

**BIODEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS OLEOSOS  
PROVENIENTES DE REFINARIA DE PETRÓLEO  
ATRAVÉS DO SISTEMA DE BIOPILHAS**

**EDUARDO BERALDO DE MORAIS**

**Orientadora: Profa. Dra. SÂMIA MARIA TAUKE-TORNISIELO**

**Co-orientadora: Profa. Dra. ANA PAULA DE ARRUDA GERALDES KATAOKA**

**Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia do Campus de Rio Claro,  
Universidade Estadual Paulista, como  
parte dos requisitos para obtenção do  
título de mestre em Microbiologia  
Aplicada.**

**Rio Claro  
Estado de São Paulo – Brasil  
Setembro de 2005**

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Antônio e Maria Tereza, que sempre me  
incentivaram e apoiaram durante  
esta fase da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, o criador de tudo, que me permitiu cumprir mais esta etapa da minha vida.

Agradeço a Dra. Sâmia Maria Tauk-Tornisielo, minha orientadora da graduação e do mestrado, pela orientação, confiança, incentivo, amizade e estímulo durante o desenvolvimento da minha carreira acadêmica.

À Dra. Ana Paula Arruda Geraldes Kataoka pela co-orientação.

À Dra. Dejanira de Francheschi de Angelis, pelas colaborações durante o desenvolvimento desse trabalho.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado.

À Refinaria de Paulínia, REPLAN, pelo convênio firmado com a UNESP permitindo as coletas do resíduo oleoso.

Ao Centro de Estudos Ambientais (CEA) da UNESP, que colocou à minha disposição a infra-estrutura necessária para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao professor Dr. José Silvio Govone pela orientação das análises estatísticas.

À Francisca de Assis Mattioli Gonçalves e Eleni Nadai Malagutti, técnicas dos laboratórios do CEA, pela amizade, ensinamentos e assistência no laboratório.

À Sara Cristina Galvão pelas mais diversas ajudas.

Aos meus amigos Lye e Davi, companheiros de república, pela amizade e companheirismo. À Maria Paula e Elaine Yumi pelas colaborações durante a realização dos experimentos.

Ao amigo Zito pelo auxílio nas análises de toxicidade.

Enfim, agradeço a todos os amigos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>01</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>04</b>
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>05</b>
3.1 Petróleo: panorama geral .....	<b>05</b>
3.2 Poluentes ambientais .....	<b>06</b>
3.3 Utilização de hidrocarbonetos de petróleo por microrganismos.....	<b>07</b>
3.4 Biodegradação das frações do petróleo .....	<b>12</b>
3.5 Biorremediação .....	<b>14</b>
3.6 Principais fatores ambientais que afetam a biodegradação de hidrocarbonetos	<b>18</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
4.1 Material .....	<b>21</b>
4.1.1 Inóculo .....	<b>21</b>
4.1.2 Solo .....	<b>22</b>
4.1.3 Resíduo oleoso .....	<b>22</b>
4.1.4 Respirômetro de Bartha .....	<b>22</b>
4.2 Métodos .....	<b>23</b>
4.2.1 Avaliação da biodegradabilidade do resíduo oleoso através do método respirométrico de Bartha .....	<b>23</b>
4.2.2 Construção das biopilhas.....	<b>25</b>
4.2.2.1 Preparo da mistura solo/resíduo .....	<b>25</b>
4.2.2.2 Montagens das biopilhas.....	<b>25</b>
4.2.2.3 Inóculo adicionado nas biopilhas .....	<b>26</b>
4.2.3 Monitoramento das biopilhas.....	<b>27</b>
4.2.3.1 Amostragens .....	<b>27</b>
4.2.3.2 Caracterização física e química do solo e análise dos elementos inorgânicos do resíduo oleoso .....	<b>28</b>
4.2.3.3 Determinação do número de microrganismos .....	<b>28</b>

4.2.3.4 Determinação da toxicidade .....	28
4.2.3.5 Determinação da quantidade de hidrocarbonetos de petróleo.....	29
4.2.3.6 Condições das biopilhas .....	29
4.2.4 Análise estatística e interpretação dos dados obtidos .....	30
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
5.1 Características químicas e físicas do solo .....	31
5.2 Quantificação dos elementos inorgânicos no resíduo oleoso.....	32
5.3 Evolução de CO <sub>2</sub> durante o ensaio de biodegradação do resíduo oleoso utilizando o método respirométrico de Bartha .....	32
5.4 Condições das biopilhas .....	35
5.4.1 Temperatura das biopilhas.....	35
5.4.2 pH das biopilhas.....	38
5.4.3 Umidade das biopilhas.....	39
5.4.4 Contagem de microrganismos das biopilhas.....	41
5.4.5 Toxicidade das biopilhas .....	43
5.4.6 Quantidade de hidrocarbonetos de petróleo nas biopilhas.....	45
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>51</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>63</b>

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Protocolo experimental da construção das biopilhas .....	25
<b>Tabela 2.</b> Características físicas e químicas do solo utilizado nas biopilhas .....	31
<b>Tabela 3.</b> Análises de elementos inorgânicos no resíduo oleoso .....	32
<b>Tabela 4.</b> Quantificação de CO <sub>2</sub> acumulado (mg/50g solo) devido a biodegradação do resíduo oleoso, frente a adição do inóculo e do inóculo mais o fertilizante, durante 133 dias, através do respirômetro de Bartha .....	33
<b>Tabela 5.</b> Teores da umidade (%) das biopilhas .....	40
<b>Tabela 6.</b> Valores de toxicidade das biopilhas durante a biodegradação do resíduo oleoso .....	44

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Foto do “landfarming” da REPLAN utilizado para a disposição do resíduo oleoso .....	22
<b>Figura 2.</b> Esquema de um respirômetro de Bartha e Pramer (1965) .....	23
<b>Figura 3.</b> Esquema da montagem das biopilhas .....	26
<b>Figura 4.</b> Evolução de CO <sub>2</sub> , quantificado em respirômetro de Bartha, obtidos a partir da degradação do resíduo oleoso, frente à adição de inóculo e do inóculo mais o fertilizante, durante 133 dias .....	34
<b>Figura 5.</b> Gráfico da eficiência da biodegradação (EB) segundo os teores de carbono inicial do solo e a quantidade de carbono biodegradado .....	35
<b>Figura 6.</b> Valores das temperaturas das biopilhas, a 20 cm de profundidade, comparados à temperatura do ar .....	36
<b>Figura 7.</b> Valores de pH nas diferentes biopilhas .....	38
<b>Figura 8.</b> Contagem das UFC de fungos nas biopilhas .....	41

<b>Figura 9.</b> Contagem das UFC de bactérias nas biopilhas .....	<b>41</b>
<b>Figura 10.</b> Concentração de hidrocarbonetos de petróleo nas diferentes biopilhas durante 350 dias de biodegradação.....	<b>46</b>
<b>Figura 11.</b> Resultado do teste de Friedman comparando as diferentes biopilhas quanto à concentração de hidrocarbonetos de petróleo .....	<b>47</b>

## RESUMO

O potencial de um sistema de biopilhas em degradar resíduos oleosos provenientes de refinaria de petróleo também chamado de borra de óleo foi estudado, assim como a possibilidade de otimizar o mesmo através da bioestimulação (adição de fertilizantes) e bioenriquecimento (adição de inóculo). Primeiramente, verificou-se a biodegradabilidade do resíduo através do método respirométrico de Bartha, quantificando o CO<sub>2</sub> emitido, observando os efeitos do uso de inóculo e de fertilizantes neste processo. Os microrganismos utilizados na produção do inóculo, fungos e bactérias, foram isolados de “landfarming” da Refinaria de Paulínia, REPLAN, estado de São Paulo, por serem adaptados ao ambiente de estresse ocasionado pelo resíduo oleoso e por terem demonstrado capacidade em biodegradar hidrocarbonetos de petróleo, em ensaios prévios realizados em laboratório. Foram construídas cinco biopilhas contendo solo poluído pela borra de óleo, nas constituições: 1 controle do experimento; 2 adicionada com inóculo; 3 com inóculo e fertilizante para plantas; 4 com inóculo e palha de arroz; 5 com inóculo, fertilizante e palha de arroz. Os resultados após 350 dias demonstraram redução da quantidade de resíduo em todas as biopilhas: 67%, 70%, 75%, 82% e 79% nas biopilhas 1, 2, 3, 4 e 5 respectivamente. As biopilhas contendo palha de arroz demonstraram degradação mais rápida do resíduo, principalmente nos dois primeiros meses deste estudo, provavelmente devido ao maior número de microrganismos que foram observados nas mesmas decorrente da adição do inóculo ou estimulação da microbiota natural. Nas condições de estudo, o inóculo adicionado nas biopilhas 2 e 3 não sobreviveram ao novo ambiente não influenciando a degradação do resíduo assim como a adição do fertilizante nas biopilhas 3 e 5 também não influenciou. Ficou evidente a importância da adição de materiais e agregados como a palha de arroz, para melhorar as características do solo quanto à aeração e permeabilidade contribuindo para acelerar a biodegradação do resíduo. Conclui-se que o sistema de biopilhas pode ser considerado uma tecnologia potencial para tratamento de resíduos oleosos de refinaria de petróleo e, portanto, podendo ser usado para biorremediação de solos poluídos por tais compostos. Propõe-se, contudo, a necessidade de maior número de estudos quanto a otimização da eficiência das biopilhas, pois os resultados obtidos demonstraram que o resíduo não foi totalmente biodegradado.

**Palavras-chave:** biodegradação; resíduo oleoso; petróleo; biorremediação; atividade microbiana; biopilhas.

## ABSTRACT

The potential of a biopile system to degradate oily residues from a petroleum refinery also called oil sludge was studied, as well as the possibility of its optimization through biostimulation (fertilizers addition) and bioaugmentation (inoculum addition). First, the biodegradability of the residue was verified through the Bartha flasks, quantifying the CO<sub>2</sub> emitted, observing the effects of the inoculum and fertilizer use in this process. The microorganisms used in the inoculum production were isolated from the landfarming of Refinery of Paulínia, REPLAN, São Paulo State, as they are adapted to the environmental stress provoked by the oily residue showed the capacity to degradate petroleum hydrocarbons in previous assays in laboratory. Five biopiles were built with the soil polluted by the oil sludge, they were constituted by: 1 experimental control, 2 with inoculum; 3 with inoculum and plant fertilizer; 4 with inoculum and rice straw; 5 with inoculum, fertilizer and rice straw. The results after 350 days showed a reduction of the residue quantity in all the biopiles: 67%, 70%, 75%, 82% and 79% in the biopiles 1, 2, 3, 4 and 5 respectively. The biopiles containing rice straw showed a faster degradation of the residue mainly during the first two months of this study, probably due to the higher number of microorganisms provoked by the addition of the inoculum or stimulation natural microorganisms. At the conditions of this study, the addition of the inoculum to the biopiles 2 and 3 did not survive in the new environment not influencing the residue degradation, as well as the fertilizer addition did not have any influence to the biopiles 3 and 5. It was clear the importance of the addition of materials and aggregated such as the rice straw, to improve the soil characteristics regarding to aeration and permeability contributing to accelerate the residue biodegradation. It is concluded that the biopile systems can be a potential technology for the treatment of oily residues of petroleum refineries and it can be used for the bioremediation of soils polluted by such compounds. It is proposed, however, the necessity of a higher number of studies regarding to the optimization of the biopiles efficiency, once the results obtained showed that the waste was not totally biodegraded.

**KEYWORDS:** biodegradation, oily waste, petroleum, bioremediation, microbial activity, biopiles.

## 1. INTRODUÇÃO

A espécie humana principalmente a partir do domínio do fogo vem modificando consideravelmente seu ambiente, com a única justificativa de obter um conforto constante. Principalmente nos dois séculos passados ocorreu um grande crescimento industrial que se estendeu aos dias atuais, apoiado pelo forte consumismo que acompanha o homem. Esta busca de conforto, porém, trouxe como consequência uma acelerada degradação ambiental, decorrente da transformação de matérias-primas em bens manufaturados, acarretando a produção de muitas substâncias indesejáveis que têm sido descartadas no solo, na água ou no ar.

Nas últimas décadas vem ocorrendo o aumento da preocupação com a deposição irresponsável de substâncias orgânicas, muitas vezes tóxicas, no ambiente. Tais substâncias não tratadas previamente e acumuladas poderão apresentar efeitos negativos sobre os seres vivos, incluindo o próprio homem. Como esta situação vem sofrendo aumento acelerado, há atualmente o despertar para a busca de metodologias eficientes para o descarte e tratamento de resíduos.

A atividade industrial, apesar de produzir menores quantidades de resíduos em relação ao esgoto doméstico, lança substâncias muito mais tóxicas, corrosivas, radioativas e outras. As refinarias de petróleo, assim como as demais indústrias de grande escala, são fontes potenciais de poluição ambiental devido à geração de grandes quantidades de resíduos durante as etapas de produção, transporte e refino. Atualmente, entretanto, grandes investimentos estão sendo voltados para programas de proteção do

ambiente entre eles, o acesso às tecnologias limpas, pesquisas e programas de educação ambiental.

O petróleo, um dos recursos energéticos mais utilizado neste século e no passado, é uma mistura complexa de compostos não-aquosos e hidrofóbicos como *n*-alcanos, aromáticos, asfaltenos e resinas (BALBA et al., 1998). O refinamento do petróleo é responsável pela produção de resíduos, dentre eles a borra de óleo, um resíduo oleoso que acarreta grave problema devido à dificuldade para a sua disposição final. A borra de óleo é uma emulsão basicamente composta por água, sólidos grosseiros, hidrocarbonetos e compostos de difícil biodegradação e seu manejo e reaproveitamento é dificultado em virtude de sua composição extremamente variável (URURAHY et al., 1998). Este resíduo pode poluir solos, sedimentos e água, sendo necessária sua remediação para minimizar seus impactos ambientais negativos e reduzir riscos à saúde humana (KIRCHMAN e EWENETU, 1998).

A biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo por populações naturais de microrganismos representa um dos mecanismos primários pelo quais estes poluentes são eliminados do ambiente. O alto custo energético envolvido no processo de incineração, além do potencial de poluição do ar e da ameaça da persistência de hidrocarbonetos poliaromáticos, assim como da inadequação da disposição de resíduos muito tóxicos em aterros sanitários, têm proporcionado a realização de várias pesquisas no intuito de desenvolver bioprocessos para o tratamento desse tipo de resíduo. O aparato metabólico dos microrganismos representa o caminho ecologicamente correto, além de ser economicamente viável, para que os resíduos oleosos de petróleo sejam biodegradados, antes que atinjam o ambiente ou para que sejam removidos do mesmo, minimizando seus impactos negativos quanto ao ambiente e à saúde. Diversos sistemas de biotratamento podem ser usados a fim de promover a degradação dos resíduos oleosos de petróleo, entre eles os sistemas de “landfarming”, compostagem e biopilhas, onde a biodiversidade do solo é utilizada para promover a biodegradação de resíduos perigosos (URURAHY et al., 1998).

O sistema de biopilhas é uma tecnologia que vem sendo adotada com grande sucesso por ser uma alternativa menos onerosa e mais efetiva do que as técnicas convencionais usadas para reduzir a poluição gerada por poluentes orgânicos. A tecnologia de biopilhas envolve a construção de células ou pilhas de solo poluído de

forma a estimular a atividade microbiana aeróbia dentro das mesmas, através de aeração mais eficiente. Os microrganismos degradam os hidrocarbonetos adsorvidos nas partículas de solo, reduzindo assim suas quantidades aí presentes. Tipicamente, as biopilhas são construídas sobre uma base impermeável para reduzir o potencial de migração dos lixiviados para o ambiente subsuperficial. As biopilhas podem ser recobertas por plástico para evitar a liberação de poluentes voláteis para a atmosfera, bem como para protegê-la das intempéries. Esta tecnologia opera muito bem em temperaturas acima de 10 °C sendo que a atividade microbiana dobra a cada 10 °C de incremento até o limite de 45 °C. Para o tipo de clima dominante no Brasil esta é uma grande vantagem (BITTAR, 2002).

A hipótese deste estudo situa-se no fato de que o uso de biopilhas pode ser uma metodologia eficiente para a biodegradação de resíduos de petróleo. Caso esta hipótese seja correta, o descarte de modo responsável deste resíduo contribuirá na minimização dos impactos ambientais negativos decorrentes da disposição dos mesmos nos recursos naturais renováveis, como solo, água e ar.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho consistiu em avaliar o desempenho do sistema de biopilhas na degradação de resíduos oleosos provenientes de refinaria de petróleo.

