

VI-116 - AVALIAÇÃO DA BIOAUMENTAÇÃO EM SOLOS CONTAMINADOS COM ÓLEO DIESEL PROVENIENTES DE POSTOS DE COMBUSTÍVEIS

Adriana Bee ⁽¹⁾

Engenheira Ambiental pela Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC.

Priscila Pacheco Mariani ⁽²⁾

Engenheira Ambiental pela Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC. Mestranda em Ciência do Solo pela Universidade de Santa Cruz do Sul – UFRGS. Responsável técnica dos laboratórios do curso de Engenharia Ambiental da UNISC.

Valéria Boettcher ⁽³⁾

Engenheira Ambiental pela Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC.

Jéssica Tayná Vasques da Silva ⁽⁴⁾

Engenheira Ambiental pela Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC.

Diosnel Antonio Rodriguez Lopez ⁽⁵⁾

Engenheiro de Minas, Doutor em Engenharia (Tu-Berlim). Professor Adjunto do Departamento de Engenharia, Arquitetura e Ciências Agrárias – UNISC.

Endereço ⁽²⁾: Av. Independência, 2293 - Universitário – Santa Cruz do Sul - RS - CEP: 96815-900 - Brasil - Tel: +55 (51) 3717-7549 - Fax: +55 (51) 9733-7649 - e-mail: priscilamariani@unisc.br.

RESUMO

A crescente contaminação de solos e águas subterrâneas por hidrocarbonetos derivados de petróleo advindos de vazamentos acidentais em tanques de combustíveis torna-se cada vez mais frequente. Assim, este trabalho propõe fazer uma comparação entre um sistema de bioaumentação associado à bioestimulação e atenuação natural estimulada. Um sistema que acoplava dois baldes foi montado. Os baldes eram conectados a uma engrenagem, que, ligado a um motor fazia o sistema girar, garantindo o revolvimento do solo e renovação de oxigênio. Os mesmos foram mantidos a temperatura constante de 30°C. Ambos os sistemas receberam a mesma quantidade de solo contaminado com hidrocarbonetos. Adicionou-se ainda, esterco de aviário nos dois reatores. No reator submetido à bioaumentação/bioestimulação foi realizada a inoculação dos fungos *Aspergillus fumigatus* e *Cephalosporium* sp. O processo foi testado por um período de 60 dias. O solo foi mantido a umidade de 60% da capacidade de saturação do solo e o pH manteve-se neutro. Foram realizadas contagem de fungos e leveduras e bactérias no início do processo, em 30 e 60 dias. Também foram analisados a degradação dos PAH, HTP, HRP e MCNR ao longo do tempo. Os resultados mostraram que a degradação dos hidrocarbonetos segue uma cinética de primeira ordem, sendo que após 60 dias de ensaios, mais de 84% da concentração dos hidrocarbonetos foi reduzida. Em relação aos micro-organismos, foi possível observar que a adição de fungos a um dos sistemas aumentou significativamente o número destes micro-organismos dentro do sistema. A contagem dos fungos aos 30 dias demonstrou que o sistema em que eles foram inoculados obteve um aumento de 1066% superior ao sistema sem inoculação. Porém, não é possível afirmar que eles foram responsáveis pela degradação da maior parte dos contaminantes presentes no solo, visto que o sistema livre da inoculação dos mesmos apresentou-se mais eficiente na remoção de todos os compostos.

PALAVRAS-CHAVE: Hidrocarbonetos, Bioaumentação, Bioestimulação, Atenuação Natural, Micro-organismos.

INTRODUÇÃO

O solo possui grande importância para o homem e a natureza, pois é uma base para a vida e um habitat para as pessoas, animais, plantas e outros organismos. Grande parte de nossos alimentos provém do solo, que como parte integrante dos sistemas naturais, cumpre papel importante nos ciclos da água e dos nutrientes. O solo é um espaço com intensa atividade microbiológica, meio para a decomposição, equilíbrio e renovação química, protetor de recursos hídricos, em especial às águas subterrâneas, em função de suas propriedades filtrantes, de tamponamento e de conversão de substratos (SEABRA, 2005).

A crescente contaminação de solos e água subterrânea por hidrocarbonetos derivados de petróleo, principalmente em função da frequência com que os episódios de contaminação são verificados e da gravidade com que o meio ambiente é afetado, tem ganhado destaque nas últimas décadas. Embora os grandes vazamentos acidentais de petróleo sejam preocupantes e têm ganhado espaço na mídia, estima-se que a principal fonte de contaminação por derivados de petróleo seja devida a pequenos vazamentos de combustível ocasionados em reservatórios, falhas mecânicas ou humanas ocorridas nas operações de descarga e até mesmo por acidentes ocorridos no transporte deste produto químico (MENEGETTI, 2007).

Algumas técnicas já foram desenvolvidas para o tratamento de áreas contaminadas por petróleo e seus derivados. Dentre essas, as técnicas físico-químicas, que envolvem o emprego de substâncias químicas e fatores físicos como, por exemplo, temperatura e pressão, são de uso frequente em função da elevada eficiência e ao rápido período de tratamento. Porém, além do alto custo, esses tratamentos apresentam inconvenientes, como a geração de grandes volumes de rejeitos contaminados (águas e solventes), e risco de poluição atmosférica através da volatilização de alguns compostos (RISER-ROBERTS, 1998; KHAN, HUSAIN & RAMZI, 2004).

Sendo assim, nas últimas duas décadas, a aplicação de processos biológicos no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo estão despertando o interesse das comunidades científica e industrial. Esses processos de tratamento utilizam organismos como bactérias, fungos e/ou vegetais, com a finalidade de reduzir ou eliminar compostos orgânicos perigosos ao meio ambiente e à saúde humana, que se acumularam no ambiente. Entre as principais vantagens do emprego dos processos biológicos está o seu baixo custo, comparando-se com os processos convencionais (DAVIS et al., 1995), como também o fato de serem processos naturais, com baixo consumo de energia e que causam poucas mudanças nas características físicas, químicas e biológicas do meio (SEABRA, 2005).

De modo geral, a biorremediação baseia-se na degradação bioquímica dos contaminantes por meio da atividade de micro-organismos presentes ou adicionados no local de contaminação (BERNETH et al., 2000). Os hidrocarbonetos são degradados principalmente por bactérias e fungos e a adaptação destas comunidades microbianas, por exposição prévia aos hidrocarbonetos, aumenta as taxas de degradação dos mesmos. A adaptação é provocada por enriquecimento seletivo de micro-organismos usuários dos hidrocarbonetos e a ampliação do conjunto de genes catabolizantes de hidrocarbonetos (JACKSON et al., 1996).

