

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**AVALIAÇÃO EM MICROCOSMO DA DEGRADAÇÃO  
DE BORRA OLEOSA NO SOLO**

Márcia de Campos Orantas  
Dissertação

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**AVALIAÇÃO EM MICROCOSMO DA DEGRADAÇÃO  
DE BORRA OLEOSA NO SOLO**

MÁRCIA DE CAMPOS ORANTAS  
Engenheira-Agrônoma (UFRGS)

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de  
Mestre em Ciência do Solo

Porto Alegre (RS) Brasil  
Setembro de 2013

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Flávio Camargo, pela oportunidade;

À Profª Fátima Menezes Bento, pelo otimismo inabalável e contagiante e pelo exemplo irretocável de pesquisadora;

À Vanessa Cerqueira, por toda a ajuda, inspiração e risadas;

À Patrícia Quadros, por ser um verdadeiro anjo da guarda;

Ao Bruno Loss dos Santos, por toda ajuda e companheirismo;

À todos os colegas do Laboratório de Biorremediação, pelo ambiente de trabalho maravilhoso e pela ajuda sempre disponível;

Ao SICECORS, na pessoa do Sr. Nestor Rodrigues, pela disponibilização das amostras de solo e borra e pela grande gentileza de contribuir de inúmeras formas com esta pesquisa;

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado;

A meus pais, pelo amor, fé e torcida incansáveis;

Ao meu marido, Marcelo, pelo carinho no fim dos dias longos, pela paciência, por rir dos meus medos bobos, pela companhia noites adentro em frente ao computador e pela coautoria do Carlito;

À minha amiga (e sogra) Míriam, por ser babá, mãe, amiga, avó e inspiração e sem cuja ajuda inestimável esse trabalho não seria possível;

A Deus, que torna tudo possível.

À Terezinha, Maria do Rosário e Tereza D'Ávila, companheiras incansáveis do primeiro ao último dia dessa jornada.

# AVALIAÇÃO EM MICROCOSMO DA DEGRADAÇÃO DE BORRA OLEOSA NO SOLO<sup>1</sup>

Autor: Márcia de Campos Orantas

Orientador: Prof. Flávio A. O. Camargo

## RESUMO

Durante o processo de refino do petróleo é gerado um resíduo denominado de borra oleosa que compreende cerca de 0,34% do volume total processado. Entre os tratamentos possíveis para a borra oleosa estão métodos físicos, químicos e biológicos. O *landfarming* é uma técnica em que o resíduo oleoso é incorporado ao solo, sob condições controladas, para promover a degradação e imobilização dos contaminantes perigosos presentes pela microbiota do solo. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar estratégias de biorremediação como a bioaugmentação e bioestimulação em solo de *landfarming* contaminado com borra oleosa durante 35 dias, em frascos respirométricos no Laboratório de Biorremediação do Departamento de Solos. Foram coletadas amostras de solo de célula de *landfarming* e de borra oleosa no SICECORS do Pólo Petroquímico de Triunfo. Quatro espécies de bactérias (*Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cibi* e *Bacillus cereus*) previamente isoladas por Cerqueira (2011) do solo de *landfarming* e da borra oleosa foram usadas para formação de um consórcio microbiano na estratégia de bioaugmentação e três relações C:N:P (dose 1: 100:0,5:0,125; dose 2: 100:6:1,5 e dose 3: 100:12:3) foram selecionadas para os tratamentos de bioestimulação. Foram usados  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fonte de nitrogênio e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  como fonte de fósforo na preparação da solução aquosa de fertilizantes. Os tratamentos de bioaugmentação e de bioestimulação (denominados respectivamente de AD1, AD2, AD3, ED1, ED2 e ED3) foram usados isoladamente e também em conjunto (denominados AED1, AED2 e AED3). Os indicadores avaliados foram: produção de C-CO<sub>2</sub>, P mineral, N mineral, hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) e hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP). A maior liberação de C-CO<sub>2</sub> ocorreu nos tratamentos contendo a dose 2 de fertilizantes, e maior ainda quando o consórcio foi adicionado. As formas nitrogenadas inorgânicas e o fósforo variaram entre os tratamentos, sendo observado os maiores valores nas maiores doses de fertilizantes adicionados. Observou-se que a maior atividade hidrolítica do FDA ocorreu no tratamento AED1. Quando a dose de fertilizante foi aumentada na bioaugmentação, a atividade hidrolítica diminuiu. Em relação aos valores de HTP, o tratamento AED1 apresentou o maior valor. Nos tratamentos AED1, AED2 e AED3 os valores de HTP foram inversamente proporcional as doses aplicadas, e para os tratamentos ED1, ED2 e ED3, os valores de HTP não foram alterados pelo aumento das doses. Os resultados permitem concluir que a fertilização associada a microrganismos competentes pode ser uma boa estratégia de degradação da borra oleosa.

<sup>1</sup>Dissertação de mestrado em Ciência do Solo. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (50p.) Agosto, 2013. Trabalho realizado com apoio financeiro da CAPES.

# MICROCOSM EVALUATION OF SLUDGE OIL DEGRADATION IN SOIL<sup>1</sup>

Author: Márcia de Campos Orantas

Adviser: Prof. Flávio A. O. Camargo

## SUMMARY

During the process of petroleum refining an oily sludge residue is generated comprising about 0,34% of the total volume processed. Among the possible treatments for oily sludge are physical, chemical and biological. The landfarming is a technique in which the oily residue is incorporated into the soil under controlled conditions to promote degradation and immobilization of hazardous contaminants present by soil microorganisms. The aim of this study was to evaluate bioremediation strategies such as bioaugmentation and biostimulation in landfarming soil contaminated with oily sludge. We collected soil samples from cell landfarming and oily sludge from Sicecors in the Triunfo Petrochemical Plant Complex. Four bacteria previously isolated by Cerqueira (2011) from landfarming soil and oily sludge were used to form a microbial consortium for the bioaugmentation strategy and three C: N: P ratios (dose 1: 100:0,5:0,125; dose 2: 100:6:1,5 and dose 3: 100:12:3) were selected for biostimulation treatments. The bioaugmentation treatment and biostimulation (named respectively as AD1, AD2, AD3, ED1, ED2 and ED3) were used alone and also in combined (named as AED1, AED2 and AED3). The indicators were: production of CO<sub>2</sub>-C, P mineral, N mineral, hydrolysis of fluorescein diacetate (FDA), pH and total petroleum hydrocarbons (TPH). The greater release of CO<sub>2</sub>-C occurred in treatments containing dose 2 of fertilizer, and greater still when the consortium was added. Inorganic forms of nitrogen and phosphorus varied between treatments, the highest values being observed at higher doses of fertilizer added. It was observed that the greater hydrolytic activity over FDA was observed in treatment AED1. When the dose of fertilizer was increased in bioaugmentation, the hydrolytic activity decreased. Regarding the values of TPH, treatment AED1 showed the highest value. In the treatments AED1, AED2 and AED3 TPH values were inversely proportional to the doses applied, and for the treatments ED1, ED2 and ED3 TPH values were not affected by increasing doses. The results allow us to conclude that fertilization associated with microorganisms can be a good strategy for degradation of oily sludge in soil.

<sup>1</sup>M.Sc. Dissertation in Soil Science – Programa de Pós-Graduação em Ciênc do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (50p.) August, 2013.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Caracterização e biodegradação de borra oleosa .....	13
2.2 Gerenciamento de resíduos: Polo Petroquímico/RS.....	15
2.3 Remediação do solo.....	16
2.4 Biorremediação de solos contaminados .....	20
2.4.1 Atenuação natural/ Biorremediação passiva .....	20
2.4.2 Bioestimulação .....	21
2.4.3 Bioaugmentação.....	22
2.4.4 Biopilhas .....	23
2.4.5 Bioventilação .....	23
2.4.6 Fitorremediação.....	24
2.5. Aporte de nutrientes para a microbiota degradadora.....	24
2.6 Degradação microbiana de hidrocarbonetos .....	26
2.7 Estimativa da degradação de poluentes derivados do petróleo .....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Coleta das amostras.....	32
3.2 Experimentos de biorremediação .....	32
3.3 Preparo do consórcio microbiano .....	34
3.4 Montagem dos experimentos .....	35
3.5 Atividade respiratória.....	35
3.6 Avaliação da Atividade com Diacetato de Fluoresceína .....	36
3.7 Determinação do Nitrogênio Mineral .....	37
3.8 Determinação do Fósforo Mineral.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
5. CONCLUSÕES.....	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1</b> Composição dos microcosmos de acordo com o tratamento	33
<b>Tabela 2</b> Parâmetros cinéticos da mineralização da borra oleosa adicionada ao solo na concentração de 1,5%, com 3 doses de fertilizantes.	39
<b>Tabela 3</b> Nitrogênio mineral, fósforo, atividade enzimática e hidrocarbonetos de petróleo totais em tratamentos onde foi adicionado ao solo borra oleosa com 3 doses de fertilizantes ao final da avaliação.	41

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> Compostos orgânicos representativos encontrados na borra oleosa. (adaptado de Zhu et al., 2001)	14
<b>Figura 2</b> Oxidação microbiana do ciclohexano como exemplo de metabolismo de hidrocarbonetos alicíclicos (adaptado de Atlas e Bartha, 1997).	26
<b>Figura 3</b> Metabolismo microbiano de anel aromático (simplificado) por clivagem meta ou orto, aqui mostrado para o benzeno (adaptado de Atlas e Bartha, 1997)	27
<b>Figura 4</b> Liberação diária de C-CO <sub>2</sub> pelos tratamentos contendo solo contaminado com 1,5% de borra oleosa.	38
<b>Figura 5</b> Liberação acumulada de C-CO <sub>2</sub> pelos tratamentos contendo solo contaminado com 1,5% de borra oleosa.	39
<b>Figura 6</b> Box plots da liberação acumulada do C-CO <sub>2</sub> pelos tratamentos contendo solo contaminado com 1,5% de borra oleosa.	40

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a produção brasileira de petróleo ultrapassa a marca dos 2,5 milhões de barris por dia. O refino deste petróleo gera 0,34% deste volume no sistema de tratamento de efluentes um resíduo chamado de borra oleosa. A borra oleosa é classificada, de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas – NBR10004 (ABNT) como resíduo perigoso, pertencente à classe I e se caracteriza como uma emulsão formada de água, sedimentos, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, resinas e asfaltenos. Dentre os tratamentos possíveis para a borra oleosa estão métodos físicos, químicos e biológicos. No entanto, frequentemente os métodos físicos e químicos se apresentam como alternativas dispendiosas e não levam a uma descontaminação adequada do solo. Outro aspecto que deve ser considerado é o aumento de interesse por tecnologias de descontaminação “limpas”, isto é, que gerem menos resíduos e sejam menos onerosas, destacando-se deste modo o *landfarming*.

O *landfarming* é uma técnica em que o resíduo oleoso é incorporado ao solo, sob condições controladas, para promover a degradação e imobilização dos contaminantes perigosos presentes pela microbiota do solo. Tipicamente o resíduo é aplicado à superfície de uma área e misturado ao solo por meio de equipamentos convencionais, como tratores equipados com arados e/ou grades. O solo do local deve estar contido em uma célula devidamente impermeabilizada, de forma que não ocorra contaminação do lençol freático. Esta técnica também é apropriada para tratamento do óleo não passível de recuperação contendo materiais absorventes impregnados (palha, serragem e turfa) e as emulsões água em óleo (CETESB, 2013). O objetivo da disposição da borra oleosa em células de *Landfarming* é transformar o

contaminante em substância inerte - material orgânico estabilizado, água e CO<sub>2</sub>. Este sistema permite a aplicação dos resíduos ao solo e sua operação é simples, e como é um processo de biorremediação *ex situ*, requer o transporte do resíduo até a unidade de tratamento.

O *Landfarming* é um biorreator do tipo aberto, ou seja, opera sob condições ambientais. O resíduo é disposto sobre o solo devidamente impermeabilizado, passando por revolvimentos e homogeneizações periódicos, favorecendo assim a aeração do conjunto, o que contribui para o processo de biorremediação, visto que o processo de degradação de borra oleosa é na sua maior parte, um processo realizado por micro-organismos aeróbios. No entanto, o fato de se tratar de um reator a céu aberto faz com que as condições ambientais frequentemente adversas afetem diretamente a atividade microbiana e as características do resíduo. Temperatura, umidade, aeração, relação C:N:P e pH desfavoráveis podem retardar ou até mesmo inibir o crescimento e o metabolismo da microbiota local, culminando na redução da eficiência do processo de biodegradação e consequente permanência deste resíduo por um período de tempo maior.