Os objetivos específicos foram:

- verificar previamente a biodegradabilidade do resíduo oleoso através do método respirométrico de Bartha;
- verificar o efeito de alguns fatores, como bioenriquecimento (adição de inóculo) e bioestimulação (adição de fertilizantes), para a aceleração da biodegradação do resíduo oleoso;
- verificar a contribuição de materiais adicionados às biopilhas (palha de arroz) que podem facilitar a permeabilidade e aeração das mesmas, durante a biodegradação do resíduo oleoso; e
- fornecer subsídios para que o sistema de biopilhas possa ser utilizado como tecnologia de biorremediação de solos poluídos por hidrocarbonetos de petróleo.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Petróleo: panorama geral

Os hidrocarbonetos incluem compostos formados por carbono e hidrogênio com propriedades químicas e físicas definidas pelo número de átomos e arranjo das moléculas. O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos que pode ser dividida em quatro frações: saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos. A fração dos compostos saturados inclui os n-alcenos, alcenos ramificados (isoalcenos) e cicloalcenos (naftenos). A fração aromática contém: hidrocarbonetos monoaromáticos voláteis tais como benzeno, tolueno e xileno; os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs); os nafteno-aromáticos; e compostos de enxofre, tais como tiofenos e dibenzotiofenos. As resinas e a fração asfalteno consistem de moléculas polares contendo nitrogênio, enxofre e oxigênio. As resinas caracterizam-se por serem sólidos amorfos dissolvidos no óleo, enquanto os asfaltenos apresentam-se como grandes moléculas coloidais, dispersas no óleo. A proporção destas frações no petróleo depende de fatores tais como fonte, história geológica, idade, migração ou alteração do mesmo (BALBA et al, 1998).

As necessidades da sociedade ao longo dos anos ditaram e ditam o mercado e, conseqüentemente, as fontes de energia que devem ser buscadas. Como exemplo deste fato, antes que o uso do automóvel fosse generalizado, o querosene foi o produto mais procurado devido sua utilização para iluminação das cidades, enquanto a gasolina era quase sem valor. Depois da década de 50 do século passado, a situação se inverteu e a

gasolina assumiu um papel de destaque dado o seu uso no transporte tendo um alto valor de mercado como os demais subprodutos do refino do petróleo. Assim, o petróleo se tornou uma fonte de energia economicamente viável em virtude do seu potencial de aplicação no mercado.

A produção média diária de petróleo no mundo é aproximadamente 75 milhões de barris, enquanto o total de reservas mundiais de petróleo está estimado em aproximadamente um trilhão de barris (OPEC - ORGANIZATION OF PETROLEUM EXPORTING COUNTRIES, 2003).

O Brasil ocupa a 18ª posição mundial na produção de petróleo, por produzir diariamente 1,3 milhões de barris (ou 488 milhões de barris/ano). Nos últimos dez anos, a produção desse recurso no país vem crescendo a uma taxa anual média de 8,2%. A maioria da produção nacional de petróleo é obtida a partir de campos marítimos, responsáveis por 83,4% do total produzido. O estado do Rio de Janeiro responde por 96,4% da produção marítima e por 80,4% da produção nacional, porém o Rio Grande do Norte é o maior produtor em terra, com 32,9% do total terrestre em relação ao nacional. O total de reservas nacionais é cerca de 8,5 bilhões de barris, estando 89,3% no mar (ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, 2003).

### **3.2 Poluentes ambientais**

Os poluentes ambientais podem ser definidos como substâncias químicas naturais ou sintéticas que ao serem liberadas no ambiente apresentam efeitos indesejáveis aos seres vivos e ao equilíbrio dos ecossistemas (SKLADANY e METTING, 1992). Os poluentes são principalmente resultados da atividade humana e são classificados em dois grupos: inorgânicos e orgânicos. Entre os poluentes inorgânicos estão os metais pesados como zinco, cádmio, mercúrio, cobre, alumínio e compostos como cianetos, sulfetos entre vários outros. Dentre os diversos tipos de poluentes orgânicos podem ser citados os pesticidas (inseticidas, fungicidas e herbicidas), os bifenilpoliclorados, solventes orgânicos clorados e derivados de petróleo.

Os poluentes orgânicos geralmente são classificados em biodegradáveis, persistentes ou recalcitrantes. Skladany e Metting (1992) citaram que os compostos

persistentes são aqueles que resistem à biodegradação em certas condições específicas, enquanto que os recalcitrantes são aqueles que realmente são resistentes à biodegradação. O ponto importante dessa definição é que não é possível provar a recalcitrância de um composto em todas as condições ambientais possíveis e um composto químico pode ser biodegradável mesmo que persista no ambiente. O termo xenobiótico também é utilizado para designar os compostos ambientalmente perigosos produzidos pelo homem em contrastes aos compostos biogênicos que ocorrem naturalmente no ambiente.

Diversos são os impactos ambientais acarretados por poluentes no solo, podendo a comunidade dos organismos ser afetada diretamente devido ao efeito tóxico dessas substâncias, ocorrendo mudanças no metabolismo, crescimento e desenvolvimento, longevidade e alterações genéticas. Alterações do equilíbrio ecológico no solo podem ocorrer como, por exemplo, mudanças nas taxas de natalidade, nas relações entre predador e presa com mudanças em toda a teia alimentar. Esses impactos não só prejudicam o equilíbrio e as populações de organismos do solo, mas também as funções dos ecossistemas terrestres (EDWARDS, 2002). As substâncias perigosas presentes no solo, também representam riscos potenciais para as águas subterrâneas e superficiais devido aos processos de lixiviação e erosão que os solos possam estar sujeitos.

Os hidrocarbonetos de petróleo, incluindo aqueles que são aromáticos policíclicos (PAHs), são considerados poluentes ambientais perigosos pela United States Environmental Protection Agency (USEPA) e por muitas outras organizações ambientais mundiais, pois representam riscos ao ambiente e à vida devido sua toxicidade e mutagênicidade, sendo necessárias medidas de preservação para evitar a presença desses compostos no ambiente.

### **3.3 Utilização de hidrocarbonetos de petróleo por microrganismos**

Biodegradação é a transformação de compostos orgânicos pela atividade metabólica dos organismos, especialmente microrganismos. Por ser o petróleo composto principalmente de hidrocarbonetos, a sua degradação completa resulta na produção de CO<sub>2</sub> e água, fenômeno denominado de mineralização. Quando um composto orgânico é convertido a outro composto com estrutura molecular diferente

ocorrendo a perda de alguma propriedade característica da substância inicial, tem-se a biotransformação.

Os microrganismos desempenham importante função na ciclagem de nutrientes na natureza. A mineralização de compostos orgânicos é essencial para a manutenção da vida na Terra, pois permite a liberação do carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo e outros elementos no estado inorgânico no ambiente. O conceito de que os microrganismos podem utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia é difundido há muito tempo. Em 1895, um estudo mostrou a degradação da parafina por fungo *Botrytis cinerea*. Desde então, o metabolismo de hidrocarbonetos tem sido extensivamente estudado (HIGGINS e BURNS, 1975). Espécies de microrganismos que degradam hidrocarbonetos estão amplamente distribuídas na natureza. Suas atividades são reguladas pelas condições ambientais de modo que para a ocorrência do processo degradativo é necessário que haja um estado de equilíbrio no ambiente.

A habilidade em degradar hidrocarbonetos não é restrita a apenas alguns gêneros de microrganismos, sendo vários os grupos de bactérias, fungos, actinomicetes e leveduras que têm demonstrado essa capacidade. Saono e Gandjar (1972) verificaram a habilidade de 18 linhagens de leveduras isoladas de solo, em utilizar hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia. Dessas 18 linhagens, uma foi identificada como sendo *Rhodotorula glutinis*, seis como *Candida parapsilosis*, e onze como *Candida tropicalis*. Este estudo também demonstrou que esses microrganismos possuíam diferentes preferências pelas diversas frações dos hidrocarbonetos.

Austin et al. (1977) isolaram várias linhagens de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos de ambientes aquáticos salinos poluídos e não poluídos por petróleo. A identificação destas bactérias revelou diversas linhagens de actinomicetes, bactérias pertencentes à família enterobacteriaceae e as bactérias *Klebsiella aerogenes*, *Micrococcus* sp., *Nocardia* sp., *Pseudomonas* sp. e *Sphaerotilus natans*.

Schaeffer et al. (1979) verificaram que de um total de 27 linhagens microbianas com a habilidade em degradar octano, apenas 9 apresentaram a capacidade de utilizar o composto ramificado dimetiloctano como única fonte de carbono e energia, revelando que a ramificação de hidrocarbonetos pode inibir sua biodegradação. Estes microrganismos com esta habilidade em degradar compostos ramificados pertenceram

aos gêneros bacterianos *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Pseudomonas* e aos gêneros fúngicos *Aspergillus*, *Cunninghamella* e *Eupenicilium*.

Werneck e Gontijo (1983) isolaram micobactérias de solo poluído com resíduos de refinaria, solo de jardim e esgoto e testaram suas habilidades em degradar os hidrocarbonetos heptadecano e hexadecano além de diesel e petróleo bruto. *Mycobacterium fortuitum* foi a espécie que apresentou melhor resultado quanto à degradação seguida da espécie *Mycobacterium trivilae*. Heitkamp et al. (1988) também isolaram uma linhagem bacteriana do gênero *Mycobacterium* de sedimentos marinhos altamente poluídos por derivados petrolíferos e verificaram que cultura pura desse microrganismo era capaz de mineralizar pireno, um hidrocarboneto aromático policíclico de quatro anéis aromáticos, além de outros como naftaleno, fenantreno, fluoranteno, 1-nitropireno e 6-nitrocriseno.

Os fungos *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* e *Bjerkanderan adusta* também apresentaram a capacidade em degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos antraceno e benzo(a)pireno sendo que esta última espécie degradou 99,2% e 83,1% dos hidrocarbonetos respectivamente mencionados em 28 dias (FIELD et al., 1992).

Cho et al. (1997) desenvolveram experimentos em escala de laboratório sobre a biorremediação de solo poluído por petróleo durante a guerra do Golfo em 1991 e verificaram que as frações saturadas de petróleo foram mais rapidamente degradadas comparadas às frações aromáticas pelos microrganismos isolados do local. As principais espécies de bactérias encontradas no solo biorremediado que supostamente foram as responsáveis por essa degradação foram *Rhodococcus* sp. e *Nocarida asteróides*.

Bactérias, fungos e leveduras são os principais agentes biotransformadores devido à habilidade em degradar uma ampla variedade de substâncias xenobióticas, normalmente encontradas em resíduos de indústrias de óleo (URURAHY et al., 1998). Bactérias e leveduras aparentam ser os principais responsáveis pela degradação dos hidrocarbonetos em ambientes aquáticos enquanto que fungos e bactérias são dominantes no solo (HANSON, 1997 apud BALBA et al., 1998).

Nas últimas décadas o aumento de acidentes, envolvendo transporte de petróleo e seus derivados com a conseqüente contaminação do ambiente por esses compostos, resultou em pesquisas que objetivaram isolar e identificar microrganismos com a

capacidade de degradar hidrocarbonetos de petróleo para uma eventual utilização em processos de recuperação das áreas poluídas.

Palittapongarnpim et al. (1998) isolaram duas linhagens de leveduras de solos contaminados por óleo e foram identificadas como *Candida tropicalis*. Estas duas linhagens mostraram ser capazes de degradar óleo cru, porém com diferentes capacidades. A linhagem mais eficiente degradou 87,3% do petróleo total sendo que 99,6% dos n-alcenos foram degradados. Isso demonstrou que diferentes linhagens de uma mesma espécie de microrganismo podem apresentar diferenças na habilidade em degradar hidrocarbonetos de petróleo

Yateem et al. (1998) relataram que basidiomicetos responsáveis pela podridão branca da madeira podem ser utilizados nos processos de biorremediação devido a sua capacidade em degradar compostos que não são facilmente utilizados por bactérias. Esta habilidade é devido à produção de enzimas extracelulares de baixa especificidade conhecidas como peroxidases que são responsáveis pela despolimerização oxidativa da lignina, e podem atacar os compostos orgânicos poluentes que apresentam estrutura química semelhante a este composto da madeira. Estas enzimas peroxidases geralmente são produzidas durante o metabolismo secundário desses fungos sob condições nutricionais limitadas. Estes autores testaram a habilidade dos fungos *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* e *Coriolus versicolor* em degradar óleo em solos poluídos e constataram que esta última espécie diminuiu a concentração de óleo de 32g/kg para 7g/kg de solo em doze meses, sendo a maior taxa de degradação obtida.

Ururahy et al. (1998) estudaram a viabilidade técnica do tratamento biológico de borra oleosa em escala de bancada. A partir de estímulo de microrganismos nativos presentes no resíduo oleoso, concluíram que os mesmos foram capazes de crescer em meio contendo borra de óleo como única fonte de carbono e energia. A identificação desses microrganismos revelou a presença das bactérias *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas picketti*, *Flavobacterium indologenes*, *Xanthomonas maltophilia* e *Ochrobactrum anthropi*, das leveduras *Candida tropicalis* e *Rhodotorula mucilaginosa*, além de duas espécies de fungos filamentosos.

Chaîneau et al. (1999) identificaram bactérias como *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Sphingomonas*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter* e *Corynebacterium*, e os fungos *Aspergillus*, *Penicillium*, *Beauveria*, *Acremonium*,

*Cladosporium*, *Fusarium* e *Trichoderma* como degradadores de hidrocarbonetos de petróleo. Todos esses microrganismos foram isolados de solo de agroecossistemas.

Li et al. (2000) isolaram bactérias como *Xanthomonas*, *Bacillus* e *Hyphomicrobium* de área poluída por petróleo a mais de 25 anos, verificando que estas eram potencialmente degradadoras de hidrocarbonetos. Barathi e Vasudevan (2001) isolaram uma linhagem de *Pseudomonas fluorescens*, também de solo poluído por petróleo, com capacidade em degradar várias frações de hidrocarbonetos.

Após um acidente no mar do Japão, em 1997, envolvendo um petroleiro russo transportando óleo pesado, Chaerun et al. (2004) iniciaram estudos sobre biorremediação do local impactado. Após cinco anos desse acidente e com possível adaptação das linhagens à toxicidade do óleo, esses autores isolaram trinta e nove linhagens de bactérias capazes de utilizarem hidrocarbonetos, como única fonte de carbono e energia, das áreas poluídas pelo óleo. Somente sete linhagens, contudo, foram capazes de degradar significativamente óleo pesado, ou seja, alcanos de cadeia longas. Todavia essas linhagens não foram eficientes quanto à degradação de compostos aromáticos. A análise do DNA ribossômico dessas linhagens demonstrou que cinco delas apresentaram 99% de similaridade com *Pseudomonas aeruginosa*, uma espécie apresentou 99% de similaridade com *Bacillus cereus* ou *Bacillus thuringiensis* e outra, 97% de similaridade com *Paracoccus seriniphilus* ou *Paracoccus marcusii*.

Outros gêneros de microrganismos também foram descritos como potenciais degradadores de hidrocarbonetos. Bactérias pertencentes aos gêneros *Gordonia*, *Brevibacterium*, *Aeromicrobium*, *Dietzia*, *Burkholderia* e *Mycobacterium*, fungos pertencentes ao gênero *Amorphoteca*, *Neosartorya*, *Paecilomyces*, *Talaromyces* e *Graphium* além das leveduras *Yarrowia* e *Pichia* (CHAILLAN et al., 2004).

Yu et al. (2005) estudaram a biodegradação de uma mistura de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) constituídos de fluoreno, fenantreno e pireno por um consórcio microbiano isolado de sedimento de mangue afetado por descargas industriais e esgotos domésticos. Os estudos de biodegradação foram conduzidos em meios líquidos cuja concentração de cada PAHs utilizado foi de 10mg/L. O consórcio constituído por bactérias *Rhodococcus* sp., *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas* sp. degradou 100% do fluoreno e do fenantreno em quatro semanas, enquanto que a

completa degradação do pireno ocorreu em maior tempo indicando a preferência desse consórcio bacteriano em utilizar PAHs de menor peso molecular.

Microrganismos com habilidade em utilizar hidrocarbonetos de petróleo podem ser encontrados em áreas poluídas ou áreas que não tiveram contato prévio com esses poluentes. A quantidade de microrganismos, porém, que apresentam essa habilidade geralmente é maior no local que foi impactado. Além disso, nas áreas expostas a esses poluentes, a condição de estresse ocasionada pode selecionar melhores linhagens com habilidade em degradar tais compostos. Os microrganismos presentes em solo poluído por hidrocarbonetos de petróleo provavelmente estão adaptados a esse ambiente e podem utilizar este poluente como fonte de carbono e energia. Segundo Rosato (1997), o processo de adaptação dos microrganismos ocorre através de três mecanismos inter-relacionados: indução e/ou desrepressão de enzimas específicas, mudanças genéticas que resultam na aquisição de novas atividades metabólicas e enriquecimento seletivo de organismos capazes de transformar os compostos.