Frente a essa realidade, e com enfoque na necessidade de tecnologias de remediação mais acessíveis e menos impactantes, o presente estudo avalia a eficiência das técnicas de bioaumento e bioestímulo em comparação com a atenuação natural estimulada, na degradação de hidrocarbonetos derivados de petróleo de um solo contaminado. O objetivo geral dessa pesquisa é estudar a biorremediação de um solo contaminado com hidrocarbonetos derivados de petróleo por meio da bioaugmentação com cepas de fungos, a temperatura constante.

MATERIAIS E MÉTODOS

Montagem dos Sistemas

Para a realização deste trabalho foram montados dois reatores de mistura completa, com aquecimento elétrico, capaz de operar a temperatura constante, que permitia o revolvimento da mistura como forma de homogeneização. Para a construção dos reatores foram utilizados dois baldes de 20 litros de PP (polipropileno). Os dois reatores foram montados sobre um suporte, o qual foi conectado a um sistema mecânico agitação/mistura. Este consiste de um motor elétrico de 550W (furadeira) marca DEWALT, modelo DW 508-B2 acoplado a um moto redutor conectado a uma roda dentada ligada a uma corrente que tem a função de distribuir o movimento igualmente para os dois reatores. A rotação dos reatores foi mantida em 0,5 rpm. No interior dos reatores foram instalados defletores que têm a finalidade de revolver o solo.

Os baldes de PP foram instalados em um ângulo de 45° em relação à horizontal para que o revolvimento do solo fosse eficiente, sem a acumulação do material em cantos, evitando assim, zonas mortas. Para manter a temperatura constante, os reatores foram dotados de um sistema de aquecimento (Figura 1). Nesta montagem, os cilindros foram envolvidos com uma resistência de 30W e posteriormente cobertos com uma manta asfáltica

isolante. As resistências foram conectadas à controladores de temperatura eletrônicos, os quais foram ajustados para operar em $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

Em cada reator, foi adicionado 9 quilogramas de solo e 200 gramas de adubo orgânico tipo cama de aviário curtido e estabilizado. Este foi utilizado como suplementação de nutrientes ao sistema, principalmente como fonte de nitrogênio e fósforo, além de servir como material estruturante para o solo.

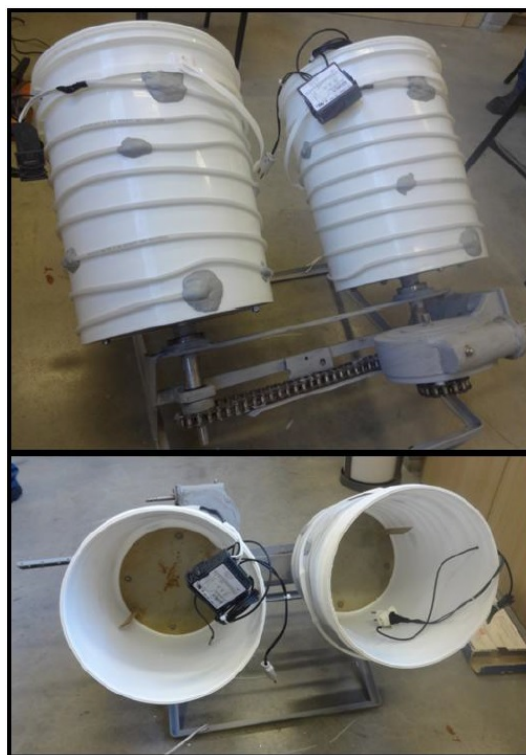


Figura 1: Montagem do sistema de biorremediação.

Os ensaios de biorremediação foram realizados com adição de cepas microbianas (Reator 1) e sem adição de cepas microbianas (Reator 2). As cepas utilizadas foram isoladas por Bisognin (2012). O processo de biorremediação foi testado no sistema por um período de 60 dias. Na Figura 2 está apresentado o início de funcionamento do sistema de remediação.



Figura 2: Início do processo de remediação; Biorremediação (Reator 1) – Atenuação Natural (Reator 2).

Características do solo a ser tratado

O solo que passou pelo processo de biorremediação foi proveniente de uma unidade de tratamento de solo contaminado. Esta unidade recebeu solo oriundo de um posto de combustível que passou pela substituição de

tanques subterrâneos, quando foi percebida a presença de vazamento de óleo diesel no entorno do antigo tanque.

Nesse estudo, realizou-se a caracterização físico-química do solo utilizado, no laboratório da Central Analítica da Universidade de Santa Cruz do Sul. Na Figura 3 são apresentadas imagens do solo utilizado.

A amostra representa um solo arenoso com a presença de torrões de argila, composição muito comum no material de assentamento de tanques subterrâneos.



Figura 3: Solo utilizado no processo de biorremediação.

Seleção e inoculação dos micro-organismos

Bisognin (2012), em sua dissertação, isolou centenas de micro-organismos contidos em um sistema de remediação de solos contaminados. Os consórcios foram formados a partir das cepas previamente isoladas. A seleção dos micro-organismos foi realizada com base em sua capacidade de degradação do óleo diesel, estudada por meio do uso do indicador redox 2,6-Diclorofenol-indofenol.

Kronbauer (2014) observou, em um processo de biorremediação, que os fungos das espécies *Aspergillus fumigatus* e *Cephalosporium* sp., previamente isolados e testados por Bisognin (2012) apresentaram bons resultados quanto à degradação de compostos derivados de petróleo. Assim, foi proposto utilizar esses micro-organismos, para realização da bioaumentação do solo contaminado.

Conforme a metodologia seguida por Kronbauer (2014) foi realizado o processo de isolamento e purificação dos micro-organismos. Os fungos utilizados neste trabalho foram apenas estriados novamente em placa de Petri que continha meio mineral BH, o qual foi acrescido com 1,5% de ágar-ágar e 1,5% de óleo diesel. Após o estriamento, as placas foram mantidas invertidas em estufa a temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2$ para crescimento microbiano.

Após, os micro-organismos foram ressuspensos em meio BH e padronizados através da escala de McFarland. As amostras foram lidas no espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado em 580 nm. Foram utilizadas populações de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, que representa 0,5 na escala de McFarland. Fez-se uso 1 mL de inóculo microbiano para cada 100 g de solo seco.

