpex*, *Kuehneromyces*, *Laetiporus*); **Pireno** (*Thermus*, *Coniothyrium*,

Corioloopsis, Crinipellis, Cyclothyrium, Gliocladium, Mucor, Nematoloma, Penicilium, Pleurotus, Pseudallescherita, Psilocybe, Scopulariopsis, Trametes); **Fluoranteno** (*Pasteurella*); **Fluoreno** (*Absidia*); **Benzo[a]pireno** (*Agrocybe, Bjerkandera, Chrysosporium, Marasmiellus, Mortierella, Phanerochaete, Romaria, Stropharia, Ankistrodesmus, Scenedesmus, Selenastrum*); e **Antraceno** (*Rhizoctonia*).

As Figuras 4.15, 4.16 e 4.17 apresentam as análises microscópicas da microbiota do solo tratado.

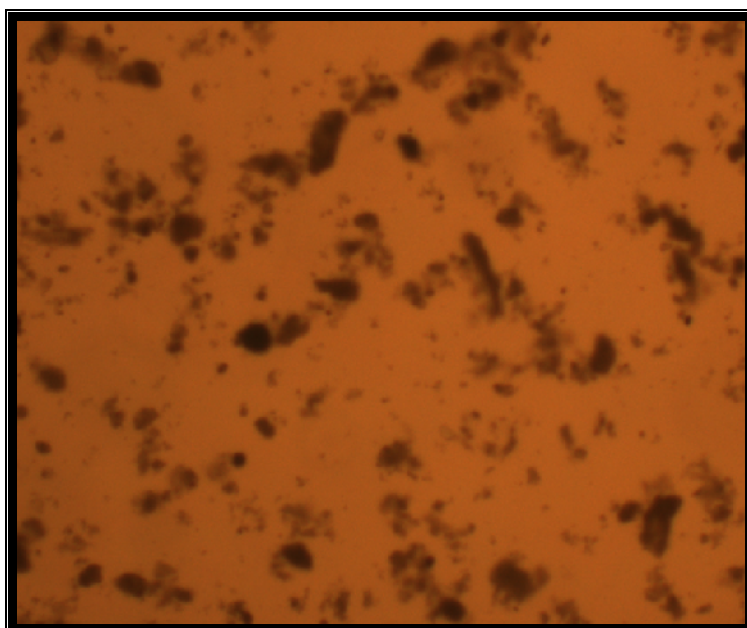


Figura 4.15: Microscopia do solo em preparação a fresco – aumento de 100x

A técnica aplicada para visualização de fungos (Figura 4.15) permitiu comprovar a presença deste grupo microbiano no solo em estudo, capaz de biodegradar diversas classes de hidrocarbonetos.

Paula *et al.* (2006) avaliaram a ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares (*Glomus clarum* e *Paraglomus occultum*) em solo de *landfarming* para tratamento de resíduos petroquímicos. Nesse estudo, os autores verificaram o potencial dessas espécies na remoção de poluentes tóxicos.

Atagana *et al.* (2006) trabalharam em *landfarming* para tratamento de creosoto, isolando e identificando 5 gêneros de fungos: *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Pleurotus*. Os autores destacam a habilidade desses microrganismos na degradação de compostos recalcitrantes como HPA. O diferencial dos fungos em relação aos demais grupos microbianos se deve a maior dispersão das hifas, resultando em maior área efetiva de atuação e produção de enzimas extracelulares.

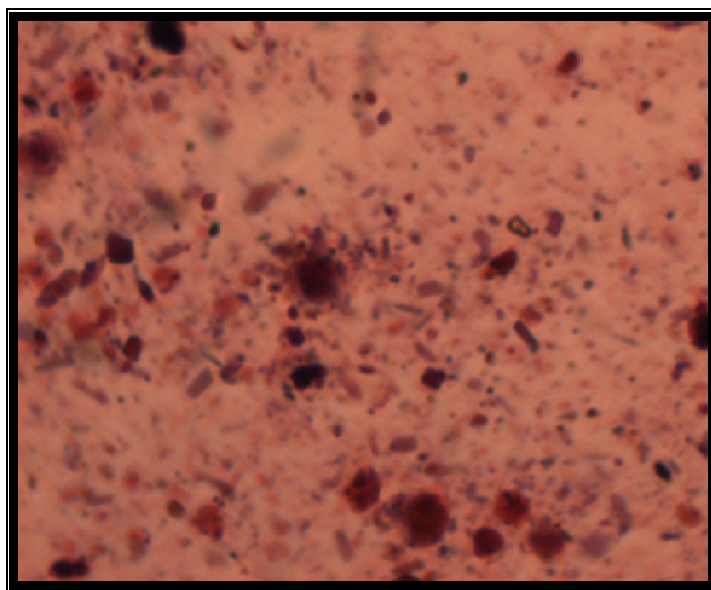


Figura 4.16: Microscopia de preparações coradas pelo método de Gram do solo – aumento de 1000x