Diante desse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de estratégias de biorremediação como bioaugmentação e bioestimulação em solo de *landfarming* contaminado com borra oleosa, considerando diferentes relações entre nutrientes (C:N:P).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O petróleo é uma matéria-prima de importância crucial no panorama industrial atual. Poucos produtos industrializados de uso generalizado podem ser produzidos sem que o petróleo desempenhe algum papel na sua cadeia produtiva. Segundo dados de 2007 da Petrobras, as 11 refinarias no país produziram cerca de 1,8 milhão de barris de derivados por dia (Petrobras, 2013). Embora seja um produto de origem essencialmente natural, contaminações por petróleo causam impactos ambientais significantes e representam danos substanciais à saúde humana e ao meio ambiente, contaminando corpos d'água, solos e áreas litorâneas (Xu e Lu, 2010). No entanto cada um desses ambientes quando contaminados, devem ser abordados de forma distinta, visto que são inúmeros os fatores que afetam o sucesso da descontaminação da área. A composição do contaminante, seu volume, o clima da região e as características do solo tem papel crucial na determinação da estratégia mais adequada para a remediação do local.

O solo contaminado com petróleo é atualmente tratado por processos físicos, químicos ou biológicos (Venkateswar et al, 2011). Os métodos físicos mais comuns de tratamento de solos contaminados, como disposição em aterros e incineração, são dispendiosos e frequentemente geram outros resíduos tão ou mais tóxicos do que o petróleo (Sarkar et al., 2005; Ayotamuno et al. 2007). Processos químicos de tratamento de solo contaminado (utilizando-se resinas e polímeros, por exemplo) são geralmente métodos dispendiosos e requerem grande perturbação do ambiente (Roldán-Carrillo et al. 2012 ). Já os métodos biológicos apresentam inúmeras vantagens: baixo

custo, possibilidade de realização *in situ*, ausência de subprodutos poluentes, baixo impacto ambiental, entre outros (Kriipsalu et al. 2007; Singh e Lin, 2009).

## 2.1 Caracterização e biodegradação de borra oleosa

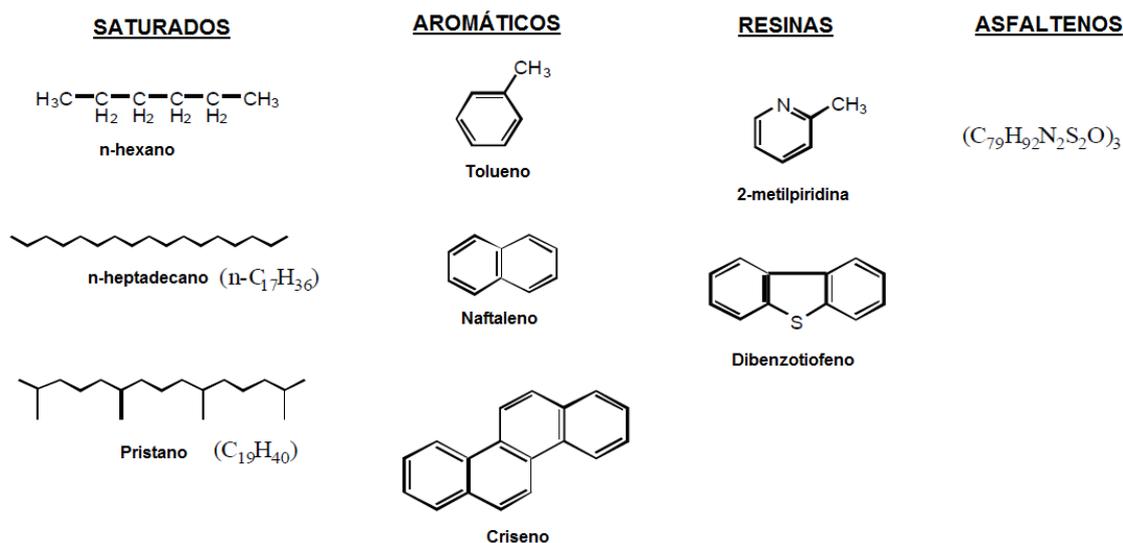
A borra oleosa é o principal resíduo gerado pelos processos industriais de uma refinaria de petróleo. Devido às suas características altamente poluentes, sua disposição adequada é bastante restrita. De acordo com Souza (2004), a Refinaria de Petróleo Ipiranga (RPI) no município de Rio Grande (RS), vem encaminhando a borra oleosa produzida em sua planta para a empresa de produção de cimento Itambé, no estado do Paraná. Lá, a borra recebida é separada em duas partes: a que ainda possui bom poder calorífico para ser usada nas caldeiras; e aquela que não é capaz de fornecer boa quantidade de energia se queimada, a qual será incorporada no cimento. No entanto, de forma a não deteriorar as qualidades necessárias do cimento produzido, o percentual de borra incorporada ainda é somente de 3%, resultando em um grande volume de borra que é armazenada para posterior utilização.

A borra oleosa é uma substância classificada, segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas – NBR 10004, como pertencente à Classe I - Resíduos perigosos - classe formada por materiais não reutilizáveis nem recicláveis, podendo apresentar características de inflamabilidade, corrosividade, toxicidade ou patogenicidade. A borra oleosa surge como subproduto da indústria química e constitui um poluente de grande importância ambiental. A composição da borra varia com a composição do óleo cru do qual se originou, com os processos industriais a ele aplicados e eventuais misturas com outras borras pré existentes. De forma geral, a borra oleosa é composta de água, sólidos grosseiros, óleos, gorduras, compostos orgânicos, elementos químicos e metais. Entre os compostos orgânicos presentes, os mais comuns são compostos saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos. Os hidrocarbonetos saturados incluem alcanos normais e ramificados com estrutura de  $C_nH_{2n+2}$  (alifáticos) e alcanos cíclicos com estruturas de  $C_nH_{2n}$  (alícíclicos), com faixa em comprimento de cadeia de 1 a 40 carbonos (como as parafinas, o óleo diesel, a nafta, entre outros). Os compostos saturados são

usualmente os constituintes mais abundantes em óleos crus (Cerqueira, 2011). As resinas e asfaltenos compreendem a fração pesada do petróleo, com estruturas químicas complexas e com grande condensação de anéis aromáticos. As resinas incluem compostos polares contendo nitrogênio, enxofre e oxigênio. Na fração asfaltenos, metais como níquel, vanádio e ferro encontram-se também associados (Cerqueira, 2011).

Os hidrocarbonetos aromáticos incluem aromáticos monocíclicos, tais como o benzeno, tolueno e xilenos, e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) tais como naftaleno, antraceno e fenantreno. Algumas dessas moléculas estão exemplificadas na figura 1. As resinas e asfaltenos formam a fração pesada do petróleo, com estruturas químicas complexas e com alta condensação dos anéis aromáticos. Frequentemente contém átomos de nitrogênio, enxofre e oxigênio. Entre as resinas, encontram-se compostos polares contendo nitrogênio, enxofre e oxigênio - como exemplo piridinas e tiofenos (Cerqueira, 2011). A dificuldade de tratamento da borra oleosa reside na sua estrutura complexa, bem como na sua concentração, o que significa que cada tipo de borra oleosa traz consigo um problema que deve ser avaliado para que se determine o tratamento mais adequado do tratamento (Roldán-Carrillo, 2011).

A sequência generalizada de componentes de petróleo, em ordem decrescente de biodegradabilidade é representada como se segue: n-alcanos > alcanos de cadeia ramificada > alcenos ramificados > N-alkil aromáticos de baixo peso molecular > monoaromáticos > alcanos cíclicos > policíclicos aromáticos >> asfaltenos. (Van Hamme et al, 2003).



**Figura 1:** Compostos orgânicos representativos encontrados na borra oleosa. (adaptado de Zhu et al., 2001)

A borra oleosa passa por vários processos de envelhecimento e intemperismo que podem eventualmente levar a um maior peso molecular médio e mudanças na partição das frações dos hidrocarbonetos totais do petróleo (Tahhan et al., 2010). Esses processos de intemperismo, que podem ser representados por ciclos de molhamento e secagem da borra e exposição sucessiva à variações de temperatura, aumentam a sorção do contaminante à matriz coloidal do solo, diminuindo sua biodisponibilidade (Trindade et al., 2005). Existe uma variedade de opções de remediação disponíveis para limpeza de locais contaminados, incluindo incineração, solidificação/estabilização, extração do solo por vapor, lavagem do solo, etc. Estes métodos podem ser relativamente dispendiosos pois o contaminante extraído ou incinerado deve frequentemente sofrer mais uma etapa de tratamento ou disposição (Xu e Lu, 2010).

## 2.2 Gerenciamento de resíduos no Polo Petroquímico/RS

O Pólo Petroquímico do estado do Rio Grande do Sul se localiza na cidade de Triunfo e atualmente é composto por cinco empresas (Braskem, Lanxess, Inova, Oxiteno e White Martins). Essas empresas recebem a matéria-prima (nafta) para suas atividades e encaminham os resíduos gerados para uma das duas estâncias da Companhia Riograndense de Saneamento (CORSAN) localizadas próximas ao Pólo, dependendo da natureza desses

resíduos: o SITEL (Sistema Integrado de Tratamento de Efluentes Líquidos) ou o SICECORS (Sistema Centralizado de Controle de Resíduos Sólidos).

O SITEL é responsável pelo recebimento e tratamento dos efluentes líquidos resultantes das atividades das indústrias do Pólo Petroquímico. Estes efluentes podem ter composição majoritária orgânica ou inorgânica. Os efluentes orgânicos sofrem um tratamento em três fases: física, química e biológica. Os efluentes inorgânicos recebem um tratamento menos complexo.

O SICECORS recebe os resíduos sólidos, comuns e industriais, provenientes das indústrias do Pólo Petroquímico. Os resíduos são classificados como Resíduo Sólido Comum, passíveis de decomposição biológica (como aqueles gerados pela limpeza de áreas de escritório, sanitários, refeitórios, entre outros), Resíduo Sólido Industrial, provenientes do processo industrial, não biodegradáveis, não perigosos, insolúveis em água (lamas de catalisadores, por exemplo) e Resíduo Sólido Industrial Especial, provenientes do processo produtivo, apresentando periculosidade efetiva ou potencial à saúde humana e ao meio ambiente (como por exemplo tem-se a borra oleosa, materiais contaminados com óleo, etc). O SICECORS recebe, dispõe e/ou trata os resíduos fazendo uso de unidades de processo como: valos de tratamento e disposição (VTD's), que são destinados aos resíduos sólidos industriais e resíduos sólidos industriais especiais; *landfarming* e *landspreading* destinados à disposição de resíduos orgânicos biodegradáveis, principalmente borras oleosas; aterro sanitário destinado aos resíduos sólidos comuns; e pátio de tambores, destinado à armazenagem provisória de embalagens e tambores (CORSAN, 2013).

### **2.3 Remediação do solo**

A CETESB define uma área contaminada como um local onde há comprovadamente poluição ou contaminação causada pela introdução de quaisquer substâncias ou resíduos que nela tenham sido depositados, acumulados, armazenados, enterrados ou infiltrados de forma planejada, acidental ou até natural e que gera impactos negativos sobre os bens a proteger.

A existência de uma área contaminada pode apresentar danos à saúde, comprometimento da qualidade dos recursos hídricos, restrições ao uso do

solo e danos ao patrimônio público e privado, com a desvalorização das propriedades, além dos danos ao meio ambiente (CETESB, 2013). A restauração de áreas contaminadas é uma tarefa complexa e geralmente onerosa, não havendo garantias de que os parâmetros ambientais requeridos pela legislação o órgãos locais sejam alcançados (Mariano, 2006). Além disso, devido à miríade de fatores que devem ser considerados na tomada de decisão, deve-se ter em mente que o processo de remediação levará à uma mudança ou suspensão das funções naturais do meio, de forma permanente ou temporária (Zhu, Lu e Zhang, 2010).

Seabra (2008) destaca três estratégias básicas para remediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo: destruição ou alteração; extração ou separação dos contaminantes do local; e imobilização do contaminante. A seleção da técnica deve contemplar as características do contaminante, as características do local, as exigências regulatórias vigentes, os custos operacionais e o tempo disponível. (Reddy, Admas e Richardson, 1999). Diferentes processos químicos, físicos e biológicos são conhecidos para a remoção de hidrocarbonetos no solo (Singh e Lin, 2009). As técnicas podem ser aplicadas *in situ*, realizando as operações de remediação no local, ou *ex situ*, quando o solo contaminado é removido do local para ser tratado (Zhu, Lu e Zhang, 2010). Geralmente, essa última abordagem é utilizada no caso de locais impactados com altas concentrações de contaminantes recalcitrantes, necessitando de estratégias mais agressivas de recuperação do local (Mohan *et al.*, 2006).