Nas Figuras 4 e 5 estão apresentados, respectivamente, os micro-organismos utilizados e a realização do processo de padronização com o auxílio de um espectrofotômetro modelo V1200 Spectrophotometer da Pró-Análise.

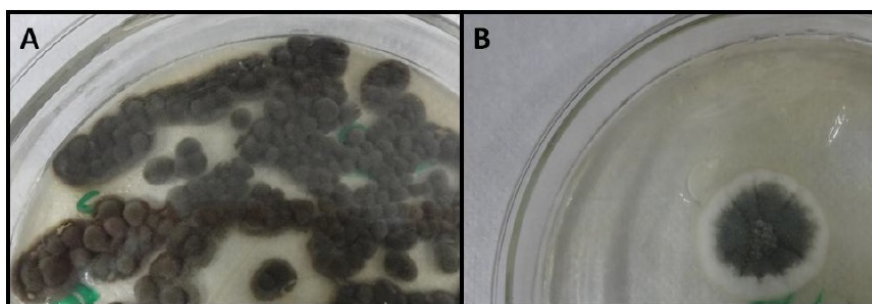


Figura 4: Micro-organismos utilizados: *Cephalosporium* sp. (A); *Aspergillus fumigatus* (B).

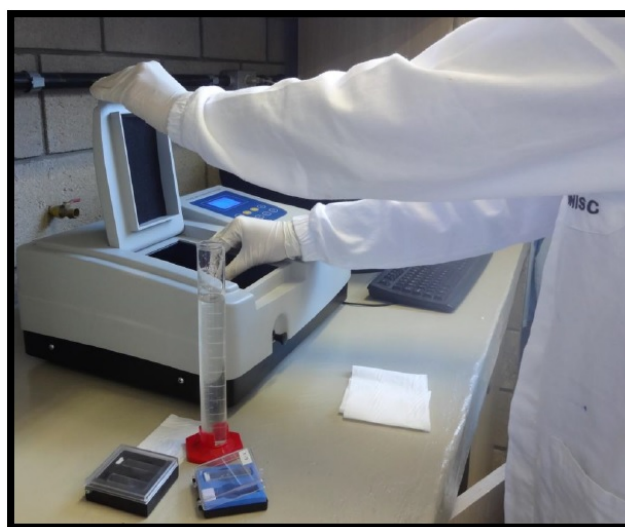


Figura 5: Padronização das culturas em $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹.

Controle do pH, temperatura e umidade

O pH de cada sistema foi monitorado a cada semana durante os 60 dias de teste, diluindo o solo em água deionizada a uma relação de 1:5, e a seguir verificado com um pHmetro PHS-3B marca PHTEK. A temperatura interna dos reatores era medida através dos controladores de temperatura modelo MT-530 super, marca M-Full Gauge, instalados. A mesma era mantida constantemente a $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ pela adição de água deionizada.

A umidade foi verificada, retirando aproximadamente 10g de solo do sistema. A seguir, a mesma era deixada a 105°C durante 24 horas para secagem completa. A amostra era pesada antes e após sua estada no forno, e com a diferença de massa obtida era calculado o teor de umidade dos solos.

Quando o solo estava muito seco, a umidade era corrigida. No reator que sofria atenuação natural acrescentava-se água deionizada e o reator que passava pelo processo de biorremediação recebia uma solução de nutrientes: (g.L⁻¹: MgSO₄7H₂O: 0,2; CaCl₂.2H₂O: 0,02; KH₂PO₄: 1,0; NH₄PO₄: 1,0; NH₄NO₃: 1,0; FeCl₃:0,05), para que houvesse também a estimulação do crescimento microbiano.

Contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos viáveis e bolores e leveduras

Para monitorar o crescimento microbiano ocorrido no sistema de remediação, uma amostra de cada reator era retirada e enviada para a contagem dos micro-organismos aeróbios mesófilos viáveis e contagem de bolores e leveduras no Laboratório da Central Analítica da Universidade de Santa Cruz do Sul, no tempo de amostragem zero, 30 e 60 dias. O laboratório baseou-se na Instrução Normativa N°62, de 26 de agosto de 2003: Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água, para a realização das análises.

Análise química de hidrocarbonetos de petróleo (BTEX, PAH, TPH *Fingerprint* e n-alcanos)

Com a finalidade de realizar o monitoramento da remediação do solo, amostras de solo foram retiradas aos 0, 20, 40 e 60 dias, de cada reator. As mesmas foram resfriadas e mantidas a uma temperatura de até 4°C e então enviadas para o Laboratório Analytical Solutions a fim de serem analisados PAH, TPH, TRP e MCNR. Para análise de PAH, o laboratório em questão seguiu a norma EPA 8270D e para TPH a EPA 8015D.

RESULTADOS

Características do solo

O solo apresenta baixa Capacidade de Troca Catiônica (CTC) evidenciada pela análise. A CTC representa a capacidade que o solo possui de reter ou ceder nutrientes catiônicos como o Ca⁺, Mg⁺, K⁺, para o solo por meio de sua fração coloidal que é representada por argilas e matéria orgânica. Assim, o baixo índice de CTC está relacionado à baixa concentração de material orgânico e a solos mais argilosos, que contribui para aumentar a retenção de água e de contaminantes.

Controle pH, temperatura e umidade

A temperatura foi mantida constante a 30°C durante o período de testes, podendo ocorrer uma variação de $\pm 2^\circ\text{C}$. Essa temperatura se encontrava em uma faixa ótima para crescimento microbiano, pois segundo Alvarez e Ilman (2006), o desenvolvimento de micro-organismos mesófilos, característicos desse tipo de solo, ocorre na faixa de 25-35°C.

O teor de umidade foi mantido em aproximadamente 60% da capacidade de saturação do solo, sendo este um fator importante, pois conforme Cardoso et al. (1992), a umidade ideal para o desenvolvimento de micro-organismos característicos de solos com contaminações de hidrocarbonetos está localizada entre 60-70% da capacidade de retenção de água do solo.