O uso de culturas mistas de microrganismos eucariotos e procariotos pode ser mais eficiente na biodegradação do petróleo, por ser este uma mistura complexa de compostos (BALBA, et al., 1998). Muitos trabalhos quanto a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo demonstraram o uso de consórcio de microrganismos (LAZAR et al., 1999; JØRGENSEN et al. 2000; LI et al., 2000; MISHRA et al., 2001; VASUDEVAN e RAJARAM, 2001), pois, a capacidade biodegradativa deste é maior quantitativamente e qualitativamente quando comparado com a cultura pura. A comunidade mista pode também apresentar maior resistência frente às substâncias tóxicas, pois é maior a probabilidade de que um organismo que tenha a capacidade de detoxificá-las estar presente. Finalmente, sendo o petróleo e seus resíduos macromoléculas, a utilização de culturas mistas permite uma sucessão de ataques aos mesmos, proporcionando no final uma completa degradação do poluente (GRADY, 1985 apud KATAOKA, 2001).

### **3.4 Biodegradação das frações do petróleo**

Os produtos derivados do petróleo quando liberados no ambiente ficam sujeitos a numerosos processos que podem alterar sua composição. Os compostos altamente

voláteis podem sofrer evaporação, os compostos solúveis na água podem ser dispersos e penetrar no solo, e pode ocorrer ainda a oxidação química, fotooxidação e a biodegradação (TROY et al., 1994 apud KATAOKA, 2001). A biodegradabilidade dos hidrocarbonetos depende primeiramente da estrutura química do composto, mas também é influenciada fortemente pelo seu estado físico e sua toxicidade, sendo que a susceptibilidade ao ataque microbiano difere entre os vários tipos de hidrocarbonetos. Segundo Galli (1994) o cometabolismo é outro mecanismo importante na biodegradação de compostos recalcitrantes, incluindo hidrocarbonetos de petróleo, sendo definido como a transformação de um substrato pelo microrganismo sem, contudo, este último utilizá-lo como fonte de carbono e energia.

A principal via metabólica de biodegradação de hidrocarbonetos já foi elucidada. O passo inicial para a biodegradação de hidrocarbonetos por bactérias e fungos envolve a oxidação do substrato por oxigenases com a utilização de oxigênio molecular. Os alcanos geralmente são convertidos a ácidos carboxílicos que posteriormente são biodegradados pelo processo de  $\beta$ -oxidação. A biodegradação dos compostos aromáticos requer uma reação de dihidroxilação com a formação de diols, seguida da clivagem do anel e a formação de catecol que posteriormente é degradado em intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico. Os fungos formam *trans*-diols, e muitos destes são potentes carcinogênicos, enquanto que bactérias quase sempre formam *cis*-diols que não são biologicamente ativas (ATLAS, 1995). Os passos metabólicos para a degradação dos componentes asfálticos são menos compreendidos. Eles são complexos na sua estrutura e de difícil análise e supõe-se que tais moléculas são inertes para biodegradação (ROSATO, 1997).

Em muitos casos os genes responsáveis pela degradação de hidrocarbonetos presentes nas bactérias estão localizados em plasmídeos. Quando um ambiente é poluído com petróleo a tendência é ocorrer um aumento na proporção das populações bacterianas que possuem este tipo de material genético (ATLAS, 1995). Segundo Yateem et al. (1998) as bactérias necessitam que suas enzimas sejam induzidas pelos poluentes ambientais, incluindo os hidrocarbonetos, para que ocorra a biodegradação, ao contrário de alguns fungos, principalmente aqueles da podridão branca da madeira, que não requer contato prévio com o poluente uma vez que a produção das enzimas são induzidas pelo estado nutricional do ambiente. As bactérias podem ainda, terem suas

enzimas reprimidas como consequência da degradação do poluente a níveis que são incapazes de induzi-las, ao contrário dos fungos que podem apresentar a capacidade de degradar o poluente mesmo em baixas concentrações.

Durante a degradação do petróleo e seus resíduos, seus compostos não são degradados completamente restando aqueles que são mais recalcitrantes e muitas vezes inertes ao ambiente, ou seja, aqueles que não apresentam efeitos tóxicos. Os alcanos com número de carbono variando de  $C_{10}$  a  $C_{26}$  são prontamente degradados assim como os compostos tóxicos monoaromáticos benzeno, xileno e tolueno. Os compostos com estruturas mais complexas, ou seja, aqueles de cadeia longa, ramificados ou com anéis aromáticos condensados, são mais resistentes à biodegradação (ATLAS, 1995). Geralmente, as bactérias e leveduras demonstram decréscimo na capacidade de degradação de alcanos com o aumento do tamanho da cadeia, enquanto que os fungos filamentosos parecem ser mais hábeis em degradar ou transformar hidrocarbonetos de estrutura complexa e de cadeia longa. O metabolismo de fungos geralmente resulta em degradação incompleta, sendo necessária a associação de bactérias para alcançar a completa oxidação do composto (RISER-ROBERTS, 1992 apud KATAOKA, 2001).

Os compostos aromáticos com um, dois ou três anéis aromáticos são degradados facilmente e há linhagens capazes de degradar compostos com até cinco anéis aromáticos. Entretanto, a persistência desses compostos no ambiente aumenta com o aumento do número de anéis aromáticos. Compostos com mais de quatro anéis aromáticos não são utilizados como substrato para o crescimento microbiano sendo que sua transformação ocorre através do cometabolismo (GALLI, 1994).

### **3.5 Biorremediação**

Diversas substâncias tóxicas podem poluir os solos afetando negativamente suas funções ecológicas. A poluição de solos por hidrocarbonetos de petróleo pode ser resultado de derramamentos acidentais (rupturas de oleodutos, acidentes durante transporte e outros), deposição aérea devido à combustão de compostos oleosos ou através da disposição de resíduos oleosos sob condições controladas.

Uma grande variedade de métodos físicos e químicos estão disponíveis para a recuperação de solos poluídos por substâncias perigosas, entre elas os hidrocarbonetos

de petróleo. Processos como incineração, extração de vapores do solo, recuperação de produto livre, extração com solvente, lavagem do solo, degradação química e barreiras físicas podem ser utilizados para essa finalidade. Muitos desses métodos, entretanto, apresentam elevados custos e nem sempre promovem uma completa destruição dos poluentes (BALBA et al., 1998).

A tecnologia de biorremediação tornou-se importante para a restauração de ambientes poluídos por resíduos de petróleo, pois utiliza a capacidade dos microrganismos em biodegradar ou biotransformar as mais diversas substâncias perigosas (DIBBLE e BARTHA, 1979; GENOUW et al., 1994; ATLAS, 1995; BALBA et al., 1998; MACNAUGHTON et al., 1999; RHYKERD et al., 1999; MISHRA et al., 2001; VASUDEVAN e RAJARAM, 2001; RAHMAN et al., 2003). A biorremediação possui a vantagem de ser um processo natural que promove a destruição ou a transformação a produtos inócuos de muitos poluentes ambientais. Desde as duas décadas passadas, as estratégias de biorremediação têm sido adotadas como uma metodologia eficaz e de baixo custo para a remediação de solos poluídos por petróleo e de outros compostos orgânicos evitando proporcionar maiores distúrbios na área ambientalmente impactada.

Quando hidrocarbonetos de petróleo atingem o ambiente, a microbiota nativa pode iniciar um processo de limpeza do local através da biodegradação desses compostos, processo que é denominado de atenuação natural. Durante a biorremediação de ambientes poluídos dois procedimentos podem ser utilizados com o intuito de acelerar o processo natural de biodegradação do poluente: a bioestimulação e o bioenriquecimento, também chamado de bioaumento. Ambos possuem o objetivo de criarem condições favoráveis para que ocorra aumento da comunidade microbiana com conseqüente acréscimo das atividades metabólicas envolvidas na degradação dos poluentes. A bioestimulação consiste no controle de fatores abióticos para que ocorra o aumento da taxa de biodegradação do poluente por microrganismos indígenas, seja pela adição de nutrientes inorgânicos (normalmente nitrogênio e fósforo), aceptores de elétrons (oxigênio ou outros) ou substratos orgânicos. O bioenriquecimento visa incrementar a capacidade biodegradadora das áreas poluídas pela inoculação de microrganismos com habilidades catalíticas desejáveis para a degradação do poluente (BALBA et al., 1998).

Quando o bioenriquecimento é adotado para a recuperação de áreas poluídas, torna-se necessário determinar se o microrganismo a ser utilizado possui a capacidade em degradar o poluente e qual o tempo necessário para que isto ocorra (GEERDINK et al., 1996). Dessa maneira, segundo Melo e Azevedo (1997), o sucesso de um programa de biorremediação de áreas poluídas dependerá, em parte, de um bom planejamento inicial sobre isolamento e seleção de um microrganismo ou consórcio de microrganismos eficientes na degradação do poluente em questão. O isolamento dos microrganismos pode permitir o detalhamento das vias metabólicas, enzimas, produtos intermediários e outras etapas do processo em estudo.

Os estudos prévios envolvendo a medida da taxa de mineralização através da produção de CO<sub>2</sub> podem fornecer importantes informações sobre a biodegradabilidade de hidrocarbonetos em solos poluídos. Esta metodologia tem sido eficiente para o aperfeiçoamento das técnicas de biorremediação a serem adotadas, pois fornecem resultados rápidos, podendo ser testadas diversas opções como, por exemplo, a adição de nutrientes e de microrganismos (BALBA et al., 1998). Sabaté et al. (2004) citaram que o desenvolvimento de um protocolo experimental envolvendo estudos laboratoriais permitirá conclusões sobre o sucesso da aplicação da tecnologia de biorremediação para uma área poluída específica.

A biorremediação de uma área degradada pode ser realizada por processo *in situ* ou *ex situ*. No primeiro a remediação biológica é aplicada diretamente no local poluído, ao contrário dos processos *ex situ*, em que o meio impactado é removido e tratado em qualquer outro local. A análise da evolução da biodegradação de hidrocarbonetos, principalmente em processos *in situ*, é mais difícil quando comparada aos estudos realizados em laboratórios. A determinação da concentração residual de hidrocarbonetos pode ser complexa uma vez que sua distribuição no ambiente é tipicamente heterogênea, requerendo um alto número de amostras para a obtenção de resultados satisfatórios. Além do monitoramento das concentrações do poluente no solo a ser biorremediado, alguns parâmetros biológicos também podem ser pesquisados como a respiração do solo (consumo de O<sub>2</sub> e produção de CO<sub>2</sub>), biomassa, atividade enzimática e contagem de microrganismos, todos com o mesmo objetivo de monitorar a evolução da biorremediação (MARGESIN et al., 2000).

O sistema de biopilhas é uma tecnologia *ex situ* de biorremediação, no qual pilhas de solo poluído são construídas com o objetivo de acelerar o processo biodegradativo do poluente. As biopilhas quando comparadas às tecnologias *in situ*, apresentam a vantagem da facilidade da manipulação dos fatores ambientais que influenciam a biodegradação do poluente (SCHOEFS et al., 1998). Além disso, as biopilhas de solo poluído são construídas sobre uma base impermeável evitando a lixiviação do contaminante e conseqüente poluição das águas subterrâneas. Condições ambientais como concentração de oxigênio, umidade, concentração de nutrientes e pH são controlados para aumentar a atividade da comunidade microbiana (KODRES, 1999). Jørgensen et al. (2000) relataram que no caso de ocorrer adição de matéria orgânica às biopilhas, o processo passa ser compostagem. Segundo esses autores, os solos poluídos geralmente são pobres em matéria orgânica apresentando baixa atividade microbiana. Dessa maneira, a taxa de biodegradação do poluente pode ser afetada negativamente.

A utilização do sistema de biopilhas para a biorremediação de muitos poluentes orgânicos tem resultado em sucesso especialmente para hidrocarbonetos de petróleo (JØRGENSEN et al., 2000). Li et al. (2002) estudaram a remediação de solo poluído por hidrocarbonetos de petróleo através de biopilhas que receberam excremento de frango para suplementação de nutrientes e palha de arroz como material que melhoram as características do solo quanto à aeração. Durante 53 dias de operação, 38% a 57% do total do óleo presente no solo foi biodegradado. Esses autores concluíram que o sistema de biopilhas apresentou-se como uma tecnologia eficiente de biorremediação de baixo custo.

Estudos de remediação de solo poluídos por outros poluentes orgânicos, através do sistema de biopilhas, também têm apresentado bons resultados. Miller et al. (2004) obtiveram redução de 76% da concentração inicial de pentaclorofenol de solo poluído, tratado pelo sistema de biopilhas após a adição de resíduos sólidos municipais, concluindo que tal sistema é eficaz para remediação de solo poluído por esse poluente.

### **3.6 Principais fatores ambientais que afetam a biodegradação de hidrocarbonetos**

Verifica-se que além dos microrganismos com a habilidade em degradar hidrocarbonetos de petróleo, diversos fatores ambientais influenciam este processo. Os mais importantes são a temperatura, concentração de oxigênio, umidade, pH, nutrientes inorgânicos e a biodisponibilidade e concentração desse poluente.

A temperatura atua tanto na natureza física e química dos hidrocarbonetos de petróleo, como pela alteração das populações microbianas. A biodegradação dos hidrocarbonetos pode ocorrer em uma faixa grande de variação de temperatura, entre 0 a 70°C. Em geral, a baixa temperatura acarreta aumento da viscosidade do óleo e a volatilização dos alcanos de cadeias curta é reduzida, o que leva a um processo mais lento, devido à redução na atividade enzimática. Tipicamente o metabolismo dos hidrocarbonetos é máximo à temperatura de 30-40°C (ROSATO, 1997). Ferguson et al. (2003) verificaram o efeito da temperatura na mineralização de petróleo em sedimentos coletados da Antártida e demonstraram que existe uma correlação positiva entre eles. Em temperaturas próximas ao ponto de congelamento da água foi verificado a ausência da mineralização dos hidrocarbonetos do petróleo enquanto que a 37°C e 42°C foram observadas as maiores taxas de mineralização o que surpreendeu os pesquisadores pois os microrganismos presentes no sedimento apresentaram temperaturas ótimas de crescimento entre 20 e 30°C.

A quantidade de oxigênio é outro fator importante na biorremediação de solos poluídos por resíduos de petróleo, pois geralmente este processo é aeróbio. Conseqüentemente, uma baixa concentração de oxigênio afeta a mineralização dos hidrocarbonetos pelos microrganismos. Ururahy et al. (1998) estudaram o efeito da aeração na biodegradação de resíduos oleosos de petróleo através da evolução de gás carbono e constataram que a interrupção do fornecimento de O<sub>2</sub> foi acompanhada por queda drástica na produção do CO<sub>2</sub> provavelmente devido ao decréscimo da atividade microbiana. A degradação inicial dos hidrocarbonetos de petróleo frequentemente requer a ação de enzimas oxigenases, fato que torna o processo biodegradativo dependente do oxigênio molecular (ATLAS, 1991 apud CHAERUN et al., 2004). Dessa maneira, muitos estudos envolvendo as biopilhas como tecnologia de

biorremediação têm sido realizados com a injeção de ar através de tubulações para suprir a necessidade de oxigênio o que pode ser financeiramente dispendioso. Uma alternativa é a utilização de materiais ou agregados que aumentam a aeração do solo.

Tais materiais ou agregados são adicionados ao solo poluído com a finalidade de aumentar a permeabilidade, aeração e facilitar o contato da água e dos nutrientes com os microrganismos obtendo acréscimo da atividade dos mesmos. Esses materiais, geralmente serragem, palhas e cascas de origem vegetal, possuem baixa densidade e aumentam a porosidade e difusão do oxigênio no solo. Rhykerd et al. (1999) estudaram o impacto desses tipos de materiais na remediação de solos poluídos por hidrocarbonetos concluindo que houve aumento da biodegradação e assim, reduzindo o tempo necessário para a biorremediação. Meysami e Baheri (2003) verificaram que esses tipos de materiais podem permitir o crescimento e penetração de fungos ligninolíticos no solo poluído, pois serve de substratos a esses microrganismos que passam a secretar enzimas responsáveis pela despolimerização da lignina e que podem biodegradar compostos poluentes como os hidrocarbonetos.

Valores extremos de pH são inibitórios para grande maioria dos processos de degradação microbianos. Este parâmetro assim como a umidade podem afetar a degradação dos hidrocarbonetos, pois estão diretamente relacionados ao metabolismo dos microrganismos. A adição de fertilizantes também favorece a biorremediação. O estado nutricional deve ser balanceado, propiciando uma boa relação entre carbono, fósforo e nitrogênio para o desenvolvimento dos microrganismos. Segundo Atlas (1995) durante a biorremediação de um derramamento de óleo em águas marinhas, a taxa de biodegradação aumentou de 3 a 5 vezes após a aplicação de fertilizantes. Margesin e Schinner (2001) compararam a biorremediação de solo poluído por óleo diesel com concentração inicial de 2612 mg/kg de solo através da atenuação natural e bioestimulação por fertilizantes e verificaram redução de aproximadamente 70% no solo bioestimulado enquanto que no solo não tratado a redução foi de 50%. Estes autores relataram ainda que no solo que recebeu fertilizantes, o número de microrganismos, a respiração do solo e as atividades das enzimas catalase e lipase tiveram aumento significativo estando correlacionados com a diminuição da concentração de hidrocarbonetos. Gallego et al. (2001) e Gogoi et al. (2003) também demonstraram que

a biorremediação de solos poluídos por hidrocarbonetos de petróleo pode ser acelerada com a adição de fertilizantes.