De acordo com a CETESB, técnicas convencionais como a escavação dos solos contaminados, seguida de tratamento ou disposição em aterros, têm sido utilizadas para efetuar a remediação de locais contaminados. Além das técnicas de remoção e redistribuição de solos, outras têm sido aprimoradas, testadas e avaliadas em relação a sua eficiência/eficácia e custo, incluindo a contenção, biorremediação, oxidação química, extração de vapores, bombeamento e tratamento de águas subterrâneas, entre outros. Desta forma, inúmeros processos químicos, físico e biológicos tem sido utilizados para descontaminação das 1275 áreas impactadas no estado de São Paulo, sendo a biorremediação uma estratégia ainda pouco frequente no Brasil (CETESB,

2011). Os processos químicos e físicos de remediação de solos contaminados apresentam alto custo de aplicação e perturbação do local (Sridevi *et al.*, 2011).

A biorremediação combina processos biotecnológicos com a engenharia ambiental, aplicada a solução e a atenuação de problemas causados pela contaminação ambiental. Esta técnica utiliza processos e atividades de microrganismos ou plantas para degradar contaminantes ambientais e estão entre as tecnologias que buscam a destruição dos poluentes, ao invés de simplesmente dispô-los no ambiente (Venkateswar *et al.*, 2011; Lazar *et al.*, 1999; Ayotamuno *et al.*, 2007). A biorremediação tem numerosas aplicações, incluindo descontaminação de águas subterrâneas, solos, lagoas, lodos e efluentes líquidos industriais. Técnicas de biorremediação foram utilizadas no plano de limpeza costeira em Príncipe William Sound, no Alasca, após o derramamento de óleo da empresa Exxon Oil em alto mar em 1989 (Irvine *et al.*, 2006; Li e Boufadel, 2011). Da mesma forma, técnicas de biorremediação foram utilizadas no Kuwait e Iraque, após os conflitos gerados pela Guerra do Golfo e pela invasão ao Iraque, com o objetivo de descontaminar as áreas onde houve derramamento de petróleo. Mais de 600 poços de petróleo explodiram em razão dos conflitos, gerando lagos de óleo que cobriam uma área de 49 quilômetros quadrados (Balba *et al.*, 1996). Também na costa da África do Sul, dois derramamentos de óleo ocorreram no ano de 2000, um deles com o vazamento de 1,3 milhão de toneladas de óleo no oceano Atlântico (Singh e Lin, 2009). No Brasil, a biorremediação é frequentemente utilizada para descontaminar solos de postos de combustíveis (Chagas-Spinelli, 2012; Colla, 2011).

A biorremediação oferece inúmeras vantagens em relação às técnicas convencionais tais como disposição em aterros e incineração. Pode ser feita no local, é frequentemente mais barata e a perturbação do local é mínima. Elimina o resíduo de forma permanente e pode ser combinada com outras técnicas (físicas ou químicas) de tratamento. A biorremediação frequentemente deve abordar ambientes multifásicos heterogêneos como solos, onde o contaminante fica associado às partículas de solo. Em função dessas complexidades, a biorremediação bem-sucedida depende de uma abordagem interdisciplinar, envolvendo áreas como microbiologia, engenharia, ecologia, geologia e química (Boopathy, 2000).

Tecnologias de biorremediação baseadas nos princípios da bioestimulação e bioaugmentação incluem bioventilação, landfarming, biorreatores e compostagem. A escolha da opção tecnológica pode ser feita considerando-se muitos fatores, que incluem a classe dos contaminantes orgânicos e o custo da operação (Megharaj et al., 2011). Tratamentos *ex situ* (que incluem landfarming, compostagem e biopilhas) utilizam revolvimento do solo para mistura do solo, aeração e aplicação de nutrientes e são realizados num leito preparado ou em um reator (Xu e Lu, 2011). Condições adequadas de aeração (obtidas com o revolvimento do solo) são necessárias para a obtenção de uma taxa ótima de biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos (Vasudevan e Rajaram, 2001). No caso de células de landfarming, esse revolvimento pode ser feito com o uso de trator equipado com arado, grade ou escarificador, dependendo do poluente adicionado à célula e do teor de argila do solo (Guerin, 2000).

A taxa e a extensão da biodegradação de compostos orgânicos no solo, principalmente para compostos hidrofóbicos, são afetadas pelas interações entre as moléculas dos contaminantes, as partículas do solo, a água intersticial e os microrganismos degradadores dos contaminantes. Nos casos em que a taxa de biodegradação dos contaminantes é próxima à taxa de dessorção da fase sólida do solo e a de dissolução do líquido de fase não aquosa, a biorremediação é limitada pela sua biodisponibilidade. Quando a taxa de biodegradação é muito menor que a taxa de dessorção, fatores microbianos limitam a biorremediação. Processos intensivos de mistura de solo e adição de agentes surfactantes são tidos como soluções para aumentar a biodisponibilidade dos compostos orgânicos. No entanto, ainda não se conhece a fundo quais são as estratégias adotadas pelas bactérias para terem acesso a compostos hidrofóbicos. A mais conhecida é a produção de biossurfactantes. Os glicolipídios e os fosfolipídios são os dois grupos de biossurfactantes mais comuns encontrados. Os biossurfactantes são usualmente produzidos por microrganismos crescendo em substratos pouco solúveis em água. O aumento da biodegradação dos compostos hidrofóbicos é causado pela solubilização ou emulsificação dos poluentes sorvidos ou em fase livre, com ajuda dos surfactantes. Os surfactantes não aumentam a concentração aquosa de um composto, mas formam uma pseudofase micelar dentro da fase aquosa. Esta

fase micelar acumula o contaminante e facilita o seu transporte, aumentando o seu acesso aos microrganismos (Seabra, 2005; Zhang et al., 1997).

## **2.4 Biorremediação de solos contaminados**

Técnicas de biorremediação podem ser utilizadas em biorreatores ou em landfarming. Em biorreatores ocorre a remoção do solo contaminado e seu transporte para o local de tratamento. O solo extraído é misturado com água e aditivos e então os micro-organismos (cultura pura ou ou consórcio microbiano) são adicionados para a biodegradação dos contaminantes. Os biorreatores são ambientes controlados, a fim de manter os sólidos suspensos e os micro-organismos em contato com os contaminantes. Nestes reatores, a biodegradação ocorre a uma taxa rápida, com tempos de tratamento variando de menos de 1 mês a mais do que 6 meses (Khan et al., 2004). Já o Landfarming, consiste na disposição de resíduos na camada superficial do solo (contido em células impermeabilizadas) e posterior incorporação destes ao material contido na célula que, embora se trate de um solo construído, será, por motivos práticos chamado apenas de solo. Periodicamente é feito o revolvimento do solo visando a fornecer oxigênio necessário à atividade microbiana. De forma a favorecer a atividade microbiana, são corrigidos ainda o pH (para que se mantenha na faixa ótima requerida pelos microrganismos), a umidade e as concentrações de nutrientes. A eficiência desse método depende principalmente da capacidade da microbiota local para degradar ou imobilizar os vários componentes dos resíduos. (Coneglian et al., 2006, Rizzo et al., 2006).

### **2.4.1 Atenuação natural/ Biorremediação passiva**

Esta estratégia se fundamenta apenas nos processos naturais de degradação, dentre os quais a biodegradação e no seu monitoramento. Durante a atenuação natural, os poluentes podem ser transformados em substâncias menos nocivas ou serem imobilizados com o tempo, utilizando-se para isto apenas os micro-organismos nativos do solo onde o resíduo foi disposto. No entanto, o uso isolado da bioatenuação se torna impróprio em muitos casos, pois grande parte dos solos são originalmente desprovidos de

uma população microbiana degradadora eficiente e numerosa, resultando em um período de tempo muito extenso para que ocorram as reações (Megharaj et al., 2011). No caso da atenuação natural, as características do solo desempenham um papel ainda mais importante do que em relação às outras estratégias, visto que não é adotada nenhuma outra medida além da simples disposição do contaminante no solo. Sendo assim, o conteúdo de argila, a capacidade de retenção hídrica e a profundidade de um determinado solo, entre outras características, podem determinar se um solo é um bom candidato a receber um determinado contaminante. A atenuação natural é indicada em casos em que o local contaminado é de difícil acesso, quando as taxas naturais de degradação são altas ou quando se prevê que o tratamento alternativo à atenuação natural irá trazer mais danos que benefícios ao meio ambiente. Os principais processos responsáveis pela remoção natural de contaminantes do meio ambiente são:

Evaporação: é um dos mais importantes processos de limpeza natural durante os primeiros estágios de um derramamento de petróleo, o que resulta na remoção das frações mais leves do petróleo. Dependendo da composição do óleo derramado, até 50% dos componentes mais tóxicos de menor peso molecular podem evaporar dentro das primeiras 12 horas após um derrame (EPA, 1999)

Foto-oxidação: ocorre quando o oxigênio reage com luz solar em componentes oleosos; leva à decomposição de compostos mais complexos em compostos mais simples, que tendem a ser mais leves e mais solúveis na água, permitindo que possam ser removidos depois através de outro processo (Zhu et al, 2001)

Biodegradação: vários tipos de microrganismos que são capazes de oxidar hidrocarbonetos petrolíferos estão difundidos na natureza. A biodegradação é um importante mecanismo para remover elementos não voláteis do óleo do meio ambiente. Esse é um processo relativamente lento e pode necessitar de meses a anos para os microrganismos degradarem uma fração relevante de óleo retidos no solo (Zhu et al, 2001).

#### **2.4.2 Bioestimulação**

Esta estratégia visa estimular a microbiota indígena do solo pela correção de seus parâmetros físico-químicos, pois o aumento nas taxas degradativas depende em grande parte da presença de fonte de carbono disponível, nutrientes em proporções adequadas, temperatura, pH, umidade, aeração e potencial redox apropriados. Ao se dispor um hidrocarboneto no solo, há com isso um grande aporte de compostos de Carbono, desequilibrando a relação C:N:P (Carbono:Nitrogênio:Fósforo). Considerando que a máxima biodegradação ocorre dentro de uma relação C:N:P restrita, o aumento em apenas um dos componentes da relação torna os demais nutrientes limitantes para o processo da biodegradação. Corrigindo-se esse desbalanço e fornecendo os nutrientes necessários em quantidades adequadas, é favorecido o aumento das taxas de degradação do poluente (Megharaj *et al.*, 2011). Geralmente, a adição de macronutrientes é feita a partir de fertilizantes solúveis, como  $\text{NH}_3\text{NO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Entretanto, a correção desses parâmetros deve ser individualizada para cada local e tipo de contaminante, pois flutuações de pH são frequentes e em muitas situações elas são as responsáveis pelo insucesso de tentativas de biorremediação. Dependendo da fonte de N utilizada, pode ocorrer uma acidificação do meio, inviabilizando o crescimento dos microrganismos e impedindo que a biorremediação ocorra (Zhu *et al.*, 2001; Das e Chandran, 2010).

### **2.4.3 Bioaugmentação**

Consiste na introdução de microrganismos específicos selecionados, com potencial capacidade de degradação do contaminante alvo, visando aumentar a taxa de degradação do contaminante. Muitas vezes a microbiota presente no local, embora em número suficiente, pode não ser capaz de degradar uma ampla gama de substratos presentes em misturas complexas, tais como o petróleo (EPA, 2001). A seleção de microrganismos deve ser baseada no potencial metabólico do microrganismo e também na característica essencial que capacita as células a serem funcionalmente ativas e persistentes em condições ambientais desejáveis (Cerqueira, 2011).

Em geral, a bioaugmentação é feita em locais onde a microbiota indígena degradadora não existe ou é inexpressiva. É também usada quando se deseja

diminuir a fase lag das bactérias já existentes no local (Zhu et al, 2001). O inoculo contém microrganismos pré-selecionados, já encontrados no ambiente em questão ou não, com comprovada capacidade de degradação e competição, capazes de metabolizar compostos específicos (Lin et al., 2010; Zanaroli et al., 2010; Bento et al., 2003; Silva et al., 2009). O inóculo microbiano previamente adaptado ao contaminante pode ser formado por uma cultura pura ou por uma combinação de microrganismos em consórcio. A utilização de consórcios com microrganismos de diferentes grupos fisiológicos pode trazer vantagens seletivas em certos ambientes (Megharaj *et al.*, 2011).

#### **2.4.4 Biopilhas**

O sistema de biopilhas é uma variação da técnica de compostagem de materiais orgânicos. Muitas publicações utilizam os termos biopilha e compostagem quase como sinônimos. Contudo, o termo compostagem é melhor empregado para sistemas com revolvimento periódico das pilhas. Em adição a isso, a compostagem envolve um maior teor de matéria orgânica a ser estabilizado, resultando em temperaturas elevadas (na faixa termofílica), o que não ocorre normalmente com solos contaminados. Neste procedimento o solo contaminado é disposto em pilhas ou células, com umidade, nutrientes, oxigênio, temperatura e pH controlados, estimulando-se assim a atividade degradativa dos microrganismos presentes no solo (EPA, 2001). As biopilhas são normalmente dispostas em locais impermeabilizados para reduzir os riscos de migração do lixiviado para regiões de subsuperfície não contaminadas. No processo estático, o oxigênio é fornecido por meio de uma rede de tubos perfurados instalado acima da base, conectada a um soprador ou bomba a vácuo. Usualmente, as biopilhas são cobertas com mantas impermeáveis para minimizar o escape de poluentes, principalmente voláteis, além de proteger o solo do vento e das chuvas (Seabra, 2005).