De acordo com Cardoso (1992), a aeração e a umidade estão inversamente relacionadas, pelo movimento e substituição do ar e da água. As mudanças na constituição do ar do solo controlam o crescimento e a atividade microbiana, pois o CO₂ e O₂ são necessários ao crescimento. Um solo bem arejado, do ponto de vista microbiológico, é aquele em que a atividade de oxigenação é máxima. Contudo, é pouco provável que um solo torne-se suficientemente aerado a ponto de satisfazer toda biota, devido à dificuldade de movimentação gasosa nos pequenos poros, baixa difusão de oxigênio em meio líquido e microambientes, no qual os micro-organismos estão situados. O pH passou por variações ao longo do tempo, porém se manteve entre 7 e 8,6.

O pH do solo afeta diretamente a atividade dos micro-organismos através dos efeitos dos íons H⁺ na permeabilidade celular e na atividade enzimática, assim como, indiretamente, pela influência na disponibilidade de macro e micronutrientes e na solubilidade de diversos metais pesados, que podem ser tóxicos aos micro-organismos (JACQUES et. al., 2007).

Bactérias e actinomicetos se desenvolvem melhor em valores de pH na região alcalina e neutra, ao contrário deles, os fungos são predominantes em solos ácidos em que sofrem menor competição. Os fungos podem ser encontrados em solos com pH de 3,0 a 9,0, porém o valor ótimo varia para cada espécie (CARDOSO et al., 1992).

Sendo assim, observa-se que os sistemas se mantiveram em uma faixa de pH adequada para o desenvolvimento dos micro-organismos já existentes no solo e daqueles que foram adicionados através da bioaumentação. Verificam-se dois picos de aumento de pH durante o experimento e segundo Rhaman et al. (2003), um aumento no valor de pH sugere a formação de sub-produtos durante a degradação dos hidrocarbonetos. Ligeiramente, ocorreram também reduções dos valores no período de testes, que pode ter sido devido ao aumento da concentração de ácidos graxos durante a metabolização do contaminante, como foi verificado pelo autor, para óleo diesel (BOOPATHY, 2003).

Contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos viáveis e bolores e leveduras

Na Tabela 1, observa-se a contagem dos micro-organismos presentes em ambos os sistemas de tratamento.

Tabela 1: Contagem dos micro-organismos presentes.

Tempo (dias)	Mesófilos Viáveis		Bolores e leveduras	
	Sist. 01	Sist. 02	Sist. 01	Sist. 02
0	$3,5 \times 10^8$		$1,2 \times 10^4$	
30	$2,2 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$1,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$
60	$1,6 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	$9,5 \times 10^4$	$3,2 \times 10^3$

As Figuras 6 e 7 apresentam o desenvolvimento microbiano durante a realização do estudo.

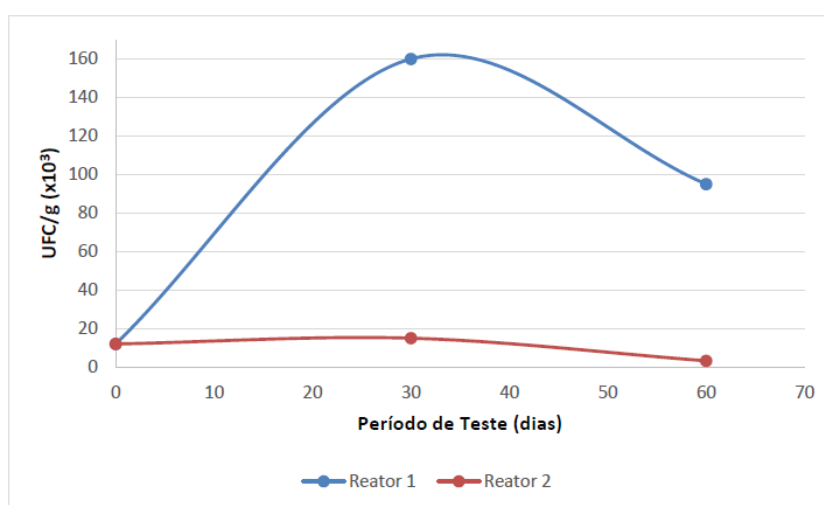


Figura 6: Contagem de fungos nos Reatores 1 e 2.

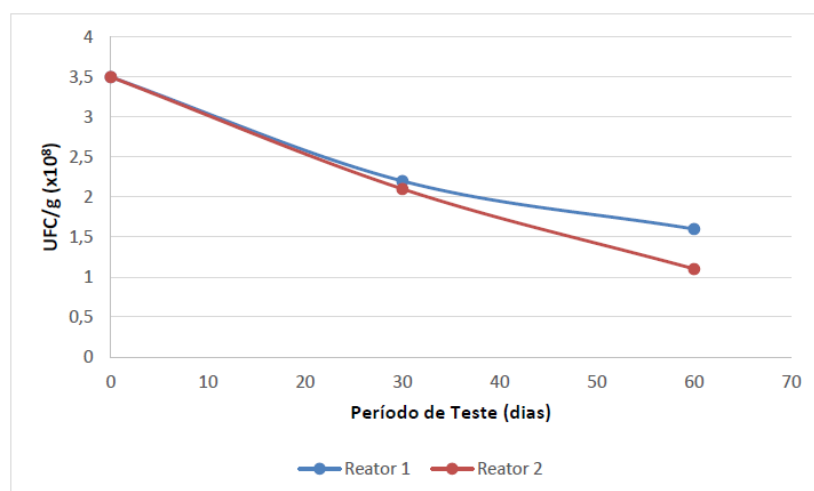


Figura 7: Contagem de bactérias nos Reatores 1 e 2.

Como pode ser observado, a população de bactérias se apresentou maior do que a de fungos em ambos os sistemas, haja visto que as bactérias se encontram normalmente em um maior número que os fungos no solo, pelo fato de se desenvolverem com mais facilidade e rapidez. De todos os micro-organismos, as bactérias formam o grupo com maior diversidade de funcionamento do organismo, garantindo assim maior adaptabilidade no meio onde se encontram (SIQUEIRA et. al., 1994). Além do mais, solos com temperatura

acima de 20° C, como é característico em locais de clima tropical e subtropical, são locais propícios para a proliferação de bactérias, havendo menos fungos e actinomicetos (PRIMAVESI, 1981).

Porém, observa-se que a população de fungos do Reator 1, no qual os mesmos foram inoculados, cresceu de forma significativa nos primeiros 30 dias de testes, provavelmente devido à adição de uma solução de nutrientes a esse sistema durante sua operação, com a finalidade de corrigir umidade e estimular o crescimento dessa microbiota. No Reator 2 não houve adição de nutrientes ou a inoculação de micro-organismos, sendo a umidade do sistema controlada somente através da adição de água deionizada.

