



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



**UTILIZAÇÃO DE TRATAMENTO FÍSICO E BIOLÓGICO CONJUGADOS
EMPREGANDO REATORES DE DIFERENTES ESCALAS NA REMEDIAÇÃO DE
SOLO CONTAMINADO POR BIODIESEL**

Uberlândia - MG

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



**UTILIZAÇÃO DE TRATAMENTO FÍSICO E BIOLÓGICO CONJUGADOS
EMPREGANDO REATORES DE DIFERENTES ESCALAS NA REMEDIAÇÃO DE
SOLO CONTAMINADO POR BIODIESEL**

Marcela Loureiro Fanni Raminho

**Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química da Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de Mestre em
Engenharia Química, área de concentração em
Pesquisa e Desenvolvimento de Processos
Químicos.**

Uberlândia - MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- R173u
2015
- Raminho, Marcela Loureiro Fanni, 1981-
Utilização de tratamento físico e biológico conjugados empregando reatores de diferentes escalas na remediação de solo contaminado por biodiesel / Marcela Loureiro Fanni Raminho. - 2015.
107 f. : il.
- Orientador: Ubirajara Coutinho Filho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
Inclui bibliografia.
1. Engenharia química - Teses. 2. Biodiesel - Teses. 3. Biorremediação - Teses. 4. Solos - Contaminação - Teses. I. Coutinho Filho, Ubirajara. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 13/02/2015.

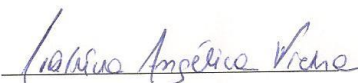
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho
Orientador (PPG-EQ/UFU)



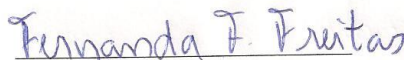
Prof.^a. Dra. Vicelma Luiz Cardoso
Coorientadora (PPG-EQ/UFU)



Prof.^a. Dra. Patrícia Angélica Vieira
(FEQUI/UFU)



Prof. Dr. Márcio Ricardo Salla
(PPGEC/UFU)



Prof.^a. Dr.^a. Fernanda Ferreira Freitas
(IQ/UFU)

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABELAS	III
RESUMO.....	IV
ABSTRACT	V
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Produção e caracterização do biodiesel.....	4
2.2 Inserção do biodiesel na matriz energética.....	6
2.3 Contaminação ambiental por combustíveis e legislação vigente.....	6
2.4 Técnicas de remediação aplicadas a áreas contaminadas.....	8
2.4.1 <i>Tecnologias de tratamento ex-situ</i>	10
2.4.2 <i>Tecnologias de tratamento in situ</i>	11
2.5 Tratamento químico	12
2.6 Tratamento físico	12
2.7 Tratamento biológico	15
2.7.1 <i>Fatores que afetam a biorremediação</i>	16
2.8 Estratégias de aumento da eficácia dos processos de biorremediação.....	19
2.8.1 <i>Bioestímulo</i>	20
2.8.2 <i>Bioaumento e bioenriquecimento</i>	20
2.8.3 <i>Adição de surfactantes</i>	21
2.8.4 <i>Adição de Material Estruturante</i>	23
2.9 Microrganismos capazes de biodegradar hidrocarbonetos.....	25
2.10 Mecanismo de degradação dos compostos orgânicos	28
2.11 Monitoramento do processo de biorremediação	29
2.11.1 <i>TPH</i>	31
2.12 Biorreatores.....	32
2.12.1 <i>Tipos de biorreatores</i>	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 O Solo.....	35
3.1.1 <i>Amostragem</i>	35
3.1.2 <i>Caracterização físico-química do solo</i>	35
3.1.3 <i>Caracterização microbiológica do solo</i>	36
3.1.4 <i>Contaminação do solo com biodiesel</i>	36
3.2 O biodiesel.....	37
3.3 A cultura mista.....	37
3.3.1 <i>Adaptação da cultura mista ao biodiesel em meio líquido</i>	37
3.3.2 <i>Adaptação da cultura mista ao solo</i>	38
3.4 O sistema de lavagem do solo.....	38
3.5 Tratamento físico do solo	39
3.5.1 <i>Testes preliminares</i>	40
3.5.1.1 <i>Teste de tempo de agitação</i>	40
3.5.1.2 <i>Teste de concentração de sólidos</i>	41
3.5.1.3 <i>Teste com água de reúso</i>	41
3.5.1.4 <i>Teste com utilização de surfactante</i>	41

3.5.2	<i>Teste com reúso do efluente</i>	42
3.6	O efluente gerado no tratamento físico do solo	43
3.6.1	<i>Caracterização físico-química do efluente</i>	43
3.6.2	<i>Biorremediação do efluente</i>	44
3.6.3	<i>Teste com utilização do efluente tratado</i>	45
3.7	Biodiesel recuperado na etapa de lavagem	46
3.7.1	<i>Caracterização do biodiesel recuperado</i>	46
3.8	Experimentos de biorremediação do solo	46
3.8.1	<i>Reator Abiótico</i>	47
3.8.2	<i>Reator rotativo em escala de bancada</i>	47
3.8.3	<i>Reator rotativo em escala piloto</i>	48
3.8.4	<i>Análises quantitativas</i>	50
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1	O Solo	51
4.2	Tratamento físico do solo	52
4.2.1	<i>Testes preliminares</i>	52
4.2.1.1	<i>Teste de tempo de agitação</i>	52
4.2.1.2	<i>Teste de concentração de sólidos</i>	54
4.2.1.3	<i>Teste com água de reúso</i>	56
4.2.1.4	<i>Teste com utilização de surfactante</i>	56
4.2.2	<i>Teste com reúso do efluente</i>	60
4.3	O efluente gerado no tratamento físico do solo	63
4.3.1	<i>Biorremediação do efluente</i>	64
4.3.2	<i>Teste com utilização do efluente tratado</i>	66
4.4	Biodiesel recuperado na etapa de lavagem	67
4.5	Experimentos de biorremediação do solo	69
4.5.1	<i>Reator Abiótico</i>	69
4.5.2	<i>Reator rotativo escala de bancada</i>	69
4.5.3	<i>Reator rotativo escala piloto</i>	73
5.	CONCLUSÃO	79
6.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	81
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXO I		94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Produção anual de biodiesel (ABIOVE, 2015).....	1
Figura 2. Reação de transesterificação para produção de biodiesel (Palomino-Romero <i>et al.</i> , 2012).	5
Figura 3. Principais processos de conversão de biomassa. Adaptado de Demirbas (2008).....	5
Figura 4. Diferentes formas físicas de contaminantes orgânicos no solo, segundo Volkering <i>et al.</i> (1998).....	8
Figura 5. Esquema do sistema de lavagem do solo.	14
Figura 6. Esquema do processo de lavagem de solo ex-situ (Adaptado de SHENKER, 2010).	14
Figura 7. Agitador mecânico e turbina de Rushton de 6 pás.....	39
Figura 8. Subprodutos da etapa de remoção mecânica do contaminante.....	39
Figura 9. Sistema solo-água-biodiesel após decantação.	40
Figura 10. Esquema do procedimento de reutilização do efluente.....	42
Figura 11. Sistema utilizado no tratamento do efluente.....	45
Figura 12. Funil de separação utilizado na recuperação do biodiesel retirado do solo.....	46
Figura 13. Reatores do rotativo escala de bancada.	48
Figura 14. Reator tipo tambor rotativo.....	48
Figura 15. Inversor de frequência do reator.	49
Figura 16. Parte interna do reator para visualização das aletas.	49
Figura 17. Comparação múltipla dos tempos de lavagem pelo teste de Tukey.....	53
Figura 18. Comparação múltipla entre os teores de sólidos ao nível de 95% de significância.	55
Figura 19. Resultado de remoção para uma contaminação inicial de 5 e 12% de biodiesel, variando os tempos de agitação, utilização ou não de surfactante, tipo de surfactante e concentração de sólidos no sistema.	58
Figura 20. Resultado de remoção para uma contaminação inicial de 5 e 12% de biodiesel, variando os tempos de agitação, utilização ou não de surfactante, tipo de surfactante e concentração de sólidos no sistema.	59
Figura 21. Remoção de biodiesel com reutilização do efluente (60% de sólidos e 60 minutos).	61