#### **2.4.5 Bioventilação**

A bioventilação é uma técnica de remediação *in situ*, baseada na degradação de contaminantes orgânicos adsorvidos ao solo pela ação de microrganismos já presentes no solo. Na bioventilação, a atividade destes microrganismos é melhorada pela introdução de um fluxo ar (oxigênio) na zona

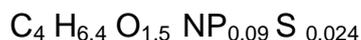
não saturada, usando poços de injeção ou extração e caso necessário, adicionando-se macronutrientes ao meio. A bioventilação é recomendada para tratamento de contaminantes degradáveis aerobicamente, em especial para solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. As principais vantagens deste método são: a) utilização de equipamentos de fácil aquisição e instalação; b) minimização da extração de vapores, com redução dos custos de seu tratamento; c) implantação sem grande impacto na área; d) é passível de ser aplicada em áreas de difícil acesso (CETESB, 2001; Rizzo et al., 2006).

#### **2.4.6 Fitorremediação**

A fitorremediação é um processo de biorremediação que utiliza plantas para remover metais pesados do ambiente pela absorção, acumulação ou transformação do metal em sua biomassa vegetal, sendo uma ferramenta que pode ser usada para a remediação de áreas contaminadas com metais pesados, compostos orgânicos e radionuclídeos. A remediação pode ocorrer tanto pela remoção do poluente pela própria planta em seus processos metabólicos como pela degradação do poluente pelos microrganismos da rizosfera (Andreazza, 2009; Khan et al., 2004). O tipo de poluente, sua concentração e a presença de toxinas no solo ou na água devem estar dentro dos limites de tolerância da planta; dessa forma, é necessário conhecer o metabolismo da planta a ser empregada para avaliação de sua eficiência como remediadora (Oliveira et al., 2007).

#### **2.5. Aporte de nutrientes para a microbiota degradadora**

De forma a biorremediar adequadamente um contaminante, a microbiota do solo pode ser estimulada através do aporte de macroelementos como N e P. Estes macroelementos são constituintes de componentes estruturais e de enzimas, representam os principais constituintes iônicos do citoplasma e são necessários em concentrações relativamente elevadas em comparação com os micronutrientes. A razão molar de macroelementos necessária para um crescimento celular equilibrado pode ser calculada a partir da composição média da célula bacteriana, conforme Barton et al. (2010):



Paul e colaboradores (2007) relataram que a relação C:N:P adequada para a microbiota do solo é de 100:10:1. No entanto, ao variar o teor de carbono no contaminante, deve-se também ajustar os teores de N e P aportados ao solo (Roldán-Carrillo, 2011). A degradação microbiana de hidrocarbonetos no solo ocorre em um padrão de sucessão no qual compostos mais simples, menos tóxicos, mais biodisponíveis e com maior rendimento energético são degradados antes de seus homólogos. Dessa forma, quando uma fonte mista de hidrocarbonetos é adicionada ao solo, os alcanos são geralmente degradados primeiro, independentemente da capacidade intrínseca de degradação de HPA, por exemplo (Tahhan et al., 2010).

Segundo Boopathy (2000), o resultado de cada processo degradativo depende de: a) fatores microbianos: concentração de biomassa, diversidade populacional, atividade enzimática; b) substrato: características físico-químicas, estrutura molecular e concentração; c) fatores ambientais: pH, temperatura, conteúdo de umidade, Eh, disponibilidade de aceptores de elétrons e fontes de energia.

Os fatores abióticos que tem impacto direto na biorremediação são as fontes de energia (doadores de elétrons), aceptores de elétrons, nutrientes, pH, temperatura, substratos e metabólitos inibitórios (citar). Porém os fatores abióticos contribuem, mas não conduzem diretamente a remoção de TPH de um solo contaminado. Além disso, a comunidade microbiana do solo geralmente não possui o potencial genético para cobrir a utilização de todo o espectro dos compostos que formam o TPH (Tahhan et al., 2010). No entanto, a utilização conjunta de estratégias de bioaugmentação e bioestimulação, assim como a ocorrência de reações de degradação cometabólicas, favorece uma degradação mais ampla dos compostos que compõem um contaminante complexo (Guerin, 2000).

Num processo de biorremediação por atenuação natural, os microrganismos nativos podem ou não buscar os hidrocarbonetos como fonte de nutrientes. Já com a bioaugmentação, os hidrocarbonetos são supostamente degradados mais rapidamente em comparação com a atenuação natural em função do aumento no número de microrganismos causado por níveis de nutrientes mais elevados (Sarkar et al., 2005). Os microrganismos nativos do solo podem degradar uma ampla gama de hidrocarbonetos, mas sua

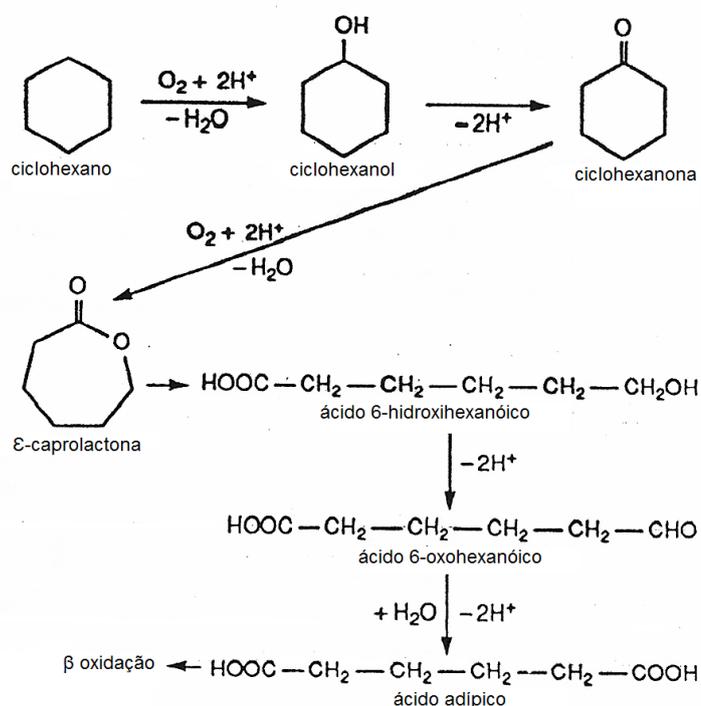
população e atividade são afetados quando contaminantes tóxicos estão presentes em concentrações mais altas (Xu e Lu, 2010). O histórico de exposição e o status adaptativo dos degradadores microbianos determinam a fase lag da degradação, uma vez que locais contaminados por períodos mais longos apresentam uma microbiota mais aclimatada e portanto com maior potencial de degradação (Megharaj et al., 2011).

## **2.6 Degradação microbiana de hidrocarbonetos**

As taxas de degradação microbiana de compostos orgânicos dispostos no solo variam com os parâmetros que regem o metabolismo dos microrganismos (temperatura, pH, aeração, disponibilidade de nutrientes, umidade etc.), e também com a disponibilidade do contaminante aos microrganismos. Solos mais argilosos tendem a tornar o contaminante menos disponível para a microbiota, uma vez que as cargas da argila desses solos formam uma ligação forte com os radicais do contaminante (Meurer, 2006). Da mesma forma, solos com menor capacidade de retenção de água também apresentam taxas menores de biodegradação de hidrocarbonetos, uma vez que a umidade adequada é um componente essencial para o metabolismo microbiano. Temperaturas medianas também favorecem os processos degradativos, permitindo que as enzimas responsáveis pelo ataque ao contaminante atuem de forma adequada.

As dioxigenases e monoxigenases são duas das enzimas primárias empregadas pelos organismos aeróbios durante a transformação e mineralização de xenobióticos (Boopathy, 2000). A biodisponibilidade do contaminante é controlada por um número de processos físico-químicos tais como sorção e dessorção, difusão e dissolução. Uma biodisponibilidade reduzida do contaminante no solo é causada pela reduzida transferência de massa para os microrganismos degradadores (Boopathy, 2000). A diminuição da biodisponibilidade ao longo do tempo é frequentemente relatada como envelhecimento ou intemperismo do poluente, e pode resultar de: a) reações químicas de oxidação incorporando o contaminante à matéria orgânica natural; b) lenta difusão do poluente para poros pequenos e absorção pela matéria orgânica. (Boopathy, 2000).

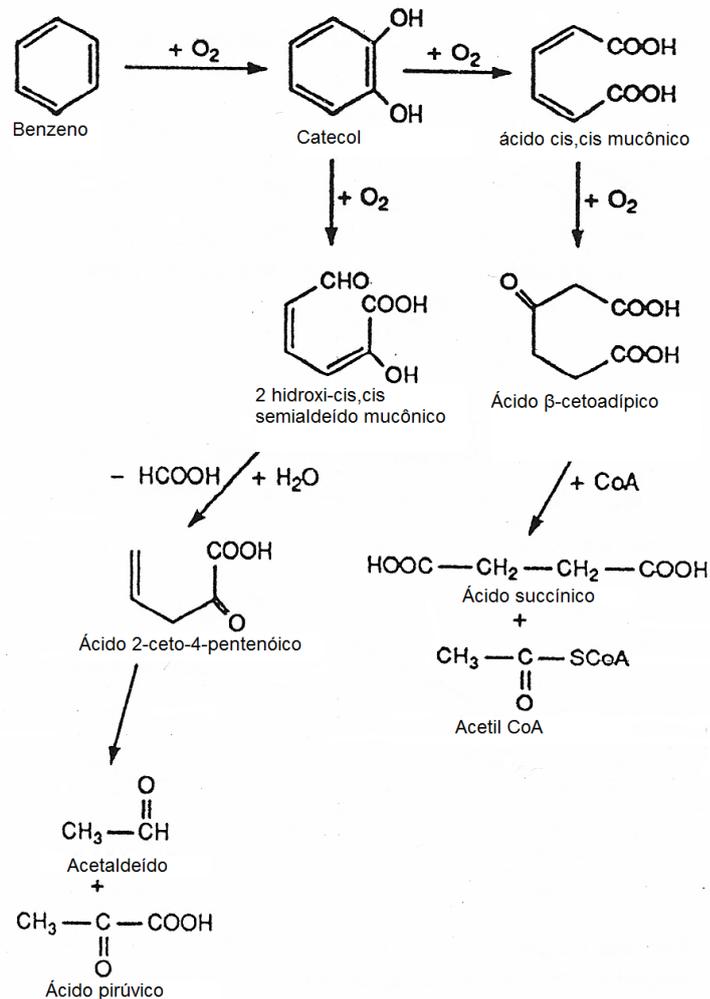
Na figura 2 observa-se a rota de oxidação microbiana de um composto alicíclico resultando em ácido adípico, que pode ainda passar por uma  $\beta$ -oxidação. Existem relatos de micro-organismos crescendo em meios ricos em ciclohexano (Atlas e Bartha, 1997), sendo portanto capazes de realizar a rota acima, transformando o contaminante em uma substância inócua. Na figura 3 tem-se o esquema da oxidação do benzeno como exemplo de contaminante aromático, resultando em ácido pirúvico, que é atóxico (não resultando em posterior contaminação se acumulado) e também pode desempenhar papel de substrato em reações metabólicas variadas, como a fermentação.



**Figura 2:** Oxidação microbiana do ciclohexano como exemplo de metabolismo de hidrocarbonetos alicíclicos (adaptado de Atlas e Bartha, 1997).

Na figura 2 observa-se a rota de oxidação microbiana de um composto alicíclico resultando em ácido adípico, que pode ainda passar por uma  $\beta$ -oxidação. Existem relatos de micro-organismos crescendo em meios ricos em ciclohexano (Atlas e Bartha, 1997), sendo portanto capazes de realizar a rota acima, transformando o contaminante em uma substância inócua. Na figura 3 tem-se o esquema da oxidação do benzeno como exemplo de contaminante aromático, resultando em ácido pirúvico, que é atóxico (não resultando em

posterior contaminação se acumulado) e também pode desempenhar papel de substrato em reações metabólicas variadas, como a fermentação.



