



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

**ESTABILIZAÇÃO DE "LANDFARMING" DE REFINARIA DE
PETRÓLEO, MEDIANTE METABOLISMO MICROBIANO, E
APLICABILIDADE EM SOLOS PRÉ-DESERTIFICADOS**

FABIANA APARECIDA HENCKLEIN

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista
"Julio de Mesquita Filho",
Campus de Rio Claro, para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas
(Microbiologia Aplicada).

Janeiro - 2008

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**ESTABILIZAÇÃO DE “LANDFARMING” DE REFINARIA DE
PETRÓLEO, MEDIANTE METABOLISMO MICROBIANO, E
APLICABILIDADE EM SOLOS PRÉ-DESERTIFICADOS**

FABIANA APARECIDA HENCKLEIN

Orientadora: Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis

**Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista
“Julio de Mesquita Filho”,
Campus de Rio Claro, para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas
(Microbiologia Aplicada).**

***Rio Claro*
Estado de São Paulo -Brasil
Janeiro de 2008**

620.1122 Hencklein, Fabiana Aparecida

H494e Estabilização de \”landfarming\” de refinaria de
petróleo, mediante metabolismo microbiano, e
aplicabilidade em solos pré-desertificados. – Rio Claro :
[s.n.], 2008
97 f. : il., tabs, gráfs., fots., mapas

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Dejanira de Franceschi de Angelis

1. Biodegradação. 2. Respirometria. 3. Agente
descompactante. 4. Vinhaça. 5. Casca de arroz. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI – Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

*À todos que acreditam e lutam por um mundo
mais justo e limpo, dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida;

Agradeço a meus pais (Benedito Hencklein e Maria Judith P. S. Hencklein) por sempre acreditarem em mim;

Agradeço a Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis pelos ensinamentos e por ser, para sempre, minha mãe científica;

Agradeço a meus irmãos (Nádia e Marcelo) pelas conversas sempre construtivas;

Agradeço a meus amigos de graduação que ainda permanecem em Rio Claro e também àqueles que estão longe, mas sempre presentes em minha vida. Vocês sempre farão diferença;

Agradeço aos amigos de pós-graduação pelos almoços, jantares, baladas e também conselhos;

Agradeço aos amigos, técnicos e professores do Departamento de Bioquímica e Microbiologia da Unesp, campus de Rio Claro. Esse trabalho sempre teve o apoio de vocês;

Agradeço ao pessoal do Grupo de Educação Ambiental “Preserve o Planeta Terra: Reciclando” por toda a experiência que vivemos;

Agradeço aos professores e alunos do Cursinho Praxis os quais me fizeram enxergar o quanto gosto de lecionar;

Agradeço aos amigos do Coral “Uirapuru”, pelos bons momentos de aprendizado;

Agradeço aos demais amigos de outros departamentos, institutos, centros de pesquisa e universidades que sempre prestaram apoio a meu enriquecimento científico;

Agradeço ao Prof. Roberto Naves Domingos pelo apoio e conselhos;

Agradeço ao Prof. Newton La Scala Jr. por ceder o aparelho analisador de CO₂;

Agradeço a meu namorado, que sempre buscou me auxiliar e me fez acreditar cada vez mais na pesquisa científica. “*Enquanto eu respirar...*”;

Agradeço ao Programa de Recursos Humanos (PRH-05) da Agência Nacional de Petróleo pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivos Gerais	3
2.2. Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. Solos – Sistema de tratamento de resíduos	4
3.2. Biodegradação	8
3.2.1. Agentes Descompactantes	18
3.2.2. Vinhaça	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Material	23
4.1.1 Solos	23
4.1.2 Matérias Descompactantes	24
4.1.3 Aditivo orgânico	25
4.1.4 Respirômetros de Bartha & Pramer	25
4.1.5 Equipamentos, vidraria, reagentes, meios de cultura e aparelho de absorção óptica no infravermelho	26
4.2 Métodos	27
4.2.1 Método de coleta do solo de cerrado e do “landfarming” e vinhaça	27
4.2.2 Preservação dos solos	27
4.2.3 Caracterização físico-química dos solos e vinhaça	27
4.2.3.1 Solos	28
4.2.3.2 Vinhaça	28
4.2.4 Preparo dos solos	28
4.2.4.1 Capacidade de Campo (adaptada de ANDERSON e INGRAM, 1996) e Umidade Relativa	28
4.2.4.2 Adição dos Agentes Descompactantes	29
4.2.5 Ensaio respirométrico	30
4.2.5.1 Experimento de Respirometria	30
4.2.5.2 Cálculos	32
4.2.5.3 Quantificação do número de bactérias e fungos dos tratamentos do ensaio respirométrico	33
4.2.6 Ensaio de avaliação do CO ₂ produzido utilizando espectroscopia de absorção óptica no infravermelho	33
4.2.6.1 Montagem dos Reatores	34
4.2.6.2 Leituras da produção de CO ₂	36
4.2.6.3 - Avaliação de Temperatura	37
4.2.6.4 – Avaliação de pH	37
4.2.6.5 - Avaliação do crescimento de bactérias e fungos presentes nos tratamentos	37
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO	38
5.1. Caracterização dos solos e da vinhaça	38
5.2. Ensaio Respirométricos	41

5.2.1. Quantidade de CO ₂ produzido por dia de tratamento	41
5.2.2. Carbono Biodegradado acumulado.....	44
5.2.3. Eficiência de Biodegradação.....	47
5.2.4. Avaliação do crescimento de bactérias e fungos	49
5.3. Utilização de espectroscopia de absorção ótica no infravermelho	54
5.3.1. Quantificação do CO ₂ liberado e acumulado	54
5.3.2. Avaliação dos microrganismos presentes nos solos estudados neste ensaio.	59
5.3.3. Avaliação da Umidade inicial e final.....	62
5.3.4. Avaliação dos valores de pH inicial e final	64
5.3.5. Avaliação dos valores Máximos e Mínimos de Temperatura	66
6. CONCLUSÕES	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXO I	82
Ensaio respirométricos	82
ANEXO II	86
Ensaio utilizando espectroscopia de absorção ótica no infravermelho.....	86

RESUMO

O aumento da população humana tem acrescentado ao meio ambiente grande quantidade e diversidade de compostos. Isto acopla-se ao desenvolvimento das atividades industriais acrescentando novas técnicas que geram novos resíduos. Essas substâncias podem ou não ser degradadas dentro dos processos edáficos. Os microrganismos têm sido por muito tempo os agentes controladores dos resíduos produzidos em nosso planeta, porém, os seres humanos ultrapassaram a capacidade de suporte do ecossistema. Sendo assim, a microbiota necessita de auxílio na biodegradação dos xenobióticos, estes têm sido adicionados aos solos. “Landfarming” consiste na aplicação do contaminante na camada arável do solo, onde esse resíduo é misturado mecanicamente por aração e gradeamento. Nestes sítios as condições físico-químicas são ajustadas para maximizar a atividade microbiana. Este trabalho buscou verificar mediante estudos de respirometria, a biodegradação da matéria orgânica presente no solo de “landfarming” de refinaria de petróleo. Os resultados apontam que a evolução de CO_2 ocorre neste solo e que sua eficiência de biodegradação aumenta (13,9%) quando se adiciona casca de grão de arroz em associação com vinhaça, resíduo proveniente das destilarias de etanol. Também detectou-se que a mistura de solo de cerrado, contendo baixa quantidade de matéria orgânica, pode estimular o aumento na liberação de CO_2 (15,8%). Contudo, quando a essa mistura acrescenta-se casca de grão de arroz e vinhaça, o aumento da evolução de CO_2 é mais pronunciado (78%). A atividade das bactérias e fungos também foi avaliada, mediante contagem das UFC/g/ss, e observou-se aumento de até 300 vezes no número de colônias nos tratamentos em que foram adicionados casca de arroz e vinhaça. Sendo assim, conclui-se que o solo de “landfarming” pode ainda ser estimulado a aumentar a biodegradação das substâncias recalcitrantes se a ele for acrescentado produtos que auxiliem a aeração e forneçam nutrientes, tais como a associação de casca de grão de arroz e vinhaça, agentes utilizados neste trabalho.