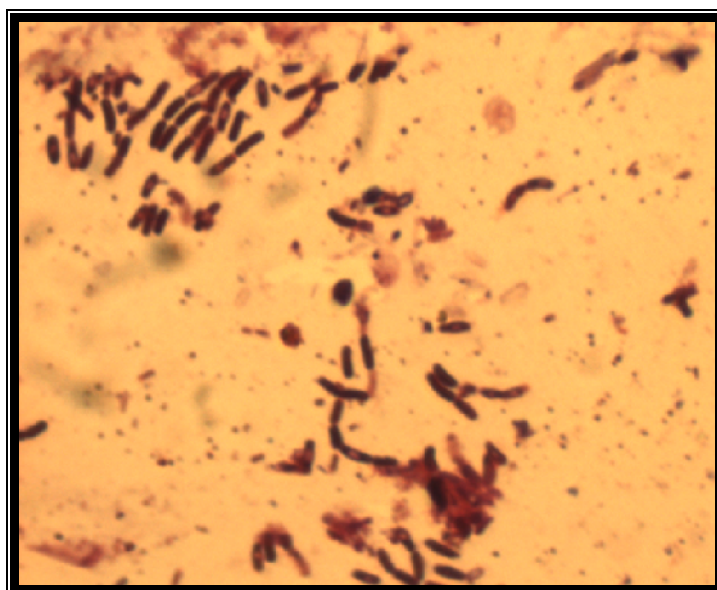


Figura 4.17: Microscopia de preparações coradas pelo método de Gram de microrganismos crescidos em meio nutriente – aumento de 1000x

De acordo com a Figura 4.16 observa-se a presença de bastonetes Gram positivas e negativas. A Figura 4.17 apresenta a presença de células em forma de bastonetes com diferentes dimensões, isoladas e em cadeias, retas e curvas, esporuladas e não esporuladas, Gram positivas e negativas.

Lima (2002) isolou do solo de *landfarming* avaliado neste trabalho alguns microrganismos, identificando os seguintes gêneros de bactérias: *Proteus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Shigella*, *Klebsiella* e *Enterobacter*.

A partir de pesquisa feita no Manual Bergey de determinação bacteriológica (HOLT *et al.*, 1994), foram levantadas algumas das características principais dos gêneros identificados.

a) Gênero *Proteus*: pertencente à família *Proteeae*, Gram-negativa; aeróbia estrita; oxidase negativa; células arredondadas, diâmetro de 0,4 a 0,8 μm , comprimento de 1,0 a 3,0 μm e móveis por flagelos peritríquios. As espécies pertencentes a este gênero produzem ácidos a partir de muitos mono e dissacarídeos, assim como glicerol. São encontradas no intestino do homem e outros mamíferos, também ocorrem em manguezais, solos e águas poluídas.

b) Gênero *Pseudomonas*: pertencente à família *Pseudomonaceae*, Gram-negativa; aeróbia facultativa utilizando oxigênio como aceptor final de elétrons, e em alguns casos o nitrato pode assumir essa funcionalidade; oxidase positiva ou negativa, catalase positiva; células em forma de bastonetes retos ou levemente curvados, diâmetro de 0,5 a 1,0 μm e comprimento de 1,5 a 5,0 μm ; móveis por um ou vários flagelos polares e, raramente imóveis. As espécies pertencentes a este gênero são frequentemente encontradas em locais contaminados por hidrocarbonetos, visto que participam ativamente do processo de biodegradação de inúmeros compostos orgânicos.

Obayori *et al.* (2009) estudaram a biodegradação de óleo cru, e identificaram duas linhagens de *Pseudomonas* (*putida* e *aeruginosa*). Os autores destacam ainda que espécies de *Pseudomonas aeruginosa* foram mais efetivas na biodegradação de hidrocarbonetos, conseguindo degradar compostos alifáticos diversos (C₆ a C₁₆), compostos aromáticos variados, incluindo policíclicos aromáticos.