Figura 22. Remoção de biodiesel com reutilização do efluente (45% de sólidos e 60 minutos).	61
Figura 23. Remoção de biodiesel com reutilização do efluente (30% de sólidos e 30 minutos).	62
Figura 24. Aparência do efluente após separação da parte sólida.	63
Figura 25. Redução da concentração de biodiesel e do COT na biorremediação do efluente para concentrações iniciais de 1,77% e 7,44% de biodiesel, respectivamente.	65
Figura 26. Comparação da aparência do efluente antes e após o tratamento, e após retirada dos microrganismos.	66
Figura 27. Separação do biodiesel após o processo de lavagem.	68
Figura 28. Aparência do biodiesel recuperado do solo.	68
Figura 29. Cinética da degradação do biodiesel na biorremediação.	72
Figura 30. Concentração de bactérias no solo na biorremediação.	72
Figura 31. Cinética de degradação do biodiesel no primeiro experimento de biorremediação.	73
Figura 32. Temperatura durante o primeiro experimento de biorremediação.	74
Figura 33. Umidade durante o primeiro experimento de biorremediação.	75
Figura 34. Concentração dos microrganismos no primeiro experimento de biorremediação.	75
Figura 35. Cinética de degradação do biodiesel no reator escala piloto.	76
Figura 36. Temperatura no reator durante a biorremediação.	77
Figura 37. Umidade no reator durante a biorremediação.	77
Figura 38. Concentração dos microrganismos na biorremediação.	78

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Custos de métodos de remediação de solo contaminado com compostos orgânicos (ZHU <i>et al.</i> , 2010).	10
Tabela 2. Caracterização do solo.	51
Tabela 3. Resultados do teste de tempo.	53
Tabela 4. Percentual de remoção para diferentes concentrações de sólidos.	54
Tabela 5. Avaliação da influência do tipo de água de lavagem.	56
Tabela 6. Resultados de remoção (%) do teste com surfactantes para uma contaminação inicial de 5% de biodiesel.	57
Tabela 7. Resultados de remoção (%) do teste com surfactantes para uma contaminação inicial de 12% de biodiesel.	57
Tabela 8. Avaliação da concentração do surfactante utilizando 5% de contaminação inicial.	60
Tabela 9. Avaliação da concentração do surfactante utilizando 12% de contaminação inicial.	60
Tabela 10. Comparativo dos resultados de remoção com reutilização do efluente para sistemas com diferentes concentrações de sólidos.	62
Tabela 11. Caracterização do efluente proveniente da lavagem de solo contaminado com 5% de biodiesel.....	64
Tabela 12. Caracterização do efluente proveniente da lavagem de solo contaminado com 12% de biodiesel.....	64
Tabela 13. Resultados de lavagem utilizando o efluente tratado, concentração de 30% de sólidos e 35 minutos de agitação.....	66
Tabela 14. Resultados de lavagem utilizando o efluente tratado, concentração de sólidos de 60% e 60 minutos de agitação.....	67
Tabela 15. Valores de C, N, P e umidade antes do início da biorremediação.....	70

RESUMO

A busca por fontes renováveis e processos sustentáveis fez com que o biodiesel se tornasse um importante combustível dentro da matriz energética. Em relação ao meio ambiente, o biodiesel apresenta importantes vantagens se comparado ao diesel de petróleo pois possui maior biodegradabilidade e menor impacto ambiental. Assim, o aumento da produção e consumo do biodiesel fez surgir a necessidade do desenvolvimento de tecnologias para tratamento de áreas contaminadas com este combustível para o caso de acidentes ou derrames. A biorremediação, processo que transforma por meio da atividade biológica, os contaminantes em substâncias inertes, está entre as formas de tratamento mais aplicadas para a recuperação de solos contaminados com combustíveis. Porém, sua utilização é limitada por fatores como alta concentração do contaminante ou condições ambientais desfavoráveis aos microrganismos. Nesses casos, é plausível utilizar a combinação de dois ou mais tratamentos visando obter a eficiência necessária para atendimento das normas ambientais. Um procedimento que pode ser aplicado como pré-tratamento antes da biorremediação é a remoção do contaminante através de tratamento físico de lavagem do solo. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a remoção da carga poluente em solo contaminado com biodiesel, combinando técnicas de tratamento físico e biológico. O tratamento físico foi realizado por um sistema de agitação do tipo turbina de Rushton, utilizando água de reúso de indústria como base da solução extratora. No pré-tratamento de lavagem, para o sistema com utilização do surfactante Tween 80 (0,25% w/v), 60% de concentração de sólidos e 60 minutos de agitação, foram obtidos percentuais de remoção de biodiesel acima de 70%. No caso da não utilização do surfactante, o melhor resultado foi apresentado pela configuração 30% de concentração de sólidos e 35 minutos de agitação. Os percentuais de remoção obtidos neste caso foram próximos a 65%. Através da separação das fases óleo-água, foi possível recuperar cerca de 43% do biodiesel removido do solo e análises de acidez, umidade e poder calorífico indicaram que o biodiesel recuperado possui características que possibilitam sua reutilização. O tratamento do efluente gerado na etapa de lavagem foi realizado por processo biológico, utilizando a cultura mista C1 previamente adaptada ao meio líquido contendo o contaminante. Após 11 dias de tratamento, a concentração de biodiesel do efluente aproximou-se de zero e o valor do carbono orgânico total tornou-se constante com uma redução de até 75,4%. Na biorremediação foram utilizadas as estratégias de bioestimulação com controle de temperatura, umidade e nutrientes (N e P) e bioaugmentação em dois tipos de biorreatores: a) biorreator rotativo em escala laboratorial (0,3 kg), b) biorreator tipo tambor rotativo em escala piloto (15 kg). A cultura mista inoculada ao solo foi a mesma utilizada no tratamento do efluente líquido. Após 14 dias de biorremediação, foi obtida uma concentração celular da ordem de 10^{10} UFC/g de solo para bactérias e fungos mostrando que houve uma adaptação dos microrganismos ao solo. A concentração do contaminante no solo foi determinada através de análise de hidrocarbonetos totais de petróleo. Os resultados obtidos indicaram percentuais de biodegradação acima de 90% em 35 dias para os tratamentos com biorreator rotativo em escala laboratorial e o mesmo percentual em 70 dias para o biorreator rotativo em escala piloto.

Palavras-Chave: solo contaminado, biodiesel, lavagem do solo, biorremediação.

ABSTRACT

The search for renewable energies and sustainable processes has made the biodiesel became an important fuel in the energetic matrix. In relation to the environment, biodiesel has important advantages compared to petroleum diesel it has greater biodegradability and low environmental impact. However, the increasing production and consumption of biodiesel has created a need to develop technologies for treating contaminated areas with this fuel. Bioremediation, a process that transforms through biological activity, contaminants in inert substances, is the form of treatment most applied for the remediation of contaminated soils with fuel. However, this method has limited application by factors such as high concentration of the contaminant or unfavorable environmental conditions for microorganisms. In such cases, it is reasonable to use a combination of two or more treatments to achieve the necessary efficiency to meet the environmental standards. A procedure that can be applied as a pretreatment before the bioremediation is the removal of contaminants from soil by physical treatment of washing. The objective of this study was to evaluate the removal of the pollutant load in the soil contaminated with biodiesel, combining techniques of physical and biological treatment. The physical treatment was performed by an agitation system of turbine Rushton, using the reuse water from a manufacturing industry as the basis of extraction solution. In the washing pretreatment, for the system using the surfactant Tween 80 (0.25% w/v), 60% solids concentration and 60 minutes of stirring, were obtained biodiesel removal percentages above 70%. In the case of not using the surfactant, the best result was shown by setting a 30% solids concentration and 35 minutes stirring. The removal percentage obtained in this case was near 65%. By separation of oil-water phases, it was able to recover about 43% of removed soil biodiesel and acid analysis, moisture and calorific value indicated that the recovered biodiesel has characteristics that allow its reuse. The treatment of the effluent from the washing step was done by biological process using the mixed culture C1 previously adapted into medium containing the contaminant. After 11 days of treatment, the concentration of biodiesel in the effluent approached zero and the value of the total organic carbon became constant with a decrease of up to 75.4%. The techniques used in bioremediation were biostimulation with temperature, humidity and nutrients (N and P) controls and bioaugmentation in two types of bioreactors: a) rotating bioreactor in laboratory scale (0.3 kg), b) bioreactor type rotary drum on a pilot scale (15 kg). The mixed culture inoculated soil was the same used in treatment of the liquid effluent. After 14 days of bioremediation, was obtain a cell concentration of approximately 10^{10} CFU/g soil for bacteria and fungi, showing that there was an adaptation of the microorganisms to soil. The concentration of the contaminant in the soil was determined by analysis of total petroleum hydrocarbons. The results indicated the percentage biodegradation above 90% in 35 days for treatments with rotating lab scale bioreactor and the same percentage in 70 days for the rotating pilot scale bioreactor.