A biodisponibilidade dos hidrocarbonetos refere-se ao grau com que este composto pode ser obtido e utilizado pelos microrganismos. Suas propriedades físicas e químicas são responsáveis pelo seu transporte e sorção no solo além de interações com a matéria orgânica o que pode dificultar seu acesso pelos microrganismos. A concentração de hidrocarbonetos no solo é outro fator que influencia a degradação do mesmo. Dibble e Bartha (1979) citaram que freqüentes aplicações de pequenas quantidades de resíduos oleosos de refinaria favorecem a biodegradação, ao contrário de uma única aplicação em grande quantidade. Além disso, esses autores constataram que a aplicação de 5% (m/m) do resíduo oleoso no solo, resultou em maiores taxas de biodegradação de todas as classes de hidrocarbonetos presentes no mesmo. Ururahy et al. (1998) estudaram a biodegradação de resíduos oleosos de petróleo em meio líquido e verificaram que a eficiência da biodegradação no meio contendo 5% (v/v) de resíduo foi maior do que a eficiência da biodegradação no meio contendo 10% (v/v) do mesmo. Estes resultados foram relacionados ao maior número de microrganismos presente no meio com menor concentração de resíduo e os autores concluíram que em altas quantidades, as populações microbianas podem sofrer inibição pelo efeito tóxico do resíduo. Plaza et al. (2005) também obtiveram resultados relacionando altas concentrações de hidrocarbonetos ao aumento da toxicidade do meio poluído. Neste presente estudo, todos estes fatores ambientais foram considerados no intuito de acelerar a biodegradação do resíduo em pauta.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Inóculo

Os microrganismos utilizados para a elaboração do inóculo durante o bioenriquecimento das biopilhas foram isolados do “landfarming” da REPLAN (figura 1), município de Paulínia, SP e identificados previamente por Kataoka (2001). Este “landfarming” é utilizado pela refinaria para a disposição e tratamento do resíduo oleoso sendo constituído de oito células de disposição que são usadas em sistemas de rotação. Os microrganismos isolados consistem em sete linhagens de fungos identificadas como *Trichoderma pseudokoningii*, *Eurotium amstelodami*, *Aspergillus flavus*, *Pseudallescheria boydii*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus terreus* e *Cylindrocarpon didymum* e seis linhagens de bactérias sendo uma identificada como *Acinetobacter baumannii*, três como *Ochrobactrum anthropi*, uma como *Bacillus cereus* e uma linhagem não identificada pelos padrões taxonômicos tradicionais.



**Figura 1.** Foto do “landfarming” da REPLAN utilizado para a disposição do resíduo oleoso.

#### **4.1.2 Solo**

O solo utilizado na construção das biopilhas foi coletado até 50 cm de profundidade na Floresta Estadual “Navarro de Andrade” segundo a Norma Técnica L6.245 – “Solos. Coleta e preparação de amostras. Procedimentos” (CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL, 1984).

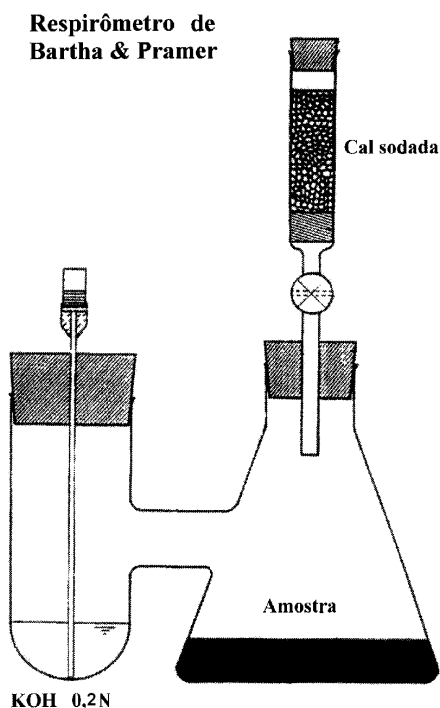
#### **4.1.3 Resíduo oleoso**

O resíduo oleoso foi proveniente do fundo dos tanques de estocagem e das unidades de tratamento de efluentes da Refinaria de Paulínia, REPLAN, SP.

#### **4.1.4 Respirômetro de Bartha**

Em uma fase inicial, antes da montagem das biopilhas, verificou-se em laboratório a biodegradabilidade do resíduo no solo utilizado neste estudo, assim como a contribuição da adição de inóculo e de fertilizante no aumento da taxa de biodegradação, através de respirômetros desenvolvidos por Bartha e Pramer (1965). O

respirômetro de Bartha (figura 2) é um sistema fechado, constituído de duas câmaras interligadas, onde se pode quantificar o  $\text{CO}_2$  produzido durante a biodegradação do resíduo.



**Figura 2.** Esquema de um respirômetro de Bartha e Pramer (1965).

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Avaliação da biodegradabilidade do resíduo oleoso através do método respirométrico de Bartha.

O ensaio para verificar a biodegradabilidade do resíduo oleoso foi realizado de acordo com a Norma Técnica L6.350 – “Solos – Determinação da Biodegradação de Resíduos – Método Respirométrico de Bartha” (CETESB, 1990). Através da medida do  $\text{CO}_2$  evoluído, a porcentagem de resíduo degradado foi calculada. O  $\text{CO}_2$  foi capturado em 10mL de solução de KOH 0,2N que foi trocada em períodos fixados a partir de resultados obtidos. A quantificação do  $\text{CO}_2$  evoluído foi realizada através da titulação do KOH retirado do respirômetro acrescido de 1mL de  $\text{BaCl}_2$  1N e 2 gotas de fenolftaleína com HCl 0,1N utilizando a seguinte equação:

$$\text{mg CO}_2 = (A - B) \times 50 \times f_{\text{HCl}} \times 0,044$$

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  $\mu\text{mol}$  de  $\text{CO}_2$

0,044 = fator para transformar  $\mu\text{mol}$  em mg de  $\text{CO}_2$

$f_{\text{HCl}}$  = fator de correção HCl 0,1N

O solo foi misturado com o resíduo na proporção de 5% (m/m), após o teor de umidade ser corrigido para 70%. Após a homogeneização, 50g da mistura solo/resíduo foram adicionadas em cada respirômetro, e estes foram incubados por 133 dias a 28°C de temperatura. Os diferentes tratamentos foram realizados em triplicata. Em um dos tratamentos foram adicionados 2mL do inóculo constituídos das bactérias e fungos isolados do “landfarming” da REPLAN já mencionados anteriormente e em outro tratamento além do inóculo, fertilizante foi acrescentado na mesma quantidade adicionada nas biopilhas, ou seja, 20g/kg solo. Para a produção do inóculo, efetuaram-se suspensões das espécies de bactérias padronizando-as junto ao tubo 8 da escala de Macfarland enquanto que para os fungos foram efetuadas suspensões de esporos padronizados a  $10^7/\text{mL}$  em câmara de Neubauer. Após, 3mL de cada suspensão de microrganismos foram adicionados em enlermayer de 125mL, formando o inóculo utilizado. Foram feitos dois controles, um utilizando somente solo e outro utilizando solo/resíduo.

A quantidade de  $\text{CO}_2$  devido à biodegradação do resíduo foi determinada através da subtração da quantidade de  $\text{CO}_2$  produzida no respirômetro contendo solo pela quantidade de  $\text{CO}_2$  produzida nos tratamentos. Segundo a norma, admite-se que 50% do carbono biodegradado transforma-se em  $\text{CO}_2$  e 50% é incorporado à biomassa ou na forma de húmus. Dessa maneira o carbono biodegradado foi calculado segundo a equação:  $C_b$  (mg de C) = 2 x  $\text{CO}_2$  (mg  $\text{CO}_2$ ) produzido.

## 4.2.2 Construção das biopilhas

### 4.2.2.1 Preparo da mistura solo/resíduo

O solo coletado foi peneirado para retirada das raízes, “torrões de solo” e pedras em malha 4,0 mm, aproximadamente. Após este procedimento, este foi misturado com aproximadamente 5% (m/m) do resíduo oleoso até a obtenção de uma homogeneização.

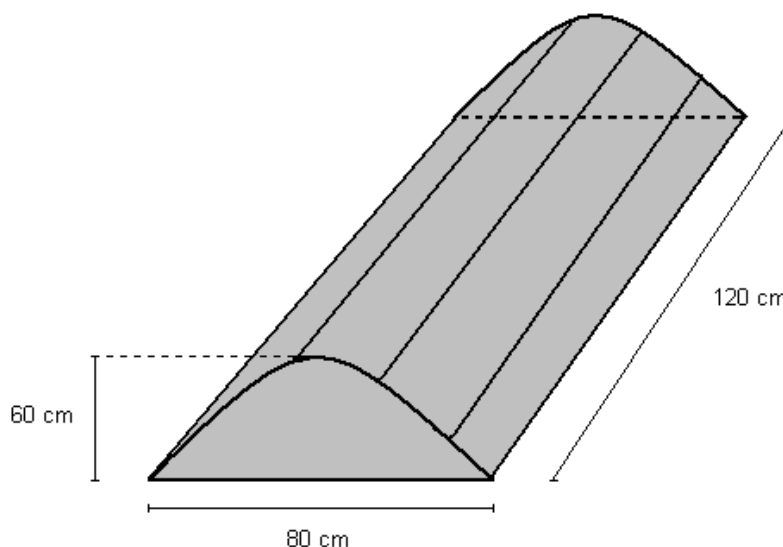
### 4.2.2.2 Montagem das biopilhas

Foram construídas 5 biopilhas, segundo o protocolo experimental descrito na tabela 1.

**Tabela 1.** Protocolo experimental da construção das biopilhas.

Biopilha nº	Solo + Resíduo 5% (m/m) do resíduo	Inóculo	Fertilizante	Palha de arroz
1	+	-	-	-
2	+	+	-	-
3	+	+	+	-
4	+	+	-	+
5	+	+	+	+

As biopilhas foram construídas sobre uma lona plástica para a impermeabilização do local evitando assim, a lixiviação dos poluentes para o ambiente subsuperficial. A dimensão das biopilhas foi de 120 cm de comprimento, 80 cm de largura e 60 cm de altura (figura 3), mantidas por molduras de madeira retangulares que envolviam as mesmas.



**Figura 3.** Esquema da montagem das biopilhas.

As biopilhas foram construídas na estufa de vegetação nas dependências do Centro de Estudos Ambientais (CEA) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Rio Claro. Nas biopilhas 3 e 5 adicionou-se fertilizante para plantas, 20g/Kg de solo, cuja composição era constituída de 10% de nitrogênio total, 10% de  $P_2O_5$  e 10% de óxido de potássio. Sua concentração foi calculada de acordo com análises prévias realizadas no solo e no resíduo de modo que a relação entre C e N fosse 30 : 1. Nas biopilhas 4 e 5 palha de arroz foi acrescida na proporção de 1 : 15 de solo.

A princípio os experimentos foram realizados com as biopilhas descobertas visando o aumento da aeração nas mesmas uma vez que o processo de biodegradação dos hidrocarbonetos é principalmente aeróbio. A partir do 215º dia de experimento, entretanto, as biopilhas foram recobertas por uma lona plástica preta com o intuito de otimizar umidade e temperaturas mais elevadas.

#### 4.2.2.3 Inóculo adicionado nas biopilhas

Os microrganismos isolados do “landfarming” foram previamente ativados em meio mineral BHS (BUSHNELL – HASS, 1941 apud KATAOKA, 2001) (ANEXO) adicionado de vaselina, como única fonte de carbono, para verificar seus respectivos potenciais em degradar hidrocarbonetos. Para a produção do inóculo, 100g de solo/resíduo (5% m/m) foram agitados juntamente com 1.000mL de água destilada por

24 horas, obtendo um extrato que foi acrescido com glicose (0,5%) e que serviu de substrato para o crescimento dos microrganismos. A utilização deste extrato de solo/resíduo como substrato teve a finalidade de induzir a adaptação prévia dos microrganismos às condições oferecidas pelo resíduo, no intuito de diminuir o tempo da mesma quando o inóculo fosse adicionado nas biopilhas estudadas.

Efetuar-se suspensões das bactérias isoladas do “landfarming” que foram padronizadas junto ao tubo 8 da escala de Macfarland e a partir dessas suspensões adicionou-se 1mL de cada uma em enlermayers de 250mL adicionado de 100mL do extrato de solo. Esses frascos foram mantidos sob agitação a 150 rpm por 3 dias, a 37°C. Os mesmos procedimentos foram usados para os fungos isolados do “landfarming”, porém as suspensões de esporos foram padronizadas a  $10^7$ /mL em câmara de Neubauer e os frascos foram mantidos sob agitação a 150 rpm por 5 dias, a 28°C. Após estes tempos, as suspensões dos fungos e das bactérias foram misturadas obtendo o inóculo de cultura mista e adicionou-se aproximadamente 50mL/kg de solo do mesmo nas biopilhas estudadas excetuando a biopilha 1, controle do experimento. Durante o período de estudo foram realizadas inoculações no 1º e no 215º dia de experimento.

### **4.2.3 Monitoramento das biopilhas**

#### 4.2.3.1 Amostragem

As amostras das biopilhas para análises quanto à biodegradação do resíduo foram constituídas de quatro sub-amostras coletadas aleatoriamente em diferentes pontos de cada biopilha até uma profundidade de 40 cm. Após a retirada das amostras, a umidade das biopilhas foi corrigida para 30-40% quando necessário e a cada 10 dias as mesmas foram revolvidas para promover maior aeração.

#### 4.2.3.2 Caracterização física e química do solo e análise dos elementos inorgânicos do resíduo oleoso

A análise química e os aspectos físicos do solo, além da análise dos elementos inorgânicos do resíduo oleoso, foram realizados no Instituto Campineiro de Análise de Solo e Adubo (ICASA), Campinas, SP.

#### 4.2.3.3 Determinação do número de microrganismos

A técnica de diluição em séries (CLARK, 1965) foi utilizada para a estimativa da quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias e fungos em meios específicos para estes grupos de microrganismos. Para as bactérias utilizou-se o meio plate count agar (PCA) (DIFCO, 1953) e para fungos o meio Martin (MARTIN, 1961), com estreptomicina (ANEXO). Após as coletas das amostras em recipientes previamente esterilizados, 10g de solo foram adicionados a 90mL de solução salina (0,85%) esterilizada e as devidas diluições foram realizadas. As contagens das colônias foram efetuadas após a incubação por 3 dias, a 37°C para bactérias e 5 dias, a 28°C para os fungos.

#### 4.2.3.4 Determinação da toxicidade

Para a determinação da toxicidade aguda durante a biodegradação do resíduo oleoso, procedeu-se a preparação de suspensões contendo 40g de solo e outras contendo 40g de solo/resíduo das respectivas biopilhas em 250mL de água destilada e deionizada. Estas suspensões foram agitadas por 24 horas, deixadas em repouso por 30 minutos e centrifugadas a 3.000 rpm, a 22°C, durante 10 minutos, para a separação da fração solúvel. O teste de toxicidade aguda empregado utilizou *Daphnia similis* como organismo teste e foi realizado de acordo com a Norma Técnica L5.018 – “Água – Teste de Toxicidade Aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea)” (CETESB, 1991).

O cálculo da CE (50), 48 horas (concentração nominal do agente tóxico que causa efeito agudo (imobilização) a 50% dos organismos em 48 horas de exposição) foi

realizado através do programa estatístico Spermán Karber (HAMILTON et al. 1977 apud KATAOKA, 2001). A conversão dos resultados em Unidades Tóxicas (UT) foi feita através da seguinte equação:

$$UT = \frac{100}{CE (50), 48h}$$

#### 4.2.3.5 Determinação da quantidade de hidrocarbonetos de petróleo

A concentração de hidrocarbonetos nas biopilhas foi efetuada gravimetricamente segundo Eaton et al. (1995), após extração com solvente orgânico. As amostras de solo foram previamente secas a 60 °C, por 48 horas, para evitar interferência da umidade. Após este procedimento, a quantidade de hidrocarbonetos contidos em 5g de solo foi extraída utilizando-se hexano como solvente. Sílica gel, que possui a habilidade de adsorver compostos polares, foi utilizada para remoção de ácidos graxos. Após, o solvente foi evaporado e o resíduo foi pesado em balança analítica.

#### 4.2.3.6 Condições das biopilhas

Durante o período de estudo os parâmetros temperatura, pH e teor de umidade das biopilhas foram determinados. A temperatura das biopilhas (°C) foi determinada por medida direta a 20cm de profundidade, com a utilização de termômetro digital de haste metálica, em cinco pontos aleatórios das mesmas. A determinação do pH foi efetuada segundo Beaudin et al. (1999), onde 10g da amostra foram agitados com 100mL de água destilada por 5 minutos e em seguida o pH foi medido em um pHmetro. Para a determinação do teor de umidade das biopilhas utilizou-se a metodologia citada por Jørgensen et al. (2000) onde a diferença entre peso úmido e seco foi determinada. O peso seco é obtido após a amostra permanecer em estufa a 105°C por 24 horas. A temperatura do ar também foi determinada por medida direta através de termômetro digital.