ABSTRACT

The increase of human population added great amount and diversity of composts into the environment. This occurs because of the industrial activities development that adds new technologies, generating new wastes. These substances can or not be degraded by soil processes. The microorganisms have been for much time the controlling agents of residues produced in our planet. However, the human being had exceeded the ecosystem support capacity. So, microbial community needs help in biodegradation of xenobiotics added to soil. "Landfarming" consists in contaminants application at the arable layer of soil, where these wastes are mechanically mixed by tillage and the physico-chemical conditions are adjusted to maximize the microbial activity. This work verified, using respirometric methods, the biodegradation of organic matter present in "landfarming" soil of an oil refinery. The results showed that CO₂ evolution occurs in this soil, and that its biodegradation efficiency increases (13,9%) when added rice grain husk in association with vinasse, an alcohol production waste. We also detected that the mixture with brazilians savanna soil, that has low organic matter amount, can stimulate the increase in CO₂ release. However, when vinasse and rice grain husk are added to this mixture, CO₂ evolution rises up (78%). The activity of the bacteria and fungus was also evaluated by means of UFC/g/ss counting. An increase of 300 times of colonies number was observed at the treatments where rice husk and vinasse had been added. Therefore we conclude that the "landfarming" soil still can be stimulated to increase the recalcitrant substances biodegradation, if these products that assist the aeration and supply nutrients are added, as the association of rice grain husk and vinasse used at this work.

1. INTRODUÇÃO

O solo pode ser visto de diversas formas, uma como um importante biotransformador. Essa função foi construída ao longo de muitos anos de evolução dos processos químicos, físicos e biológicos, sendo assim, os solos são formados pela decomposição de rochas e também de animais e plantas, que são incorporados a esse sistema. Nos solos tropicais, mesmo os solos sob vegetação natural possuem baixas reservas de matéria orgânica, pois essas são transformadas rapidamente, devido às altas temperaturas, que são ótimas para a atividade das comunidades microbianas.

O aumento da população humana tem acrescentado grandes quantidades e diversidade de compostos, pois o desenvolvimento das atividades industriais envolve o estabelecimento de novas técnicas, que geram novos resíduos (xenobióticos). Essas substâncias podem ou não ser degradadas dentro dos processos edáficos. Os microrganismos têm sido por muito tempo os agentes controladores dos resíduos produzidos em nosso planeta, porém os seres humanos ultrapassaram a capacidade de suporte do ecossistema.

A atividade microbiana cumpre um importante papel na biodegradação de novos compostos, pois suas respostas fisiológicas podem se adaptar as

mudanças ambientais, que são provocadas pelo número crescente de novos materiais adicionados pelo homem. Deve-se tomar cuidado com as formas e locais de disposição dos resíduos, pois se seu manejo não for bem previsto, eles podem causar sérios problemas ao solo, além das ameaças à qualidade das águas superficiais e subterrâneas, além de ameaçar os próprios solos.

A decomposição de compostos xenobióticos ocorre sem e com a participação dos microrganismos. A biodegradação (degradação devida a microbiota) pode diminuir o tempo de transformação desses compostos e também sua toxicidade, pois a ação catalizadora de suas enzimas diminui a energia necessária para a degradação dos xenobióticos. O uso de processos biológicos para a biodegradação de compostos persistentes, inclui a possível mineralização do contaminante a produtos inócuos ao meio ambiente, como gás carbônico e água.

A biodegradação de resíduos de hidrocarbonetos provenientes das indústrias de refino envolve a atividade de monoxigenases e a clivagem por beta-oxidação, processos dependentes de oxigênio. Sendo assim, embora exista uma grande variedade de microrganismos capazes de oxidar esses compostos, a biotransformação de hidrocarbonetos ocorre, principalmente, por via aeróbia e, o oxigênio pode ser a substância limitante em muitos casos.

Vários fatores podem afetar a biodegradação em solos contaminados com hidrocarbonetos, entre eles, a aeração, a umidade, a temperatura, a textura dos solos, a toxicidade do contaminante e a disponibilidade de nutrientes. A maioria deles é dependente das condições ambientais, porém muito se tem feito para adequar os locais, a fim de otimizar a biodegradação e, uma das maneiras, mais efetivas e menos custosas, é o acréscimo de compostos que aumentam a aeração nos solos e também provêm nutrientes, acréscimo de biomassa e, possibilitam maior estabilidade na umidade. Estes compostos são chamados agentes descompactantes, que podem ser acrescentados aos solos, somente como aeradores, mas também podem possibilitar maior sorção dos contaminantes e, quando tem composição orgânica, ser fonte de nutrientes e biomassa, desta forma, aumentando a biodegradação.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Avaliar a biodegradação da matéria orgânica de refinaria de petróleo presente no solo de seu tratamento denominado “landfarming”, mediante os métodos respirométricos de Bartha e Pramer e absorção óptica no infravermelho.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a biodegradação da matéria orgânica presente no solo de “landfarming”, mediante a evolução de CO₂ em função da compactação e presença de vinhaça;
- Investigar a possibilidade de co-disposição de solos de “landfarming” com solo em etapa de pré-desertificação;
- Auxiliar a biodegradação nos processos de recuperação da borra no “landfarming” de refinaria.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Solos – Sistema de tratamento de resíduos

O solo é um grande e complexo sistema de biodegradação construído ao longo de anos, formado pela decomposição de rochas e também de animais e plantas, que são incorporados a esse sistema (PRIMAVESI, 1985).

Moreira e Siqueira (2006) comentam que a presença de uma população microbiana em um ambiente é em função de sua carga genética, que determina suas respostas fisiológicas às condições ambientais predominantes. Além disso, os microrganismos são bastante versáteis em sua adaptação a mudanças, tanto físicas (água, aeração, porosidade, etc.), quanto químicas (disponibilidade de nutrientes e toxicidade de alguns elementos persistentes, como xenobióticos). A quantidade de oxigênio (O₂) nos solos depende da atividade microbiana, da sua textura, quantidade de água e a profundidade que se está estudando. Profundidades acima de 30 centímetros a concentração de O₂ varia entre 15% em solos secos e 5% em solos úmidos (RHYKERD et al, 1999).

A matéria orgânica do solo é um importante determinante da sua fertilidade, produtividade e sustentabilidade e é um ótimo indicador da qualidade dos solos tropicais nos sistemas agrícolas, porém as baixas reservas de matéria orgânica presentes em solos tropicais, ainda sob vegetação natural, são rapidamente consumidas em poucos anos sob cultivos agrícolas, mesmo em pequenas propriedades (CHIVENGU, et al, 2007 e ZINGORE et al, 2005).

O fluxo de eliminação de gás carbônico (CO_2) do solo cumpre um papel importante dentro do ciclo do carbono. As medições deste fluxo são amplamente utilizadas para avaliar o desempenho deste composto. Quando esta medida é usada como uma avaliação da atividade metabólica da microbiota do solo e das raízes das plantas pode-se entender melhor as características dos controles ambientais sobre a respiração do solo em ecossistemas naturais e nos agroecossistemas (LUND, et al, 1999 e BUTNOR e JOHNSEN, 2004).

Pouco se entende sobre o comportamento da respiração dos organismos heterotróficos e autotróficos nos solos, os processos individuais que contribuem para a respiração total desse sistema e os fatores que os controlam. A respiração do solo nos ecossistemas e agrossistemas, somando-se da respiração microbiana e a decomposição química da serrapilheira e da matéria orgânica presente neste, pode fornecer 80% ou mais de todo o CO_2 do sistema. Devido às taxas de produção de CO_2 entre a interface solo-ar serem lentas, grande concentração de CO_2 acumula-se no solo, dificultando a observação de seu fluxo sem perturbá-lo (BAIN et al, 2005).

Lund et al (1999) fizeram uma revisão das técnicas utilizadas para se mensurar o CO_2 liberado pelo solo e, em sua maioria, esses estudos utilizam técnicas de câmaras estáticas, porque são relativamente econômicas e de fácil aplicação. Nestas metodologias o CO_2 difundido pelo solo é capturado em um frasco utilizando-se soluções alcalinas (KOH, NaOH, por exemplo) ou cal sodada. Embora sejam técnicas interessantes, elas podem subestimar ou superestimar a quantidade de CO_2 liberada pelo sistema. A utilização de cromatografia gasosa em câmaras estáticas parece fornecer dados mais apurados, pois minimiza as mudanças no gradiente de concentração de CO_2 .