Keywords: contaminated soil, biodiesel, soil washing, bioremediation.

1. INTRODUÇÃO

A maior parte de toda a energia consumida no mundo provém do petróleo, do carvão e do gás natural. Essas fontes são limitadas e com previsão de esgotamento no futuro, portanto, a busca por fontes alternativas de energia é de suma importância (SHUCHRDT *et al.*, 1998). Tal fato aliado à busca de processos sustentáveis que visam a redução da poluição ambiental e do aquecimento global tem estimulado o mercado de combustíveis que acarretam menor impacto negativo ao meio ambiente que os combustíveis fósseis.

O biodiesel é um combustível alternativo obtido a partir de matérias-primas vegetais ou animais (SILVA *et al.*, 2102), que possui inúmeras vantagens sobre os combustíveis derivados do petróleo é proveniente de fontes renováveis, além da melhor qualidade das emissões durante o processo de combustão (CORRÊA; ARBILLA, 2006).

No Brasil, a produção e comercialização de biodiesel possuem importantes vantagens devido à grande disponibilidade de matéria-prima e ao crescimento contínuo da indústria de óleos vegetais e de etanol (RIVALDI *et al.*, 2007). A Figura 1 apresenta os dados da produção anual de biodiesel fornecidos pela Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE, 2015). Na análise dos dados verifica-se que a produção de biodiesel no Brasil aumentou cerca de 4.000 vezes do ano de 2005 até o ano de 2013, e vem mantendo uma curva ascendente de crescimento.

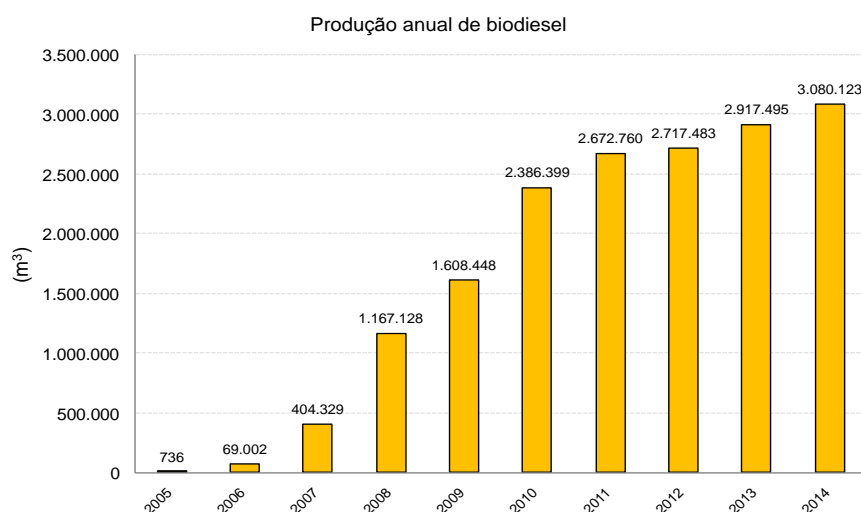


Figura 1. Produção anual de biodiesel (ABIOVE, 2015).

De acordo com o Ministério das Minas e Energia (MME, 2014), foram registradas no Brasil, até junho de 2014, 58 usinas produtoras de biodiesel, com capacidade instalada de 7.541 mil m³/ano (MME, 2014). Comparando a capacidade instalada com a produção

acumulada em 2013, percebe-se a existência de uma substancial capacidade ociosa onde as empresas utilizam apenas 39% do seu potencial de produção. Essa capacidade ociosa do setor pode ser reduzida com o aumento da mistura de biodiesel no diesel para 7%. Neste caso, o consumo passaria dos atuais 2,92 bilhões de litros em 2013 para 4,2 bilhões de litros (REUTERS, 2013).

Entretanto, o crescimento da produção de biodiesel aumenta significativamente a probabilidade de derramamentos acidentais durante o processo, transporte e armazenagem, potencializando o risco de contaminação do ambiente (solo e água). Devido a isso, técnicas de tratamento de solo contaminado por hidrocarbonetos derivados do biodiesel têm sido alvo de inúmeros estudos e constituem um grande desafio para a comunidade científica que busca obter métodos eficazes, economicamente viáveis e compatíveis com os aspectos socioambientais atuais. Devido à complexidade e diversidade das contaminações, não há uma regra que determine o melhor tratamento a ser utilizado. Cada caso deve ser analisado individualmente, avaliando suas particularidades. Em geral, o sucesso da técnica empregada depende das condições físicas, químicas e biológicas do local contaminado, do tempo de exposição, tipo e concentração do contaminante e do tempo requerido para a remoção do composto alvo (ANDRADE *et al.*, 2010).

O elevado potencial no uso de microrganismos, apontados na literatura como agentes degradadores das mais diversas substâncias, indica o tratamento biológico como um dos mais eficientes modos de reduzir os efeitos adversos dos hidrocarbonetos sobre o meio ambiente (ALEXANDER, 1999). Assim, a biorremediação vem se destacando como uma das estratégias mais promissoras a ser adotada no tratamento de solos contaminados por combustíveis (TRINDADE *et al.*, 2002), além de ser vista como um método seguro, eficiente e mais barato quando comparado aos demais métodos (PROVIDENTI *et al.*, 1993).

Nas aplicações mais comuns da biorremediação, os microrganismos naturalmente presentes nos solos ou águas contaminados são estimulados a degradar os contaminantes orgânicos, como os hidrocarbonetos, através da manipulação de condições ambientais tais como suprimento de oxigênio, concentração de nutrientes e teor de umidade. O benefício desses processos é a mineralização do poluente, isto é, a transformação em gás carbônico, água e biomassa (RISER-ROBERTS, 1998).

Entretanto, a utilização da biorremediação pode ser limitada pela existência de hidrocarbonetos não biodegradáveis e pela toxicidade apresentada pelos mesmos quando presentes em altas concentrações. Segundo Johnsen *et al.* (2005) a incapacidade dos

microrganismos em metabolizar eficientemente certos hidrocarbonetos, a falta de nutrientes para a microbiota degradadora e a baixa biodisponibilidade dos hidrocarbonetos aos microrganismos são os principais fatores que inviabilizam a utilização da técnica.

Além de contornar os problemas anteriormente citados, a lavagem do solo é uma alternativa viável como pré-tratamento para reduzir a quantidade de contaminante a ser processado por outras tecnologias de descontaminação. A lavagem do solo pode ser aplicada *in situ* ou *ex situ* (DENNIS *et al.*, 1992; GRIFFITHS, 1995) e consiste na extração dos contaminantes do solo por dissolução ou suspensão deste em soluções aquosas. Este tipo de tratamento apresenta como vantagens altas taxas de remoção em curto período de tempo (ANDRADE *et al.*, 2010) e a possibilidade de recuperar e reutilizar parte do combustível contaminante. Porém, a necessidade de tratamento adicional do efluente gerado neste processo que eleva o custo da aplicação da tecnologia (RIZZO, 2008).

Na busca de soluções mais eficientes no tratamento de ambientes contaminados por biodiesel, este trabalho teve como objetivos avaliar a remoção da carga poluente do solo combinando duas técnicas de tratamento (físico e biológico), além de desenvolver um processo além da escala laboratorial, empregando biorreator rotativo em escala piloto. O tratamento físico foi realizado por meio de um sistema de lavagem por agitação mecânica utilizando turbina de Rushton com 6 pás e posterior adição de nutrientes e inoculação de microrganismos no solo para tratamento de biorremediação. Para o tratamento biológico foram construídos um biorreatores rotativo em escala laboratorial e em escala piloto utilizando cargas de 0,3 kg e 15,0 kg de solo respectivamente.

Sumarizando, este trabalho possui como objetivos específicos: a) realizar a separação do biodiesel do solo através de lavagem com agitação mecânica utilizando água de reúso de indústria; b) recuperar o biodiesel retirado do solo; c) realizar a biorremediação do solo em escala laboratorial e escala piloto; d) tratar o efluente gerado na lavagem do solo. Assim, espera-se ofertar subsídios que proporcionem o desenvolvimento e aperfeiçoamento da utilização de técnicas físicas e biológicas conjugadas na remediação de solo contaminado com biodiesel.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção e caracterização do biodiesel

Biocombustíveis são derivados de biomassa renovável, e podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo ou gás natural em motores a combustão ou em outro tipo de gerador de energia. Os dois principais biocombustíveis líquidos utilizados no Brasil são o etanol extraído da cana de açúcar e, em escala crescente, o biodiesel que pode ser usado puro ou misturado ao diesel em diversas proporções. A mistura (“blend”) de 2% de biodiesel ao diesel de petróleo é chamada B2 e, assim sucessivamente, até o biodiesel puro, denominado B100 (CNI, 2007).