**Figura 3:** Metabolismo microbiano de anel aromático (simplificado) por clivagem meta ou orto, aqui mostrado para o benzeno (adaptado de Atlas e Bartha, 1997)

Os biossurfactantes são compostos biológicos anfipáticos (suas moléculas possuem uma extremidade polar e outra apolar) produzidos extracelularmente ou como parte da membrana celular por bactérias, leveduras e fungos filamentosos a partir de várias substâncias incluindo açúcares, óleos e resíduos (Cerqueira, 2011). O potencial de aplicação dos biossurfactantes é baseado em suas propriedades funcionais, que incluem: emulsificação, solubilização, de-emulsificação, detergência, capacidade espumante, lubrificação e dispersão de fases (Mayer & Soberon-Chaves, 2000). Aplicações de crescente interesse incluem biorremediação e dispersão em derrames de

óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e recuperação terciária de petróleo (Chrzanowski, Lawniczak e Czaczyk, 2012). Os biossurfactantes constituem uma das principais classes de surfactantes naturais, sendo classificados de acordo com a sua composição química e/ou sua origem microbiana.

Os principais tipos de biossurfactantes são: glicolipídios (compostos formados por um carboidrato e um lipídio, sendo a ligação feita por meio de um grupamento éter ou éster), lipopeptídios e lipoproteínas (lipídio agregado a um polipeptídio), fosfolipídios (compostos formados entre grupos alquil sobre um lipídio e um fosfato), entre outros. A eficiência da biodegradação de compostos de petróleo tem sido limitada por sua baixa biodisponibilidade devida à alta hidrofobicidade dos compostos oleosos, levando a uma reduzida miscibilidade aquosa (Mrayyan e Battikhi, 2005). No entanto, surfactantes sintéticos não são adequados para aplicação em biorremediação, já que seus equivalentes biológicos (biossurfactantes) tem propriedades superiores, incluindo a ausência de toxicidade, biodegradabilidade e eficácia em temperaturas extremas, pH e salinidade (Verma, Bhargava e Pruthi, 2006).

## **2.7 Métodos de estimativa da degradação de poluentes derivados do petróleo**

Muitas são as formas de avaliação do nível de contaminação de uma área contaminada com poluentes derivados de petróleo. Entre elas está a quantificação dos Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP), que pode ser dividida em três grupos, de acordo com o tamanho das cadeias de carbono, sendo: C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub> correspondente à faixa da gasolina (TPH-GRO-Gasoline Range Organics), C<sub>11</sub>-C<sub>28</sub> faixa do diesel (TPH-DRO - Diesel Range Organics) e C<sub>20</sub>-C<sub>40</sub> faixa de óleo lubrificante (TPH –ORO – Oil Range Organics) (EPA, 2013).

Técnicas cromatográficas têm sido amplamente utilizadas para a determinação das frações de hidrocarbonetos dos combustíveis, as quais são consumidas pelos micro-organismos durante o seu crescimento. A cromatografia consiste na separação físico-química dos constituintes do combustível (partição) em duas fases: uma móvel e outra estacionária. Na cromatografia gasosa, a fase móvel é um gás quimicamente inerte à fase estacionária e aos componentes da mistura a ser analisada (Gonçalo, 2004).

Adicionalmente, as colunas cromatográficas podem complementar outras técnicas instrumentais de análise como, por exemplo, detectores de raios ultravioleta, infravermelho e à espectrofotometria de massa (Souza, 2012). Estudos recentes (Mariano *et al.*, 2008, Cerqueira, 2011, Colla, 2012) tem utilizado a cromatografia à gás como técnica padrão para análise de óleos submetidos a biodegradação.

Outra forma de se avaliar a degradação de um determinado contaminante é pelo uso da respirometria. Esta técnica fundamenta-se na quantificação do gás carbônico liberado via respiração aeróbia a partir da descarboxilação dos compostos orgânicos e estima a biodegradação dos contaminantes. Esta técnica tem sido utilizada em diversos estudos de avaliação da biodegradação de contaminantes derivados de petróleo no solo (Soares, Mariano e De Angelis, 2009; Colla, 2012; Tramontini, 2013). Alguns estudos demonstram a relação entre o CO<sub>2</sub> liberado e a degradação de poluentes orgânicos (Jacques *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2012). No entanto, durante a degradação, existe a possibilidade de formação de compostos intermediários ainda mais recalcitrantes. Desta forma, técnicas cromatográficas podem ser utilizadas na determinação do real destino do contaminante no processo de biorremediação.

O uso de éster de fluoresceína para avaliação da atividade enzimática de lipase foi primeiramente realizado por Kramer e Guilbault (1963). Swisher e Carroll (1980) demonstraram que as quantidades de fluoresceína produzida pela hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) eram proporcional à população microbiana. Posteriormente Schnürer e Rosswall (1982) utilizaram FDA para determinação da atividade microbiana total em solo e em culturas puras. O diacetato de fluoresceína (3,6 diacetil-fluoresceína) é uma fluoresceína conjugada a dois radicais acetato, formando um composto incolor que é hidrolisado tanto por enzimas livres (exoenzimas) como por enzimas ligadas à membrana celular e que libera um produto final colorido, a fluoresceína. A metodologia para determinação da hidrólise do diacetato de fluoresceína se baseia na quantificação da fluoresceína, formada após a reação de lipases, proteases e esterases com o substrato. Em um estudo realizado em uma área de recuperação de mineração de bauxita, Carneiro (2000) observou que a atividade da urease e a hidrólise do diacetato de

fluoresceína (FDA) relacionaram-se com o índice de reabilitação dos solos das áreas mineradas.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Coleta das amostras**

As amostras de solo foram coletadas das células de *landfarming*, em 5 pontos aleatórios e distintos, as quais vêm recebendo resíduos petroquímicos há 30 anos. O solo adjacente às células de *landfarming* foi classificado como Argissolo Vermelho Distrófico. As amostras de borra oleosa foram coletadas em frascos esterilizados nos valos de tratamento e disposição (VTD's) da unidade do Sistema Centralizado de Controle de Resíduos Sólidos (SICECORS)/CORSAN, no município de Triunfo/RS. As amostras de solo foram transportadas até o laboratório, peneiradas em peneiras de 2mm, homogeneizadas e mantidas sob refrigeração (4°C) até o início do experimento. O solo foi caracterizado quimicamente e apresentou a seguinte composição: argila (8%), matéria orgânica (9,7%), pH (6,3), índice SMP (7,5), C-orgânico (8,89%), P (11 mg/dm<sup>3</sup>), K (63 11 mg/dm<sup>3</sup>), CTC (12,9 cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>), Al+H (12,9 cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>), Ca/Mg (4,2), Ca/K (59), Mg/K (14), Zn (202 mg/dm<sup>3</sup>), Cu (46 mg/dm<sup>3</sup>), B (0,9 mg/dm<sup>3</sup>), Mn (13 mg/dm<sup>3</sup>) e HTP ( mg/kg de solo). A borra oleosa tinha a 79,2% de sólidos e 5,7% de óleos e graxas.

#### **3.2 Experimentos de biorremediação**

Com o objetivo de avaliar a eficiência da biodegradação de borra oleosa, foram realizados os tratamentos de atenuação natural, bioestimulação e bioaugmentação. Foram testadas 3 doses de fertilizantes, correspondentes a

três relações C:N:P. O carbono orgânico total do solo foi medido por digestão seca e seu valor, 0,8 g/kg, foi considerado baixo e portanto desconsiderado para efeitos de cálculo. Sendo assim, para efeitos de cálculo de adição de carbono ao microcosmo considerou-se apenas o carbono aportado pela borra oleosa, que foi medido por digestão úmida (método Walkley-Black), obtendo-se o valor de 93%. Com base nesse valor e no valor da densidade da borra (0,87 g/ml), calculou-se o volume de borra correspondente. Todos os frascos receberam 1,5%<sub>m/m</sub> de borra oleosa e 300 g de solo de *landfarming*. Os sais usados na preparação das soluções aquosas de fertilizantes foram (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fonte de nitrogênio e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> como fonte de fósforo. O frasco testemunha continha solo da célula de *landfarming*.

**Tabela 1:** Composição dos microcosmos de acordo com o tratamento

Tratamento	Componentes do microcosmo			
	Solo	Borra	Fertilizantes	Microrganismos
T	+	+	-	-
A	+	+	-	+
AED1	+	+	+	+
AED2	+	+	+	+
AED3	+	+	+	+
ED1	+	+	+	-
ED2	+	+	+	-
ED3	+	+	+	-

(+) Presença. (-) Ausência. Abreviações: T: testemunha; A: bioaugmentação; AED1: bioaugmentação + bioestimulação dose 1; AED2: bioaugmentação + bioestimulação dose 2; AED3: bioaugmentação + bioestimulação dose 3; ED1: bioestimulação dose 1, ED2: bioestimulação dose 2; ED3: bioestimulação dose 3

Os tratamentos avaliados foram: bioaugmentação - A, bioaugmentação + bioestimulação 1 – AED1 (dose de fertilizantes usada:  $6,975 \times 10^{-3}$  g de N e  $1,74 \times 10^{-3}$  g de P para 300g de solo), bioaugmentação + bioestimulação 2 – AED2 (dose 2 de fertilizantes usada: 0,0837 g de N e 0,0209 g de P para 300g de solo), bioaugmentação + bioestimulação 3 – AED3 (dose 3 de fertilizantes usada: 0,1674 g de N e 0,0418 g de P para 300g de solo), bioestimulação 1 – ED1 (dose 1 de fertilizantes), bioestimulação 2 – ED2 (dose 2 de fertilizantes), bioestimulação 3 – ED3 (dose 3 de fertilizantes).

As relações C:N:P correspondentes às doses 1,2 e 3 de fertilizantes foram: a) dose 1 de fertilizante: C:N:P= 100: 0,5: 0,125, conforme Atlas e Bartha (1997), o que corresponde a  $6,975 \times 10^{-3}$  g de N adicionados e  $1,74 \times 10^{-3}$  g de P adicionados em 300 g de solo; b) dose 2 de fertilizante: C:N:P= 100: 6 : 1,5 (aproximadamente o ponto médio do intervalo), o que corresponde a 0,0837 g de N adicionados e 0,0209 g de P adicionados em 300 g de solo; c) dose 3 de fertilizante: C:N:P= 100: 12 : 3 , conforme Ruberto, Vazquez e Mac Cormack (2003), o que corresponde a 0,1674 g de N adicionados e 0,0418 g de P adicionados em 300 g de solo.

### 3.3 Preparo do consórcio microbiano

O consórcio microbiano foi formado por quatro isolados bacterianos pré-selecionados como degradadores de borra. As bactérias foram isoladas de amostras de solo *landfarming* e de borra oleosa petroquímica através da técnica de enriquecimento seletivo, tendo como única fonte de carbono a borra oleosa. Da borra oleosa foram selecionadas as bactérias identificadas como *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus cibi* e do solo foi selecionada *Bacillus cereus*, todas isoladas e identificadas pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA por Cerqueira (2011).

Para o preparo do inóculo, colônias foram transferidas com auxílio de alça de platina, da cultura estoque para frascos de vidro contendo 50 mL de caldo nutritivo estéril, os quais foram mantidos em agitador rotatório a 100 rpm, 30°C durante 48 h. Em seguida, as células foram centrifugadas a 10°C, a 10.000 rpm durante 10 minutos e posteriormente lavadas três vezes com solução salina estéril (0,85%). O *pellet* resultante foi ressuscitado em solução salina estéril. O inóculo de cada isolado foi padronizado através de diluições em solução salina estéril para que se atingissem as concentrações celulares correspondentes a  $10^7$  UFC/ml para cada micro-organismos constituinte do consórcio, concentrações essas previamente estabelecidas por Cerqueira (2011) e o consórcio resultante foi adicionado aos solos de cada unidade experimental de forma a inocular  $10^7$  células/g de solo.

### **3.4 Montagem dos experimentos**

Os microcosmos foram montados utilizando-se frascos de vidro com fechamento hermético e capacidade de 1 L. O solo foi contaminado com 1,5% (massa/massa) de borra oleosa petroquímica. Foram colocados 300g de solo em cada frasco, garantindo assim que o oxigênio não fosse fator limitante para ocorrência do processo de degradação. A umidade dos solos foi ajustada para 60% da capacidade de campo através da adição de água destilada estéril. Os acréscimos de água, borra e fertilizantes ao solo nos frascos, foram realizados sob homogeneização.

Nos ensaios de bioaugmentação e bioaugmentação + bioestimulação, foram adicionadas soluções de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  como fonte de nitrogênio e fósforo, respectivamente, de forma a se atingir as seguintes relações C:N:P: a) 100:0,5:0,125 (dose 1, sugerida por Atlas e Bartha, 1997); b) 100:6:1,5 (dose 2, aproximadamente o ponto médio entre as doses 1 e 3); c) 100:12:3 (dose 3, conforme Ruberto et al., (2003).

A cada leitura foi realizada a aeração do solo dos microcosmos, através de revolvimento mecânico, assim como adição de água quando necessário. A temperatura ambiente foi monitorada ao longo do tempo. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biorremediação do Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul durante 35 dias.