Os autores também citam o uso de analisadores de gás por infravermelho em métodos utilizando câmaras dinâmicas e não estáticas.

O papel do solo na reciclagem de resíduos, principalmente orgânicos, tem recebido crescente atenção nos últimos anos, devido à quantidade e variedade de resíduos e dos métodos de disposição destes. As formas e locais em que os resíduos são dispostos, no entanto, apresentam sérios problemas para a qualidade das águas superficiais e subterrâneas, além de ameaçar os próprios solos, pois a taxa de biodegradação dependerá: do tipo de substrato, da relação espacial (acessíveis ou não) entre os materiais e as células e/ou enzimas e, das condições físico-químicas do micro-habitat. Além disso, nem toda substância, mesmo que orgânica, é passível de degradação por microrganismos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Métodos mais seguros para a disposição de resíduos sólidos perigosos em solos ainda necessitam ser estudados (FULLER e WARRICK, 1985).

Os microrganismos têm sido por muito tempo os agentes controladores dos resíduos produzidos em nosso planeta, porém os seres humanos ultrapassaram sua capacidade de suporte do ecossistema, acrescentando muitos e variados novos produtos e, desta forma, a microbiota necessita de ajuda (PAUL e CLARK, 1996).

Como consequência à aceleração das ameaças causadas pela poluição ao meio ambiente e o nosso incompleto conhecimento de maneiras para estabilizar a dispersão dos poluentes nos ambientes, novos tratamentos e aperfeiçoamentos tem sido pesquisados (FULLER e WARRICK, 1985).

A contaminação dos solos é um efeito típico da atividade industrial. Muitos compostos são transformados em outros materiais por vários processos metabólicos, que podem diminuir ou aumentar sua toxicidade (LANDIS e YU, 1995). A incorporação de matéria orgânica e nutrientes favorece o aumento dos microrganismos heterotróficos presentes no solo, porém à medida que o substrato é consumido ocorre declínio nas populações. Desta forma, torna-se necessário a estimulação de solos rizosféricos, pois aqueles que não o são, tornam-se desertos nutricionais (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Os resíduos carbonáceos de organismos em depósitos biogênicos mostram que a decomposição microbiana ocorre também nas grandes reservas de materiais orgânicos, como carvão e petróleo, portanto são consideradas biodegradáveis se condições ambientais apropriadas forem fornecidas (RICHARDS, 1987). Porém, os impactos à saúde humana e a do meio ambiente associado à presença de hidrocarbonetos do petróleo na subsuperfície causa preocupação (DAVIS, et al, 2003). Afinal, a grande complexidade e variedade de compostos presentes no petróleo dificultam a interpretação das taxas de biodegradação (CAPONE e BAUER, 1992).

Segundo Pelczar, et al (1996) os microrganismos estão associados com o petróleo na sua formação, pois esses estão presentes nos materiais sedimentados em ambientes marinhos e na sua recuperação final dos poços de perfuração, pois algumas bactérias produzem ácido que dissolvem a formação rochosa e, assim o óleo é liberado com maior facilidade. Além disso, os microrganismos fazem parte dos processos de decomposição do petróleo. Aproveitando-se desta propriedade muitas espécies de microrganismos são utilizadas em locais poluídos por petróleo na tentativa de degradar o óleo derramado. Porém, a capacidade de determinadas bactérias – as autótrofas – processarem ainda compostos inorgânicos pode causar sérios contratempos na recuperação do óleo, pois, se não forem controladas, podem gerar corrosão nas tubulações, além de alterar as características físicas dos fluídos.

O tratamento de resíduos em solos pode ocorrer pelas vias:

- pela suplementação de nutrientes, principalmente nitrogênio (N) e fósforo (P) para estimular o crescimento de espécies potencialmente biodegradadoras;
- pela inserção de populações de bactérias modificadas geneticamente, que são adicionadas em culturas puras. Capone e Bauer (1992) comentam que a primeira opção, que é menos complicada e controversa, tem dado resultados promissores.

3.2. Biodegradação

Skladany e Metting (1993) definem biodegradação como a atividade biológica que resulta na quebra de um composto. Moléculas complexas são biodegradadas envolvendo o efeito interativo de populações mistas de microrganismos em que os principais componentes são fungos e bactérias. A biodegradação pode ser estudada de diferentes maneiras. Uma delas é observação da degradação de um composto sob condições ambientais bem definidas, sem considerar detalhes da ação da comunidade microbiana. Outra forma é o estudo de culturas puras para identificar os caminhos catabólicos, as enzimas responsáveis e os mecanismos de controle genético.

A biodegradação é um dos principais mecanismos de transformação de xenobióticos no solo, embora sua decomposição também ocorra sem o envolvimento dos microrganismos e suas enzimas, a participação da microbiota neste processo diminui o tempo de degradação e a toxicidade desses compostos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Biodegradação é o mais efetivo e econômico meio de eliminar a capacidade que muitos materiais e compostos orgânicos têm de poluir o meio ambiente. Como uma ferramenta no controle da poluição, ainda começa-se a entender e a utilizar os processos biodegradativos eficientemente, embora estes tenham estado sempre disponíveis nos ambientes (FULLER e WARRICK, 1985). As vantagens de se utilizar a biotransformação (transformação de compostos utilizando processos biológicos) incluem a possível mineralização completa dos contaminantes a produtos inócuos (CO_2 e H_2O) e a observação que reações enzimáticas mediadas pela microbiota acontecem mais rapidamente do que aquelas em que a participação microbiana não ocorre (BOUWER, 1992).

Algumas relações têm sido propostas para aumentar a biodegradação de compostos derivados do petróleo (CAPONE e BAUER, 1992):

- Otimizar as condições ambientais a fim de maximizar o potencial degradador de contaminantes de bactérias nativas: mediante suplementação

de fatores nutricionais limitantes ao crescimento de microrganismos biodegradadores de hidrocarbonetos;

- Disseminar o meio ambiente contaminado com cepas de bactérias que sejam tolerantes e capazes de degradação rápida de um dado contaminante e, desta forma, suplementando a microbiota autóctone;

- Suplementar as populações naturais com espécies de bactérias que podem ser genomicamente alteradas para suprir a proliferação de caminho metabólico específico.

Os microrganismos demonstram uma grande habilidade em utilizar os mais raros complexos enzimáticos para degradar xenobióticos. Hidrocarbonetos alifáticos são componentes do óleo cru e dos produtos do refinamento do petróleo, incluindo combustíveis. A biodegradação destes compostos envolve atividades de monoxigenases e a clivagem por beta-oxidação. Alguns exemplos desta transformação são (SKLADANY e METTING, 1993):

- n-alcanos de cadeia longa são biodegradados mais lentamente do que os de cadeia curta;

- hidrocarbonetos saturados são mais rapidamente degradados do que seus análogos insaturados;

- o grau de ramificação é inversamente relacionado à taxa de biodegradação e;

- a recalcitrância é comum para os grandes compostos alifáticos metilados.

Segundo Fuller e Warrick (1985), os três processos biológicos mais efetivos no controle da poluição causada por resíduos são:

- Oxidação/Redução;

- Mineralização/Imobilização;

- Síntese de constituintes orgânicos/Reações complexas.

Essas categorias são amplas e representam uma base para discussão dos seus ciclos implícitos. Para que a biodegradação ocorra é necessário um ambiente propício, embora não exista um conjunto ideal de fatores para todos os organismos, há um meio ambiente geralmente considerado ótimo para a

decomposição de matéria orgânica no solo. A temperatura mais adequada está entre 25 e 35°C. A umidade do solo não pode exceder um nível que impeça a aeração ou a difusão do oxigênio, geralmente esse nível está levemente abaixo da capacidade de campo, onde a água ocupa todos os espaços e poros do solo, e também deve estar acima do ponto de murcha das plantas. Outros fatores de controle de biodegradação incluem pH, fonte de energia, aceptores de elétrons e nutrientes essenciais (FULLER e WARRICK, 1985).