#### **4.2.4 Análise estatística e interpretação dos dados obtidos**

Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) calculando a estatística F, a um nível de significância de 5%, nos resultados obtidos durante o estudo da biodegradabilidade do resíduo oleoso através do teste respirométrico. Para os tratamentos utilizados nas biopilhas, foi realizada análise de variância pelo teste de Friedman, ao nível de 5% de significância, para comparar o comportamento das diferentes biopilhas. Ambos os testes foram realizados através do software Bioestat 3.0.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Características químicas e físicas do solo

Os resultados para análises físicas e químicas do solo utilizado para o ensaio de biodegradação do resíduo através do sistema de biopilhas se encontram na tabela 2.

**Tabela 2.** Características físicas e químicas do solo utilizado nas biopilhas.

Valores das Análises Químicas											
pH		g/Kg	mg/dm <sup>3</sup>		mmol/dm <sup>3</sup> TFSA					%	
CaCl <sub>2</sub>	Água	C	P	K	Ca	Mg	H + Al	Al	Sb <sup>1</sup>	CTC <sup>2</sup>	V
5,0	5,8	13,0	3,0	0,4	11,0	4,0	28,0	1,0	15,4	43,4	35,5
(mg/dm <sup>3</sup> )		Micronutrientes (mg/dm <sup>3</sup> )						%			
S	Na	Fe	Mn	Cu	Zn	B	N				
18,0	1,0	4,0	4,5	0,8	0,2	0,14	0,1				
Valores das Análises Físicas											
Composição Granulométrica (%)					Densidades		Classe	Sub-classe			
Areias					Aparente	Real					
Grossa	Fina	Argila	Limo	Cascalho							
13,3	27,9	54,4	4,4	0,0	1,06	2,04	Argiloso	Argiloso			

<sup>1</sup> Soma de bases; <sup>2</sup> Capacidade de troca catiônica

O solo utilizado na construção das biopilhas foi caracterizado como de textura argilosa. Este apresentou quantidade de matéria orgânica relativamente baixa assim como a quantidade de nitrogênio total, que foi de 0,1%. O valor para pH indicou que esse mesmo solo apresentou-se ácido.

## 5.2 Quantificação dos elementos inorgânicos no resíduo oleoso

As análises dos elementos inorgânicos presentes no resíduo oleoso são mostrados na tabela 3. Densidade, matéria orgânica, pH e umidade também foram determinados.

**Tabela 3.** Análises de elementos inorgânicos no resíduo oleoso.

Elementos inorgânicos presentes no resíduo oleoso												
pH	%	Densidade	Umidade (%)		%							
	MO	g/mL	65°C	105°C	N	Ca	Mg	S	Fe	Na	Al	C/N
7,2	63,9	1,03	80,9	81,3	0,5	0,3	0,1	0,3	0,7	0,1	0,7	66,9
ppm												
P <sub>total</sub>	Mn	Cu	Zn	B	Co	Mo	Ba	Cd	Cr	Ni	Pb	
908	138	27,5	683	50	2,5	--	52,1	0,3	57,8	14,1	13,2	

-- abaixo do limite de detecção

O resíduo oleoso em questão apresenta muitos componentes que fazem parte do Anexo C (substâncias que conferem periculosidade aos resíduos) da norma NBR 10004 – “Resíduos Sólidos: classificação” (ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2004) o que o torna perigoso e portanto, classificado como Resíduo Classe 1 – Perigosos.

## 5.3 Evolução de CO<sub>2</sub> durante o ensaio de biodegradação do resíduo oleoso utilizando o método respirométrico de Bartha

Nos estudos preliminares utilizando a produção do CO<sub>2</sub> como indicador do processo de biodegradabilidade que ocorreu no sistema solo/resíduo oleoso nos respirômetros de Bartha, verificou-se que: a adição do resíduo no solo proporcionou

aumento na produção de CO<sub>2</sub>, sendo que a produção desse gás no sistema contendo apenas solo correspondeu durante 133 dias, a aproximadamente 10% dos valores encontrados nos demais sistemas que receberam o resíduo.

A tabela 4 apresenta os resultados das quantidades de CO<sub>2</sub> acumulados durante 133 dias da biodegradação do resíduo oleoso, frente aos diferentes tratamentos aqui utilizados. Verificou-se que a adição do inóculo e do inóculo mais o fertilizante proporcionaram acréscimo de 1,8% e 5,3% respectivamente, na evolução de CO<sub>2</sub>, comparado com o controle solo/resíduo.

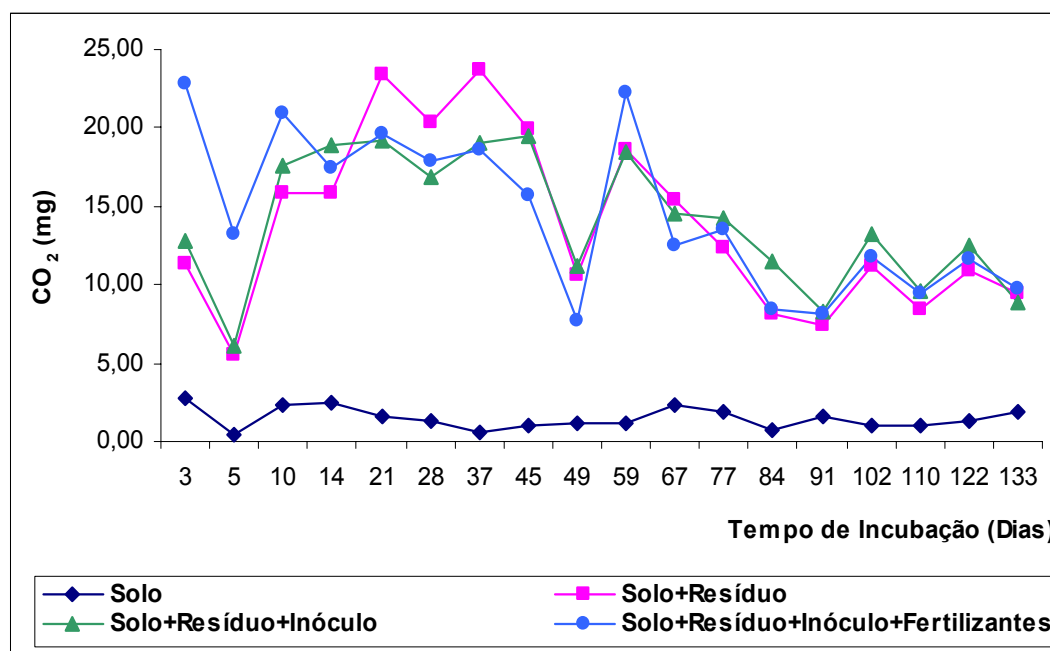
**Tabela 4.** Quantificação de CO<sub>2</sub> acumulado (mg/50g solo) devido a biodegradação do resíduo oleoso, frente a adição do inóculo e do inóculo mais o fertilizante, durante 133 dias, através do respirômetro de Bartha.

<b>Tempo de Degradação (Dias)</b>	<b>Solo</b>	<b>Solo + Resíduo</b>	<b>Inóculo</b>	<b>Inóculo + Fertilizante</b>
3	2,8	11,4	12,8	22,9
5	3,2	16,9	18,8	36,1
10	5,4	32,7	36,4	57,0
14	7,9	48,5	55,3	74,3
21	9,5	71,9	74,6	94,0
28	10,9	92,2	91,4	111,8
37	11,5	115,9	110,5	130,5
45	12,5	135,8	130,0	146,2
49	13,7	146,3	141,1	153,8
59	14,9	164,9	159,6	176,0
67	17,2	180,4	174,2	188,5
77	19,1	192,7	188,4	202,1
84	19,8	200,9	199,9	210,5
91	21,4	208,3	208,2	218,7
102	22,4	219,4	221,5	230,4
110	23,5	227,9	231,1	239,9
122	24,8	238,7	243,6	251,5
133	26,6	248,1	252,5	261,2

De acordo com a figura 4, observa-se que nos primeiros 14 dias de incubação os respirômetros adicionados de inóculo mais o fertilizante apresentaram maior produção de CO<sub>2</sub>. Provavelmente, a adição do fertilizante pode ter contribuído para o aumento da

atividade microbiana nesse período, com conseqüente aumento do processo de biodegradação que ocorre no sistema solo/resíduo. Após duas semanas de experimento, contudo, a emissão de CO<sub>2</sub> no sistema que recebeu o fertilizante não era maior do que as emissões de outros sistemas.

Ainda analisando a figura 4 observa-se que entre 21° e 37° dia os respirômetros controles, ou seja, os respirômetros contendo solo/resíduo apresentaram maior evolução de CO<sub>2</sub> quando comparados aos demais tratamentos, indicando o potencial da comunidade microbiana presente no solo e resíduo em degradar alguns compostos deste último.

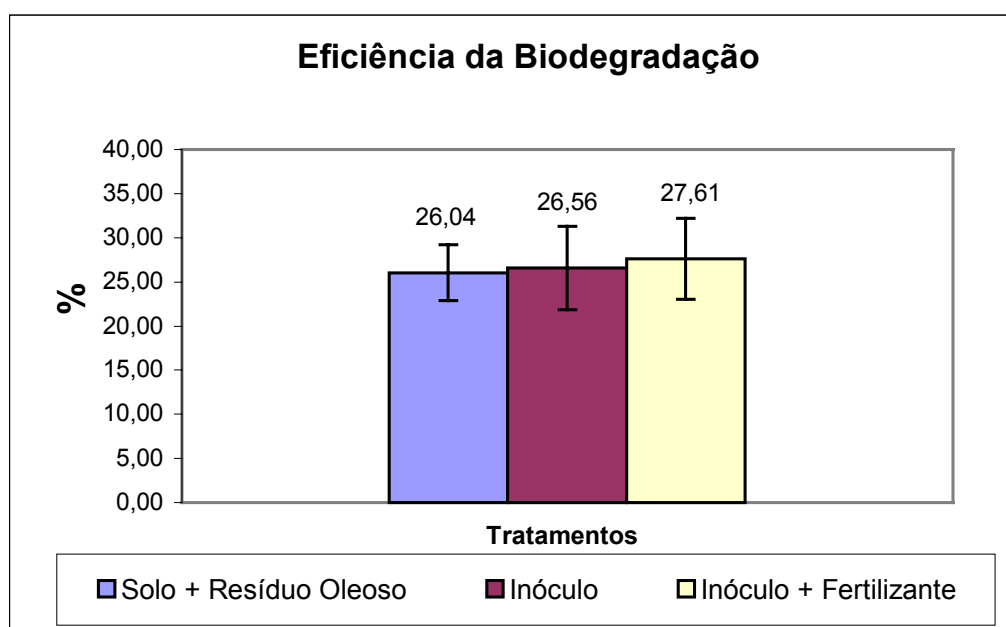


**Figura 4.** Evolução de CO<sub>2</sub>, quantificado em respirômetro de Bartha, obtidos a partir da degradação do resíduo oleoso, frente a adição de inóculo e do inóculo mais o fertilizante, durante 133 dias.

Nos primeiros 45 dias, foram produzidos mais de 50% do total de CO<sub>2</sub> acumulado em todos os respirômetros. Nesse período, provavelmente, os microrganismos consumiram mais rapidamente aqueles compostos que são facilmente biodegradáveis restando, portanto, os que são mais resistentes à degradação (recalcitrantes), que foram consumidos posteriormente de forma mais lenta. Margesin et al. (2000) também verificaram que grande parte do CO<sub>2</sub> produzido durante a

biodegradação de óleo diesel em um solo poluído ocorreu nos primeiros 15 dias e que após esse período houve diminuição na produção desse gás.

A figura 5 apresenta os valores da eficiência da biodegradação do resíduo oleoso de cada tratamento utilizado nessa primeira etapa. Apesar da adição de inóculo e de inóculo mais o fertilizante terem proporcionado um aumento de 0,52% e 1,57%, respectivamente, na eficiência da biodegradação do resíduo oleoso em relação à eficiência do sistema solo/resíduo, a análise de variância ( $F = 0,1074$ ;  $p = 0,8992$ ) demonstrou que não existe diferença estatística entre elas, ou seja, a adição de inóculo e do fertilizante não contribuíram para aumentar a eficiência da biodegradação.



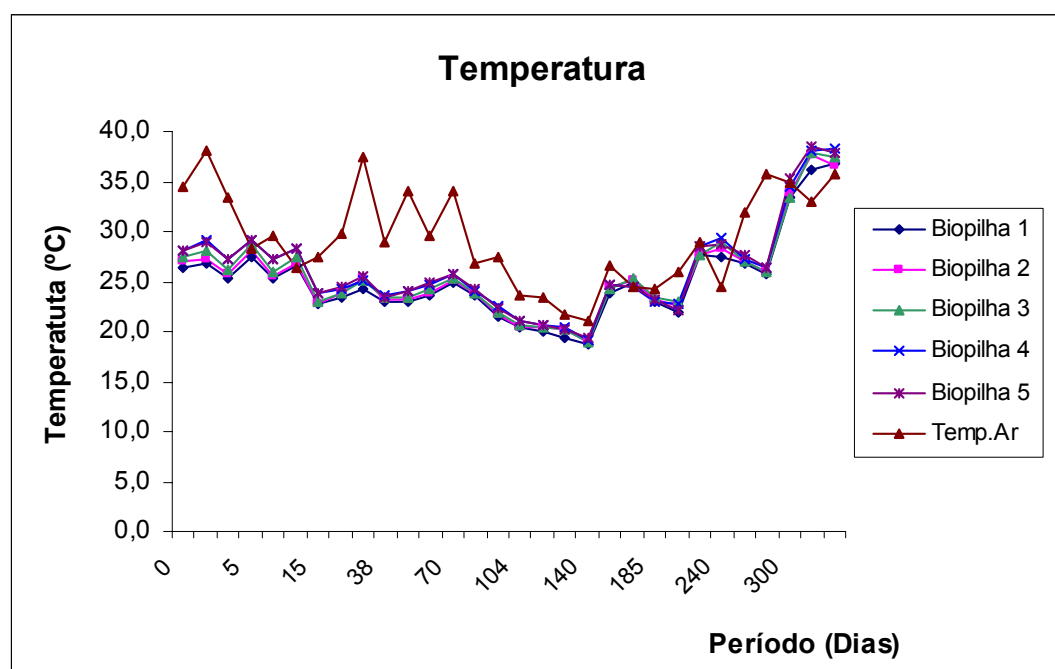
**Figura 5.** Gráfico da eficiência da biodegradação (EB) segundo os teores de carbono inicial do solo e a quantidade de carbono biodegradado.

## 5.4 Condições das biopilhas

### 5.4.1 Temperatura das biopilhas

Tipicamente o metabolismo dos hidrocarbonetos é máximo na faixa de temperatura entre 30 e 40°C (ROSATO, 1997), como já citado anteriormente. Durante a fase em que as biopilhas estavam descobertas, os valores encontrados para este parâmetro nos interiores das mesmas não ultrapassaram 30°C, sendo 29,1°C o maior

valor médio encontrado na biopilha 4, o que pode não ter beneficiado a aceleração da biodegradação dos hidrocarbonetos. É importante lembrar que por se tratar de um experimento em escala piloto, a pequena dimensão das biopilhas pode ter contribuído para a dissipação mais rápida do calor para o ambiente, assim como a quantidade de revolvimentos do material que constitui as biopilhas. Após o recobrimento das biopilhas, no 215º dia de experimento, verificou-se que a temperatura no interior das mesmas teve um aumento significativo sendo que a biopilha 5 apresentou o maior valor para esse parâmetro no 320º dia de experimento, ou seja, 38,5°C. A figura 6 apresenta os valores da temperatura nos interiores das biopilhas, durante o período de estudo juntamente com os valores da temperatura do ar.



**Figura 6.** Valores das temperaturas das biopilhas, a 20 cm de profundidade, comparados à temperatura do ar.

Geralmente, temperaturas maiores são observadas no início dos experimentos devido à liberação de calor durante a degradação das frações de hidrocarbonetos facilmente biodegradáveis, sendo que em muitas ocasiões, a temperatura das biopilhas é maior do que a temperatura do ar, indicando o sucesso da biodegradação. Jørgensen et al. (2000) estudando a biorremediação de solos poluídos por hidrocarbonetos de petróleo através do sistema de biopilhas, encontraram os maiores valores de temperatura

no início do experimento com picos desse parâmetro ao redor do 30º dia. No presente estudo, verificou-se que as maiores temperaturas foram encontradas após o recobrimento das biopilhas apesar de grande parte da degradação do resíduo ter ocorrido principalmente nos dois primeiros meses.