A matéria prima utilizada para a produção do biodiesel pode ser o óleo vegetal ou outros tipos de óleos e gorduras. Opções de matérias prima ecologicamente corretas como o óleo vegetal residual, normalmente descartado depois de utilizado em frituras, e os subprodutos da produção de carnes como sebo, banha de porco, graxa amarela e gordura de frango, fontes de gordura animal, têm tido destaque em pesquisas atuais (MAGALHÃES, 2101; MORAES, 2008; ZANETTI, 2012).

As propriedades físico-químicas do biodiesel variam conforme a composição de ácidos graxos do elemento empregado na sua produção (LIN *et al.*, 2011). De acordo com dados de 2010, divulgados pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, a maior parte do biodiesel produzido no Brasil deriva do óleo de soja.

Quimicamente, os óleos e gorduras consistem em moléculas de triglicerídeos, constituídas por três ácidos graxos de cadeia longa ligados na forma de ésteres a uma molécula de glicerol. Para viabilizar o uso de óleos vegetais como combustível alternativo, métodos químicos que modificam algumas de suas características podem ser empregados, como a microemulsificação e a pirólise (GERIS *et al.*, 2007). No entanto, a transesterificação dos triglicerídeos com alcoóis de cadeia curta (Figura 2) é considerada a técnica de maior aceitabilidade, pois produz biodiesel com propriedades similares às do diesel fóssil (DEMIRBAS, 2009). A Figura 3 mostra os principais processos relacionados a esta conversão de biomassa.

Dentre os alcoóis empregados na transesterificação de óleos e gorduras, os mais utilizados são metanol e etanol. O metanol é mais amplamente aplicado na produção de biodiesel em escala comercial e, por ser mais reativo, implica em menor temperatura e tempo

de reação. O etanol, além de ter produção consolidada no Brasil, é consideravelmente menos tóxico, é renovável e produz biodiesel com maior número de cetano e lubricidade (LÔBO *et al.*, 2009).

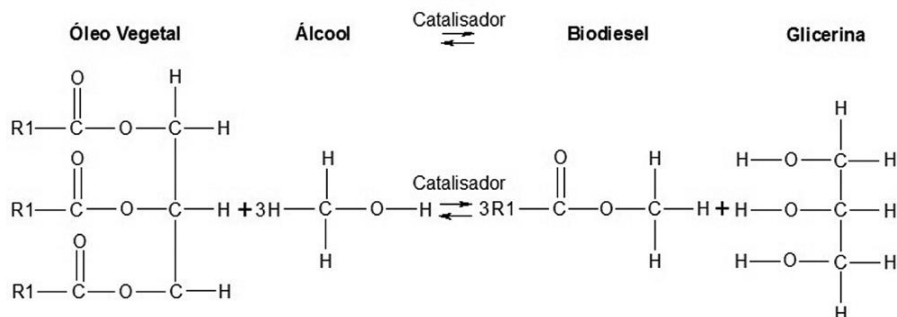


Figura 2. Reação de transesterificação para produção de biodiesel (PALOMINO-ROMERO *et al.*, 2012).

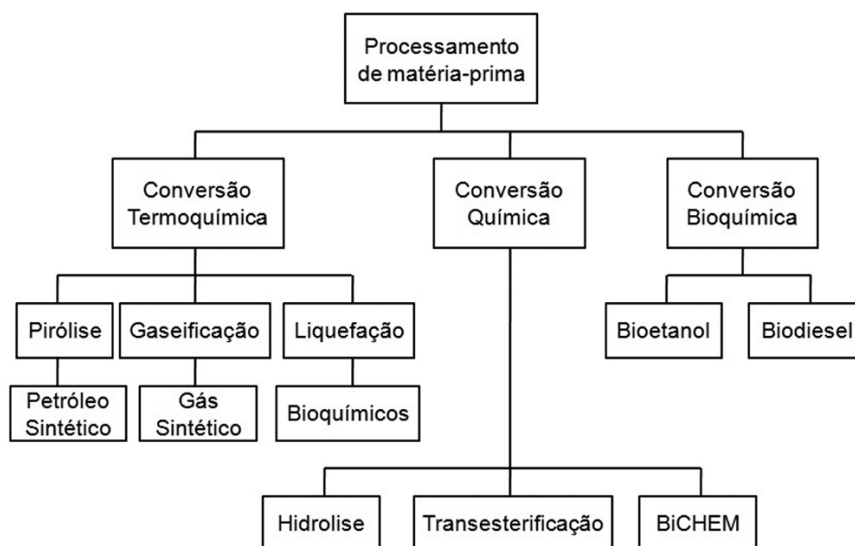


Figura 3. Principais processos de conversão de biomassa. Adaptado de Demirbas (2008).

Apesar das propriedades do biodiesel possibilitar a substituição do diesel, a composição química destes dois combustíveis é bem diferente. O óleo diesel é constituído basicamente por hidrocarbonetos, apresentando em baixas concentrações átomos de enxofre, oxigênio e nitrogênio. A cadeia de hidrocarbonetos que forma o óleo diesel varia, podendo chegar até vinte e oito átomos de carbono. Já o biodiesel é uma mistura de ésteres de ácidos graxos com monoalcoóis de cadeia curta (SUAREZ *et al.*, 2007), compostos de baixa complexidade estrutural. O biodiesel possui predominantemente oito diferentes ácidos graxos metil esterificados, é isento de enxofre e sua biodegradabilidade é favorecida pelas cadeias

C₁₆-C₁₈ (ácidos graxos), ausência de moléculas aromáticas, propriedades higroscópicas e disponibilidade de ligações éster de alta energia (PASSMAN; DOBRANIC, 2005). Porém, apresenta também algumas vulnerabilidades em relação ao petrodiesel, como a susceptibilidade à deterioração em sistemas de estocagem e a liberação de óxidos de nitrogênio (NO_x) durante sua combustão (DEMIRBAS, 2009; PASSMAN; DOBRANIC, 2005). Ainda assim, o apelo ambiental vinculado ao seu uso tem fomentado a ampliação de sua utilização.

2.2 Inserção do biodiesel na matriz energética

O primeiro uso documentado de óleo vegetal como combustível em um motor a diesel ocorreu em 1900, na Exposição Mundial de Paris, quando foi demonstrado o funcionamento de um motor com óleo de amendoim. No entanto, as pesquisas por fontes alternativas de energia pouco avançaram até a primeira crise do petróleo, na década de 70 (KNOTHE, 2010). Nesta época foram criados vários programas de desenvolvimento de energias renováveis, de economia de energia, de uso da energia nuclear, do gás natural e do carvão mineral. Este quadro se manteve até meados dos anos 80, quando o preço do petróleo caiu consideravelmente e o interesse pelos substitutos do insumo fóssil diminuiu devido ao custo dos subsídios necessários para mantê-los no mercado (LEITE; LEAL, 2007).

Recentemente, novas questões despertaram o interesse pelos biocombustíveis, como a diminuição da dependência externa do petróleo, por razões de segurança de suprimento ou impacto na balança comercial; minimização dos efeitos das emissões veiculares na poluição; e o controle da concentração de gases de efeito estufa na atmosfera (LEITE; LEAL, 2007).

Atualmente, o Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel no mundo. Com capacidade instalada de 7,5 bilhões de litros, a produção anual em 2013 foi de 2,9 bilhões de litros. Com isso, aproximadamente 45% da energia e 18% dos combustíveis consumidos no país são renováveis. O Plano Nacional de Energia 2030, desenvolvido pelo Ministério das Minas e Energia, projeta um cenário de comercialização da mistura B8, em detrimento a atual B7, em 2020, e da B12 em 2030 (MME, 2014).

2.3 Contaminação ambiental por combustíveis e legislação vigente

O solo é reconhecido como um recurso natural básico, sendo um componente fundamental dos ecossistemas e dos ciclos naturais, um reservatório de água, um suporte essencial da atividade agrícola e um espaço para as atividades humanas. No entanto, a

integridade desse recurso pode, algumas vezes, ser comprometida por atividades antropogênicas inerentes ao desenvolvimento socioeconômico da humanidade, quando as mesmas são realizadas sem o comprometimento com a preservação ambiental (RIZZO, 2008).