Os microrganismos devem transformar os nutrientes disponíveis no meio em formas que são utilizáveis para incorporação em suas células e para a síntese de seus polímeros. As células usam formas reduzidas de polímeros (monômeros) e para essa transformação necessitam de energia e uma fonte de elétrons. Os doadores de elétrons são essenciais para o crescimento celular, pois tornam os nutrientes disponíveis em energia viável, quando o doador os transfere para a um composto aceptor de elétrons (BOUWER, 1992).

A biodegradação de resíduos orgânicos pode ocorrer em um amplo espectro de valores de pH, porém a taxas de decomposição nos pontos extremos são mais lentas. A escala ótima para a maioria dos microrganismos do solo está entre os valores 5,5 e 8,5 de pH. A natureza do resíduo e a taxa de disposição influenciam a disponibilidade de oxigênio e podem influenciar os níveis de pH do solo. Frequentemente a maior influência causada pelos níveis de pH para a microflora é a modificação na disponibilidade de nutrientes (FULLER e WARRICK, 1985).

Muitas indústrias e dentre elas, as refinarias de petróleo, geram grande quantidade de lodo proveniente da decantação nos tanques de estocagem, e este resíduo é um subproduto descartável, que contém uma mistura de hidrocarbonetos, água e sedimentos e alguns são perigosos (ADMON et al, 2001). Desta forma, faz-se necessário a seleção de microrganismos que sejam capazes de biodegradar esse lodo, também chamado de borra oleosa, pois os problemas para a sua disposição final são complexos (KATAOKA, 2001). Kirtland et al (2000) comentam que a atenuação (diminuição) natural de hidrocarbonetos do petróleo requer adequado monitoramento para assegurar-

se que os contaminantes permaneçam apenas no local de estudo e sejam biodegradados pelos processos microbianos.

Os benefícios e vantagens da biorremediação incluem: baixo custo operacional, possibilidade de tratamentos *in situ*, diminuição nos custos de transporte, eliminação permanente do resíduo, diminuição de riscos de contaminação de outras áreas e maior aceite público (DEL'ARCO e FRANÇA, 1999).

O baixo custo e o sucesso de uma aplicação da biorremediação dependem da precisão do processo de medição das taxas de biodegradação para que se possa prever a efetividade desta e estimar o tempo necessário para que a degradação ocorra (DAVIS, et al, 2003; SKLADANY e METTING, 1993). Landis e Yu, 1995 comentam que é importante usar certos critérios na opção por biorremediação, pois deve-se considerar a complexidade do ambiente, bem como, a concentração dos contaminantes.

Técnicas de biorremediação baseadas nas atividades metabólicas dos microrganismos têm certas vantagens (SABATÉ et al, 2004), pois estimulam os processos naturais de biodegradação, quando a atenuação natural não alcança os limites regulamentados em um tempo razoável. Esses processos de biorremediação são recursos e opções ambientalmente responsáveis para limpar o derramamento de óleo e de combustíveis (PRINCE, 2000). Biorremediação é uma aceleração de fatos naturais e assim uma ótima solução para o problema de poluentes derivados do petróleo que causam muitos transtornos nos ecossistemas.

As tecnologias de biorremediação *in situ* (no local) para a descontaminação dos sedimentos no solo e em águas contaminadas com hidrocarbonetos do petróleo envolvem estimulação dos microrganismos autóctones capazes de degradar contaminantes orgânicos (BOOPATHY, 2003). Usando produtos contaminantes como substrato para gerar energia e crescimento, os microrganismos os convertem em produtos menos perigosos, principalmente CO₂, massa de células, sais inorgânicos e água (BOOPATHY, 2003; LANDIS e YU, 1995; SKLADANY e METTING, 1993 e BOUWER, 1992). Alguns gêneros de bactéria como *Corynebacterium*, *Mycobacterium* e

Pseudomonas podem utilizar os hidrocarbonetos como fonte de carbono (RICHARDS, 1987).

As técnicas de biorremediação são fundamentadas nos processos de biodegradação, mas possuem variações de tratamentos *in situ* ou *ex-situ* (fora do local). A grande maioria dessas técnicas envolve o tratamento em superfície, mas também podem envolver a biorremediação em subsuperfície. Moreira e Siqueira (2006) citando Skipper (1998) comentam alguns tipos e estratégias de biorremediação em solo, apresentados no quadro abaixo.

Quadro 1 – Tipos e estratégias para biorremediação do solo (Skipper, 1998 apud MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

	Biorremediação	Fundamentos e definições
<i>In situ</i>	Natural	Consiste na degradação intrínseca ou natural pelos microrganismos indígenas do solo.
	Bioestimulação	Consiste na adição de nutrientes, como N e P, para estimular os microrganismos indígenas.
	Bioventilação	É a forma de bioestimulação por meio da adição de gases estimulantes, como O ₂ e CH ₄ , para aumentar a atividade microbiana decompositora.
	Bioaugmentação	É a inoculação no local contaminado com microrganismos selecionados para degradação do contaminante.
<i>Ex situ</i>	“Landfarming”	É a aplicação e incorporação de contaminantes ou rejeitos contaminados na superfície do solo não contaminado para degradação. O solo é arado e gradeado para promover aeração e mistura uniforme do contaminante.
	Compostagem	É o uso de microrganismos termofílicos aeróbios em pilhas construídas para degradar o contaminante.

Brown e Nadeau (2002) recomendam uma técnica de biorremediação que consiste em duas fases, nas quais há opções de tratamentos passivos e

ativos para solos contendo mais do que 1% de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP). O tratamento ativo usa a aeração contínua e um revolvimento do solo, enquanto o tratamento passivo ocorre em solos estáticos e com vegetação. A fase I utiliza tanto a biorremediação passiva quanto a ativa na presença de plantas tolerantes ao petróleo. A fase I é completa quando a quantidade de HTP no solo reduziu a níveis toleráveis por plantas nativas sendo assim apropriado para uma restauração. A fase II é iniciada com o plantio de espécies nativas apropriadas para a zona climática do lugar. Essa fase completa a restauração combinando a biorremediação passiva com a revegetação final e, assim, espera-se que os contaminantes do solo sejam minimizados a níveis aceitáveis, pois as plantas podem absorver os elementos tóxicos ainda presentes no solo (SPOSITO, 1989).

As condições químicas e a matéria orgânica do solo são importantes para a população microbiana cometabolizante, pois muitos contaminantes apresentam baixa degradabilidade e, desta forma, se faz necessário o tratamento do resíduo com surfactantes (químicos ou biológicos) ou agentes pré-oxidantes, pois este procedimento reduz a recalcitrância e acelera a biodegradação (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Sabaté et al (2004) observaram que solos possuem diferenças nas atividades metabólicas dos microrganismos selvagens, sendo assim, a estrutura e composição do solo afetam as características e o comportamento coligativo deste. As propriedades dos solos podem controlar os padrões de emissão de CO₂ pelos microrganismos, uma vez que este é uma das maiores fontes deste gás (LA SCALA et al, 2000a, 2001). Nestas condições a cinética de todo o processo de biodegradação será diferente em cada tipo de solo. O comportamento bifásico dos compostos no solo deve também ser considerado, pois pelo modelo de seqüestro, a proporção inicial de poluentes livres introduzidos no solo é fixada nos nanoporos de suas partículas tornando os compostos inacessíveis aos microrganismos. Assim também certas frações de hidrocarbonetos podem ficar “presas” nesses nanoporos do solo juntamente com os agregados deste tornando-os inacessíveis aos microorganismos (ADMON et al, 2001). Seabra (2001) relata que vários são os fatores que

influenciam a biodegradação dos hidrocarbonetos, entre eles estão: a sua composição química, concentração, estado físico e toxicidade.

A sobrevivência de microrganismos consumidores de hidrocarbonetos em solos diferentes demonstra a presença de uma larga variedade de organismos capazes de oxidar hidrocarbonetos (BHATNAGAR e FATHEPURE, 1991). Mais de 10 milhões de compostos são biodegradáveis e como o número de substâncias químicas sujeitas ao catabolismo microbiano é grande (10^6), deve haver equivalente número de enzimas e vias metabólicas ocorrendo na natureza (WACKETT e ELLIS, 1999), porém os microrganismos autóctones podem não ser capazes de biodegradar as diversas substâncias presentes nos compostos derivados de petróleo. Esses organismos geralmente falham ao degradar asfaltenos e compostos aromáticos com quatro ou mais anéis, assim, acrescentar microrganismos exógenos já adaptados é uma solução interessante (ATLAS, 1995).