O meio de nutrientes adicionado ao Reator 1 possuía a seguinte constituição: g.L-1: MgSO₄·7H₂O: 0,2; CaCl₂·2H₂O: 0,02; KH₂PO₄: 1,0; NH₄PO₄: 1,0; NH₄NO₃: 1,0; FeCl₃:0,05. A adição dessa solução propiciou um maior desenvolvimento das colônias de fungos. Porém, observa-se que o aumento de seu número não se refletiu no aumento significativo da taxa de degradação dos contaminantes, pois de acordo com Putzke (2002) a preferência dos fungos na utilização como nutrientes são moléculas simples, sendo, então, reprimida a síntese de enzimas para moléculas mais complexas. A glicose é preferida pelo fungo, portanto, se ela estiver presente no meio, não serão formadas as enzimas para degradar substratos complexos, como amido e celulose, nem enzimas para degradar dissacarídeos, como galactose, maltose e sacarose.

Ainda que este fato tenha ocorrido, é possível afirmar que a inoculação microbiana do Reator 1 foi eficiente, uma vez que a população desses organismos chegou em 1,6x10⁵ UFC/g de solo, enquanto que a população de fungos no Reator 2, neste mesmo período, foi de 1,5x10⁴ UFC/g solo. Acredita-se que o desenvolvimento de fungos do segundo reator ocorreu pela assimilação dos compostos contaminantes, já que a microbiota ali presente estava aclimatada ao meio, por se tratar de uma contaminação antiga e utilizava as moléculas tóxicas como forma de substrato para suas atividades metabólicas.

No Reator 1, ao qual foram adicionados fungos isolados de outros sistemas de biorremediação, os micro-organismos podem não ter se adaptado ao meio em que foram introduzidos e seu crescimento só ocorreu, pois foi estimulado com nutrientes. Neste caso, os micro-organismos não utilizaram unicamente os contaminantes para sua sobrevivência.

Ao final do experimento, as populações de fungos, em ambos os sistemas, passaram por um processo de declínio de sua população que pode estar associado à redução da concentração de substratos e à diminuição dos nutrientes adicionados.

As bactérias estiveram em declínio desde o início do tratamento de remediação. Possivelmente esses micro-organismos foram os reais degradadores dos contaminantes, visto que a diminuição da população está intimamente ligada à diminuição das concentrações dos contaminantes.

Aos 60 dias de teste, observa-se pouca diferença na população de bactérias do Reator 1 e 2. Mais adiante, serão apresentados os resultados da degradação dos compostos tóxicos e a degradação ocorrida no Reator 2 é mais acentuada. Como nesse reator não houve inoculação de outra microbiota, afirma-se que as bactérias, assim como os fungos, não sofreram interferência em seu processo de crescimento e desenvolvimento.

Degradação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nos reatores 1 e 2

Os resultados da degradação dos HPA estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Degradação de HPA nos Reatores 1 e 2.

Parâmetro	Reator	Tempo de amostragem				Limite Máximo Permitido CONAMA 420/09 (µg/kg)
		0	20	40	60	
Naftaleno	R1	337	<5,0	<5,0	<5,0	120
	R2					
Acenaftileno	R1	64	<5,0	<5,0	<5,0	-
	R2					
Acenafteno	R1	40	<5,0	<5,0	<5,0	-
	R2					
Fluoreno	R1	30	<5,0	<5,0	<5,0	-
	R2					
Fenantreno	R1	327	<5,0	<5,0	<5,0	3300
	R2					
Antraceno	R1	200	<5,0	<5,0	<5,0	39
	R2					
Fluoranteno	R1	62	<5,0	<5,0	<5,0	-
	R2					
Pireno	R1	83	<5,0	<5,0	<5,0	-
	R2					
Benzo(a)antraceno	R1	37	<5,0	<5,0	<5,0	25
	R2					
Criseno	R1	22	<5,0	<5,0	<5,0	8100
	R2					
Benzo(a)fluoranteno	R1	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0	-
	R2					
Benzo(k)fluoranteno	R1	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0	380
	R2					
Benzo(a)pireno	R1	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0	52
	R2					
Indeno[1,2,3-cd]pireno	R1	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0	31
	R2					
Dibenzo[a,h]antraceno	R1	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0	80
	R2					
Benzo[g,h,i]perileno	R1	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0	570
	R2					

*Unidade de concentração do contaminante em µg/kg

São 16 os HPA's considerados prioritários pela agência americana de meio ambiente (EPA) em função de sua importância industrial, ambiental e toxicológica. Na Tabela 2 pode ser observado que todos os HPA tiveram suas concentrações reduzidas para um valor abaixo do mínimo detectável pelo método utilizado após 20 dias de teste.

No início do processo de tratamento as concentrações de alguns dos contaminantes eram inferiores ao valor detectado pelo método. Outros HPAs já mostravam concentrações menores que o limite de detecção do equipamento. Este comportamento observado para a concentração de HPAs se justificaria pelo fato de que o solo contaminado utilizado para o presente estudo, se tratando de uma contaminação mais antiga, onde já pode ter ocorrido a degradação ou mesmo a volatilização da maior parte desses contaminantes, permanecendo somente as cadeias carbônicas longas, complexas e parcialmente degradadas através de processos físico-químicos no solo ou fatores biológicos.

Na Figura 8 pode ser observado que a concentração total dos HPA era de 1202 µg/kg no início dos ensaios e após 20 dias de teste a concentração já tinha sido totalmente reduzida podendo ser associada à eficiência microbiológica de ambos os sistemas na degradação desse tipo de composto. Na Tabela 2, acima, observa-se que diversos compostos possuíam concentrações acima do permitido pela legislação vigente.