Qualquer substância indesejada introduzida ao ambiente é chamada de contaminante e os efeitos causados por ele levam à poluição, condição em que um recurso natural é considerado não adequado ao uso (MEGHARAJ *et al.*, 2011). A contaminação do solo consiste na deposição, disposição, descarga, infiltração, acumulação, injeção ou aterramento de substâncias ou produtos poluentes, em estado sólido, líquido ou gasoso. Assim, pode-se concluir que o solo será contaminado sempre que houver adição de compostos que modifiquem suas características naturais, podendo ocorrer nas etapas de produção, transporte, armazenagem e manipulação dos combustíveis.

Segundo um histórico de acidentes relacionado ao transporte de cargas perigosas no estado do Rio Grande do Sul, foram registrados pela Fundação Estadual de Proteção Ambiental (FEPAM), de janeiro de 1994 a maio de 2010, 475 acidentes rodoviários com produtos químicos de diversas origens. Aproximadamente 25% desse total relacionados ao derramamento de combustíveis, sendo o solo o compartimento ambiental mais impactado (MEYER, 2011). Além dos derrames acidentais, a qualidade do solo tem sido afetada por contaminações crônicas decorrentes de vazamentos nos tanques de armazenagem e tubulações de postos de combustíveis (COUTINHO; GOMES, 2006).

Sanches (1998) aponta três problemas gerados pela contaminação do solo por hidrocarbonetos: existência de riscos à segurança das pessoas e das propriedades, riscos à saúde pública e dos ecossistemas e restrições ao desenvolvimento urbano e imobiliário. Segundo Gibotti (1999), a ocorrência de vazamentos de combustíveis configura perigo constante de incêndio ou explosão nos locais atingidos. Vapores de gasolina podem explodir sem ignição prévia ao atingirem concentrações da ordem de 1,4% (14.000 ppm) no ar, quando a mistura de combustível mais comburente é suficiente para que haja combustão espontânea.

Além destes problemas, é importante ressaltar que a recuperação de áreas contaminadas é uma tarefa complexa e bastante demorada, e em alguns casos não se consegue atingir os limites permitidos pela legislação ou pelos órgãos ambientais.

A área é classificada como área contaminada quando se constatar a presença de contaminantes em concentrações acima dos “valores de intervenção” (concentração de determinada substância no solo acima da qual existem riscos potenciais, diretos ou indiretos, à saúde humana), indicando a necessidade de ações para resguardar os receptores de risco,

devendo seguir os procedimentos de gerenciamento de áreas contaminadas (CETESB, 2005). Os valores de TPH (hidrocarbonetos totais de petróleo) tem como valores de intervenção para solo e água, fixados em 1.000 mg/kg e 600 µg/L, respectivamente (CETESB, 2007).

Recentemente, um importante marco legal foi estabelecido, consolidando o crescimento do país no que diz respeito a leis ambientais. Em dezembro de 2009, foi publicada a Resolução CONAMA nº 420, primeira regulamentação federal sobre gerenciamento de áreas contaminadas, tendo como referência os parâmetros utilizados pela Lista Holandesa e pela CETESB.

2.4 Técnicas de remediação aplicadas a áreas contaminadas

Atualmente, a sociedade se apresenta mais preocupada e conscientizada nas questões que dizem respeito ao meio ambiente. Tal quadro exige maior atuação das autoridades, gerando uma demanda crescente em relação ao gerenciamento de áreas contaminadas.

Por esse motivo, diversas tecnologias de remediação têm sido desenvolvidas com o objetivo de restaurar a qualidade do solo e da água contaminada. A seleção de tecnologias a serem utilizadas baseia-se fundamentalmente no conhecimento das características físico-químicas do contaminante, volume vazado, tempo de vazamento, caracterização geológica e hidrogeologia do local e análise do meio físico superficial e subterrâneo (SPILBORGH, 1997). A Figura 4 mostra as formas físicas dos contaminantes orgânicos que varia de acordo com o tipo de solo contaminado, segundo Volkering *et al.* (1998).

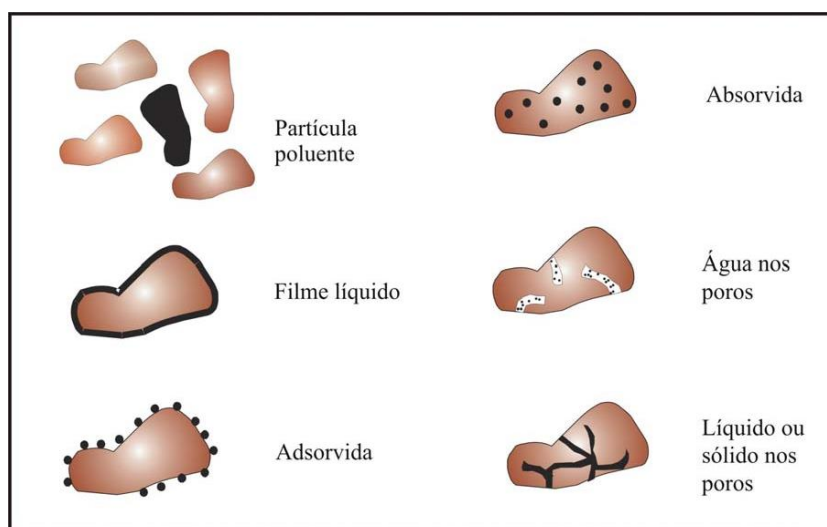


Figura 4. Diferentes formas físicas de contaminantes orgânicos no solo, segundo Volkering *et al.* (1998).

Na remediação de áreas contaminadas, podem ser aplicados diferentes processos. A princípio, pode-se diferenciar duas ideias básicas: medidas passivas ou medidas ativas. Medidas passivas, como barreiras hidráulicas e encapsulamento, visam evitar o espalhamento dos contaminantes, contudo, são consideradas soluções temporárias. Em contrapartida, as medidas ativas retiram ou eliminam os contaminantes até o limite aceitável (COOKSON, 1995).

Embora existam diversas tecnologias aplicáveis, o processo de remediação inevitavelmente resultará na mudança das funções naturais do meio, seja permanente ou temporariamente. Zhu *et al.* (2010) afirmam que solos que apresentam baixo grau de contaminação por compostos orgânicos poderiam passar apenas por processos que diminuam a disponibilidade ou restrinjam a mobilidade dos poluentes. Para tanto, métodos de estabilização e mobilização funcionariam como tecnologias de mitigação, sendo suficientes para sanar contaminações dessa magnitude. Entretanto, diante de sítios altamente impactados, abordagens mitigadoras não seriam a melhor opção, havendo a necessidade de recuperar o meio através de técnicas de remediação (ZHU *et al.*, 2010).

As medidas de descontaminação são diferenciadas em processos *in situ* e *ex-situ*. Os processos *in situ* tratam os contaminantes no local e diretamente no solo, evitando assim a escavação do mesmo. Quando há escavação do solo e tratamento externo, é denominado remediação *ex-situ*. Neste caso, diferencia-se ainda entre tratamento diretamente no local e tratamento numa estação de tratamento. Independente da aplicação da técnica *in situ* ou *ex-situ*, o controle do processo tem um papel importante no sucesso da remediação. Por causa da heterogeneidade do solo, este controle no processo *in situ* torna-se bem mais complexo.

A decisão a favor de medidas *in situ* ou *ex-situ* depende, principalmente, das condições econômicas e técnicas e do tempo disponível. A remediação “*in situ*” é realizada no próprio local, sem que haja remoção de material contaminado, evitando custos e distúrbios ambientais associados com o movimento de solos e águas que estão contaminados para outros locais destinados ao tratamento. O longo tempo de tratamento necessário para atingir o objetivo da remediação pode ser a grande desvantagem quando o local não pode ser reaproveitado em tempo hábil (BERGER, 2005).

Ainda que as técnicas convencionais de remediação estejam mais disseminadas e tenham avançado tecnologicamente nos últimos anos, elas ainda contam com altos custos de execução (Tabela 1).

Tabela 1. Custos de métodos de remediação de solo contaminado com compostos orgânicos (ZHU *et al.*, 2010).

Tipo de tratamento	Faixas de custo (\$·ton⁻¹ solo)
Remediação física	120 - 1500
Remediação química	80 - 440
Biorremediação in situ	50 - 150

2.4.1 Tecnologias de tratamento *ex-situ*

- “Landfarming”: tecnologia normalmente utilizada para o tratamento de resíduos industriais perigosos. Os resíduos são dispostos em células de tratamento de grandes dimensões e misturados à camada superficial do solo, na qual encontra-se uma maior atividade microbiana. O solo sofre frequente revolvimento e aragem com objetivo de suprir o oxigênio necessário à atividade microbiana. Da mesma forma, para a manutenção da atividade microbiana, o pH, a umidade e as concentrações de nutrientes são corrigidos periodicamente (RIZZO, 2008).