A adição de grande quantidade de biomassa celular de conhecidos biodegradadores de hidrocarbonetos pode ocasionar aumento nas taxas de biodegradação das substâncias presentes nas complexas misturas do petróleo. Atlas (1995) e Rittmann (1992) relataram que a degradação somente ocorrerá se houver algumas interações, como: o contaminante deve estar próximo e disponível ao microrganismo e este deve ser capaz de participar de alguma parte do processo de degradação ou transformação (HOEPPEL e HINCHEE, 1994), porém o simples desaparecimento do material não implica que ele foi totalmente biodegradado (LANDIS e YU, 1995).

Devido a concentrações muito baixas de alguns contaminantes orgânicos no ambiente, eles não sustentam o crescimento microbiano como únicos doadores de elétrons. Desta forma, os contaminantes orgânicos podem continuar a serem transformados pela população microbiana, que obtém a maioria da energia e do carbono de um composto diferente que serve como primeiro substrato, sendo assim esse metabolismo é chamado de “utilização secundária”. Existem casos em que substratos não utilizados como fonte de energia e, que não possuem átomos de carbono para fornecer, necessitam de um composto primário para que o crescimento microbiano aconteça, este

retenção de água no meio, porém Tejada et al (2006; 2007) observaram que a vinhaça, provinda da produção de açúcar de beterraba, presente em altas doses em solos pode ser responsável pela degradação da estrutura desse, devido à alta concentração de cátions monovalentes e de ácidos fúlvicos, que ao contrário dos ácidos húmicos, apresentam baixa polimerização. Além disso, Tejada, et al (2007) afirmam que essa vinhaça apresentou impacto prejudicial nas propriedades biológicas (biomassa microbiana, respiração do solo, atividades enzimáticas a urease, protease, glucosidase, fosfatase). Tejada e Gonzalez (2006) afirmam a preferência pela adição dessa vinhaça previamente decomposta com o auxílio de resíduos persistentes da agricultura.

Na biodegradação do petróleo, há necessidade de se introduzir outros nutrientes no processo, entre eles N e P, além de S, Fe, Mg, Ca e Na. A disponibilidade desses elementos é necessária para o catabolismo oxidativo desses hidrocarbonetos. Os trabalhos realizados sugerem que sulfato, nitrato e Fe^{++} podem servir de substrato como aceptor final de elétrons. As condições físicas devem ser averiguadas, desta forma, a temperatura deve manter-se entre 30 e 40°C e o pH entre 2 e 11 (ROSATO, 1997; DEL'ARCO e FRANÇA, 1999). Bactérias anaeróbias presentes no solo requerem vários aceptores de elétrons como o nitrato, sulfato e um suplemento de carbonatos e nitrogênio (BOOPATHY, 2003).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Solos

Foram utilizados neste estudo dois tipos de solos com o intuito de comparar as suas diferentes taxas de biodegradação (Figura 1).

O solo de cerrado (SC) foi coletado na Estação Ecológica de Itirapina localizada entre os Municípios de Itirapina e Brotas, no Estado de São Paulo, Brasil (S 22°12'39" e O 47°53'32").

O solo de "landfarming" (SL), aqui denominado, foi coletado na superfície de uma das células reservadas para tratamento de borra oleosa mediante "landfarming" da Refinaria de Petróleo – REPLAN, localizada no município de Paulínia, estado de São Paulo, Brasil (S 22°41'12" e O 47°07'26").

arroz (ca) foi o material orgânico utilizado e a argila expandida (ae) o inorgânico.

4.1.3 Aditivo orgânico

Para avaliar o desempenho do solo perante a complementação de nutrientes utilizou-se a vinhaça, resíduo da destilação do álcool, como aditivo orgânico. Este composto foi coletado na Usina Santa Lúcia, município de Araras, estado de São Paulo (S 22°20'12" e O 47°24'29").

4.1.4 Respirômetros de Bartha & Pramer

Este respirômetro é constituído de duas câmaras interligadas, onde uma contém o substrato, que está sendo analisado, e a segunda possui uma solução alcalina (hidróxido de potássio 0,2N – KOH), que reage como CO₂ liberado pela biodegradação do substrato, que ocorreu na primeira câmara (Figura 2).

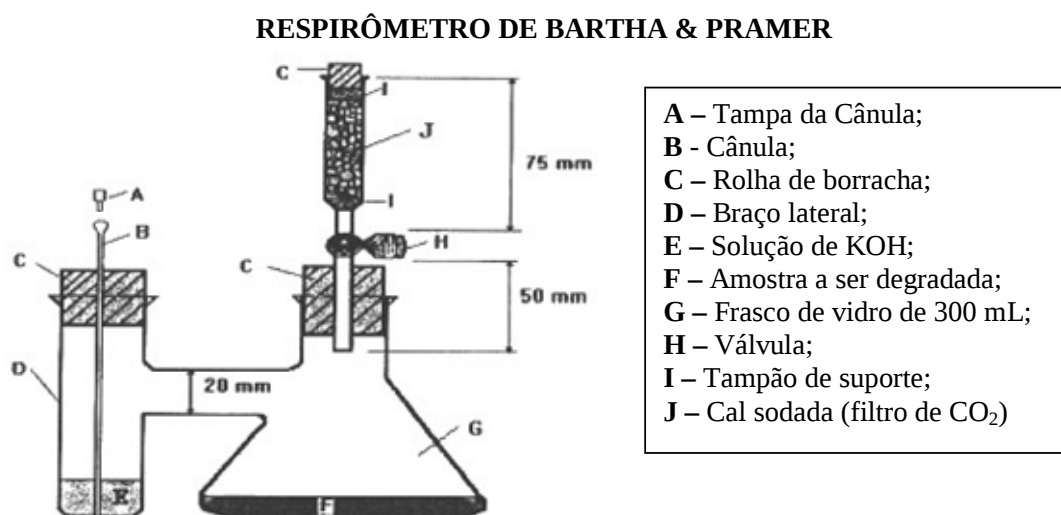


Figura 2 – Desenho esquemático do respirômetro de Bartha & Pramer

4.1.5 Equipamentos, vidraria, reagentes, meios de cultura e aparelho de absorção óptica no infravermelho.

- Vidraria usual de laboratório de microbiologia;
- Medidor eletrônico de pH modelo DMPH – 2 (Digimed);
- Balança de precisão de $\pm 0,001\text{g}$ modelo ADA 210L (marca: Adam Equipament)
- Peneira com abertura de 1,62mm
- Estufa 105 °C modelo 315SE (marca: Fanem);
- Água destilada isenta de CO₂;
- Solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,2N;
- Solução indicadora de vermelho de metila;
- Solução indicadora de fenolftaleína;
- Solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1N;
- Solução de carbonato de potássio (Na₂CO₃) 0,1N;
- Solução de Cloreto de bário (BaCl₂) 1N;
- Solução salina (NaCl) 0,85%;
- Meio de cultura para bactérias “Plate Count Agar” – PCA (marca: Acumedia – Neogen);
- Meio de cultura para fungos extrato de malte com agar (marca: Criterion – Hardy Diagnostics);
- Autoclave – modelo 105 (marca: SOC. FABBE);
- Shaker;
- Espectrofotômetro de absorção óptica no infravermelho - LI-COR 820 Gas Analyzer- (marca: Li-Cor);
- Termômetro de máxima e mínima (marca: Incoterm);
- Câmara Fria (marca: Líder);
- Baldes de 20 litros;
- Baldes de 2 litros;
- Estabilizador eletrônico;
- Ventoinha elétrica para disco rígido;
- Bomba aspiradora de secreção modelo MA 520 (marca: AspiraMax).

4.2 Métodos

4.2.1 Método de coleta do solo de cerrado e do “landfarming” e vinhaça

O solo de cerrado (SC) foi coletado, de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (1986), Norma Técnica NBR 6.457: Amostras de solo - Preparação para ensaios de compactação e ensaios de caracterização.

O solo de “landfarming” (SL) foi coletado, de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (2004), NBR 10.007: Amostragem de resíduos.

A vinhaça foi coletada de acordo com a Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (2006), Norma Técnica P4.231: Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação em solo agrícola.