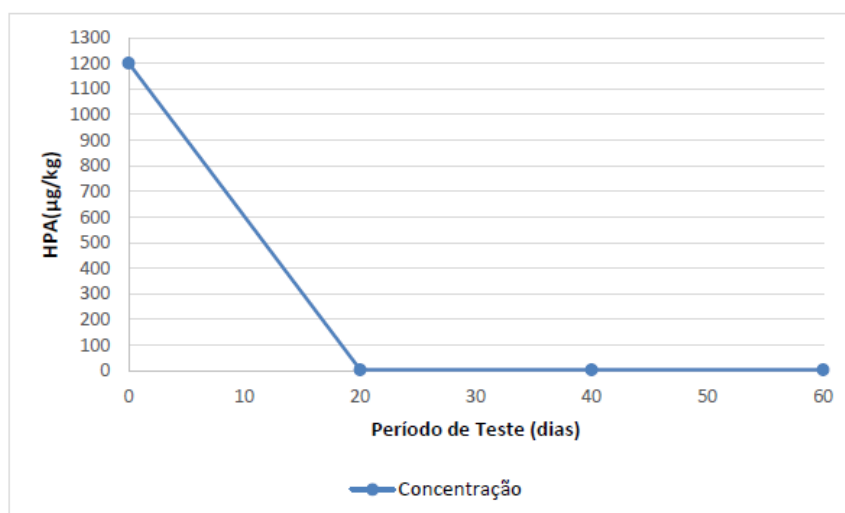


Figura 8: Concentração de HPA ao longo do tempo.

Degradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo nos Reatores 1 e 2

Os resultados da degradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo estão na Tabela 3 e podem ser analisados na Figura 9.

Tabela 3: Resultados da concentração de HTP no solo ao longo do tempo.

Tempo Operação	TPH (mg/kg)	
	Reator 1	Reator 2
0	921	921
20	672	425
40	113	107
60	97	60

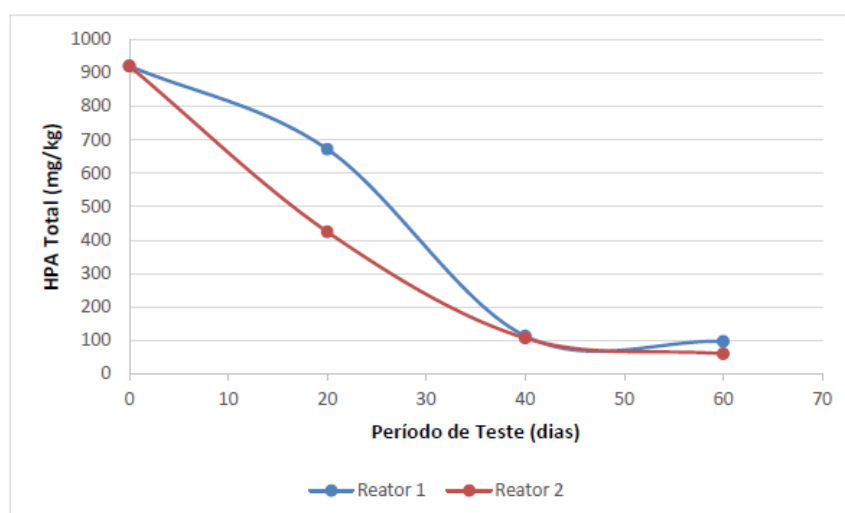


Figura 9: Degradação dos HTP nos Reatores 1 e 2.

A partir dos resultados obtidos, observa-se que houve degradação em ambos os reatores, porém o Reator 2 apresentou uma cinética mais rápida na degradação dos Hidrocarbonetos Totais de Petróleo.

Os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) correspondem ao somatório das frações dos hidrocarbonetos resolvidos de petróleo (HRP) e da mistura complexa não resolvida (MCNR).

Conforme Mariano (2008), a maior fração do óleo diesel não é caracterizada, porque a maioria dos componentes não pode ser resolvida e eles aparecem nos cromatogramas como “picos”, que é chamada de “*unresolved complex mixture* (UCM) ou Mistura Complexa não Resolvida (MCNR)”, a qual presumidamente inclui alcanos cíclicos e ramificados e produtos de transformações polares. Os hidrocarbonetos resolvidos de petróleo são chamados de (TRH) sigla que advém de “*total resolvable hydrocarbons*”. Os HRP são hidrocarbonetos não degradados, e eles aparecem como picos nos cromatogramas.

Observa-se que aos 20 dias de teste, o Reator 1 já havia removido 27% da concentração dos contaminantes e o Reator 2, 54%. Já aos 40 dias, observa-se uma eficiência maior, pois o Reator 1 foi capaz de degradar 87,73% enquanto que o Reator 2, 89% da contaminação. Ao final do experimento, os Reatores 1 e 2 degradaram, respectivamente 89,5% e 93,5% dos TPH presentes no solo contaminado.

Os fungos do Reator 1, por terem sido inoculados no início do processo de remediação, poderiam não estar adaptados ao meio em que foram introduzidos. Portanto, não puderam ser tão eficientes na degradação dos TPH. Baheri & Meysani (2002), estudaram o bioaumento com fungos e observaram que a técnica não teve um efeito significativo na biorremediação do solo. Isso foi devido, à presença de linhagens naturais do fungo no solo. O autor afirma ainda, que os micro-organismos podem não degradar o contaminante numa exposição inicial, mas fazê-lo após uma exposição duradoura.

Já o Reator 2 possuía micro-organismos adaptados a utilização de hidrocarbonetos como substrato, e que, devido a ação de suas enzimas, pode ter ajudado a romper as moléculas de pesos maiores, levando com isso a uma maior redução na concentração dos HTP. Observa-se uma relação direta entre a diminuição no número de bactérias com a redução da concentração dos contaminantes, visto que este último possivelmente foi viabilizado pelas mesmas.

As bactérias degradaram grande parte dos contaminantes, porém no Reator 1, não foi possível comprovar uma relação entre o aumento do número de fungos e a diminuição da concentração dos contaminantes no solo utilizado. Os sistemas operaram a 30°C, fato esse que facilitou a biodisponibilidade dos contaminantes, já que a essa temperatura, a viscosidade dos mesmos diminuiu, deixando-os mais suscetíveis a serem utilizados pelos micro-organismos presentes, além disso, salienta-se que a temperatura é favorável, conforme bibliografia consultada, para as atividades metabólicas de bactérias e fungos. Não se descarta também, a redução da concentração dos contaminantes, principalmente os de menor peso molecular, por volatilização.

Degradação dos hidrocarbonetos resolvidos de petróleo nos Reatores 1 e 2

Os resultados da degradação dos hidrocarbonetos resolvidos de petróleo estão tabelados e podem ser analisados na Tabela 4 e na Figura 10.

Tabela 4: Resultados da concentração de HRP solo ao longo do tempo.