- Biopilhas: tecnologia variante do “landfarming”, baseando-se, no entanto, em um sistema mais complexo que permite o controle da perda de compostos voláteis durante a fase operacional e a introdução de água, nutrientes e oxigênio. A tecnologia de biopilhas envolve a construção de células ou pilhas de solo contaminado de forma a estimular a atividade microbiana aeróbica dentro da pilha através de uma aeração muito eficiente. Esse tipo de sistema não permite a frequente mistura do solo para suprir limitações referentes à heterogeneidade e à disponibilização de nutrientes e contaminantes (RIZZO, 2008).

- Biorreatores: Os biorreatores facilitam o controle do processo de biodegradação dos poluentes no solo, facilitando a aclimação da microbiota e o desenvolvimento dos microrganismos. Além disso, maximizam as taxas de degradação através da redução ou eliminação dos poluentes (RIZZO, 2008). O emprego dos biorreatores vem surgindo como uma tecnologia viável e decisiva para tratamento de solo contaminado com compostos orgânicos (URURAHY, 1998). O tipo de biorreator mais comum para o tratamento de solos contaminados são os reatores de lama ou “slurry reactors”. Neste, após escavação e peneiramento, o solo contaminado é misturado a uma fase aquosa (que pode conter microrganismos e/ou nutrientes e/ou surfactantes). A “lama” gerada contém mais ou menos sólidos (de 10 a 40% p/p) em função do tipo de solo, dos equipamentos de agitação e do sistema de aeração disponíveis. A lama tratada normalmente é desidratada ou pode ser

submetida à biorremediação em fase sólida. Uma outra opção em termos de configuração de biorreatores, são os de fase sólida, onde trabalha-se com teores reduzidos de umidade no solo (10 – 20 %).

2.4.2 Tecnologias de tratamento in situ

- "Bioventing" (ou Bioventilação): tecnologia baseada na introdução de ar na zona insaturada do solo, suprindo assim a necessidade de oxigênio requerida pelo processo da biodegradação aeróbia.

- "Air Sparging" e "Biosparging" : tecnologias semelhantes ao "Bioventing", porém o ar é introduzido na zona saturada, isto é, no lençol freático. A proposta é não somente suprir as necessidades de oxigênio, mas também transferir os poluentes voláteis para a zona insaturada na qual se encontram os microrganismos capazes de degradá-los. Além da injeção de ar, nutrientes podem ser injetados ("biosparging") com o objetivo de aumentar a biodegradação dos contaminantes (RIZZO, 2008).

- "Bioslurping" (Extração multifásica): é uma nova tecnologia de remediação que associa elementos de "bioventing" e bombeamento para recuperação dos contaminantes livres de águas subterrâneas e solos onde ocorre a extração simultânea das diversas fases dos hidrocarbonetos a partir da aplicação de alto vácuo em poços de extração. Tanto a fase vapor quanto a fase líquida extraída são encaminhadas para sistemas de separação específicos (separadores água/óleo, separadores de vapores/líquidos). Além disso, o fluxo de ar gerado pela extração dos vapores pelo tubo promove a aeração da zona insaturada, aumentando o conteúdo de oxigênio e a taxa de degradação aeróbia (RIZZO, 2008).

- Atenuação natural monitorada: processo de tratamento não monitorado baseado em processos naturais biológicos, químicos e físicos, sendo apenas realizado monitoramento regular da concentração do contaminante. O processo ocorre sem intervenção humana de forma a conter a expansão da contaminação, reduzindo a massa, a toxicidade, o volume ou concentração dos contaminantes.

- Fitorremediação: tecnologia que envolve a utilização de vegetais superiores, diretamente ou indiretamente, resultando em remoção ou degradação do poluente. Esse processo pode ocorrer através da remoção do poluente pela própria planta ou pela degradação do poluente pelos microrganismos que colonizam as suas raízes ou que estão em uma porção do solo bem próxima destas. O baixo custo é uma vantagem, porém, o tempo para que se observem os resultados pode ser longo, pois depende do ciclo vital da planta. Além disso, a

concentração do poluente e a presença de outras toxinas devem estar dentro dos limites de tolerância da planta (RIZZO, 2008).

2.5 Tratamento químico

As técnicas de remediação química incluem principalmente a aplicação de agentes oxidantes ou solventes para extração dos contaminantes do solo. Podem ser citados como exemplos: extração por solvente e processos oxidativos avançados (POA). De acordo com os compostos poluentes envolvidos, diferentes substâncias podem ser utilizadas, como peróxido de hidrogênio, etanol, metanol, surfactantes, óleos vegetais, ciclohexano ou diclorometano (ZHU *et al.*, 2010).

Dentre os processos químicos emergentes para o tratamento de solos, os processos oxidativos avançados (POA) destacam-se como uma alternativa promissora, pois, envolvem a geração de espécies químicas radicalares e altamente oxidantes, como o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$). Esses radicais são eficientes na degradação de diversos compostos tóxicos, recalcitrantes e contaminantes de difícil degradação, em curto período de tempo, como os hidrocarbonetos de petróleo, além de apresentarem baixos custos operacionais. Os POA, em função de suas eficiências comprovadas na degradação de contaminantes de petróleo e seus derivados, representam, atualmente, uma alternativa importante para a mitigação de problemas ambientais (ANDRADE, 2005).

2.6 Tratamento físico

Os métodos físicos fundamentam-se no princípio tecnológico da transferência do contaminante do solo para um sequestrador (ou captador) na fase líquida ou gasosa. Como resultado do tratamento obtém-se o solo tratado e os contaminantes concentrados. Este tipo de tratamento pode ser realizado empregando altas temperaturas, energia cinética ou campos elétricos. São as características do contaminante que determinam a opção mais adequada. Enquanto a remediação térmica seria apropriada ao tratamento de compostos voláteis, semivoláteis ou termicamente instáveis, a remediação eletrocinética seria recomendada para descontaminação de locais impactados por compostos iônicos (ZHU *et al.*, 2010). Opções de tratamentos físicos são citados na sequência.

- Extração de vapores: a extração de vapores no solo, também conhecida como SVE (“Soil Vapor Extraction”), é uma técnica de remediação comumente empregada no tratamento

de solos contaminados, porém, deve-se ressaltar que essa técnica é aplicada somente à “zona não-saturada” (zona que se situa imediatamente abaixo da superfície topográfica e acima do nível freático) onde os espaços entre as partículas estão parcialmente preenchidos por gases, essencialmente ar atmosférico e vapor de água, e por água. De modo geral, a SVE baseia-se na aplicação de vácuo em pontos estratégicos do solo, a fim de induzir o fluxo controlado de ar e, então, remover os contaminantes presentes no solo, sobretudo, nas regiões da subsuperfície. Nessa técnica, os gases extraídos devem, obrigatoriamente, passar por etapas de tratamento de vapores, antes de serem lançados para a atmosfera (ANDRADE *et al.*, 2010).

- Remediação eletrocinética: processo que remove metais e compostos orgânicos de solos com baixa permeabilidade. Utiliza processos eletroquímicos e eletrocinéticos para liberar contaminantes metálicos e orgânicos polares adsorvidos.

- Encapsulamento e solidificação: a técnica de microencapsulamento é uma das mais utilizadas para tratamento de solos impactados com altas concentrações de hidrocarbonetos. Nesta técnica utilizam-se dois tipos de produtos: um emulsificante e um composto à base de sílica. A aplicação do primeiro produto promove a emulsificação do hidrocarboneto, enquanto a sílica reage com o hidrocarboneto emulsionado formando um produto não solúvel, o que garante a redução da mobilidade do hidrocarboneto e da toxicidade (RISER-ROBERTS, 1998).

- Lavagem do solo: a lavagem do solo (“soil flushing” ou “soil washing”) é uma técnica que consiste na extração dos contaminantes do solo por dissolução, suspensão em soluções aquosas ou através da reação química com o líquido que passa através do solo contaminado. Esta técnica permite a remoção de compostos orgânicos, inorgânicos, metais e substâncias radioativas, podendo a sua eficiência ser aumentada recorrendo ao uso de aditivos. Os métodos mecânicos geralmente envolvem agitação intensiva de uma suspensão em que o solo contaminado é limpo pelo atrito gerado entre as partículas. Após a lavagem, os hidrocarbonetos retirados do solo formam emulsões na água de lavagem. O sistema de lavagem de solo é mostrado esquematicamente na Figura 5.