Ollivier & Magot (2005) citam outras espécies do gênero *Pseudomonas* degradadoras de hidrocarbonetos: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas chlororaphis* e *Pseudomonas syringae*.

c) Gênero *Acinetobacter*: pertencente à família *Acholeplasmataceae*, Gram-negativa, mas ocasionalmente torna-se difícil de ser distinguida visualmente; aeróbia estrita; oxidase negativa, catalase positiva; células arredondadas, mas comumente tornam-se esféricas na fase estacionária de crescimento, diâmetro de 0,9 a 1,6 µm e comprimento de 1,5 a 2,5 µm; imóveis, mas apresentam fímbrias polares. As espécies pertencentes a este gênero ocorrem naturalmente nos solos, águas e efluentes. Essas linhagens apresentam crescimento entre 20 e 30°C, mas algumas espécies têm crescimento ótimo entre 33-35°C.

d) Gênero *Alcaligenes*: pertencente à família *Actinobacilleae*, Gram-negativa; aeróbia obrigatória utilizando oxigênio como aceptor final de elétrons, mas algumas linhagens apresentam respiração anaeróbia usando nitrato ou nitrito como aceptor final de elétrons; oxidase positiva, catalase positiva; células arredondadas ou ovais, diâmetro de 0,5 a 1,0 µm e comprimento de 0,5 a 2,6 µm; móveis com 1-8 flagelos peritríquios. As espécies pertencentes a este gênero são quimiorganotróficas consumindo uma variedade de ácidos orgânicos como fonte de carbono, e ocorrem naturalmente no solo e água.

Jiang *et al.* (2007) avaliaram a biodegradação de efluente contendo alta concentração de compostos fenólicos usando espécies *Alcaligenes faecalis*. A

identificação desta espécie foi possível através da técnica de sequenciamento do gene rRNA 16S.

e) **Gênero *Shigella*:** pertencente à família *Serratiae*, Gram-negativa; anaeróbia facultativa tendo ambos tipos de respiração; oxidase negativa, catalase positiva; células arredondadas, diâmetro de 0,3 a 1,0 μm e comprimento de 1,0 a 6,0 μm ; imóveis. As espécies deste gênero são quimiorganotróficas e fermentam açúcares, embora não usem citrato ou maleato como fonte de carbono.

f) **Gênero *Klebsiella*:** pertencente à família *Halobacteriaceae*, Gram-negativa formando cápsulas; anaeróbia facultativa tendo ambos tipos de respiração; oxidase negativa; células estreitas e arredondadas, arranjos simples, em pares ou pequenas cadeias, diâmetro de 0,3 a 1,0 μm e comprimento de 0,6 a 6,0 μm ; imóveis. As espécies pertencentes a este gênero podem usar citrato e glicose como fonte de carbono, gerando 2,3-butanodiol como produto intermediário, e produzindo lactato, acetato e ácido fórmico (em menor quantidade) e etanol (em grande quantidade).

g) **Gênero *Enterobacter*:** pertencente à família *Ehrlichiae*, Gram-negativa; anaeróbia facultativa; células estreitas e arredondadas, diâmetro de 0,6 a 1,0 μm e comprimento de 1,2 a 3,0 μm ; móveis por flagelos peritríquios. Fermentam glicose produzindo ácidos e gases. Citrato e maleato são geralmente usados como fonte de carbono e energia com temperatura ótima de crescimento em 30°C e amplamente distribuída no meio-ambiente.

Os gêneros *Pseudomonas* e *Alcaligenes* apresentam oxidase positiva indicando atuação das enzimas oxigenases na degradação aeróbia de hidrocarbonetos. Os outros gêneros microbianos aeróbios podem degradar alcanos via hidroxilação pela ação de enzimas pertencentes ao citocromo P450.

Outro grupo microbiano que merece investigação está relacionado às algas. Navarrete *et al.* (2006) promoveram o tratamento de resíduos oleosos em *landfarming*

através de bioaugmentação com algas alóctones (*Anabaena*, *Chroococcus*, *Scytonema* e *Lyngbya* - Cyanophyta, *Klebsormidium*, *Mougeotia* e *Oedogonium* - Chlorophyta e *Navícula* – Bacillariophyta).

Convém enfatizar que a concentração de microrganismos no *landfarming* estudado foi semelhante em todas as células, incluindo o solo controle. Portanto, as técnicas de bioestimulação através de umidificação e aeração aperfeiçoaram as atividades metabólicas de biodegradação de hidrocarbonetos.