Tempo Operação	HRP (mg/kg)	
	Reator 1	Reator 2
0	345	345
20	114	64
40	14	11
60	9	10

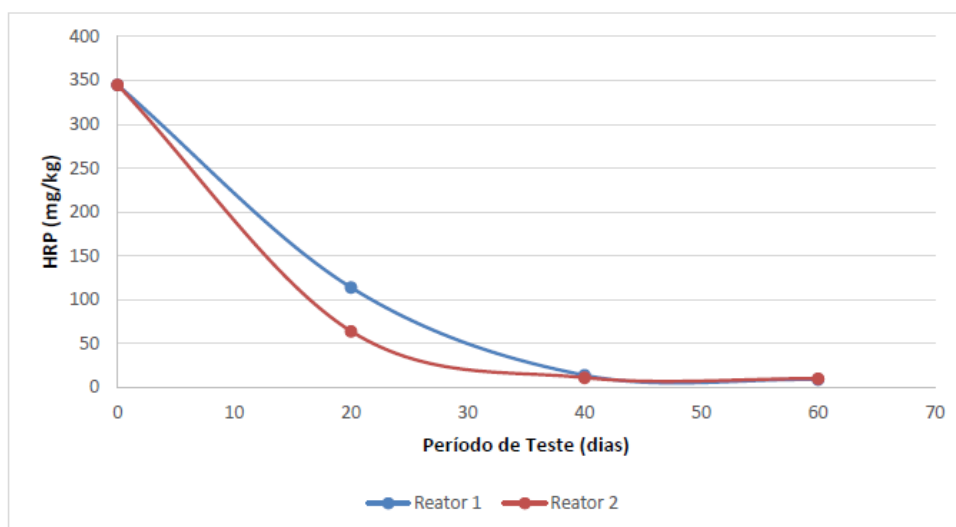


Figura 10: Degradação de HRP nos Reatores 1 e 2.

Os hidrocarbonetos resolvidos de petróleo (HRP) foram degradados com grande eficiência pelos micro-organismos, visto que aos 20 dias houve diminuição da contaminação de 66,95% no Reator 1 e de 81,45% no Reator 2. Ao final, 97,40% dos contaminantes foram degradados pelo Reator 1 e 97,10% pelo Reator 2.

Mais uma vez foi comprovado que a adição de fungos ao sistema não apresentou vantagens, uma vez que a redução do HRP mostrou uma taxa de degradação mais rápida no Reator 2 nos primeiros 20 dias de testes. Assim no Reator 2, a taxa de degradação dos HRP foi de 14,05 mg/kg.d, enquanto que no Reator 1 foi de 11,55 mg/kg.d.

Degradação da mistura complexa não resolvida nos Reatores 1 e 2

Os resultados da degradação dos hidrocarbonetos resolvidos de petróleo podem ser analisados na Tabela 5 e Figura 11.

Tabela 5: Resultados da concentração de MCNR no solo ao longo do tempo.

Tempo Operação	MCNR (mg/kg)	
	Reator 1	Reator 2
0	577	577
20	558	361
40	99	96
60	88	50

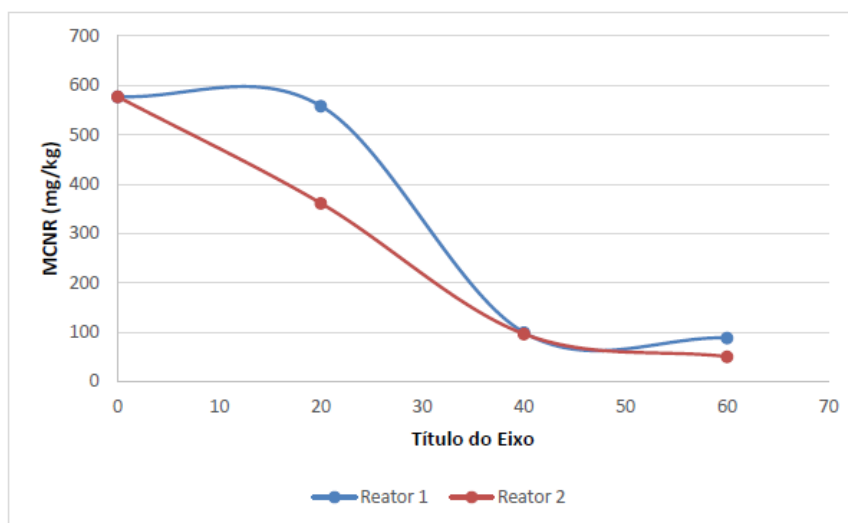


Figura 11: Degradação de MCNR nos Reatores 1 e 2.

A maior fração do óleo diesel não é caracterizada, porque a maioria dos componentes não pode ser resolvida e estes aparecem nos cromatogramas como uma “lombada = *hump*”, que é chamada a “mistura complexa não resolvida (MCNR)”, que presumivelmente inclui alcanos ramificados e cíclicos e subprodutos das transformações dos hidrocarbonetos (MARCHAL et al. 2003; BREGNARD et al. 1996).

Quanto aos MCNR, observa-se que aos 20 dias, a degradação no Reator 1 era baixa, ficando em torno de 3,29%. Já no segundo reator, foi possível observar uma redução de 37,43% dos contaminantes presentes no mesmo período. Ao final do experimento, o Reator 1 apresentou redução de 84,75% e o 2 de 91,33%.

A pouca degradação verificada aos 20 dias, pode ser relacionada à preferência dos micro-organismos para degradarem primeiro os HRP. Somente após esse período começou a ser observada degradação da MCNR. Gough & Rowland (1990) realizaram estudos e mostraram que, devido as suas estruturas, os compostos não resolvidos da MCNR são resistentes à degradação, gerando o acúmulo destes compostos no ambiente. Ainda, durante os primeiros dias havia um excesso de nutrientes no Reator 1. Esses dois fatores podem ter interferido na degradação da MCNR. Com o excesso de nutrientes, os micro-organismos podem ter preferido se alimentar da solução nutritiva utilizada, deixando de lado a MCNR. Já no Reator 2 não havia esse excesso de nutrientes, o que fez com que os micro-organismos buscassem na MCNR os substratos que eles precisavam para seu desenvolvimento.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos durante os ensaios de biorremediação em um solo contaminado com hidrocarbonetos derivados de petróleo, pôde-se concluir que a utilização da temperatura constante em $30^{\circ}\text{C} \pm 2$ mostrou-se favorável a ação microbiológica no solo sobre os hidrocarbonetos, promovendo a eficiência na remoção dos contaminantes, deixando-os mais biodisponíveis, e estimulando o crescimento da microbiota presente nesse tipo de solo, a qual possui características mesófilas (25°C - 35°C).