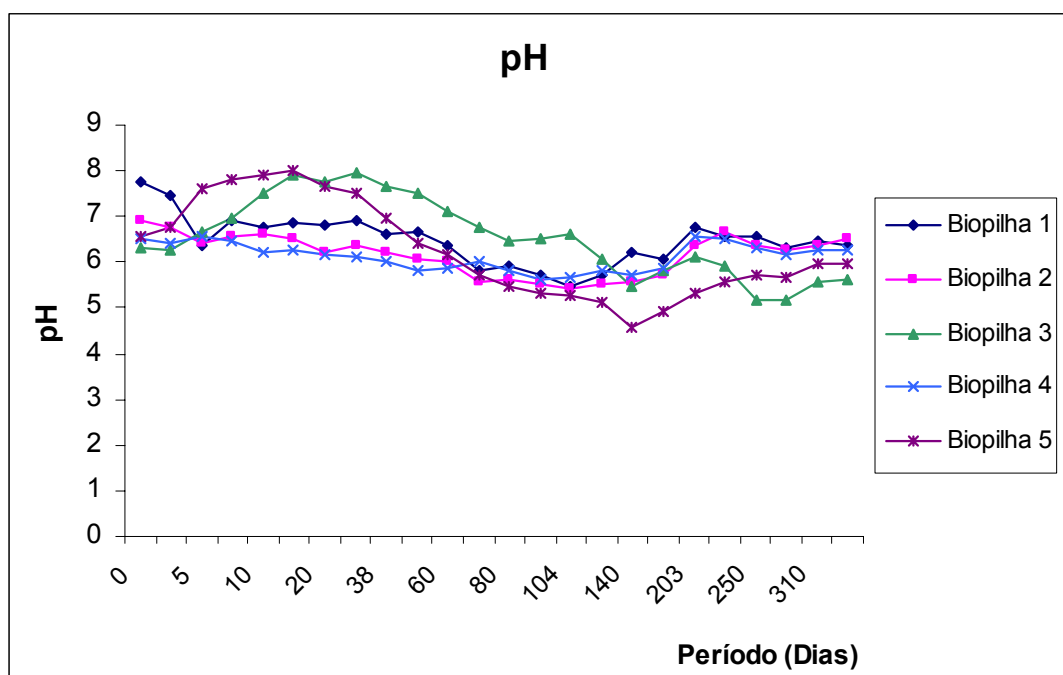
Diversos são os trabalhos demonstrando a importância do fator temperatura na biodegradação dos hidrocarbonetos. Gray et al. (2000) realizaram a biorremediação de solo poluído por hidrocarbonetos em escala laboratorial e verificaram que o aumento da temperatura de 21°C para 30°C proporcionou um acréscimo na remoção desse poluente. Delille et al. (2004) estudaram o efeito da temperatura na taxa de mineralização de hidrocarbonetos durante um estudo de remediação de solos poluídos artificialmente na Antártida. Algumas áreas poluídas foram recobertas com uma lona plástica preta o qual foi responsável pelo aumento em média de 2 °C da temperatura anual. Embora esse pequeno aumento observado, os autores consideraram que houve um impacto favorável na degradação de alcanos. Desse modo, fica evidente a importância da temperatura no processo de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo, pois como citado anteriormente, esse parâmetro está diretamente relacionado com o metabolismo microbiano.

Após o recobrimento das biopilhas, a temperatura das mesmas teve acréscimo provavelmente devido à redução da dissipação do calor de seu interior sendo verificado que em algumas ocasiões esses valores foram maiores do que a temperatura do ar. Esse fato contribuiu para dar continuidade ao processo de degradação do resíduo oleoso, após um período em que foi verificada a estabilização da concentração de hidrocarbonetos nas biopilhas. O recobrimento das biopilhas, entretanto, pode diminuir a aeração do solo poluído e o revolvimento deste ao longo do processo de biodegradação deve ser realizado.

Uma vez que a temperatura é de extrema importância para o processo biodegradativo microbiano, o clima brasileiro apresenta-se como um fator que influencia positivamente no desenvolvimento de tecnologias como a biopilha, pois as temperaturas, geralmente, são altas o ano todo, com poucas exceções no inverno na região sul e sudeste.

### 5.4.2 pH das biopilhas

O maior valor registrado de pH durante os estudos foi 8,0 na biopilha 5 no 15º dia e o menor foi 4,6 na mesma no 140º dia. No início dos experimentos percebe-se que as biopilhas 3 e 5 apresentaram aumento nos valores de pH aproximando ao pH 8 para a partir do vigésimo dia no caso da biopilha 5 e trigésimo oitavo dia para a biopilha 3, iniciar o declínio. Essas biopilhas foram aquelas que receberam fertilizantes e estes podem ter influenciado nesse aumento devido à influência na biodegradação do resíduo com formação de compostos secundários de características básicas e posteriormente ácidas. Rahman et al. (2003) também perceberam o aumento do pH durante a biorremediação de solo poluído por hidrocarbonetos quando esse foi adicionado de NPK e concluíram que tal fato sugere que houve a liberação de produtos intermediários durante a degradação dos hidrocarbonetos. A figura 7 mostra os resultados obtidos quanto ao pH nas diferentes biopilhas.



**Figura 7.** Valores de pH nas diferentes biopilhas.

Ao longo do período de estudo houve o declínio dos valores de pH para as cinco biopilhas estudadas. Isso indica que durante a degradação do resíduo ocorreu a produção de compostos intermediários, provavelmente ácidos orgânicos. Esses valores

ácidos encontrados nas biopilhas podem afetar a biodegradação dos hidrocarbonetos uma vez que afeta a atividade microbiana, principalmente a atividade bacteriana, apesar dos fungos terem melhor crescimento em pH mais ácido.

A biodegradação de hidrocarbonetos tem início com a introdução de oxigênio na molécula com a formação de ácidos orgânicos que são responsáveis pela acidificação do meio. Isso foi provado por Meredith et al. (2000) que demonstraram que um óleo específico submetido ao processo de biodegradação apresentou maior acidez comparado ao mesmo óleo não biodegradado devido a maior quantidade de ácidos carboxílicos que foi formado durante o ataque microbiano. Barth et al. (2004) também quantificaram os ácidos orgânicos presentes em amostras de petróleo submetidas ao processo de biodegradação e amostras não biodegradadas. No petróleo biodegradado a quantidade de compostos ácidos foi maior e esses autores também relataram que tais ácidos provavelmente são produzidos durante o processo de degradação microbiana.

Dessa maneira aconselha-se o monitoramento e correção do pH durante a biorremediação de solos poluídos por hidrocarbonetos de modo que valores extremos desse parâmetro não sejam desfavoráveis à atividade microbiana. Durante o período de estudo, realizou-se a adição de calcário no 140º e 170º dia para a elevação do pH a valores superiores a 6 o que pode ser observado na figura 7.

#### **5.4.3 Umidade das biopilhas**

Os valores da umidade das biopilhas são mostrados na tabela 5. Após a constatação da redução da umidade as biopilhas receberam água corrigindo a mesma para valores entre 30-40%, porém esses valores não são mostrados na tabela.

Devido às pequenas dimensões das biopilhas o teor de umidade das mesmas tinha significativa redução em aproximadamente duas semanas quando essas estavam descobertas. Após o recobrimento das mesmas, percebeu-se a redução da perda de água mencionada evitando o possível estresse ocasionado pela grande oscilação na umidade.

**Tabela 5.** Teores da umidade (%) das biopilhas.

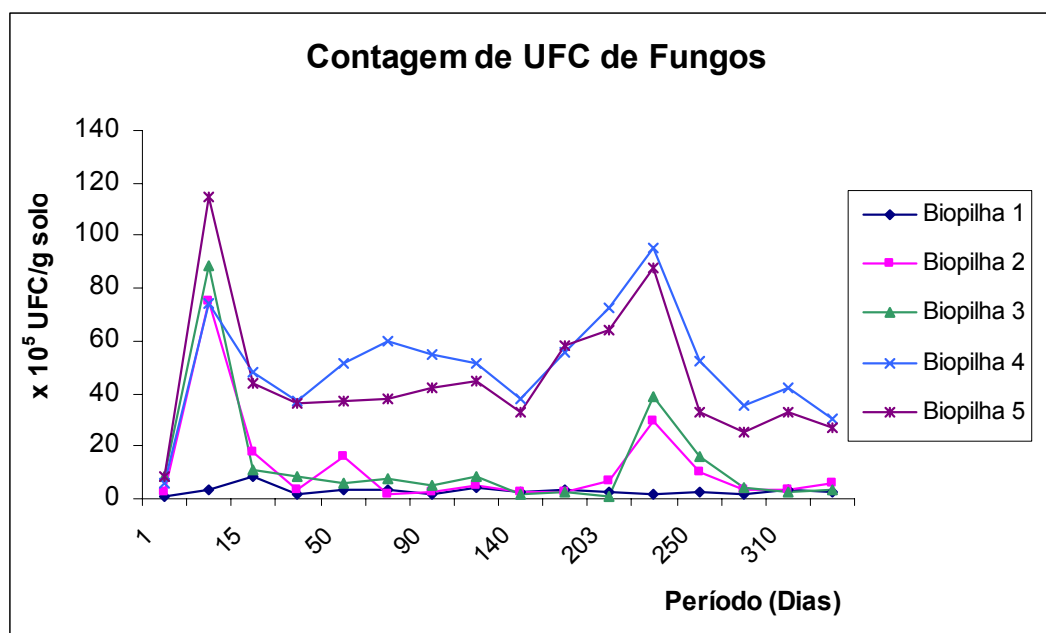
<b>Período da Biodegradação (Dias)</b>	<b>Biopilha 1</b>	<b>Biopilha 2</b>	<b>Biopilha 3</b>	<b>Biopilha 4</b>	<b>Biopilha 5</b>
Biopilhas descobertas					
0	11,6	11,9	11,8	11,3	11,0
3	17,5	15,6	16,9	18,1	17,7
15	15,6	13,7	11,0	19,9	21,5
24	14,4	13,7	15,4	22,9	21,5
37	17,0	16,5	15,9	20,9	23,2
50	17,3	16,6	15,7	22,2	21,9
65	15,2	16,9	14,9	20,6	21,5
80	15,2	15,7	16,7	20,0	20,6
97	17,2	18,0	17,8	23,2	23,8
111	17,2	18,1	17,9	21,3	20,0
128	18,1	17,6	19,1	23,6	24,1
150	17,0	19,1	19,9	21,4	20,3
175	16,5	17,3	16,1	23,2	22,2
195	19,6	18,5	19,3	23,3	24,4
215	17,8	16,4	18,7	22,4	21,1
Biopilhas recobertas					
216	37,8	35,1	35,7	34,8	36,4
250	27,7	28,7	27,9	26,5	27,1
290	28,5	30,1	30,8	30,5	31,0
330	28,9	30,5	31,1	32,5	32,7
350	31,2	32,3	33,5	34,7	32,1

Durante a primeira fase do experimento, verificou-se que as biopilhas 4 e 5 apresentavam menor redução do teor de umidade quando comparadas as demais biopilhas. A palha de arroz adicionada a essas biopilhas foi responsável por esse fato pois esta age como condicionador do solo mantendo a umidade mais constante. Quando as biopilhas foram recobertas, entretanto, não verificou-se diferença na perda de água entre as mesmas e as biopilhas raramente atingiram valores de umidade menores do que 30%.

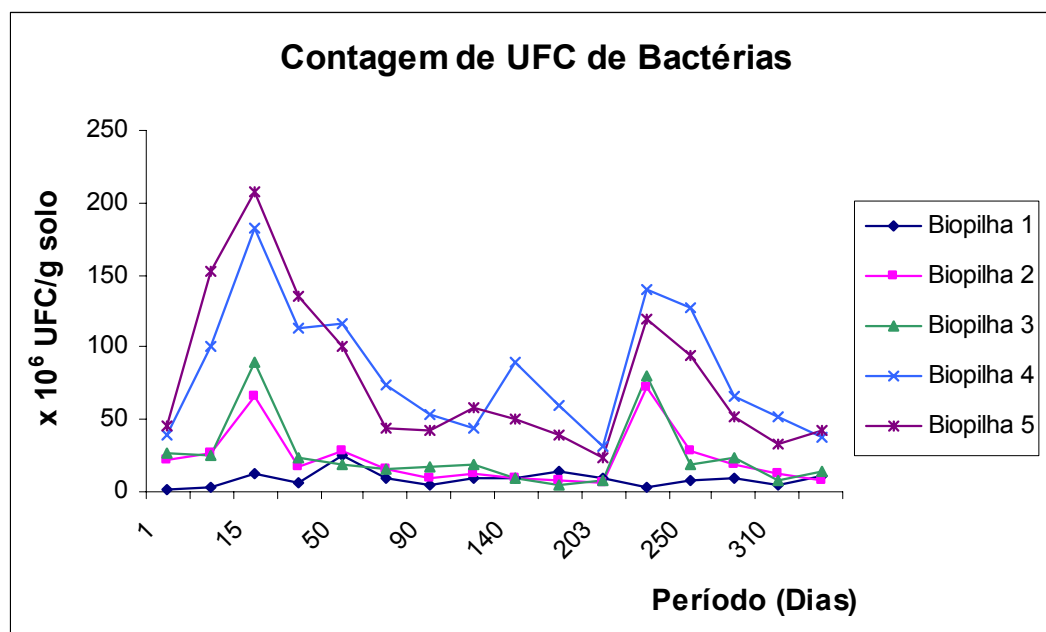
Um adequado teor de umidade é essencial para processos biodegradativos. O aumento da quantidade de água no solo é inversamente proporcional à concentração de O<sub>2</sub> presente. Dessa maneira, solos encharcados podem oferecer condições anaeróbicas que afetam negativamente a degradação dos hidrocarbonetos, uma vez que esse processo é principalmente aeróbio. As condições com escassez de água podem também desacelerar a biodegradação dos hidrocarbonetos por influenciar diretamente no metabolismo microbiano impedindo a ação dos microrganismos sobre essas moléculas.

#### 5.4.4 Contagem de microrganismos das biopilhas

As figuras 8 e 9 apresentam os resultados obtidos para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) para fungos e bactérias respectivamente, durante o período de biodegradação do resíduo.



**Figura 8.** Contagem das UFC de fungos nas biopilhas.



**Figura 9.** Contagem das UFC de bactérias nas biopilhas.

Durante o período de estudo as biopilhas receberam o inóculo no 1º e no 215º dia, excetuando a biopilha 1, ou seja, controle do experimento. Analisando as figuras 8 e 9 verifica-se que após as inoculações os números de microrganismos aumentaram consideravelmente nessas quatro biopilhas. Nas biopilhas 2 e 3 houve um decréscimo dos números de UFC, indicando que os microrganismos adicionados como inóculo não obtiveram sucesso em suas sobrevivências e tais biopilhas tiveram quantidades semelhantes de microrganismos àquelas observadas na biopilha controle. Nas biopilhas 4 e 5 também ocorreu fato semelhante com aumento dos números de microrganismos devido as inoculações, e posterior redução dos mesmos. Entretanto, os números de microrganismos nessas biopilhas se mantiveram superiores durante todo o experimento, em relação aos valores encontrados na biopilha controle. Estas biopilhas foram as que receberam palha de arroz que possivelmente criou condições favoráveis ao desenvolvimento da microbiota nativa ou pode ter favorecido a sobrevivência dos microrganismos adicionados, pois como dito anteriormente, este tipo de material impede a compactação do solo aumentando a concentração de O<sub>2</sub>.

Os resultados obtidos demonstraram (figuras 8 e 9) que a adição de fertilizantes na biopilha 3 não acarretou aumento do número de microrganismos pois, assim como na biopilha 2, um acréscimo do mesmo somente ocorreu logo após a adição do inóculo, mas logo a seguir, tanto o número de UFC de fungos e de bactérias das biopilhas 1, 2 e 3 se igualaram. A biopilha 5 também recebeu fertilizantes, mas o maior número de microrganismos registrado se deve, provavelmente, à adição da palha de arroz.

Segundo Mishra et al. (2001) a adição de microrganismos estranhos ao ambiente poluído se faz necessário quando as populações indígenas dos mesmos não têm a capacidade de degradar os constituintes do petróleo. Dessa maneira, a biodegradação dos hidrocarbonetos pode ser aumentada se a biomassa microbiana conseguir sobreviver às condições do novo ambiente após competir com esses microrganismos indígenas. Nos testes respirométricos e na biopilha controle verificou-se que os microrganismos presentes no solo e no resíduo foram capazes de biodegradar o mesmo indicando que a estimulação dessa microbiota pode ser a melhor estratégia para o sucesso da degradação.

É importante ressaltar que durante a produção do inóculo em meios líquidos envolvendo principalmente bactérias, alguns cuidados devem ser tomados para que o

mesmo ao ser adicionado no local poluído tenha sua fase lag ou fase de adaptação reduzida e esteja na fase de crescimento, ou seja, fase log, aumentando sua capacidade para competir como os microrganismos indígenas. Simon et al. (2004) citaram que a habilidade dos microrganismos exógenos em se adaptarem as condições presentes no campo pode ser considerado o principal fator limitante para a utilização do bioenriquecimento do solo. Esses mesmo autores não observaram o aumento da capacidade biodegradativa de uma área poluída por óleo através da adição de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, fato relacionado a não sobrevivência dos mesmos no novo meio.