4.2.2 Preservação dos solos

Após a coleta os dois solos utilizados neste trabalho foram armazenados em câmara fria à 4 °C, para preservar sua composição e microbiota, até sua utilização nos ensaios.

4.2.3 Caracterização físico-química dos solos e vinhaça

A análise físico-química das amostras de solos e vinhaça foi realizada no início dos experimentos pelo Instituto Campineiro de Análise de Solo (ICASA). As leituras realizadas pelo ICASA são feitas em Espectrômetro de emissão por Plasma (ICP - Inductivity Coupled Plasma). Excetuando-se a determinação da capacidade de campo e umidade relativa, descritas a seguir.

No início de cada ensaio foi realizada a análise de matéria orgânica (MO) de cada tratamento, pelo mesmo Instituto, para que se pudesse realizar os cálculos de eficiência de biodegradação (EB), explicados adiante.

4.2.3.1 Solos

Os solos foram analisados no início dos experimentos. Os compostos analisados foram: pH, matéria orgânica (MO), macronutrientes (K, fósforo residual (Pres), Ca, Mg e S), micronutrientes (Na, Fe, Al, Mn, Cu, Zn e B) soma de bases (SB), capacidade catiônica (CTC), metais pesados (Ba, Cd, Cr, Ni e Pb) e textura dos solos.

4.2.3.2 Vinhaça

As análises na vinhaça utilizada neste estudo foram: pH, MO, macronutrientes, micronutrientes e metais pesados.

4.2.4 Preparo dos solos

4.2.4.1 Capacidade de Campo (adaptada de ANDERSON e INGRAM, 1996) e Umidade Relativa

Para a montagem dos experimentos, tanto respirométricos quanto utilizando-se o LI-COR 820, os solos foram secos ao ar e peneirados em peneira ABNT com gramatura de 1,62mm. Foi realizada a medida da capacidade de campo (CC) e acertada a umidade para 70% da CC.

A capacidade de campo dos solos e das misturas utilizadas, consiste na determinação da quantidade de água necessária para se obter a saturação do solo. A capacidade de campo foi calculada mediante método gravimétrico saturando-se o solo (S1) e, após período de 24 horas, foi pesado $1 \pm 0,001\text{g}$ do material em cadinho (SCa), previamente seco e tarado, e levado à estufa 105°C , por 24 horas. Após esse período, o conjunto cadinho + solo (S1SCa) foram pesados e, calcula-se a quantidade máxima de água (A1) para se saturar o material estudado (Equação 1).

$$A1 = (S1SCa) - (SCa) \quad \textbf{Equação (1)}$$

Para se calcular a umidade já existente nos solos e tratamentos, retirou-se cerca de $1 \pm 0,001$ g de substrato (S2), de cada tratamento, e colocou-se em cadinhos (C), previamente secos e tarados (CS2). Após, 24 horas de permanência em estufa a 105°C , pesou-se o conjunto (cadinho + substrato – CS3), e calculou-se a água existente (A2) da seguinte forma (Equação 2):

$$A2 = (CS2-CS3) \quad \textbf{Equação (2)}$$

A Umidade relativa é calculada da seguinte forma (Equação 3):

$$U (\%) = (A2/A1) \times 100 \quad \textbf{Equação (3)}$$

A adição de vinhaça seguiu a correção da umidade do solo para 70% da CC. Assim, os tratamentos nos quais não houve acréscimo de vinhaça, a umidade foi acertada acrescentando-se água.

4.2.4.2 Adição dos Agentes Descompactantes

Nos experimentos analisou-se o emprego de agentes descompactantes na otimização da biodegradação da matéria orgânica presente nos solos estudados.

Nos ensaios respirométricos foram utilizados dois tipos de agentes: casca de arroz e argila expandida. Esses compostos foram acrescentados na porcentagem de 10% em relação à quantidade total de substrato utilizado em cada respirômetro.

Nos ensaios de avaliação do CO_2 produzido, utilizando espectroscopia de absorção ótica no infravermelho, acrescentou-se apenas casca de arroz como agente descompactante na proporção de 5% do volume total de solo presente no reator, onde esse agente foi utilizado.

4.2.5 Ensaio respirométrico

Este ensaio foi realizado segundo a Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (1990), Norma Técnica L.6.350: Solos – Determinação da Biodegradação de Resíduos – Método respirométrico de Bartha e segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas (1999), NBR 14.283: Resíduos em solo – Determinação da biodegradação pelo método respirométrico. Estas normas utilizam a quantificação de gás carbônico (CO₂) produzido em um sistema fechado (respirômetro).

4.2.5.1 Experimento de Respirometria

O experimento foi realizado em oito tratamentos com três repetições para cada um, nos dois ensaios foram executados.

O primeiro ensaio buscou avaliar a ação dos seguintes agentes descompactantes:

- casca de arroz (ca);
- argila expandida (ae)

Essa complementação foi feita nos dois tipos de solos a seguir:

- Solo de cerrado (SC)
- Solo de “landfarming” (SL)

Esse ensaio teve a duração de 108 dias e foi realizado segundo protocolo descrito na tabela 1.

Tabela 1 – Primeiro ensaio respirométrico empregando solo de cerrado e de “landfarming, casca de arroz e argila expandida (SC – solo de cerrado; SCca – SC + casca de arroz; SCae – SC + argila expandida; SCcae – SC + casca de arroz + argila expandida; SL – solo de “landfarming”; SLca – SL + casca de arroz; SLae – SL + argila expandida; SLcae – SL + casca de arroz + argila expandida)

Componentes	SC	SCca	SCae	SCcae	SL	SLca	SLae	SLcae
Solo de cerrado (50g)	+	+	+	+	-	-	-	-
Solo de “landfarming” (50g)	-	-	-	-	+	+	+	+
Casca de Arroz (g)	-	5	-	2,5	-	5	-	2,5
Argila Expandida (g)	-	-	5	2,5	-	-	5	2,5

(+) presença; (-) ausência – os números significam as quantidades adicionadas.

O segundo ensaio analisou a adição de 25% de solo de “landfarming” no solo de cerrado (75%), além do acréscimo de casca de arroz, como agente descompactante, e vinhaça, como aditivo orgânico. Esse experimento foi realizado durante 122 dias. O segundo ensaio respirométrico foi executado segundo o protocolo da tabela 2.

Tabela 2 – Segundo ensaio respirométrico empregando solo de cerrado e de “landfarming, casca de arroz e vinhaça (SC – solo de cerrado; SCca – SC + casca de arroz; SCv – SC + vinhaça; SCcav – SC + casca de arroz + vinhaça; SL – solo de “landfarming”; SLca – SL + casca de arroz; SLv – SL + vinhaça; SLcav – SL + casca de arroz + vinhaça

Componentes	SC	SCca	SCv	SCcav	SCSL	SCSLca	SCSLv	SCSLcav
Solo de cerrado (g)	50	50	50	50	37,5	37,5	37,5	37,5
Solo de “landfarming” (g)	-	-	-	-	12,5	12,5	12,5	12,5
Casca de Arroz (g)	-	5	-	5	-	5	-	5
Vinhaça (mL)	-	-	8	8	-	-	8	8
Água (mL)	8	8	-	-	8	8	-	-

(-) ausência – os números representam as quantidades acrescentadas

A solução alcalina foi periodicamente retirada e repostada, tomando-se os cuidados para impedir a entrada de CO₂ externo (utilizou-se coluna de cal sodada), buscando-se avaliar a taxa de biodegradação durante o tempo. Após a retirada, esta foi transferida para um erlenmeyer de 150mL, onde foi acrescentado 1mL de cloreto de bário (BaCl) 1N e 2 gotas de solução de fenolftaleína, como indicador ácido-base. Titulou-se com ácido clorídrico (HCl) 0,1N e anotou-se a quantidade de ácido utilizada, para alcançar a viragem do indicador na solução alcalina.

Este procedimento foi realizado para todos os respirômetros. Um frasco contendo solução alcalina recentemente preparada e dos demais componentes anteriores foi também titulado com HCl 0,1N. Este frasco foi considerado a solução em branco, cujo valor foi comparado com as leituras feitas nos respirômetros.