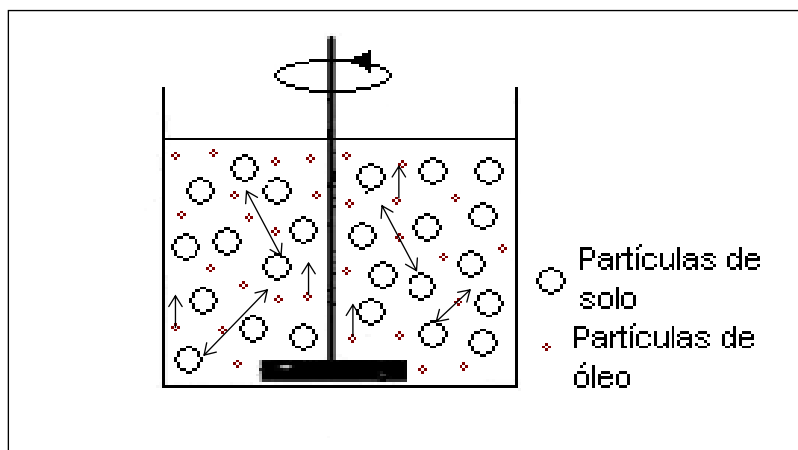


Figura 5. Esquema do sistema de lavagem do solo.

O agitador proporciona uma mistura contínua do solo contaminado com a solução extratora. As partículas de solo se chocam umas com as outras e a energia gerada pela tensão cisalhante faz com que as moléculas de óleo se desprendam do solo. A diferença na densidade entre a água e o biodiesel proporciona a flutuação do óleo para a superfície.

Uma vantagem adicional é que o custo e a manutenção do equipamento pode ser significativamente mais baixo do que aqueles dos outros sistemas. Esta técnica é muitas vezes considerada um pré-tratamento utilizado para redução da quantidade de material contaminado a ser processado por outras tecnologias de descontaminação (SMITH *et al.*, 1993). Existem duas formas de aplicação da lavagem do solo, no próprio local (*in situ*) ou em reatores. A forma *in situ* não é muito aplicada devido à dificuldade de estabelecer condições operacionais seguras (CETESB, 2007). A Figura 6 representa um esquema de lavagem de solo *ex-situ*.

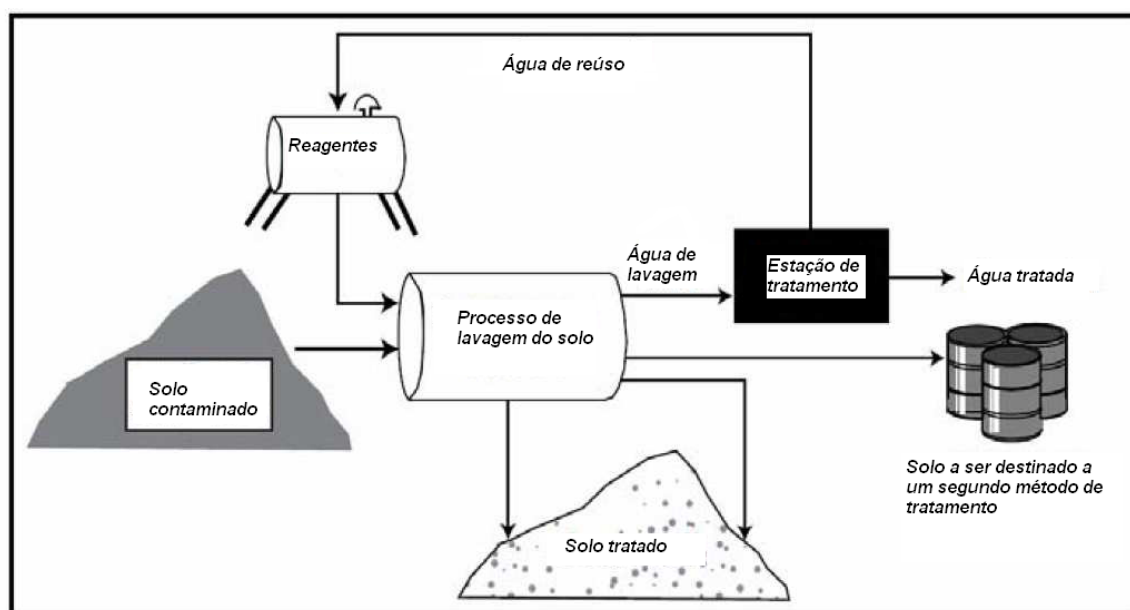


Figura 6. Esquema do processo de lavagem de solo *ex-situ* (Adaptado de SHENKER, 2010).

2.7 Tratamento biológico

Nas duas últimas décadas, a aplicação de processos biológicos ao tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo tem despertado grande interesse da comunidade acadêmica e industrial (SEABRA, 2008). No entanto, poucos trabalhos deram ênfase à presença do biodiesel como contaminante. Estudos disponíveis na literatura permitem afirmar que o biodiesel, puro ou misturado a outros combustíveis, como contaminante apresenta resultados particulares de remoção ou toxicidade (LAPINSKIENE *et al.*, 2006; LEME *et al.*, 2012).

Comparativamente às tecnologias convencionais de remediação, esta técnica possui vasta aplicabilidade, baixos custos operacionais e, embora o processo seja longo na maioria dos casos, é eficiente na transformação de contaminantes em substâncias inócuas (MADSEN, 1991; SCRAGG, 2005; ZHANG *et al.*, 2010). Entretanto, este é um procedimento complexo, pois a interação solo-microrganismo-contaminante é essencial para que a técnica tenha efetividade.

A metabolização de poluentes orgânicos por organismos vivos compõe a base fundamental da biorremediação. Ao fazerem uso dessa fonte de energia disponível, os microrganismos podem promover a transformação de moléculas contaminantes em compostos menos tóxicos e complexos, por meio de uma degradação parcial, ou produzir compostos químicos simples, como CO₂, H₂O e NH₃, através da mineralização da molécula orgânica (GAYLARDE *et al.*, 2005; JACQUES *et al.*, 2010; MEGHARAJ *et al.*, 2011; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A variedade de compostos poluentes que um sítio pode apresentar implica a presença de uma comunidade degradadora de ampla diversidade catabólica. Assim, quando uma situação de contaminação é simulada em laboratório, a utilização de consórcios microbianos ao invés do uso de culturas puras é mais vantajosa, pois provê essa diversidade metabólica necessária para um tratamento efetivo (TYAGI *et al.*, 2011). Essa perspectiva tem sido confirmada pelos bons resultados obtidos em diversos trabalhos, tanto em solo (JACQUES *et al.*, 2007) quanto em meio líquido (CERQUEIRA, 2011). O efeito de interações sinérgicas entre os membros da associação contribui para a completa mineralização dos contaminantes, em que determinado grupo de microrganismos pode remover metabólitos que são tóxicos a outro grupo ou ainda utilizar produtos de degradação como seu substrato (MUKRED *et al.*, 2008).

O estabelecimento de condições ambientais adequadas é fundamental para que o processo de biorremediação ocorra de forma eficaz. Caso isto não aconteça, o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos envolvidos no processo de degradação serão afetados e, conseqüentemente, a biorremediação dos compostos poluentes ficará comprometida. Do ponto de vista prático, segundo Moreira e Siqueira (2006), a biorremediação é fundamentada em três aspectos microbiológicos principais: a existência de microrganismos com capacidade catabólica para degradar o contaminante; a disponibilidade ou a acessibilidade do contaminante ao ataque microbiano ou enzimático; a existência de condições ambientais adequadas para o crescimento e atividade do agente biorremediador.

Providenti *et al.* (1993) afirmam que as condições ambientais podem afetar o processo de biodegradação em dois níveis: influenciando o crescimento e a atividade microbiana; e/ou influenciando as propriedades físicas e químicas dos poluentes. Os efeitos das diferentes condições ambientais impostas ao sistema podem ser interativos, o que torna difícil prever um modelo de comportamento do mesmo. A otimização das condições ambientais é, portanto, uma etapa fundamental no desenvolvimento de qualquer tecnologia a ser adotada no processo de biorremediação de solos contaminados.