#### **5.4.5 Toxicidade das biopilhas**

A tabela 6 apresenta os resultados de toxicidade aguda nas biopilhas obtidos através do teste com *Daphnia similis*, demonstrando que durante a biodegradação do resíduo oleoso houve um pequeno decréscimo dos valores de toxicidade, porém no final do experimento houve aumento desses, aproximando-se àqueles iniciais. Estes resultados podem indicar que durante a biodegradação dos hidrocarbonetos pode ter ocorrido a produção de compostos secundários que também apresentaram efeito tóxico semelhante aos compostos iniciais.

Neste estudo foi verificado que a redução na concentração de hidrocarbonetos de petróleo não foi acompanhada por uma redução na toxicidade apresentada pelas biopilhas. Resultados semelhantes foram também obtidos por Dorn e Salanitro (2000) em estudos sobre biorremediação de solos poluídos por petróleo, e esses autores concluíram que nem sempre a redução da quantidade de hidrocarbonetos no solo significa a diminuição do efeito tóxico apresentado pelo mesmo. Plaza et al. (2005) destacaram a importância da realização de testes de toxicidade para o acompanhamento da biorremediação de solos poluídos por substâncias perigosas. Ao lado de análises químicas tradicionais é necessário que tais testes sejam realizados, pois metabólitos não detectáveis ou novos compostos são formados durante os processos biogeoquímicos podendo prejudicar a qualidade da biorremediação.

Tabela 6. Valores de toxicidade das biopilhas durante a biodegradação do resíduo oleoso.

Dias de Biodegradação	CE (50), 48h										UT				
	0	15	30	90	180	270	350	0	15	30	90	180	270	350	
<b>Solo</b>	*	-	-	-	-	-	-	NT	-	-	-	-	-	-	
<b>Biopilha 1</b>	64,81	65,81	63,04	65,52	73,37	66,17	64,81	1,54	1,52	1,59	1,53	1,36	1,51	1,54	
<b>Biopilha 2</b>	64,81	66,49	62,99	63,24	71,70	65,35	63,82	1,54	1,50	1,59	1,58	1,39	1,53	1,57	
<b>Biopilha 3</b>	64,81	68,22	62,14	65,81	70,98	64,81	69,50	1,54	1,46	1,61	1,52	1,41	1,54	1,44	
<b>Biopilha 4</b>	64,81	63,94	62,04	63,74	74,83	64,81	63,82	1,54	1,56	1,61	1,57	1,34	1,54	1,57	
<b>Biopilha 5</b>	64,81	62,61	63,79	71,94	71,94	66,13	63,57	1,54	1,60	1,57	1,39	1,39	1,51	1,57	

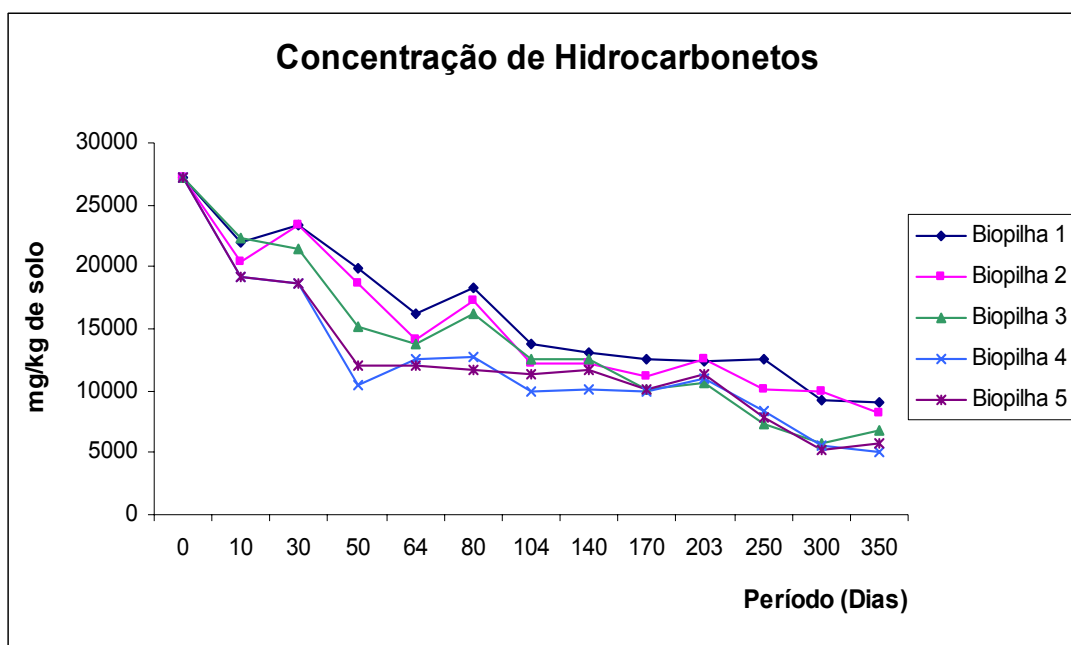
Unidade Tóxica (UT) = 100/CE(50)48h; NT – não tóxico; \* As *Daphnias similis* estavam todas vivas.

Algumas frações de hidrocarbonetos de petróleo são tóxicas para os microrganismos como, por exemplo, hexano e heptano que são compostos de baixo peso molecular e voláteis que possuem efeito de dissolver lipídeos e podem desorganizar ou destruir a membrana celular dos microrganismos. Alguns outros componentes do petróleo, como os fenóis, também possuem efeito inibitório sobre os microrganismos. Além da toxicidade apresentada pelos hidrocarbonetos, a presença de metais pesados observada no resíduo oleoso pode ter contribuído para o acréscimo da toxicidade encontrado nas biopilhas no final do experimento. Esta consideração adveio do fato desses metais estarem adsorvidos em alguns dos compostos orgânicos que quando degradados liberam tais metais, conseqüentemente ocorrendo acréscimo da toxicidade do material contido nas biopilhas.

Destaca-se aqui que a metodologia usada na determinação da toxicidade das biopilhas determina a toxicidade dos compostos solúveis em água e que o resíduo apresenta elevada quantidade de substâncias hidrofóbicas as quais podem não estar sendo extraídas durante a técnica podendo ocasionar uma medida irreal da toxicidade (KATAOKA, 2001).

#### **5.4.6 Quantidade de hidrocarbonetos de petróleo nas biopilhas**

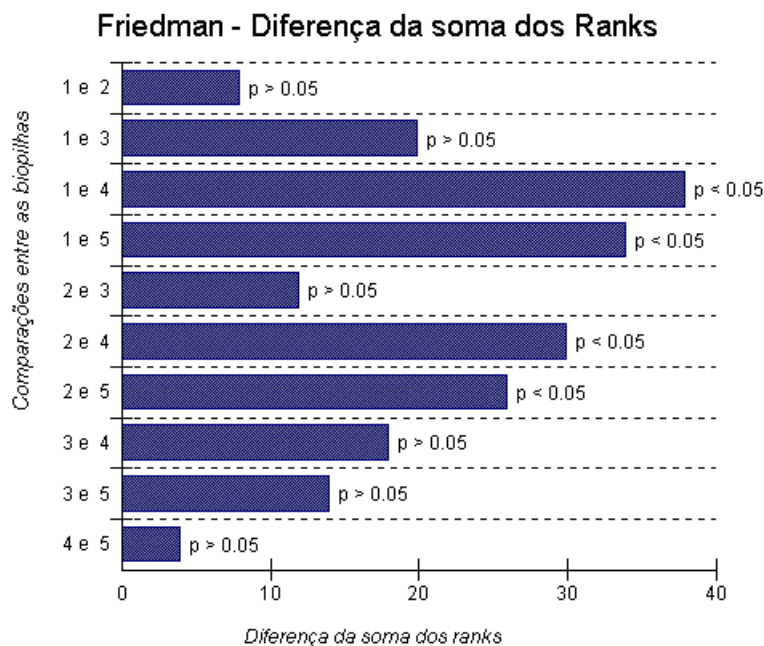
É importante lembrar que devido à dificuldade em se obter uma mistura homogênea de solo e resíduo, as biopilhas tiveram características heterogêneas, o que pode explicar porque alguns resultados mostraram quantidades de hidrocarbonetos maiores do que resultados anteriores. No tempo 0, efetuou-se a quantificação de hidrocarbonetos nas cinco biopilhas, porém como o solo poluído utilizado para a construção das mesmas eram de mesma origem, realizou-se uma média entre os valores encontrados e todas as biopilhas partiram de uma concentração de hidrocarbonetos igual a 27220 mg/kg de solo. A figura 10 mostra a quantidade de hidrocarbonetos nas diferentes biopilhas durante todo o período de estudo.



**Figura 10.** Concentração de hidrocarbonetos de petróleo nas diferentes biopilhas durante 350 dias de biodegradação.

O teste de Friedman ( $Xr^2 = 35,4667$ ;  $GL = 4$ ;  $p = 0,0000$ ) é muito significativo, mostrando que existe diferença estatisticamente significativa em relação aos tratamentos utilizados nas biopilhas. A figura 11 mostra as comparações múltiplas para as diferentes biopilhas.

Durante os 350 dias de experimentos, as biopilhas 4 e 5 apresentaram as melhores eficiências na redução do resíduo oleoso, ou seja, degradando 82 e 79% respectivamente. Como citado anteriormente, estas biopilhas foram adicionadas de palha de arroz a qual provavelmente contribuiu para as mesmas apresentarem maiores números de UFC tanto para fungos quanto para bactérias. Essa maior quantidade de microrganismos juntamente com a possibilidade de maior aeração ocasionada pela adição da palha podem ter aumentado a capacidade biodegradativa dessas biopilhas. Vasudevan e Rajaram (2001), também obtiveram maior remoção de hidrocarbonetos durante a biorremediação de solos poluídos por resíduos oleosos de petróleo adicionados de materiais dessa natureza e ao quantificar o número de bactérias nesse solo verificaram que houve um aumento comparado ao controle que não recebeu o material.



**Figura 11.** Resultado do teste de Friedman comparando as diferentes biopilhas quanto à concentração de hidrocarbonetos de petróleo.

A biopilha 3 apresentou 75% de degradação do resíduo, seguida pela biopilha 2 com 70% de degradação e a biopilha 1 com 67%. De acordo com a análise estatística (figura 11), as biopilhas 1, 2 e 3 não apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto a quantidade de hidrocarbonetos de petróleo. Desse modo, a adição do inóculo na biopilha 2 e a adição de inóculo mais o fertilizante na biopilha 3 não beneficiaram o aumento da degradação do resíduo. Entretanto, não se pode afirmar com certeza que o inóculo adicionado nas biopilhas 4 e 5 influenciou a biodegradação do resíduo oleoso, pois o maior número de microrganismos verificado nessas biopilhas pode ter sido decorrentes tanto da estimulação da microbiota natural pela palha de arroz adicionada ou das condições favoráveis criadas por esta última para a sobrevivência do inóculo, como já discutido anteriormente.

O petróleo é constituído de muitos compostos voláteis entre outros. Dessa maneira, parte do resíduo adicionado nas biopilhas, influenciado inclusive quando estas estavam descobertas, pode ter sido eliminado através da volatilização dos seus componentes ao invés de serem biodegradados.

Ainda referente as biopilhas 4 e 5, verificou-se que cerca de 60% do resíduo foi degradado nos dois primeiros meses devido provavelmente a degradação mais acelerada dos compostos facilmente biodegradáveis nesse período, com àqueles compostos mais recalcitrantes, sendo degradados lentamente em tempo posterior. Foi observado ainda, que ocorreu a estabilização da concentração de hidrocarbonetos nas biopilhas 4 e 5 a partir de sessenta dias de experimentos e nas biopilhas 1, 2 e 3 a partir de cem dias. Com o recobrimento das biopilhas melhorando as condições referentes à temperatura e umidade notou-se que parte do resíduo continuou sendo biodegradado, provavelmente devido ao aumento na velocidade do metabolismo microbiano, decorrente do acréscimo das temperaturas das biopilhas. A estabilização da concentração de hidrocarbonetos é devido a certas frações do petróleo que não são degradadas mesmo em condições favoráveis para que isso ocorra. A baixa taxa de degradação do poluente após uma rápida redução pode ser atribuída a fatores físicos como adsorção do contaminante junto às partículas do solo ou a forte ligação desses com as substâncias orgânicas do mesmo. Segundo Nocentini et al. (2000), após o tratamento biológico de solo poluído por petróleo, pode ser verificado a estabilização das concentrações do mesmo que é chamada de concentração residual.

Capelli et al. (2001) estudaram a biodegradação das frações de hidrocarbonetos presentes em resíduos oleosos provenientes do refinamento do petróleo e observaram que os compostos saturados e aromáticos foram reduzidos em 70 e 60% respectivamente, seguida da redução de resinas em 20%. Os asfaltenos, entretanto, permaneceram constantes não sendo biodegradados. Nas biopilhas pode ter ocorrido fato semelhante com a degradação daqueles compostos menos recalcitrantes restando os asfaltenos de difícil degradação.

Para a utilização do bioenriquecimento visando acelerar a biorremediação de solos poluídos por petróleo, aconselha-se a realização de estudos prévios para o desenvolvimento de inóculos eficientes com a capacidade de competirem com os microrganismos nativos, evitando dessa maneira, gastos financeiros sem contudo serem revertidos em benefícios. O bioenriquecimento tem revelado bons resultados quando realizados em escala laboratorial como observaram Vasudevan e Rajaram, 2001, Yerushalmi et al., 2003 e Bento et al., 2005, porém quando é utilizado em campo os

resultados as vezes não são promissores como aos obtidos em laboratório (BALBA et al., 1998; SIMON et al., 2004).

Resultados semelhantes aos obtidos nesse estudo quanto a ineficiência do uso de inóculo em biopilhas também foram observados por alguns autores. Jørgensen et al. (2000) não obtiveram resultados positivos com a adição de dois inóculos comerciais constituídos de culturas mistas de bactérias durante a biorremediação de solos poluídos por petróleo através de biopilhas e observaram que a criação de condições favoráveis ao desenvolvimento da microbiota nativa pode ser a melhor solução, pois foi observado que os microrganismos presentes no solo eram capazes de degradar hidrocarbonetos. Li et al. (2002) também verificaram que a adição de fungos exóticos em biopilhas de solo poluído por óleo cru não foi eficiente na remoção do mesmo.

A adição de fertilizantes para bioestimular a microbiota de um local poluído por hidrocarboneto de petróleo geralmente resultam no aumento da biodegradação, porém, quando adicionados em altas concentrações essa mesma microbiota pode ser inibida. Assim como foi verificado nesse estudo, Seklemova et al. (2001) não obtiveram efeito na descontaminação de solos poluídos com óleo diesel com a adição de fertilizantes inorgânicos e Yerushalmi et al. (2003) também não aumentaram a remoção de hidrocarbonetos de petróleo do solo com a bioestimulação por fertilizantes. Apesar disso, aconselha-se a realização de estudos prévios com o intuito em determinar as melhores relações entre carbono, nitrogênio e fósforo para acelerar a degradação de hidrocarbonetos de petróleo, uma vez que tais elementos são de extrema importância para o metabolismo microbiano.

Os resultados dos testes preliminares onde a biodegradação do resíduo oleoso foi verificada através de testes respirométricos foram semelhantes aos obtidos durante a biodegradação do mesmo através do sistema de biopilhas, pois em ambos foram verificados que a adição do inóculo e do fertilizante não tiveram influência na degradação do resíduo.

Os resultados obtidos durante este estudo indicaram que o sistema de biopilhas é uma tecnologia potencial para disposição e tratamento de resíduos oleosos de refinaria de petróleo e que medidas de baixo custo como a adição de palha de arroz podem acelerar a biodegradação do resíduo oleoso no solo. Estudos posteriores, entretanto, devem ser realizados referentes a reaplicação do resíduo no solo utilizado na construção

das biopilhas pois verificou-se que o resíduo não foi biodegradado completamente. Ademais, este sistema pode ser mais vantajoso do que os sistemas de “landfarming” utilizados por muitas refinarias de petróleo incluindo a REPLAN, pois é um sistema de baixo custo com a ocupação de menor espaço físico, que apresenta maior facilidade no controle dos principais fatores que afetam a biodegradação dos hidrocarbonetos e que representa menores riscos de contaminação dos aquíferos já que é construído sobre uma base impermeável.

## 6. CONCLUSÕES

A análise dos resultados permitiu concluir que:

- Apesar do período de estudo ser de 350 dias, este não foi suficiente para verificar degradação total dos hidrocarbonetos.
- O sistema de biopilhas foi adequado para a degradação dos hidrocarbonetos presentes no resíduo oleoso de refinaria de petróleo, contudo, alguns fatores ambientais do processo precisam ser otimizados.
- Recomenda-se o uso do recobrimento das biopilhas para otimizar umidade e temperatura mais elevadas.
- Recomenda-se a correção do pH nas biopilhas.
- O uso de agregados como a palha de arroz diminui a compactação das biopilhas, possibilitando maior aeração no interior das mesmas, contribuindo para aumentar a atividade microbiana e conseqüentemente, acelerar a biodegradação do resíduo oleoso.