Nos estudos para determinar os efeitos dos agentes contaminantes e do manejo do solo sobre a atividade e a dinâmica da comunidade microbiana, as análises mais utilizadas como indicadoras são: produção de CO₂ pela respiração microbiana, mineralização de nitrogênio e carbono, fixação biológica do nitrogênio, atividades enzimáticas, contagem de grupos microbianos e biomassa microbiana de C, N, P e S. Recentemente, também, os métodos moleculares de extração de DNA do solo e a análise de fosfolipídios estão sendo utilizados na obtenção de indicadores para avaliação do impacto ocasionado pela presença de agentes poluentes no solo (SILVEIRA & FREITAS, 2007).

Segundo Batista (2007), a eficiência da extração de DNA microbiano do solo depende da qualidade do solo, particularmente do teor de argila, do conteúdo de matéria orgânica e do pH.

4.3.2 Avaliação Ecotoxicológica

Os testes de ecotoxicidade são ferramentas importantes para estimar se as concentrações de um determinado composto são capazes de provocar alguma resposta deletéria específica em uma dada população de organismos e deve ser parte integrante de qualquer análise de poluição, devendo serem utilizados simultaneamente com

estudos físico-químicos e microbiológicos, como parte de uma avaliação mais completa (HAMDI *et al.*, 2007b). Constitui, portanto, uma ferramenta para comprovação de descontaminação de um ambiente.

Sayles *et al.* (1999) citam algumas metodologias para avaliação ecotoxicológica em *landfarming*, tais como: alterações mitóticas de cepas de *Allium*; teste de sobrevivência de anelídeos das espécies *Eisenia foetida* e *Lumbricus terrestris*; medidas do comprimento das raízes e germinação de sementes das espécies vegetais de *Avena sativa* e *Lactuca sativa*; e ensaio Microtox em fase sólida usando espécies de *Vibrio fischeri*. Esses ensaios avaliam as respostas agudas, crônicas e letais dos organismos quando submetidos aos contaminantes que podem causar efeitos deletérios através de alterações mitóticas, mutagênicas, crescimento e metabolismo.

Navarrete *et al.* (2006) avaliaram a desintoxicação do solo de *landfarming* usando minhocas da espécie *Eisenia foetida* (Oligochaeta), e observaram melhores resultados para os experimentos submetidos à bioaugmentação com algas, as quais absorveram os metais do solo tornando-o menos tóxico.

Os resultados do ensaio de letalidade (toxicidade aguda) estão apresentados na Tabela 4.4. No início de cada experimento foram utilizadas 10 minhocas. As respostas estão expressas em duplicatas para os períodos de 7 e 14 dias.

Tabela 4.4: Organismos vivos no ensaio de ecotoxicologia

Tipo de Solo	7 dias	14 dias
	Número de organismos vivos	
Tratado	10 ; 10	10 ; 9
Controle	9 ; 5	4 ; 4

Pela Tabela 4.4 nota-se que o índice médio de letalidade nos testes do solo tratado foi de zero e $5\pm 5\%$ para os períodos de 7 e 14 dias, respectivamente. Estes valores indicam a desintoxicação do solo tratado.

Entretanto, o solo controle apresentou letalidade de $30\pm 28\%$ e 60% para 7 e 14 dias, respectivamente. Esse índice indica toxicidade remanescente neste solo.

Geissen *et al.* (2008), trabalhando em condições semelhantes, obtiveram 6,6% 19% e 88% de letalidade para os organismos submetidos aos solos controle, tratados em *landfarming* e compostagem, respectivamente. Os autores reportam ainda que as minhocas da espécie *Polypheretima elongata* e *Eisenia foetida* apresentaram resultados semelhantes.

Entretanto, não se pode afirmar que as concentrações remanescentes dos contaminantes ainda não sejam tóxicas para os organismos do solo ou mesmo que o uso de substâncias durante o processo de remediação da área não possa ter afetado seu equilíbrio ecológico.

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES

- A adequação do *landfarming* às condições de tratamento de resíduos sólidos foi uma etapa fundamental para facilitar as operações de homogeneização e umidificação do solo. O isolamento de uma área (célula controle) foi fundamental para se avaliar o desempenho do bioprocessos;
- A composição granulométrica do solo indica predominância de areia resultando em maior permeabilidade facilitando os fenômenos de transferência de massa, em especial oxigênio, nutrientes (nitrogênio e fósforo) e água;
- O volume de água adicionado (umidificação), a fertilização e o teor de oxigênio na matriz do solo (aeração) foram responsáveis pela elevada biodegradação de hidrocarbonetos, visto que no solo controle a biodegradação foi muito menor;
- A concentração de hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP) decresceu significativamente no decorrer do período de tratamento no solo, obtendo-se 89,6% de degradação com uma produtividade média de degradação de 25,8 mg.Kg⁻¹.dia⁻¹. Entretanto, o solo controle teve inexpressiva degradação da ordem de 22,4% (6,5 mg.Kg⁻¹.dia⁻¹), devido ao baixo metabolismo microbiano;
- A degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) foi da ordem de 88,6% (0,13 mg.Kg⁻¹.dia⁻¹) no solo tratado, enquanto o solo controle apresentou 25,1% de degradação (0,04 mg.Kg⁻¹.dia⁻¹);
- Quanto menor o número de anéis benzênicos na molécula, mais facilmente ocorre biodegradação;
- A população de BAE, Fungos e BAN apresentaram um valor médio de 1,4x10⁷ UFC.g⁻¹, 2,6x10⁵ UFC.g⁻¹ e 2,2 x10⁶ Cels.g⁻¹, respectivamente. Essa concentração de microrganismos está compatível com os dados reportados pela literatura como efetivos para biodegradação de hidrocarbonetos;