A adição de nutrientes no Reator 1 durante o período de operação não foi satisfatória quando leva-se em consideração a eficiência para remoção dos contaminantes presentes, visto que os fungos que foram adicionados ao sistema se desenvolveram, mas não utilizaram os hidrocarbonetos presentes no meio em que foram inseridos. Este comportamento poderia ser associado ao fato dos mesmos receberem substrato (nutrientes) de mais fácil assimilação. A adição de esterco de aviário no início do processo mostrou-se adequada ao sistema, pois os solos necessitam de fertilizantes como nitrogênio e fósforo para promover uma adequada degradação de hidrocarbonetos de petróleo.

Conclui-se também que houve boa eficiência na remoção de todos os compostos tóxicos presentes no solo, porém os resultados podem ser atribuídos em sua grande parte pela ação dos micro-organismos já presentes,

principalmente as bactérias. A adição dos fungos *Aspergillus fumigatus* e *Cephalosporium* sp. não se mostrou uma boa alternativa, haja visto que no sistema ao qual os mesmos foram incorporados a degradação dos compostos foi realizada a taxas reduzidas ao final do período de testes. Isso se deve possivelmente pelos fungos adicionados não terem se adaptado adequadamente ao meio e terem sobrevivido por utilizarem os nutrientes acrescentados no Reator 1 durante o período de operação, não fazendo uso do contaminante como substrato.

O Reator 2 foi mais eficiente na remoção de praticamente todos os compostos, principalmente a partir dos 20 dias de teste quando comparado ao Reator 1, pois o mesmo degradou, aos 60 dias, 93,5% dos HTP contra 89,5% do primeiro reator.

Quanto aos HRP houve degradação de 97,40% dos contaminantes pelo Reator 1 e 97,10% pelo Reator 2, finalizando o processo ambos com praticamente a mesma eficiência.

A MCNR ao final o experimento teve 84,75% de sua contaminação removida no Reator 1 e 91,33% no Reator 2.

Por fim, é possível concluir que a utilização da bioestimulação como forma de tratamento de um solo contaminado com hidrocarbonetos é uma alternativa tecnicamente viável, porém, deve se ter um controle constante na adição de nutrientes ao sistema para que eles não prejudiquem a remediação e cumpram eficientemente sua função de estimular a biodegradação oferecendo bom resultados ao tratamento. Além disso, também é preciso ter cautela na bioaumentação, pois os micro-organismos adicionados devem estar bem adaptados ao meio em que forem inseridos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVAREZ, PEDRO J.J.; ILLMAN, WALTER A. **Bioremediation and natural attenuation: process fundamentals and mathematical models**. New Jersey: Wiley-Interscience, 609 p., 2006.
2. BAHARI, H.; MEYSAMI, P. **Feasibility of fungi bioaugmentation in composting a flare pit soil**. *Journal of hazardous materials*, B89: 279 –286. 2002
3. BERNOTH, L.; FIRTH, I.; MCALLISTER, P. & RHODES, S. **Biotechnologies for remediation and pollution control in the mining industry**. *Miner. Metall. Proc.*, 17:105-111, 2000.
4. BOOPATHY, R. **Use of anaerobic soil slurry reactors for the removal of petroleum hydrocarbons in soil**. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52: 161 – 166, 2003.
5. BREGNARD, T. P. A.; HÖHENER, P.; HÄNER, A.; ZEYER, J. **Degradation of weathered diesel fuel by microorganisms from a contaminated aquifer in aerobic and anaerobic microcosms**. *Environmental Toxicology Chemical.*, v.15, n. 3, p. 299-307, 1996.
6. CARDOSO, E. J. B. N. et al. **Microbiologia do solo**. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992.
7. DAVIS, K.L., REED, G.D., WALTER, L. **A Comparative Cost for Petroleum Remediation Technologies**. In: Hinchey et al. (eds.), *Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon*, Battelle Press, Columbus, Ohio, 1995.
8. KHAN, F.I.; HUSIAN, T.; RAMZI, H. **An overview and analysis of site remediation technologies**. *Journal of Environmental Management*, 71:95-122. 2004.
9. GOUGH, M. A.; ROWLAND, S.J. **Characterization of unresolved complex mixtures of hydrocarbons in petroleum**. *Nature*, v.334, p.648-650, 1990.
10. JACKSON, A. W.; PARDUE, J. H.; ARAUJO, R. **Monitoring crude oil mineralization in salt marshes: use of stable carbon isotope ratios**. *Environ. Sci. Technol.* 30, 1139-1144 p., 1996.
11. JACQUES, R. J. S.; OKEKE, B.C.; BENTO, F.M.; PERALBA, M. C. R.; CAMARGO, F. A. O. **Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial consortium from a petrochemical sludge landfarming site**. *Bioremediation Journal*, v.11, n.1, p.1-11, 2007.
12. MARCHAL, R.; PENET, S.; SOLANO-SERENA, F.; VANDECASTEELE, J. P. **Gasoline and diesel oil biodegradation**. *Oil & Gas Science Technology*– v.58, p.441-448, 2003.
13. MENEGHETTI, LILIANE REBECHI PINHEIRO. **Biorremediação na descontaminação de um solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel**. Programa de pós-graduação em engenharia. Universidade de Passo Fundo. 112 pag., Passo Fundo, 2007.

14. PRIMAVESI, A. **O Manejo ecológico do solo: agricultura em regiões tropicais**. São Paulo: Nobel, 3^a ed, 1981.
15. PUTZKE, J. e PUTZKE, M. T L. **Os Reinos dos Fungos**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 214 p. v.2. 2002
16. RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; KOURKOUTAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. **Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients**. Bioresource Technol., v.90, p.159-168, 2003.
17. RISER-ROBERTS, E. **Remediation of petroleum contaminated soil: Biological, Physical and Chemical processes**. Lewis Publishers, Boca Raton. 542p. 1998.
18. SEABRA, PAULO NEGRAIS CARNEIRO. **Aplicação de biopilha na biorremediação de solos argilosos contaminados com petróleo**. Programa de Pós-Graduação de Engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2005.
19. SIQUEIRA, J. O. et al. **Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental**. EMBRAPA, SPI, Brasília, DF, 1994.