- O uso do inóculo precisa ser melhor estudado pois não foi adequado sob as condições aqui estudadas, principalmente para as biopilhas 2 e 3, não beneficiando a biodegradação do resíduo oleoso.
- A bioestimulação através da adição do fertilizante não teve influência na biodegradação do resíduo oleoso.
- O desenvolvimento de um protocolo experimental com estudos laboratoriais pode fornecer informações importantes sobre as medidas a serem adotadas em programas de biorremediação.
- Verificar a otimização das biopilhas no intuito de diminuir o índice de toxicidade nas mesmas, permitindo assim maior atividade microbiana durante o processo.

## 7. REFERÊNCIAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR – 10004 – Resíduos Sólidos – Classificação**. 2004, 71p.

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, Disponível em <[www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br)>  
Acesso em 27 de Out.de 2003.

ATLAS, R. M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v.31, p.178-182, 1995a.

AUSTIN, B.; CALOMIRIS, J. J.; WALKER, J. D.; COLWELL, R. R. Numerical taxonomy and ecology of petroleum-degrading bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.34, n.1, p.60-68, 1977.

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

BARATHI, S.; VASUDEVAN, V. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. **Environ. Int.**, Elmsford, v.26, p.413-416, 2001.

BARTH, T.; HØILAND, S.; FOTLAND, P.; ASKVIK, K. M.; PEDERSEN, B. S.; BOURGUND, A. E. Acidic compounds in biodegraded petroleum. **Org. Geochem.**, Oxford, v.35, p.1513-1525, 2004.

BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of flask and method for measurement the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Sci.**, Baltimore, v.100, n.1, p.68-70, 1965.

BEAUDIN, N.; CARON, R. F.; LEGROS, R.; RAMSAY, J.; RAMSAY, B. Identification of the key factors affecting composting of a weathered hydrocarbon-contaminated soil. **Biodegradation**, Dordrecht, v.10, n.2, p.127-133, 1999.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. C.; FRANKENBERGER, W. T. Comparative bioremediation of soil contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresour. Technol.** Essex, v.96, p.1049-1055, 2005.

BITTAR, P. R. A biorremediação através do uso de biopilhas. Disponível em: <[http://www.crq4.org.br/informativo/outubro\\_2000/pagina05.html](http://www.crq4.org.br/informativo/outubro_2000/pagina05.html)> Acesso em 12 de Dez. 2002.

CAPELLI, S. M.; BUSALMEN, J. P.; SÁNCHEZ, S. R. Hydrocarbon bioremediation of mineral-base contaminated waste from crude oil extraction by indigenous bacteria. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, Oxford, v.47, p.233-238, 2001.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL. **Solos – Coleta e preparação de amostras – Procedimentos.** Norma técnica L6.245. São Paulo, 1984.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL. **Solos – Determinação da Biodegradação de Resíduos – Método Respirométrico de Bartha.** Norma Técnica L6.350. São Paulo, 1990. 15p.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL. Água – **Teste de Toxicidade Aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea)** Norma Técnica L5.018. São Paulo. 1991. 33p.

CHAERUN, S. K.; TAZAKI, K.; ASADA, R.; KOGURE, K. Bioremediation of coastal areas 5 years after *Nakhodka* oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria. **Environ. Int.**, Elmsford, v.30, p.911-922, 2004.

CHAILLAN, F.; LE FLÈCHE, A.; BURY, E.; PHANTAVONG, Y.; GRIMONT, P.; SALIOT, A.; OUDOT, J. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Res. Microbiol.**, Paris, v.155, p.587-595, 2004.

CHAÎNEAU, C. H.; MOREL, J.; DUPONT, J.; BURY, E.; OUDOT, J. Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. **Sci. Total Environ.**, Amsterdam, v.227, n.2-3, p.237-247, 1999.

CHO, B. H.; CHINO, H.; TSUJI, H.; KUNITO, T.; MAKISHIMA, H.; UCHIDA, H.; MATSUMOTO, S.; OYAIZU, H. Analysis of oil components and hydrocarbons-utilizing microorganisms during laboratory-scale bioremediation of oil-contaminated soil of Kuwait. **Chemosphere**, Oxford, v.35, n.7, p. 1613-1621, 1997.

CLARK, F. E. Agar-plate method for total microbial count. In: C.A. BLACK; D. EVANS; J.L. WHITE; L.E. ENSMINGER; F.E. CLARK E R.C. DINAUER (Ed.), **Methods of soil analysis**. New York: Madson, 1965, part 2, p.1460-1466.

DELILLE, D.; COULON, F.; PELLETIER, E. Effects of temperature warming during a bioremediation study of natural and nutrient-amended hydrocarbon-contaminated sub-Antarctic soils. **Cold Reg. Sci. Technol.**, Amsterdam, v.40, p.61-70, 2004.

DIBBLE, J. T.; BARTHA, R. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.37, n.4, p.729-739, 1979.

DIFCO Manual, 9 ed. Detroit: Difco Laboratories, 1953.

DORN, P. B.; SALANITRO, J. P. Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. **Chemosphere**, Oxford, v.40, p. 419-426, 2000.

EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19 ed. Washington: American Public Health Association, 1995

EDWARDS, C. A.; Assessing the effects of environmental pollutants on soil organisms, communities, processes and ecosystems. **Eur. J. Soil Biol.**, Montrouge, v.38, p-225-231, 2002.

FERGUSON, S. H.; FRANZMANN, P. D.; SNAPE, I.; REVILL, A. T.; TREFRY, M. G.; ZAPPIA, L. R. Effects of temperature on mineralization of petroleum in contaminated Antarctic terrestrial sediments. **Chemosphere**, Oxford, v.52, p.975-987, 2003.

FIELD, J. A.; JONG, E.; COSTA, G. F.; BONT, J. A. M. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white fungi. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.58, n.7, p.2219-2226, 1992.

GALLEGO, J. L. R.; LOREDO, J.; LLAMAS, J. F.; VÁZQUEZ, F.; SÁNCHEZ, J. Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential *in situ* techniques by study of bacterial degradation. **Biodegradation**, Dordrecht, v.12, p.325-335, 2001.

GALLI, E. The role of microorganisms in the environment decontamination. In: REZONI, A.; MATTEI, N.; LARI, L.; FOSSI, M. C.; (Ed.). **Contaminants in the environment: a multidisciplinary assessment of risks to man and other organisms**. London: Lewis Publishers. p.235-246, 1994.

GEERDINK, M. J.; LOOSDRECHT, M. C. M.; LUYBEN, K. C. A. M. Biodegradability of oil diesel. **Biodegradation**, Dordrecht, v.7, p.73-81, 1996.

GENOUW, G.; NAEYER, F.; VAN MEENEN, P.; VAN DE WERF, H.; NIJS, W.; VERSTRAETE, W. Degradation of oil sludge by landfarming – a case-study at the Ghent harbour. **Biodegradation**, Dordrecht, v.5, p.37-46, 1994.

GOGOI, B. K., DUTTA, N. N., GOSWAMI, P., MOHAN, T. R. K. A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at crude oil spill site. **Advances Environ. Res.**, London, v.7, p.767-782, 2003.

GRAY, M. R.; BANERJEE, D. K.; DUDAS, M. J.; PICKARD, M. A. Protocols to enhanced biodegradation of hydrocarbons contaminants in soil. **Bioremed. J.**, Philadelphia, v.4, n.4, p.249-257, 2000.

HEITKAMP, M. A.; FRANKLIN, W.; CERNIGLIA, C. E. Microbial metabolism of aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyreno-degrading bacterium. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.54, n.10, p.2549-2555, 1988.

HIGGINS, I. J.; BURNS, R. G. The chemistry and microbiology of pollution. London: Academic Press Inc, 1975, 248p.

JØRGENSEN, K. S.; PUUSTINEM, J.; SUORTTI, A. M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. **Environ. Int.**, Elmsford, v.107, p.245-254, 2000.

KATAOKA, A. P. A. G.; **Biodegradação de resíduos oleosos de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de “landfarming”**. 2001. 202f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

KIRCHMANN, H.; EWENETU, W. Biodegradation of petroleum-based oil wastes through composting. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 9, n.2, p.151-156, 1998.

KODRES, C. A. Coupled water and air flows through a bioremediation soil pile. **Environ. Model. Softw.**, Oxford, v.9, p.37-47, 1999.

LAZAR, I.; DOBROTA, S.; VOICU, A.; STEFANESCU, M.; SANDULESCU, L.; PETRISOR, I. G. Microbial degradation of waste hydrocarbons in oily sludge from some Romanian oil fields. **J. Petrol. Sci. Eng.**, Amsterdam, v. 22, n.1-3, p.151-160, 1999.

LI, G.; HUANG, D. N.; LERNER, D. N.; ZHANG, X. Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. **Water Res.**, New York, v.34, n.15, p.3845-3853, 2000.

LI, P. J.; SUN, T. H.; STAGNITTI, F.; ZHANG, C. G.; ZHANG, H. R.; XIONG, X. Z. ALLINSON, G.; MA, X. J.; ALLINSON, M. Field-scale bioremediation of soil contaminated with crude oil. **Environ. Eng. Sci.**, New York, v.19, n.5, p.277-289, 2002.

MACNAUGHTON, S. J.; STEPHEN, J. R.; VENOSA, A. D.; DAVIS, G. A.; CHANG, Y. J.; WHITE, D. C. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.65, n.8, p.3566-3574, 1999.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an Alpine glacier skiing area. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.67, n.7, p.3127-3133, 2001.

MARGENSIN, R.; ZIMMERBAUER, A.; SCHINER, F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. **Chemosphere**, Oxford, v.40, p.339-346, 2000.

MARTIN, W. Introduction to soil microbiology. London: Blackweell, 1961, 120p.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Como isolar microrganismos degradadores de moléculas xenobióticas. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**. EMBRAPA, São Paulo. p.167-183, 1997.

MEREDITH, W.; KELLAND, S. J.; JONES, D. M. Influence of biodegradation on crude oil acidity and carboxylic acid composition. **Org. Geochem.**, Oxford, v. 31, p.1059-1073, 2000.

MEYSAMI, P.; BAHERI, H. Pre-screening of fungi and bulking agents for contaminated soil bioremediation. **Advances Environ. Res.**, London, v.7, p.881-887, 2003.

MILLER, M. N.; STRATTON, G. W.; MURRAY, G. Effects of nutrients amendments and temperature on the biodegradation of pentachlorophenol contaminated soil. **Water Air Soil Pollut.**, Dordrecht, v.151, p.87-101, 2004.

MISHRA, S.; JYOT, J.; KUHAD, R. C.; LAL, B. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.67, n.4, p.1675-1681, 2001.

NOCENTINI, M. PINELLI, D. FAVA, F. Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixture: the residual concentration problem. **Chemosphere**, Oxford, v.41, p.1115-1123, 2000.

OPEC - ORGANIZATION OF PETROLEUM EXPORTING COUNTRIES, 2003.  
Disponível em: < [www.opec.org](http://www.opec.org) > Acesso em 08 de Nov. de 2003.

PALITTAPONGARNPIM, M.; POKETHITIYOOK, P.; UPATHAM, E.;  
TANGBANLUEKAL, L. Biodegradation of crude oil by soil microorganisms in the  
tropic. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 9, p.83-90, 1998.

PLAZA, G.; NALECZ-JAWECKI, G.; ULFIG, K.; BRIGMON, R. L. The application  
of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. **Chemosphere**,  
Oxford, v.59, p.289-296, 2005.

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.  
**Bioresour. Technol.** Essex, v.90, p.159-168, 2003.

RHYKERD, R. L.; CREWS, B.; MCINNES, K. J.; WEAVER, R. W. Impact of bulking  
agents, forced aeration, and tillage on remediation of oil-contaminated soil. **Bioresour.  
Technol.** Essex, v.67, p.279-285, 1999.

ROSATO, Y. B. Biodegradação do petróleo. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L.  
**Microbiologia Ambiental**. EMBRAPA, São Paulo. p.307-304, 1997.

SABATÉ, J.; VIÑHA, M.; SOLANAS, A. M. Laboratory-scale bioremediation  
experiments on hydrocarbons-contaminated soils. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**,  
Oxford, v.54, p.19-25, 2004.

SAONO, S.; GANDJAR, I. Hydrocarbon-utilizing soil yeast from oil fields in Tjepu  
region (Central Java, Indonésia). **Ann. Bogor.**, Bogor, v.5, p.123-130, 1972.

SCHAEFFER, T. L.; CANTWELL, S. G.; BROWN, J. L.; WATT, D. S.; FALL, R. Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.38, n.4, p.742-746, 1979.

SCHOEFS, O.; DESCHENES, L.; SAMSON, R. Efficiency of a new covering system for the environmental control of biopiles used for the treatment of contaminated soils. **J. Soil Contam.**, Boca Raton, v.7, n.6, p.753-771, 1998.

SEKLEMOVA, E.; PAVLOVA, A.; KOVACHEVA, K. Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel: field demonstration. **Biodegradation**, Dordrecht, v.12, p.311-316, 2001.

SIMON, M. A.; BONNER, J. S.; PAGE, C. A.; TOWNSEND, R. T.; MUELLER, D. C.; FULLER, C. B.; AUTENRIETH, R. L. Evaluation of two commercial bioaugmentation products for enhanced removal of petroleum from a wetland. **Ecol. Eng.**, Oxford, v.22, p.263-277, 2004.

SKLADANY, G. J.; METTING, F. B. Bioremediation of contaminated soil. In: METTING, F. B.; (Ed.). **Soil microbial ecology: application in agricultural and environmental management**. New York: Marcel Dekker, Inc. p.483-513, 1992

URURAHY, A. F. P.; MARINS, M. D. M.; VITAL, R. L.; GABARDO, I. T. PEREIRA Jr, N. Effect of aeration on biodegradation of petroleum waste. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.29, p.254-258, 1998.

VASUDEVAN, N.; RAJARAM, P. Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. **Environ. Int.**, Elmsford, v.26, p.409-411, 2001.

WERNECK, A. M.; GONTIJO, P. P. Quantificação da degradação de heptadecano e hexadecano por micobactérias através da cromatografia líquido-gasosa. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.14, n.3, p.187-190, 1983.

YATEEM, A.; BALBA, M. T.; AL-AWADHI, N. White fungi and their role in remediation oil-contaminated soil. **Environ. Int.**, Elmsford, v.24, n.1-2, p.181-187, 1998.

YERUSHALMI, L.; ROCHELEAU, S.; CIMPOIA, R.; SARRAZIN, M.; SUNAHARA, G.; PEISAJOVICH, A.; LECLAIR, G.; GUIOT, S. R. Enhanced biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated soil. **Bioremed. J.**, Philadelphia, v.7, n.1, p.37-51, 2003.

YU, S. H.; KE, L.; WONG, Y. S.; TAM, N. F. Y. Degradation of polycyclic hydrocarbons (PAHs) by bacterial consortium enriched from mangrove sediments. **Environ. Int.**, Elmsford, v.31, p.149-154, 2005.

## ANEXO

### **Equipamentos e Vidrarias**

Agitador mecânico para tubos

Autoclave

Balança analítica

Balança semi-analítica

Câmara de Neubauer

Contador de Colônias

Funis analíticos

Escala de Macfarland

Equipamento Soxhlet

Estufa

Provetas

Placas de Petri

pHmetro

Termômetro digital de haste metálica

Termohigrômetro

Trado

Tubos de ensaio

### **Meios de culturas para o crescimento de microrganismos**

#### Meio BHS

MgSO<sub>4</sub> \_\_\_\_\_ 0,2 g

CaCl<sub>2</sub> \_\_\_\_\_ 0,02 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \_\_\_\_\_ 1,0 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \_\_\_\_\_ 1,0 g

NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> \_\_\_\_\_ 1,0 g

FeCl<sub>3</sub> \_\_\_\_\_ 2 gotas sol. saturada

Agar \_\_\_\_\_ 2%  
Fonte de Carbono \_ 1%  
pH \_\_\_\_\_ 7,0 a 7,2  
Água \_\_\_\_\_ 1000 mL

Meio Plate Cunt Agar - PCA

Triptona \_\_\_\_\_ 5,0 g  
Extrato de Levedura \_\_\_\_ 2,5 g  
Glicose \_\_\_\_\_ 5,0 g  
Agar \_\_\_\_\_ 15,0 g  
Água destilada \_\_\_\_\_ 1000 mL

Meio Martin

Peptona Bacteriológica \_\_\_\_ 5,0 g  
Glicose \_\_\_\_\_ 10,0 g  
 $K_2HPO_4$  \_\_\_\_\_ 1,0 g  
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  \_\_\_\_\_ 0,5 g  
Sol. de Rosa Bengala \_\_\_\_\_ 100,0 mL  
Agar \_\_\_\_\_ 20,0 g  
 $H_2O$  \_\_\_\_\_ 900,0 mL  
Sulfato de Estreptomicina \_\_\_\_ 5 mg