- Os resultados foram promissores considerando o tempo de tratamento e concentração inicial de contaminantes. Os teores de HTP e HPA obtidos no solo tratado estiveram abaixo dos limites de intervenção preconizados pelas legislações brasileira (CETESB), holandesa e americana;
- O teste de ecotoxicidade no solo tratado foi um indicativo da eficiência do bioprocessamento que pode ser comprovado pela alta taxa de remoção de policíclicos aromáticos;
- Foi possível tratar uma área de 1.000 m², correspondente as células A, B, C, D e E, perfazendo aproximadamente 387 toneladas de resíduo sólido em 225 dias.

5.1 SUGESTÕES

Considerando os resultados obtidos, providências tornam-se necessárias, tais como:

- Estudar a viabilidade técnica-econômica do emprego das fontes de nitrogênio e fósforo de resíduos agrícola e industrial;
- Estudar a cinética da biodegradação de hidrocarbonetos pelos microrganismos autóctones;
- Quantificar parâmetros bioquímicos das enzimas oxidoreduções, desidrogenases e hidrolases.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), 1997, *Tratamento no Solo - Landfarming* ABNT NBR ISO 13.894.

_____, 2004, *Resíduos Sólidos – Classificação* ABNT NBR ISO 10.004.

_____, 2004, Procedimento para Obtenção de Extrato Lixiviado de Resíduos Sólidos ABNT NBR ISO 10.005.

_____, 2004, Procedimento para Obtenção de Extrato Solubilizado de Resíduos Sólidos ABNT NBR ISO 10.006.

_____, 2004, *Amostragem de Resíduos Sólidos* ABNT NBR ISO 10.007.

AL-AWADHI, N., AL-DAHER, R., EL NAWAWY, A., BALBA, M. T., 1996, “Biodegradation of oil contaminated soil in Kuwait. Landfarming to remediate oil contaminated soil”, *Journal of Soil Contamination*, v. 5, n. 3, pp. 243-260.

ALEXANDER, M., 1999, *Biodegradation and bioremediation*. California, Academic Press. Inc.

ALVES, J. O., VALENTE, M. C. M., SIMÕES, M. A. P., SANTOS, M. T., 1996, “Landfarming in the treatment by CETREL of organic waste from a petrochemical to remediate oil contaminated soil”, *Journal of Soil Contamination*, v. 5, n. 3, pp. 243-260.

APHA (American Public Health Association), 1992, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 18 ed., Maryland, USA.

API (American Petroleum Institute), 1983, *Land Treatment Practice in the Petroleum Industry*. Washington, Environmental Research and Technology.

ATAGANA, H.I., 2004, “Bioremediation of creosote-contaminated soil in South Africa by landfarming”, *Journal of Applied Microbiology*, v.96, pp. 510-520.