4.2.5.2 Cálculos

- Produção de CO₂ (CO₂p)

A quantidade de CO₂ produzido foi calculado a partir da fórmula (Equação 4):

$$\text{CO}_2\text{p} = (\text{A}-\text{B}) \times 50 \times f_{\text{HCl}} \quad \text{Equação (4)}$$

Onde:

A = volume de HCl 0,1N gasto para titular o branco, em mL.

B = volume de HCl 0,1N gasto para titular o tratamento, em mL.

50 = fator para transformar equivalente em μmol de CO₂

f_{HCl} = fator do HCl 0,1N (0,1/normalidade do HCl utilizado)

O cálculo do CO₂ produzido devido à biodegradação (CO₂b) é feito subtraindo-se a quantidade de CO₂p no respirômetro controle (somente com solo) da quantidade obtida no respirômetro teste.

- Carbono Biodegradado (Cb)

Admitindo-se que 50% do carbono biodegradado se transforma em CO₂ e que os 50% remanescentes se incorporam ao solo sob a forma de húmus e biomassa, o valor é calculado pela fórmula (Equação 5):

$$\text{Cb} = 2 \times \text{CO}_2\text{b} \quad \text{Equação (5)}$$

- Eficiência de Biodegradação (EB)

A EB é calculada da seguinte forma (Equação 6):

$$\text{EB (\%)} = (\text{C}_b/\text{C}_l) \times 100 \quad \text{Equação (6)}$$

Onde:

C_i (μmol) = quantidade de carbono inicial aplicada por 50g de solo, assim calculada (Equação 7):

$$C_i = \text{COT}/12 \quad \text{Equação (7)}$$

COT= carbono orgânico total inicial, em $\mu\text{g/g}$

12 = fator de conversão, em $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$ de carbono.

4.2.5.3 Quantificação do número de bactérias e fungos dos tratamentos do ensaio respirométrico

A avaliação do desenvolvimento de microrganismos foi realizada mediante contagem das Unidades Formadoras de Colônias por grama de solo seco (UFC/g/ss) no início e final do ensaio respirométrico.

Preparou-se uma suspensão de solo misturando-se 10g com 90mL de solução salina estéril (0,85% de cloreto de sódio - NaCl). Após a agitação de 15 minutos, aguardou-se 5 para decantação e coletou-se o líquido sobrenadante. Este foi adequadamente diluído para os plaqueamentos e posterior contagens das colônias de microrganismos. Os meios utilizados foram: Plate Count Agar (PCA) para bactérias e extrato de malte com agar para fungos. Após a inoculação, as culturas foram mantidas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ para bactérias e $28 \pm 1^\circ\text{C}$ para fungos. Para quantificar a UFC/g/ss verificou-se o peso seco do solo mediante sua secagem em estufa 105°C por duas horas.

4.2.6 Ensaio de avaliação do CO_2 produzido utilizando espectroscopia de absorção ótica no infravermelho

Este ensaio foi realizado utilizando-se reatores contendo os solos preparados da forma como no item 3.2.4. Utilizou-se o aparelho LI-COR 820,

4.2.6.2 Leituras da produção de CO₂

A atividade microbiana foi avaliada comparativamente mediante a produção de CO₂, que foi armazenado em câmaras, com volume de 2 litros, colocadas sobre a coluna de solo dos reatores. Os gases armazenados foram succionados por uma bomba de ar e fluía para o analisador de CO₂ (LI-COR 820), que utilizando a espectroscopia de absorção ótica no infravermelho quantificava a concentração de CO₂.

As quantificações foram realizadas diariamente, durante os primeiros 15 dias e a seguir fizeram-se medições a cada dois dias. Constatou-se que o CO₂ produzido mantinha-se armazenado dentro da câmara colocada sobre a coluna de solo do reator.

Para quantificar o CO₂ produzido continuamente pelos microrganismos foi necessário realizar sucção seguida do ar contido nas câmaras armazenadoras durante certo tempo para que os valores registrados no equipamento demonstrassem serem significativos, desta forma procedia-se a quantificação do CO₂ presente dentro das câmaras.

Nas medições realizadas estabeleceu-se um tempo pré-determinado de 5 minutos de sucção em cada câmara para as leituras. O registro dos valores era realizado a cada 5 segundos, resultando num total de 60 valores registrados. Desta forma, para um resultado integral do comportamento do solo de cada reator, realizava-se a média aritmética desses 60 valores obtidos durante 5 minutos de aspiração realizada de cada câmara (Figura 5).

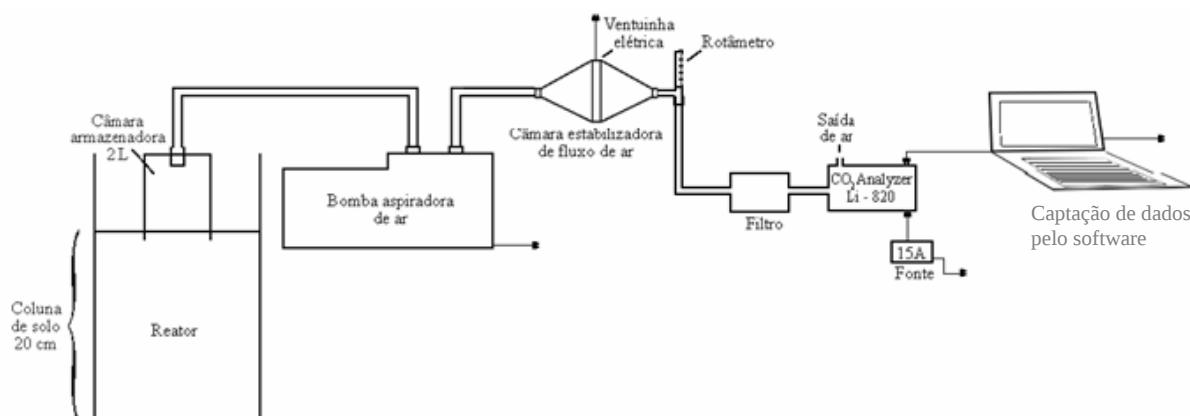


Figura 5 – Fluxograma da sucção de CO₂ no experimento utilizando o detector de CO₂ – LICOR 820.

4.2.6.3 - Avaliação de Temperatura

As medidas de temperatura foram efetuadas todos os dias de leitura utilizando-se um termômetro de máxima e mínima, mantido no local dos reatores.

4.2.6.4 – Avaliação de pH

Este parâmetro também foi avaliado no início e após o término dos experimentos.

Foram pesados 10g de solo de cada tratamento em becker de 150 mL , onde adicionou-se 50 mL de água destilada. Essa solução foi agitada com agitador magnético por 15 minutos e após 5 minutos procedeu-se a medição do pH da solução sobrenadante.

4.2.6.5 - Avaliação do crescimento de bactérias e fungos presentes nos tratamentos

A avaliação do crescimento de bactérias e fungos foi efetuada, da mesma maneira que nos ensaios respirométricos (item 3.2.5.3).

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1. Caracterização dos solos e da vinhaça

As tabelas 3; 4 e 5 inserem os dados de granulometria, elementos químicos e características físico-químicas dos dois solos utilizados neste estudo. Mediante estes dados, pode-se constatar diferenças entre os solos. O solo de cerrado (SC) analisado tem granulometria arenosa apresenta pouca quantidade de matéria orgânica e também de íons quando comparado com o solo de “landfarming” (SL). O único elemento químico que o solo de cerrado apresenta em maior quantidade é o alumínio (Al). As principais características apresentadas por Coutinho (2000) sobre os solos de cerrado são: textura predominantemente arenosa, baixo teor de matéria orgânica (em 3 e 5%), pH baixo (entre 4 e 5) e altos níveis de íons de alumínio (Al^{3+}). O que coincide com os resultados expressos nas tabelas 3; 4 e 5.