### **3.5 Atividade respiratória**

A atividade respiratória microbiana nos microcosmos foi avaliada com base na liberação acumulativa de C-CO<sub>2</sub> (Stotzky, 1965). Um sistema de captura de CO<sub>2</sub> foi montado em cada microcosmo constituído de um copo plástico com 20 mL de NaOH 0,5M e suspenso em um suporte de metal. Três frascos sem solo foram utilizados como prova em branco a fim de quantificar o CO<sub>2</sub> presente em cada frasco, cujo valor seria então subtraído do valor encontrado nas titulações dos microcosmos com solo. Os mesmos foram mantidos hermeticamente fechados e somente abertos para determinação da respiração basal. Imediatamente após a abertura do frasco, adicionou-se ao

NaOH 1 mL de BaCl<sub>2</sub> 30% e 3 gotas de fenolftaleína 1%. A quantidade de NaOH residual na solução foi titulada com HCl 0,5M. O valor do gás carbônico produzido foi obtido pela equação:

$$\text{C-CO}_2 \text{ gerado (mg/Kg de solo)} = (V_B - V_A) \cdot (M_C/2) \cdot M_{\text{HCl}} \cdot \text{FC} / m$$

onde:  $V_B$  é o volume de HCl 0,5 M usado na titulação da prova em branco, em mL;  $V_A$  é o volume de HCl 0,5 M usado na titulação do tratamento, em mL;  $M_C$  é a massa molar do carbono (em g/mol);  $M_{\text{HCl}}$  é a concentração molar da solução padronizada de HCl, em mol/L; FC é o fator de correção da molaridade de ácido/base ( $M_{\text{HCl}}/M_{\text{NaOH}}$ ) e  $m$  é massa (em quilos) de solo seco no frasco.

### **3.6 Avaliação da Atividade Microbiana com o uso de Diacetato de Fluoresceína**

O diacetato de fluoresceína (3,6 diacetil-fluoresceína) é uma fluoresceína conjugada a dois radicais acetato, formando um composto incolor que é hidrolisado tanto por enzimas livres (exoenzimas) como por enzimas ligadas à membrana celular e que libera um produto final colorido, a fluoresceína. O produto final é lido em espectrofotômetro, na faixa visível, no comprimento de 490 nm.

Foram colocadas amostras de solo (2,0g) em frascos volumétricos de 50 ml, utilizando um controle onde só foi adicionado o substrato após a incubação. Em seguida, foram adicionados 15 ml de tampão fosfato 60 mM pH 7,6 em todos os frascos e 0,2 ml da solução de diacetato de fluoresceína 1000µg/ml, com exceção dos controles. Os frascos foram fechados, agitados manualmente e então colocados em agitador orbital a 30°C por 20 minutos. Após este período, foram adicionados 15 ml de solução de clorofórmio/metanol (2:1v/v) para finalizar a reação. Novamente os frascos foram agitados manualmente com força, e então centrifugados a 2.000 rpm por 3 minutos. Posteriormente, o sobrenadante de cada amostra foi filtrado em papel filtro nº2 em frascos de 50ml. A intensidade da coloração verde do filtrado foi determinada em um espectrofotômetro a 490 nm. A absorbância foi também nas amostras controle, que não receberam adição de

diacetato fluoresceína e então foi subtraído o valor da absorbância do tratamento sem adição de substrato, do valor de absorbância do tratamento com fluoresceína. A quantidade de fluoresceína formada em cada amostra foi determinada com base numa curva padrão preparada com concentrações conhecidas de fluoresceína (0, 1, 2, 3, 4, 5  $\mu\text{g}$  de fluoresceína  $\text{ml}^{-1}$ ). A atividade enzimática é expressa em  $\mu\text{g}$  fluoresceína liberado por dia por grama de solo seco ( $\mu\text{g F g}^{-1}$  solo seco).

### **3.7 Determinação do Nitrogênio Mineral**

Os teores de nitrogênio mineral no solo foram quantificados conforme metodologia descrita por Tedesco et al. (1995) da seguinte forma: cinco gramas de solo foram colocadas em frasco tipo “snap-cap” de 90 ml, adicionando-se 50 mL de KCl 1M seguido de agitação por 30 minutos. Após agitação, os frascos foram deixados em repouso por 30 minutos e então pipetou-se uma alíquota de 20 ml do extrato obtido. Essa alíquota foi colocada em um frasco de destilação de 100 mL; paralelamente, um erlenmeyer de 50 mL contendo 5 mL de indicador ácido bórico foi ajustado no condensador. Adicionou-se então 0,2 g de MgO e 0,2 g de liga Devarda, iniciando-se imediatamente a destilação. Após coletar de 35 a 40 mL de destilado, pode-se encerrar a destilação e titular o destilado com ácido sulfúrico 0,0025M.

### **3.8 Determinação do Fósforo Mineral**

Assim como para os teores de nitrogênio mineral, os teores de fósforo mineral foram medidos tendo-se por base a metodologia descrita por Tedesco et al, (1995), cujas etapas são: 3,0 mL de solo são colocados em um erlenmeyer de 50 mL, adicionam-se 30 mL de solução de HCl 0,05M + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,0125M. Agita-se por cinco minutos em agitador horizontal, deixando-se então após essa etapa em repouso por no mínimo 15 horas. Após o período de repouso, coleta-se uma alíquota de 3,0 mL do sobrenadante para copos descartáveis, adicionam-se 3,0 mL de uma solução de HCl 0,87M+(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>. 4H<sub>2</sub>O 0,38%. Adicionam-se mais três gotas de solução de ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico, sulfito de sódio e metabissulfito de

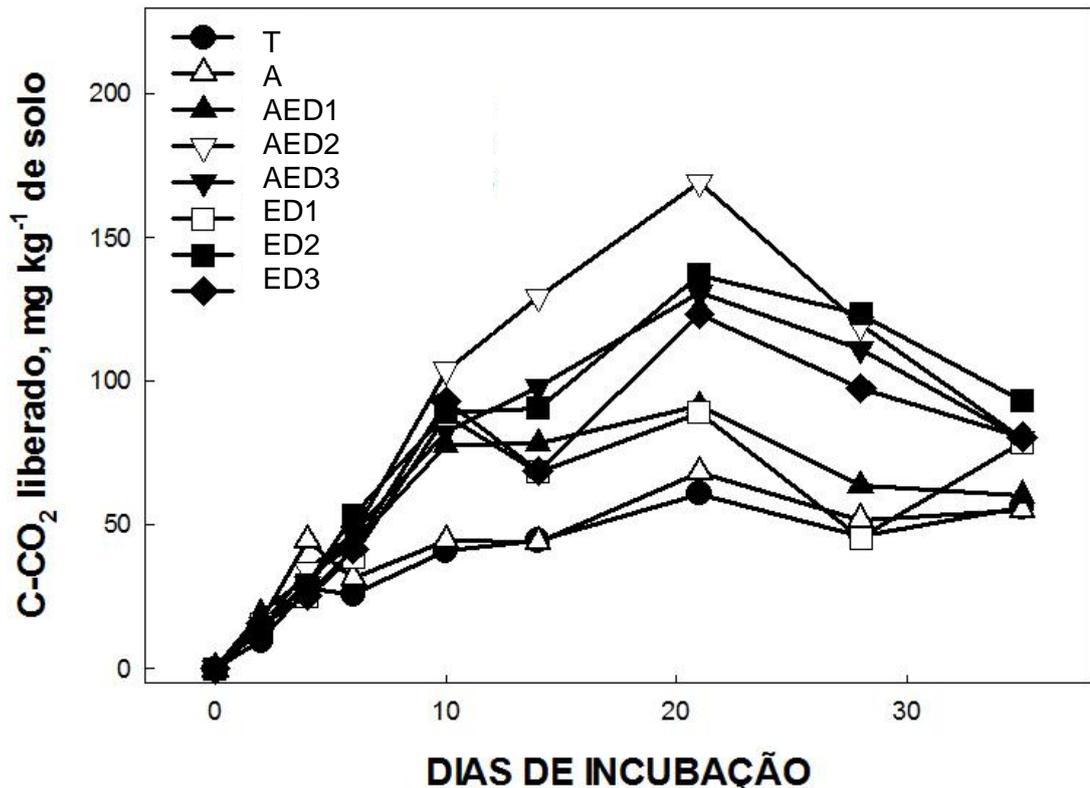
sódio, seguido de agitação. Após 15 minutos em repouso, determina-se a absorvância da solução em espectrofotômetro no comprimento de onda de 660 nm.

### **3.9 Análise estatística**

O potencial de mineralização do carbono (Co) foi obtido a partir dos valores acumulados de C-CO<sub>2</sub>, utilizando-se o programa científico de ajuste de curvas SIGMASTAT (1994) e o algoritmo descrito por Marquardt (1963) para estimar os parâmetros não lineares. A análise de estatística descritiva (box plot) foi obtida pelo teste t de Tukey com nível de confiança de 95% (p < 0,05) para comparar as médias entre os tratamentos utilizando-se o programa estatístico XLSTAT (2011)

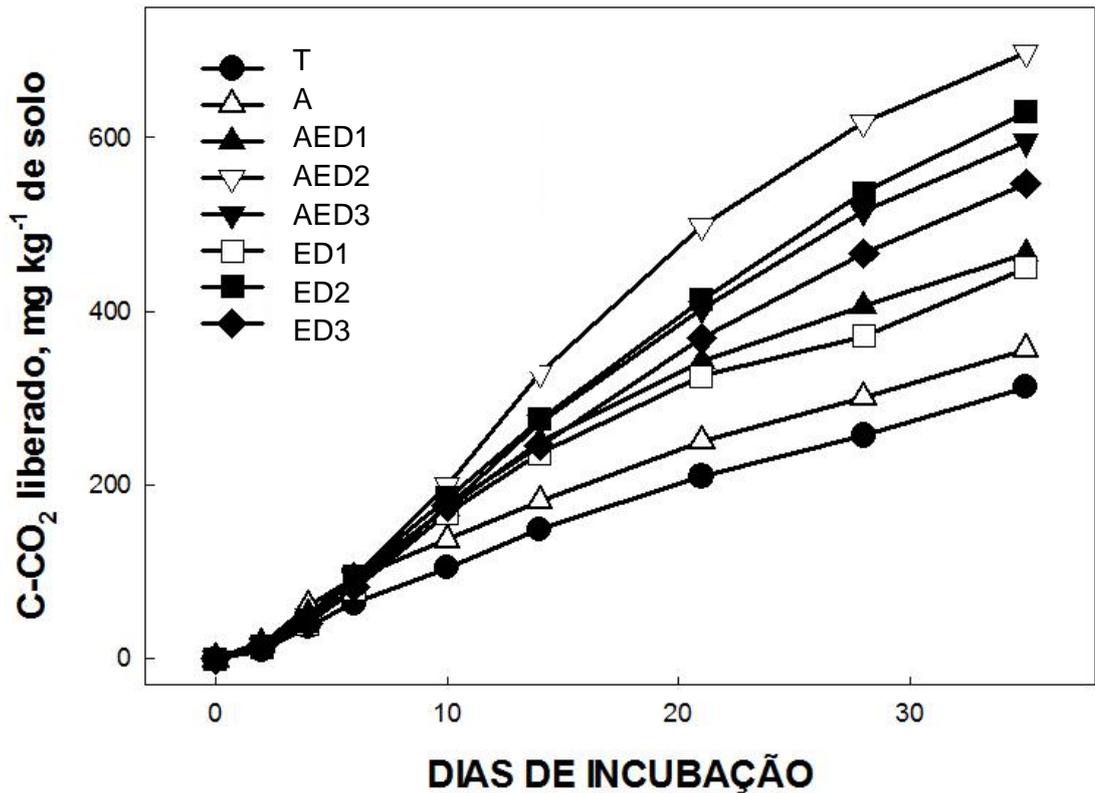
#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Ao término do experimento aos 35 dias de incubação, o C-CO<sub>2</sub> liberado diariamente variou entre os tratamentos (Figura 4). O tratamento considerado testemunha, com apenas solo e a borra oleosa adicionada (atenuação) apresentou a menor liberação diária de C-CO<sub>2</sub>. Os maiores valores foram verificados em torno dos 20 dias de incubação, no tratamento AED2. Esta dose propiciou no final do período uma maior liberação diária de CO<sub>2</sub> em comparação à mesma dose mas sem a adição do consórcio (tratamento ED2). Esta dose pareceu ser a mais adequada em termos de estímulo a degradação do carbono presente na borra oleosa.