- ATAGANA, H.I., HAYNES, R.J., WALLIS, F.M., 2006, “Fungal bioremediation of creosote contaminated soil: A laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fung”, *Water, Air and Soil Pollution*, v. 172, pp. 201-219.
- ATLAS, R.M., 1995, “Bioremediation of petroleum pollutants”, *Biodeterioration & Biodegradation*, pp. 317-327.
- BAIRD, C., 2002, *Química Ambiental*. 2. ed., São Paulo. Bookman.
- BALBA, M.T., AL-DAHER, R., AL-AWADHI, N., CHINO, H., TSUJI, H., 1998, “Bioremediation of oil-contaminated desert soil: The Kuwaiti experience”, *Environmental International*, v. 24, n. 1/2, pp. 163-173.
- BAPTISTA, S.J., 2007, *Avaliação do Emprego de Biosurfactante na Biorremediação de Solos Contaminados com Óleo Diesel*. Tese de D.Sc., EQ/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- BATISTA, S.B., 2007, *Diversidade e atividades microbianas do solo da Floresta Amazônica-Brasil, submetida a estresse híbrido utilizando técnicas de biologia molecular*. Dissertação de D.Sc., IMPPG/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- BENTO, F.M., CARMARGO, F.A.O., OKEKE, B.C., FRANKENBERGER, W.T., 2005, “Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation”, *Bioresource Technology*, v. 96, pp. 1049-1055.
- BOOPATHY, R., 2000, “Factors limiting bioremediation technologies”, *Bioresource Technology*, v. 74, pp. 63-67.
- CASTRO, R.A., CARVALHO, F.J.PC., KRENCZYNSKI, M.C., GONÇALVES, C.M., OLIVEIRA, S.C.T., LIMA, V., CREPLIVE, M., JOANELLO Jr., L.A., 2005, “Otimização do Sistema de *Landfarming* da RPBC – Refinaria Presidente Bernardes”, *3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás*.
- CESTEB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São de Paulo). *Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas*

- subterrâneas no estado de São Paulo*. Acesso em 03 de janeiro de 2009 e disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/valores.asp>.
- CRAVO Jr., W.B., 1998, *Biodegradação de querosene de aviação (QAV) por culturas mistas e por pseudomonas aeruginosa*. Dissertação de M.Sc., EQ/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- DEL'ARCO, J.P., 1999, *Degradação de hidrocarbonetos por bactérias e fungos em sedimento arenoso*. Tese de D.Sc., EQ/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- DEL'ARCO, J.P., de FRANÇA, F.P., 1999, "Biodegradation of crude oil in sandy sediment", *Biodeterioration & Biodegradation*, v. 44, pp. 87-92.
- GEISSEN, V., GOMEZ-RIVERA, P., LWANGA, E.H., MENDOZA, R.B., NARCÍAS, A.T., MARCÍAS, E.B., 2008, "Using earthworms to test the efficiency of remediation of oil-polluted in tropical Mexico", *Ecotoxicology and Environmental Safety*. . n. 2, pp. 103-111.
- GENOUW, G., DE NAEYER, F., VAN MEENEN, P., VAN DE WERF, H., DE HIJS, W., WESTRAETE, W., 1994, "Degradation of oil sludge by landfarming a case-study at the Ghent harbou", *Biodegradation*, v. 5, pp. 37-46.
- HAMDI, H., BENZARTI, S., MANUSADZIANAS, L., AOYAMA, I., JEDIDI, N., 2007a, "Bioaugmentation and Bioestimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions", *Soil Biology & Biochemistry*, v. 39, pp. 1926-1935.
- HAMDI, H., BENZARTI, S., MANUSADZIANAS, L., AOYAMA, I., JEDIDI, N., 2007b, "Solid-phase bioassays and soil microbial activities to evaluate PAH-spiked soil ecotoxicity after a long-term bioremediation process simulating landfarming", *Chemosphere*, n. 70, pp. 135-143.
- HARMSSEN, J., RULKENS, W.H., SIMS, R.C., RIJTEMA, P.E., ZWEERS, A.J., 2007, "Theory and application of landfarming to remediate polycyclic aromatic hydrocarbons and mineral oil-contaminated sediments; beneficial reuse", *Journal of Environmental Quality*, n. 36, pp. 1112-1122.

- HEJAZI, R.F., HUSAIN, T., KHAN, F.I., 2003, "Landfarming operation of oil sludge in Arid Region - Human health risk assessment", *Journal of Hazardous Materials*, n. 99, pp. 287-302.
- HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T., 1994, "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", Williams & Wikins, 9 ed., Baltimore, USA.
- JATAR, M.P., CORREA, M., GRAU, J.R., CARNEIRO, M., 1993, "Oil sludge landfarming biodegradation experiment conducted at a tropical site in eastern Venezuela", *Waste Management & Research*, n. 11, pp. 97-106.
- JIANG, Y., WEN, J., BAI, J., JIA, X., HU, Z., 2007, "Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis*", *Journal of Hazardous Materials*, n. 147, pp. 672-676.
- LIMA, A.L., 2002, *Efeito da Umidade do Solo na Decomposição de Hidrocarbonetos Residuais em Landfarming Controlado*. Dissertação de M.Sc., UFAM, Manaus, AM, Brasil.
- LINE, M.A., GARLAND, C.D., CROWLEY, M., 1996, "Evaluation of landfarm remediation of hydrocarbon-contaminated soil at the inveresk railyard, Launceston, Australia", *Waste Management*, v. 16, n. 7, pp. 567-570.
- MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., DUNLAP, P.V., CLARK, D.P., 2008, *Brock Biology of Microorganisms*. 12 ed., New Jersey, Prentice Hall.
- MARIANO, J.B., 2005, *Impactos Ambientais do Refino de Petróleo*. 1 ed., Rio de Janeiro, Interciência.
- MARIJKE, M. A., van VLERKEN, F., 1998, "Changes for biological techniques in sediment remediation", *Water Science Technology*, v. 37, n. 6-7, pp. 345-353.
- MARIN, J.A., HERNANDEZ, T., GARCIA, C., 2005, "Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity", *Environmental Research*, n. 98, pp. 185-195.