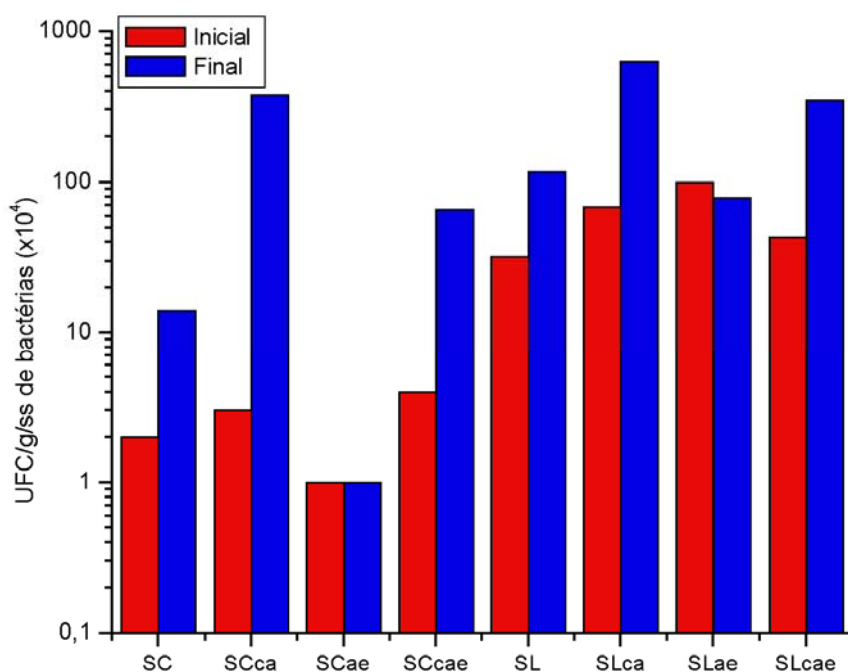


Figura 13 – Quantificação de bactérias heterotróficas presentes no início e término de ensaio respirométrico de 108 dias envolvendo tratamentos com misturas de Solo de Cerrado (SC), Solo de “landfarming” (SL), casca de arroz (ca) e argila expandida (ae).

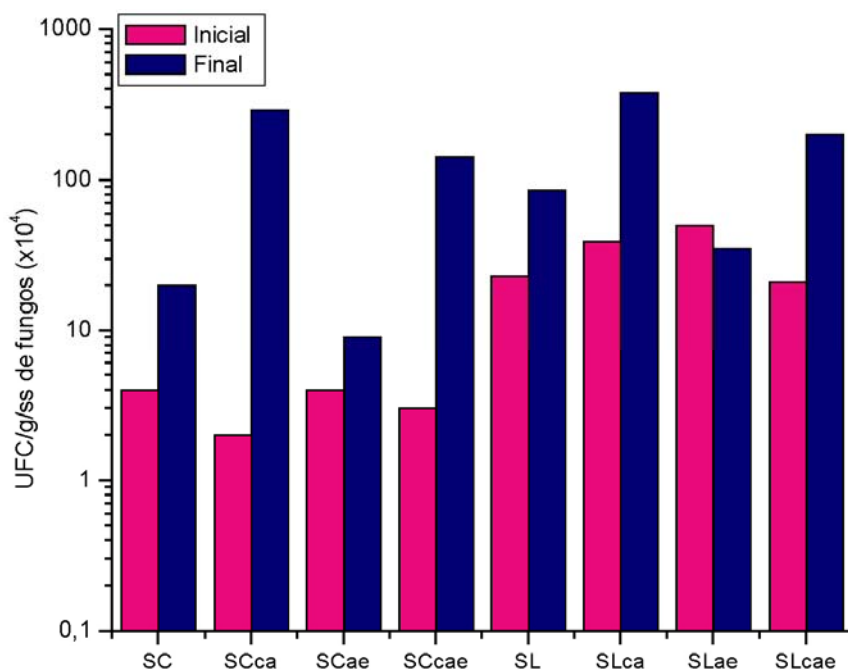


Figura 14 – Quantificação de fungos presentes no início e término de ensaio respirométrico de 108 dias envolvendo tratamentos com misturas de Solo de Cerrado (SC), Solo de “landfarming” (SL), casca de arroz (ca) e argila expandida (ae).

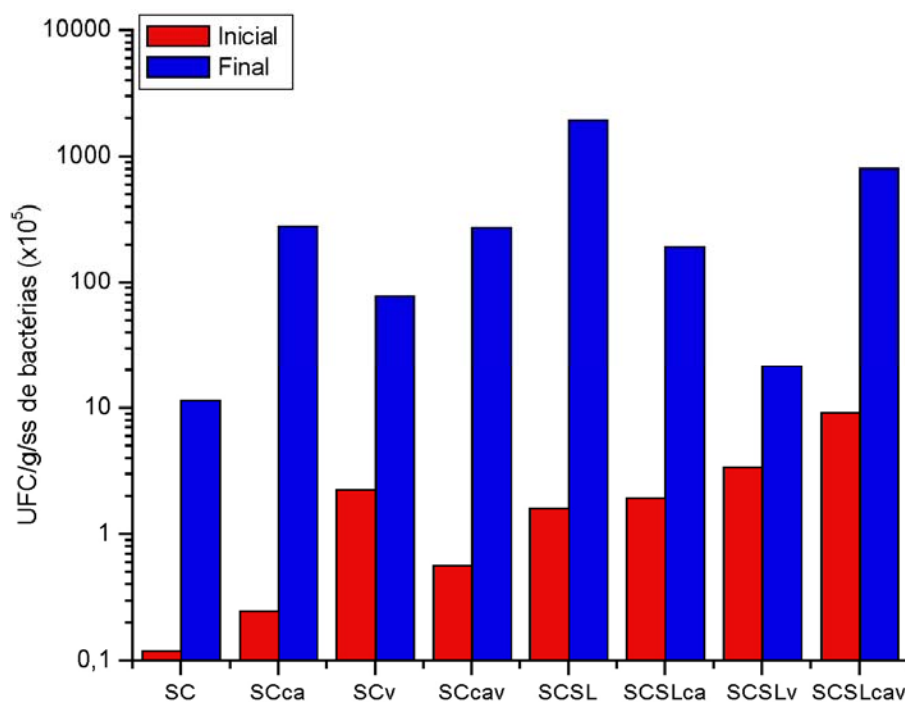


Figura 15 – Quantificação de bactérias presentes no início e término de ensaio respirométrico de 122 dias envolvendo Solo de Cerrado (SC), misturas de SC com 25% de Solo de “landfarming” (SCSL), casca de arroz (ca) e vinhaça (v).

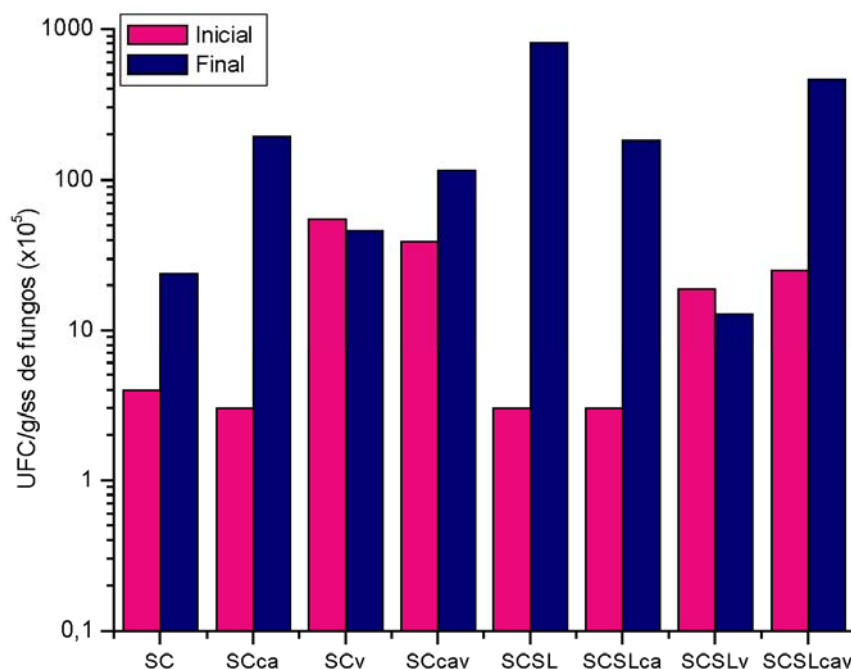


Figura 16 – Quantificação de fungos presentes no início e término de ensaio respirométrico de 122 dias envolvendo Solo de Cerrado (SC), misturas de SC com 25% de Solo de “landfarming” (SCSL), casca de arroz (ca) e vinhaça (v).