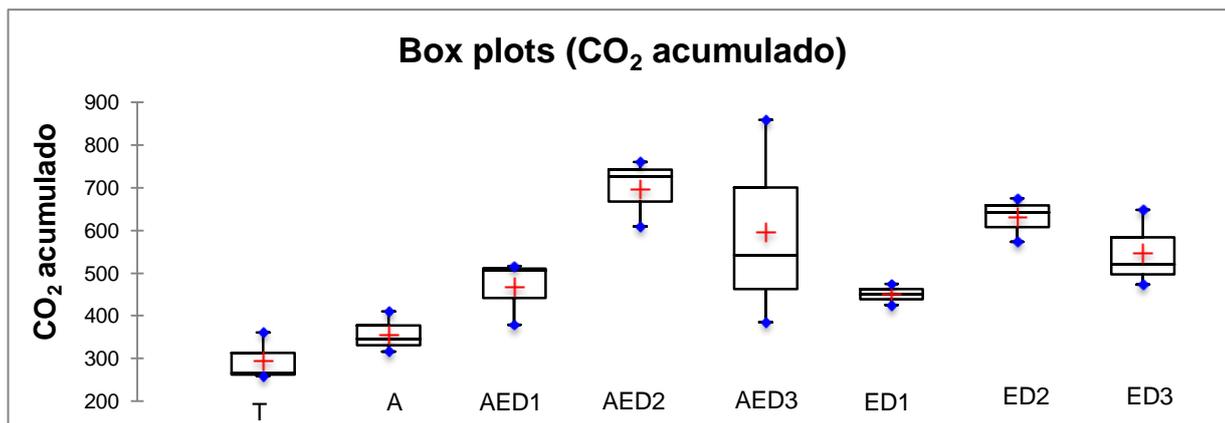
**Figura 4:** Liberação diária de C-CO<sub>2</sub> pelos tratamentos contendo solo contaminado com 1,5% de borra oleosa, com três repetições.

O C-CO<sub>2</sub> liberado e acumulado ao final do período da incubação mostrou de forma mais distinta o efeito dos tratamentos na degradação da borra oleosa (Figura 5). Em relação a testemunha, o maior C-CO<sub>2</sub> liberado pelo tratamento AED2 contendo consórcio mais fertilizantes (Bioaumentação + Bioestimulação com a dose 2 de fertilizantes) foi cerca de 2,23 vezes maior. Na sequência, o tratamento contendo a mesma dose mas sem o consórcio apresentou a maior liberação C-CO<sub>2</sub>, sendo esta 100% mais que o C-CO<sub>2</sub> liberado pela testemunha. Em relação a adição de diferentes doses de fertilizantes observou que a maior liberação ocorreu na seguinte sequência: dose 2 > dose 3 > dose 1, representando este aumento de 110, 80 e 50%, respectivamente em relação a testemunha. A adição apenas do consórcio representou apenas um leve incremento de C-CO<sub>2</sub> liberado (14%) ao final dos 35 dias de avaliação (Figura 5).



**Figura 5:** Liberação acumulada de C-CO<sub>2</sub> pelos tratamentos contendo solo contaminado com 1,5% de borra oleosa.

Os boxplots foram adotados para a comparação dos tratamentos de C-CO<sub>2</sub> acumulado. Esta estratégia estatística pode ser utilizada para sistematizar os valores máximos, mínimos, desvios, médias, etc, numa mesma figura. Esta sistematização dos dados mostrou que estatisticamente o tratamento Bioaugmentação + Bioestimulação dose 2 apresentou os maiores valores de C-CO<sub>2</sub> liberado (Figura 6). Esta dose foi também a responsável pela maior liberação de C-CO<sub>2</sub> no tratamento sem adição do consórcio



**Figura 6:** Box plots da liberação acumulada do C-CO<sub>2</sub> pelos tratamentos contendo solo contaminado com 1,5% de borra oleosa.

A cinética de mineralização foi mais bem ajustada por uma equação exponencial  $C_m = C_o (1 - \exp^{-kt})$ , onde  $C_m$  é o carbono mineralizado estimado pela liberação acumulada de C-CO<sub>2</sub>,  $C_o$  é o carbono orgânico potencialmente mineralizável e  $k$  é a taxa de degradação. Conforme pode ser observado na tabela 2, o maior potencial de mineralização foi observado no tratamento ED2, seguido do tratamento AED2. Consequentemente a este potencial de mineralização, as taxas de mineralização foram as menores observadas e a meia vida da reação foram as maiores, demonstrando que o processo de degradação da borra pode ser longo e contínuo, comparado aos demais tratamentos.

Com relação à liberação de C-CO<sub>2</sub>, os resultados obtidos apontam para o efeito positivo da bioaugmentação, sendo esta favorecida quando são também adicionados fertilizantes em uma relação C:N:P que atenda à demanda nutricional da biota. Ayotamuno et al. (2007) e Roldán-Carrillo (2012) estudando biodegradação de borra verificaram que a bioaugmentação é uma estratégia eficiente na degradação de borras oleosas. Em adição a isso, Xu e Lu (2010), Rahman et al. (2003), Mrayyan e Battikhi (2005) e Lazar et al. (1999) apontam que a bioaugmentação, quando feita com microrganismos nativos, apresenta valores ainda maiores de remoção de hidrocarbonetos. Menendez-Vega et al. (2007) avaliando a biorremediação de água contaminada com hidrocarbonetos, ressaltaram a importância da baixa biodisponibilidade do poluente em meios em que não houve correção da relação C:N:P. Sarkar et al. (2005), Vasudevan e Rajaram (2001) e Kriipsalu et

al (2007) apontam que a associação de bioaumentação com bactérias nativas associada à bioestimulação pode elevar os valores de degradação de poluente, atingindo valores próximos a 95%.

**Tabela 2:** Parâmetros cinéticos da mineralização da borra oleosa adicionada ao solo na concentração de 1,5%, com 3 doses de fertilizantes.

<b>Tratamento</b>	<b>CO mg/kg</b>	<b>k /dia</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>T<sup>1/2</sup></b>
Testemunha	805,0	0,0143	0,99	129,2
Bioaumentação	582,3	0,0272	0,97	61,2
Bioaument. + Bioestabilização 1	874,7	0,0221	0,98	78,1
Bioaument. + Bioestabilização 2	3646,1	0,0063	0,99	314,7
Bioaument. + Bioestabilização 3	3439,2	0,0056	0,99	354,2
Bioestimulação 1	906,1	0,0197	0,98	90,1
Bioestimulação 2	6804,2	0,0028	0,99	708,7
Bioestimulação 3	2777,1	0,0064	0,99	305,2

Onde: CO: carbono orgânico potencialmente mineralizável ; k: taxa de mineralização = ; R<sup>2</sup>: coeficiente de regressão; T<sup>1/2</sup> : Meia vida da reação

Depois do carbono, o nitrogênio e o fósforo inorgânicos são os nutrientes que mais limitam a degradação de compostos orgânicos. Estes elementos foram determinados ao final do experimento no microcosmo contendo solo e a borra oleosa (Tabela 2). O nitrogênio mineral variou entre os tratamentos, tendo sido consumido pela biota na testemunha e grandemente solubilizado nos tratamentos A e ED3 . Provavelmente o nitrogênio remanescente pode não ter sido utilizado para a degradação da borra pela baixa disponibilidade de carbono para os microrganismos degradadores, uma vez que o carbono que compõe a borra oleosa é de difícil metabolização.

**Tabela 2:** Nitrogênio mineral, fósforo, atividade enzimática e hidrocarbonetos de petróleo totais em tratamentos onde foi adicionado ao solo borra oleosa com 3 doses de fertilizantes ao final da avaliação.

<b>Tratamento</b>	<b><math>\Delta</math>N-mineral</b>	<b><math>\Delta</math>P-mineral</b>	<b><math>\Delta</math>FDA</b>	<b><math>\Delta</math>HTP</b>
	mg.kg <sup>-1</sup>	mg.dm <sup>-3</sup>	mg.g <sup>-1</sup>	g.kg <sup>-1</sup>
T	-0,1a	0,025a	0,411c	15,17b
A	162,9a	0,023ab	0,628ab	12,59c
AED1	7,9a	0,022ab	0,713a	18,60a
AED2	49,8a	0,015abc	0,511c	16,78b
AED3	7,9a	0,014abc	0,526c	13,58c
ED1	3,9a	0,010bc	0,611ab	17,44b
ED2	3,6a	0,006c	0,603ab	16,91b
ED3	138,5a	0,003c	0,651ab	17,01b

Abreviações:  $\Delta$ N-mineral: diferença entre N-mineral no tempo final e no tempo inicial ;  $\Delta$ P: diferença entre P-mineral no tempo inicial e no tempo final ;  $\Delta$ FDA: diferença entre hidrólise de diacetato de fluoresceína no tempo inicial e no tempo final ;  $\Delta$ HTP: diferença entre hidrocarbonetos totais do petróleo no tempo inicial e no tempo final

Esses resultados indicam que no caso da biorremediação da borra oleosa, a adição de N é de grande importância, uma vez que esse nutriente é frequentemente limitante para o metabolismo microbiano, conforme observado por Kriipsalu et al. (2007), Vasudevan e Rajaram (2001) e Bento et al. (2005).

Assim como verificado para o nitrogênio mineral, os resultados do fósforo apresentaram comportamento semelhante, com um aumento dos valores proporcional ao aumento das doses de fertilizantes aplicadas (Tabela 2). Apesar da degradação ter ocorrido em maior intensidade, o fósforo parece não ter sido fator limitante a degradação. Como não houve variação de pH no início e ao final do experimento, provavelmente a solubilidade do fósforo não variou, conforme descrito por Sparks (2003). Isso indica que as variações nos teores de fósforo foram decorrente da atividade microbiana e não do pH, conforme observaram Rahman et al. (2003) e Guerin (2000).

O diacetato de fluoresceína (FDA) é hidrolisado por várias enzimas (lipases, proteases e estereases) e tem sido utilizada para avaliar a atividade hidrolítica indiscriminada de compostos orgânicos no solo. A hidrólise do FDA foi utilizada neste trabalho para avaliar a atividade microbiana frente aos componentes da borra oleosa adicionada ao solo (Tabela 2). Observou-se que a maior atividade hidrolítica ocorreu no tratamento contendo o consórcio microbiano mais o estímulo da dose 1 de fertilizantes ( $6,975 \times 10^{-3}$  g de N e  $1,74 \times 10^{-3}$  g de P). Quando a dose fertilizante foi aumentada neste tratamento

(bioaumentação) a atividade hidrolítica diminuiu.

Para os tratamentos onde apenas houve a adição de doses de fertilizantes sem o consórcio, os valores foram um pouco inferiores a bioaumentação + dose 1 e a dose de nutrientes não afetou a atividade. Este resultado sugere que as relações C:N:P dos outros tratamentos pode ter inibido o desempenho do consórcio, conforme também observado por Sarkar et al. (2005) e Rahman et al. (2003).

Aparentemente no trabalho verificou-se que a hidrólise do FDA é maior na presença do consórcio e do fertilizante desde que a dose deste não seja muito elevada. Os resultados da presença isolada de borra no solo (testemunha) parecem indicar que a hidrólise do FDA não seria um bom indicador de atividade microbiana relacionada a degradação de hidrocarbonetos, provavelmente, devido as lipases, proteases e esterases hidrolisadas estarem menos relacionadas aos processos de degradação como no caso das desidrogenases. A presença da borra interfere na detecção dessa enzima e por isso não foi avaliada neste trabalho.

Em relação à diferença nos hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP), verificou-se ao final do experimento que os valores variaram entre 12,6 e 18,6 g de HTP/kg de solo. Apesar de a diferença entre estes extremos ser de apenas 6 g de HTP/kg de solo, entre os tratamentos observou-se diferenças significativas. Deste modo, o tratamento contendo consórcio e a dose 1 apresentou o maior valor de HTP no solo. Nos tratamentos contendo esta combinação (consórcio + fertilização) os valores de HTP foram inversamente proporcional as doses aplicadas, ou seja, maiores valores nas menores doses. Para os tratamentos sem consórcio, os valores de HTP não foram alterados pelo aumento das doses.

Os resultados de HTP demonstram que a relação C:N:P 3 favoreceu a degradação de borra, enquanto a relação 1 favoreceu a mineralização de N e solubilização de P. Uma vez que a relação C:N:P 3 foi a maior das três usadas neste estudo, conclui-se que o consórcio microbiano degradou uma maior porcentagem de HTP da borra oleosa com uma relação C:N:P maior. No entanto, é possível que as demais relações sejam adequadas para a biorremediação de outro contaminante ou para estimular um consórcio microbiano composto de indivíduos diferentes. Resultados de Vasudevan e

Rajaram (2001) e Kriipsalu et al. (2007) apontam nessa direção. Menendez-Vega et al (2007) ressaltam que em muitos casos a adição de nutrientes não é suficiente para aumentar a biodisponibilidade de um contaminante, resultando em uma baixa taxa de degradação. Esse pode ter sido o caso ocorrido com as relações C:N:P 2 e 3.