- MMA (Ministerio do Meio Ambiente). Resoluções CONAMA. Acesso em 10 de fevereiro de 2009 e disponível em <http://www.mma.gov.br/>.
- MME (Ministerio de Minas e Energia). Balanço Energético Nacional. Acesso em 03 de fevereiro de 2009 e disponível em <http://www.mme.gov.br/>.
- MOREIRA, F.M.S., SIQUEIRA, J.O., 2002, *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. Lavras, MG, UFLA/FAEPE.
- MPHEKGO, P. M., CLOETE, T.E., 2004, “Bioremediation of petroleum hydrocarbons through landfarming: Are simplicity and cost-effectiveness the only advantages?”, *Environmental Science & Bio/Technology*, n. 3, pp. 349-360.
- NAVARRETE, A.A., ANGELIS, D.F., NECCHI JR., O., FURLAN, L.T., GONÇALVES, R.A., 2006, “Alterações químicas e toxicológicas do solo de *landfarming* de refinaria de petróleo enriquecido com comunidades de algas”, In: 19ª Reunião Anual do Instituto Biológico, São Paulo (SP), Editora IB, v. 68, pp. 321-324.
- NRCS (Natural Resources Conservation Services), Soil Texture Calculator. Acesso em 20 de janeiro de 2009 e disponível em <http://soils.usda.gov/technical/aids/investigations/texture/>.
- OBAYORI, O.S., ADEBUSOYE, S.A., ODEWALE, A.O., OYETIBO, G.O., OLUYEMI, O.O., AMOKUN, R.A., ILORI, M.O., 2009, “Differential degradation of crude oil (Bonny Light) by four *Pseudomonas* strains”, *Journal of Environmental Sciences*, n. 21, pp. 243-248.
- OLIVEIRA, F.J.S., 2001, *Biorremediação de solo arenoso contaminado por óleo cru*. Tese de D.Sc., EQ/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- OLIVEIRA, F. J. S., DE FRANÇA, F. P., 2004, “The use of biostimulation and intrinsic bioremediation for crude-oil contaminated sandy soil treatment”, *Solos e Rochas - Revista Brasileira de Geotecnia*, v. 27, n. 3, pp. 287-292.

- OLIVEIRA, F.J.S., de FRANÇA, F.P., 2005, "Increase in removal of polycyclic aromatic hydrocarbons during bioremediation of crude oil-contaminated sandy soil", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 121-124, pp. 593-603.
- OLLIVIER, B., MAGOT, M., 2005, *Petroleum Microbiology*. Washington D.C., USA, ASM Press.
- PAUDYN, K., RUTTER, A., ROWE, R.K., POLAND, J.S., 2007, "Remediation of hydrocarbon contaminated soils in the Canadian arctic by landfarming", *Cold Regions Science and Technology*, pp.1-13.
- PAULA, A.M., SOARES, C.R.F.S., SIQUEIRA, J.O., 2006, "Biomassa, atividade microbiana e fungos micorrízicos em solo de landfarming de resíduos petroquímicos", *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 10, n. 2, pp. 448-455.
- PELTOLA, R., SALONEN, M.S., PULKKINEN, J., KOIVUNEN, M., TURPEINEN, A.R., AARNIO, T., ROMANTSCHUK, M., 2006, "Nitrification in polluted soil fertilized with fast-and slow-releasing nitrogen: A case study at a refinery landfarming site", *Environmental Pollution*, n. 143, pp. 247-253.
- PEREIRA, P.F.S., 2008, *Perfil Analítico da Biodegradação de Solos Arenoso e Argiloso Contaminados por Óleo Cru*. Dissertação de M.Sc., IQ/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- PICADO, A., NOGUEIRA, A., BAETA-HALL, L., MENDONÇA, E., DE FATIMA, M.R., DO CÉU, M.S., MARTINS, A., ANSELMO, A.M., 2001, "Landfarming in a PAH-contaminated soil", *Journal Environmental Science Health*, v. 36, pp. 1579-1588.
- RIBEIRO, K.O., OLIVEIRA, F.J.S., de FRANÇA, F.P., CARDOSO, V.L., 2004, "Biorremediação de solo argiloso contaminado com óleo cru". In: *XV Congresso Brasileiro de Engenharia Química*.
- RISER-ROBERT, E., 1998, *Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical, and chemical process*. Florida, USA, CRC Press LLC.

- SAYLES, G.D., ACHESON, C.M., KUPFERLE, M.J., SHAN, Y., ZHOU, Q., MEIER, J.R., CHANG, L., BRENNER, R.C., 1999, "Land treatment of PAH-contaminated soil: performance measured by chemical and toxicity assays", *Environmental Science and Technology*, v. 33, pp. 4310-4317.
- SEABRA, P.N.C., 2006, *Aplicação de Biopilha na Biorremediação de Solos Argilosos Contaminados com Petróleo*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- SEMPLE, K.T., REID, B.J., FERMOR, T.R., 2001, "Impact of composting strategies on treatment of soils contaminated with organic pollutants", *Environmental Pollution*, v.112, pp. 269-283.
- SILVA, A. C., 2005, *Biorremediação de Sedimento Marinho Contaminado por Óleo Cru*. Dissertação de M.Sc., EQ/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- SILVEIRA, A.P.D., FREITAS, S.S., 2007, *Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental*. Campinas. Instituto Agronômico.
- SISINNO, C.L.S., BULUS, M.R.M., RIZZO, A.C., MOREIRA, J.C., 2006, "Ensaio de comportamento com minhocas (*Eisenia fetida*) para avaliação de áreas contaminadas: resultados preliminares para contaminação por hidrocarbonetos", *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v. 1, n. 2, pp. 137-140.
- SOUZA, T.S., HENCKLEIN, F.A., ANGELIS, D.F., GONÇALVES, R.A., FONTANETTI, C.S., 2009, "The *Allium cepa* bioassay to evaluate landfarming soil, before and after the addition of rice hulls to accelerate organic pollutants biodegradation", *Ecotoxicology and Environmental Safety*. n. 3, pp. 117-123.
- STREVETT, K., DAVIDOVA, I., SUFLITA, J.M., 2002, "A comprehensive review of the screening methodology for anaerobic biodegradability", *Re/Views in Environmental Science & Bio/Technology*, v. 1, pp. 143-162.
- THOMAS, J.E., TRIGGIA, A.A., CORREIA, C.A., VEROTTI FILHO, C., XAVIER, J.A.D., MACHADO, J.C.V., SOUZA FILHO, J.E., PAULA, J.L., DE ROSSI, N.C.M., PITOMBO, N.E.S., GOUVEIA, P.C.V.M., CARVALHO, R.S.,

- BARRAGAN, R.V., 2001, *Fundamentos de Engenharia de Petróleo*. Rio de Janeiro, Interciência/PETROBRAS.
- TRINDADE, P.V.O., 2002, *Avaliação das técnicas de bioaumentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo*. Dissertação de M.Sc., EQ/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- TRINDADE, P.V.O., SOBRAL, L.G., RIZZO, A.C.L., LEITE, S.G.F., SORIANO, A.U., 2005, “Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study”, *Chemosphere*, v. 58, pp. 515-522.
- URURAHY, A.F.P., 1998, *Biodegradação de resíduo oleoso proveniente de refinaria*. Tese de D.Sc., EQ/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), Landfarming. In: How To Evaluate Alternative Cleanup Technologies For Underground Storage Tank Sites: A Guide For Corrective Action Plan Reviewes. Acesso em 20 de janeiro de 2009 e disponível em <http://www.epa.gov/oust/cat/landfarming.html/>
- VIDALLI, M., 2001, “Bioremediation: An overview”, *Pure Applied Chemistry*. v. 73, pp. 1163–1172.
- VIERA, D.M., COSTA, A.C.A., HENRIQUES, C.A., CARDOSO, V.L., de FRANÇA, F.P., 2007, “Biosorption of lead by the Brown seaweed *Sargassum filipendula* – batch and continuous pilot studies”, *Electronic Journal of Biotechnology*. v. 10, n. 3, pp. 368-375.
- XIA, X.H., YU, H., YANG, Z.F., HUANG, G.H., 2006, “Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the natural waters of the Yellow River: effects of high sediment content on biodegradation”, *Chemosphere*. n. 65, pp. 457-466.