## 5. CONCLUSÕES

A adição de fertilizantes combinada com a introdução do consórcio microbiano favoreceu a liberação de C-CO<sub>2</sub>. Os resultados obtidos pela análise da hidrólise do diacetato de fluoresceína não foram consistentes, apontando para a inadequação da utilização desse indicador nesse trabalho. Em relação aos valores de  $\Delta$ HTP, a adição da dose 1 e do consórcio microbiano resultou na maior remoção. Os resultados permitem concluir que a fertilização associada a microrganismos competentes pode ser uma boa estratégia de degradação da borra oleosa.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10004**: resíduos sólidos: classificação.. Rio de Janeiro, 1987. 63 p.

ANDREAZZA, R. **Potencial do uso de bactérias e plantas para a remediação de cobre em áreas de vitivinicultura e de rejeito de mineração de cobre no Rio Grande do Sul**. 2009. 142 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

ATLAS, R. M. Microbial hydrocarbon degradation: bioremediation of spills. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 52, n. 13, p. 149-156, 1991.

AYOTAMUNO, M. J. et al. Bio-remediation of a sludge containing hydrocarbons. **Applied Energy**, v. 84, n. 2, p. 936-943, 2007.

BALBA, M. T.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, n. 9, p. 155-164, 1998.

BARTON, L.; LOY, A.; MANDL, M. (Ed.). **Geomicrobiology: molecular and environmental perspective**. 3. ed. Nova Iorque: Springer, 2010. 444 p. Disponível em: <<http://link.springer.com>>. Acesso em: 29 jul. 2013.

BENTO, F. M. et al. . Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, Brasil, v. 96, n. 7, p. 1049–1055, 2005.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 21, p. 63-67, 2000.

CARNEIRO, M. A. C. **Características bioquímicas do solo em duas cronosseqüências de reabilitação em áreas de mineração de bauxita**. 2000. 166 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

CERQUEIRA, V. S. et al. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 102, n. 4; p. 11003-110010, 2011. Disponível em: <[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)>. Acesso em: 30 mar. 2012.

CERQUEIRA, V. S. **Biorremediação de borra oleosa proveniente de indústria petroquímica**. 2011. 196 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em: 28 fev. 2012.

CHAGAS-SPINELLI, A. C. O. **Biorremediação de solo argiloso contaminado por hidrocarbonetos poliaromáticos provenientes de derrame de óleo diesel**. 2007. 174 f. Tese (Doutorado em Geociências) – Faculdade de Geociências, Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

CHRZANOWSKI, L.; LAWNICZAK, L.; CZACZYK, K. Why do microorganisms produce rhamnolipids? **World J Microbiol Biotechnol**, Polônia, v. 28, n. 8, p. 401–419, 2012.

COLLA, T. S. **Avaliação da biorremediação de solo contaminado pela mistura B10 por consórcio bacteriano**. 2012. 150 f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente., Instituto de Ciências Básicas da Saúde , Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

CONEGLIAN, C. M. R. et al. Avaliação da biodegradação no solo de resíduos gerados em refinaria de petróleo. **Holos Environment**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 209-218, 2006.

CORSAN. **SITEL: superintendência de tratamento de efluentes líquidos**. Disponível em: <[http://www.corsan.com.br/sitel/www/?page\\_id=57](http://www.corsan.com.br/sitel/www/?page_id=57)>. Acesso em: 30 maio 2013.

DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. **Biotechnology Research International**, Índia, v. 7, n. 11, p. 1-13, 2011. , 2011.

GONÇALO, A. C. **Estudo da eficiência de novos aditivos na gasolina através da cromatografia gasosa**. 2004. 124 f. Monografia de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2004.

GUERIN, T. F. Long-term performance of a land treatment facility for the biorremediation of non-volatile oily wastes. **Resources, Conservation And Recycling**, Cingapura, v. 28, n. 32, p. 105-120, jul. 1999. Disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 21 mar. 2012.

IRVINE, G. V.; MANN, D. H.; SHORT, J. W. Persistence of 10-year old Exxon Valdez oil on Gulf of Alaska beaches: the importance of boulder-armoring. **Marine Pollution Bulletin**, v. 5, n. 52, p. 1011-1022, 2006. Disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 30 jun. 2012.

JACQUES, R. J. S. et al. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p.1192-1201, 2007.

KHAN, F. I., HUSAIN, T., HEJAZI, R. An overview and analysis of site remediation technologies. **Journal of Environmental Management**, v. 71, n. 22, p. 95-122, 2004.

KRAMER, D. N.; GUIBAULT, G. G. A substrate for the fluorimetric determination of lipase activity. **Analytical Chemistry**, v. 35, n. 11, p. 588-589, 1963.

KRIIPSALU, M. et al. Bio-treatment of oily sludge: the contribution of amendment material to the content of target contaminants, and the biodegradation dynamics. **Journal Of Hazardous Materials**, Kalmar, v. 12, n. 148, p. 616-622, 2007. Disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 30 jun. 2012.

LAZAR, I. et al. Microbial degradation of waste hydrocarbons in oily sludge from some Romanian oil fields. **Journal Of Petroleum Science & Engineering**, Bucareste, v. 1, n. 22, p. 151-160, 1999. Disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 30 jun. 2012.

LI, H; BOUFADEL, M.C. A tracer study in an Alaskan gravel beach and its implications on the persistence of the Exxon Valdez oil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 16, n. 62, p. 1261-1269, 2011. Disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 30 jun. 2012.

LIN, T.C. et al. Evaluation of the optimal strategy for ex situ bioremediation of diesel oil-contaminated soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 18, n. 9, p. 1487-1496, 2011.

MARIANO, A. P. et al. Investigation about the efficiency of the bioaugmentation technique when applied to diesel oil contaminated soils. **Brazilian archives of biology and technology**, Brasil, v. 52, n. 19, p. 1297-1312, 2009.

MARQUARDT, D. W. An algorithm for least squares estimation of non-linear parameters. **Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics**, New York, v. 11, n. 14, p. 431-441, 1963.

MAYER, R. M.; SOBERON-CHAVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 20, p. 625- 633, 2000.

MENENDEZ-VEGA, D. et al. Engineered in situ bioremediation of soil and groundwater polluted with weathered hydrocarbons. **European Journal Of Soil Biology**, Oviedo, v. 43, n. 6, p. 310-321, mar. 2007. Disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 30 jun. 2012.

MEGHARAJ, M. et al. Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective. **Environment International**, Anantapur, v. 10, n. 37, p.1362-1375, 2011. Disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 21 nov. 2012.

MEURER, E. J. **Fundamentos de química do solo**. 3. ed. Porto Alegre: Evangraf, 2006. 285 p.

MISHRA, S. et al. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. **Applied And Environmental Microbiology**, Nova Delhi, v. 3, n. 67, p. 1675-1681, 2001. Disponível em: <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 21 nov. 2012.

MOHAN, S. et al. Bioslurry phase degradation of di-ethyl phthalate (DEP) contaminated soil in periodic discontinuous mode operation: influence of bioaugmentation and substrate partition. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 644-652, 2006.

MRAYYAN, B.; BATTIKHI, M. N. Biodegradation of total organic carbons (TOC) in Jordanian petroleum sludge. **Journal of Hazardous Materials** v. 12, n. 17, p. 127–134, 2005.

MUKHERJI, S. et al. Biodegradation of diesel oil by an Arabian Sea sediment culture isolated from the vicinity of an oil field. **Bioresource Technology**, v. 95, n. 30, p.281-286, 2004.

OLIVEIRA, D. M. et al. **Fitorremediação: o estado da arte**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2007. 49 p. (Série Tecnologia Ambiental, 39).

PAUL, E. A. (Ed.) et al. **Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry**. 3. ed. Burlington: Elsevier, 2007. 532 p.

PETROBRAS. **Petroquímica**. Disponível em: <[www.petrobras.com.br](http://www.petrobras.com.br)>. Acesso em: 01 jul. 2013.

RAHMAN, K. S. M. et al. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. **Bioresource Technology**, v. 90, n. 25, p. 159-168, 2003.

REDDY, K. R.; ADMAS, J. F.; RICHARDSON, C. Potential technologies for remediation of Brownfield. **Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management**, Reston, v. 3, n. 6, p. 61–68, 1999.

RIZZO, A. C. L. et al. **Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores**. : CETEM/MCT, 2006. (Série Tecnologia Ambiental. STA-37).

ROLDÁN-CARRILLO, T. et al. Aerobic biodegradation of sludge with high hydrocarbon content generated by a Mexican natural gas processing facility. **Journal Of Environmental Management**, México, v. 95, n. 78, p. 593-598, maio 2011. Disponível em: <[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)>. Acesso em: 21 mar. 2012.

RUBERTO, L. et al. Influence of nutrients addition and bioaugmentation on the hydrocarbon biodegradation of a chronically contaminated Antarctic soil. **Journal of Applied Microbiology**, Argentina, v. 106, n. 21, p. 1101–1110, 2009.

SARKAR, D. et al. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, San Antonio, v. 30, n. 136, p.187-195, 2005. Disponível em: <[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)>. Acesso em: 25 mar. 2012.

SCHNÜRER, J.; ROSSWALL, T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. **Applied and Environmental Microbiology**, Uppsala, v. 43, n. 1, p. 1256-1261, 1982.

SEABRA, P. N. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. In: **Microbiologia Ambiental**. 2. ed., Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. p. 547-570. cap. 24.

SIGMASTAT. Scientific Graphing Software. Transform & Curve Fitting. Revision SPW 2.0. San Rafael, Jandel Scientific, 1994.

SILVA, I. S. et al. Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. **Bioresource Technology**, Brasil, v. 100, n. 31, p. 4669–4675, 2009.

SINGH, C.; LIN, J. Isolation and characterization of diesel oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 12, p. 1927-1932, 2008.

SOUZA, R. S. **Fatores de formação e desenvolvimento das estratégias ambientais nas empresas**. 2004. 283 f. Tese (Doutorado em Administração)- Escola de Administração Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

SWISHER, R.; CARROLL, G. C. Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces. **Microbial Ecology**, Eugene, v. 6, n. 23, p. 217-226, 1980.

SOARES, J.; MARIANO, A.; DE ANGELIS, D. Biodegradation of biodiesel/diesel blends by *Candida viswanathii*. **African Journal of Biotechnology**, Rio Claro, v. 8, n. 12, p. 2774-2778, 2009.

SPARKS, D. L. **Environmental soil chemistry**. 2. ed. San Diego: Elsevier, 2003. 352p.

SRIDEVI, V. et al. Implementation of response surface methodology for phenol degradation using *Pseudomonas putida* (NCIM 2102). **Journal of Bioremediation and Biodegradation**, Andhra Pradesh, v. 2, n. 5, p. 314-324, 2011.

STOTZKI, G. Microbial respiration. In.: Black, C. A. (Ed.). **Methods in soil analysis**,. Madison: SSSA, 1965. p. 1550-1572.

TAHHAN, R. A. et al. Enhancing the biodegradation of total petroleum hydrocarbons in oily sludge by a modified biougmentation strategy. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 35, p. 130-134, nov. 2010. Disponível em: <[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)>. Acesso em: 21 mar. 2012.

TRAMONTINI, L. **Micorremediação de solo contaminado com a mistura diesel/biodiesel**. 2013. 125 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

TRINDADE, P. V. O. et al. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. **Chemosphere**, Rio de Janeiro, v. 58, n. 32, p. 515–522, 2005.

USEPA. **United States Environmental Protection Agency**. Disponível em: <[www.epa.gov](http://www.epa.gov)>. Acesso em: 21 mai 2012.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Review**, Canadá, v. 67, n. 4, p. 503–549, 2003.

VASUDEVAN, N.; RAJARAM, P. Bioremediation of oil sludge- contaminated soil. **Environment International**, Chennai, v. 2001, n. 26, p. 409-411, 2001. Disponível em: <[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)>. Acesso em: 13 nov. 2012.

VERMA, S.; BHARGAVA, R.; PRUTHI, V. Oily sludge degradation by bacteria from Ankleshwar, India. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Roorkee, v. 71, n. 57, p. 207-213, 2006. Disponível em: <[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)>. Acesso em: 30 set. 2012.

XU, Y.; LU, M. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. **Journal Of Hazardous Materials**, Jingzhou, v. 60, n. 183, p. 395-401, 2010. Disponível em: <[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)>. Acesso em: 13 mar. 2012.

ZANAROLI, G. et al. Characterization of two diesel fuel degrading microbial consortia enriched from a non acclimated, complex source of microorganisms. **Microbial Cell Factories**, Bolonha, v. 9, n. 10, p. 183-190, 2010.

ZHANG, Z. et al. Characterization and biotechnological potential of petroleum-degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils. **Bioresource Technology**, China, v. 101, n. 35, p. 8452–8456, 2010.

ZHU, L.; LU, L.; ZHANG, D. Mitigation and remediation technologies for organic contaminated soils. **Frontiers of Environmental Science & Engineering in China**, Hangzhou, v. 4, n. 4, p. 373–386, 2010.