Como já mencionado para outros tratamentos, a biorremediação também pode ser realizada *in situ* ou *ex-situ*. Dentre as duas possibilidades, a biorremediação *in situ* é o procedimento que oferece os menores custos de execução e manutenção e os mais baixos riscos de exposição aos poluentes. Além disso, é o método que promove a restauração das funções ecológicas do ambiente em maior grau por causar um distúrbio menos expressivo durante a fase de tratamento (JORGENSEN, 2007). No entanto, cada uma das abordagens possui vantagens e desvantagens que devem ser ponderadas a cada nova situação.

2.7.1 Fatores que afetam a biorremediação

Todas as aplicações de biorremediação são dependentes da especificidade e condições do ambiente ou da matriz em que a contaminação é encontrada. O meio ambiente e a situação da matriz geralmente deve ser analisado antes da escolha do método de tratamento. Por exemplo, alguns microrganismos necessitam de propriedades específicas a fim de serem eficazes, e alguns compostos têm de ser tratados sob certas condições (por exemplo, em condições aeróbias e/ou anaeróbias) (USEPA, 1997). Os principais fatores que precisam ser monitorados/ajustados durante um processo de biorremediação estão descritos a seguir.

- Temperatura: a temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que influenciam a atividade e a sobrevivência dos microrganismos (CORSEUIL; ALVAREZ, 1996). Muitos microrganismos heterotróficos são capazes de degradar hidrocarbonetos dentro de uma ampla faixa de temperatura, porém, baixas temperaturas diminuem a fluidez e a permeabilidade da membrana celular, que controla o transporte de nutrientes e contaminantes entre o meio exterior e o interior da célula microbiana. Altas temperaturas são associadas com atividades enzimáticas mais altas e taxas de biodegradação mais rápidas, até um valor que é específico de cada espécie, mas, se a temperatura aumenta muito acima do valor ótimo, proteínas, enzimas e ácidos nucleicos tornam-se desnaturados e inativos. A faixa de 30 a 40°C é considerada ideal na biodegradação dos hidrocarbonetos (ALEXANDER, 1999; LEAHY; COLWELL, 1990; MIROSLAV; HORAKOVA, 1996).

- pH: a maioria dos solos apresenta valor de pH na faixa entre 4,0 e 8,5. As camadas superficiais dos solos, em regiões de clima úmido, tendem a ser mais ácidos devido à lixiviação dos compostos formados pela decomposição da matéria orgânica. Por outro lado, em regiões de clima seco, o solo tende a apresentar um caráter alcalino (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A diversidade metabólica dos microrganismos permite que fungos e bactérias apresentem pH ótimo desde extremamente ácido até extremamente básico. A maior parte dos microrganismos envolvidos no processo de biorremediação, a faixa de pH favorável ao seu crescimento é de 6,0 a 8,0, quando a biodegradação tende a ser mais rápida (ALEXANDER, 1999; ATLAS, 1984). Em ambientes de extrema acidez ou alcalinidade, a atividade microbiana decai.

- Características do solo: a composição química confere ao solo diferentes características, principalmente relacionadas à consistência, textura, porosidade, permeabilidade e coloração (OLIVEIRA, 2008). Elektorowicz (1993) destaca a importância da textura e da porosidade do solo para o sucesso do processo de biorremediação, já que os mesmos influenciam diretamente a densidade e permeabilidade e assim no comportamento dos gases e da água no solo. O tamanho das partículas de solo também interfere na textura do solo, sendo as principais partículas aquelas com tamanho inferior a 2 mm (areia, silte e argila). A proporção das partículas de areia, silte e argila é adotada para classificação dos solos em três grandes grupos: arenoso, silteoso e argiloso. Na escala de textura, as partículas de areia são as maiores (2,0 a 0,05 mm) e devido ao seu tamanho e suas interações químicas, os solos com alto teor de areia apresentam alta permeabilidade e porosidade (OLIVEIRA, 2008). As partículas de silte, com diâmetro entre 0,05 e 0,002 mm, apresentam fortes

interações entre si, o que faz com que, em comparação com as partículas de areia, apresentem menor permeabilidade e maior capacidade de retenção de água (OLIVEIRA, 2008). Devido a essas características, solos arenosos podem ser tratados mais facilmente do que solos com frações mais finas (silte e argila). A textura também influencia a capacidade de retenção dos contaminantes, uma vez que os solos argilosos são capazes de reter, através de adsorção, mais contaminantes do que solos arenosos (SCHEFFER *et al.*, 1998). Em resumo, quanto maior a permeabilidade, mais fácil é a distribuição dos nutrientes e do receptor de elétrons no solo contaminado e na água subterrânea. Entretanto, estas condições tendem a ampliar a extensão da contaminação. Assim, areia e cascalho são os materiais mais favoráveis para o transporte de nutriente enquanto as argilas são os menos favoráveis.

- Umidade, aeração e salinidade: o teor de oxigênio dissolvido é um fator limitante nos processos de biorremediação de petróleo no solo, visto que o catabolismo dos hidrocarbonetos alifáticos, cíclicos e aromáticos por bactérias e fungos inicia-se a partir de reações catalisadas por enzimas mono e dioxigenases (ATLAS, 1984; BARTHA, 1986; CRAVO JR., 1998). A umidade é um dos fatores físico-químicos que mais afetam a vida microbiana no solo já que os microrganismos requerem uma quantidade razoável de água para o seu crescimento. Geralmente em solos contaminados com óleo cru a taxa de biodegradação aumenta com o ajuste da umidade entre 30 e 90% do valor da capacidade de retenção de líquido. Porém, o valor ótimo de umidade dependerá das propriedades do solo e do contaminante em questão (ALEXANDER, 1999). Altos índices de salinidade e, de um modo geral, solos com alto teor de salinidade constituem um meio desfavorável para a maioria dos microrganismos, pois a salinidade inibe parcial ou totalmente a função dos microrganismos telúricos (bactéria, actinomicetos, fungos, algas e protozoários) (ALEXANDER, 1999).

- Nutrientes: os nutrientes básicos exigidos para o desenvolvimento microbiano são o nitrogênio, fósforo, enxofre e, em baixo nível, diversos metais (Fe, Mn, etc.), podendo variar de acordo com o poluente. Depois da fonte de carbono, o nitrogênio (N) e o fósforo (P) são os elementos essenciais ao crescimento celular, sendo que na maioria das vezes, a velocidade de degradação de alguns hidrocarbonetos é influenciada pela presença de N e P no solo. Geralmente, em ambientes contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, as fontes de N e P estão em quantidades inadequadas para o crescimento microbiano, tendo em vista a elevada quantidade de carbono disponível a ser degradado (MIROSLAV; HORAKOVA, 1996).

- Disponibilização dos contaminantes: a biodegradação dos hidrocarbonetos ocorre num sistema multifásico envolvendo gases (O_2/CO_2), material orgânico insolúvel em água,

sais dissolvidos e microrganismos. A variada composição dos combustíveis interfere na atividade dos microrganismos. Alguns hidrocarbonetos alifáticos são considerados insolúveis em meios aquosos e a solubilidade desses compostos é inversamente proporcional ao peso molecular, ou seja, quanto maior o peso molecular menor a solubilidade, menor a disponibilidade desses compostos para a ação dos microrganismos e menor a taxa de biodegradação (ROSENBERG, 1993).

- Tipo de contaminante: a estrutura química dos poluentes orgânicos tem uma profunda influência na habilidade dos microrganismos metabolizarem estas moléculas, especialmente com respeito às taxas e extensão da biodegradação. Alguns compostos orgânicos são rapidamente biodegradados enquanto outros são recalcitrantes (não biodegradáveis). Hidrocarbonetos com baixo a médio peso molecular e álcoois são exemplos de compostos facilmente biodegradáveis. Compostos xenobióticos (compostos químicos fabricados pelo homem), especialmente hidrocarbonetos halogenados, tendem a ser resistentes à biodegradação. Geralmente, compostos ramificados e polinucleados são mais difíceis para degradar que moléculas monoaromáticas ou com cadeias simples, e aumentando o grau de halogenação da molécula, diminui-se a biodegradabilidade (ALEXANDER, 1965 *apud* ATLAS, 1997).

- Concentração do contaminante: a concentração do contaminante acima do nível de tolerância à toxicidade dos microrganismos fará com que a biodegradação seja ineficaz ou, em outro caso, a população microbiana pode não sobreviver por causa das concentrações de contaminantes serem muito baixas para sustentá-la (USEPA, 1997).

2.8 Estratégias de aumento da eficácia dos processos de biorremediação

Vários fatores relacionados ao contaminante e ao ambiente contaminado podem limitar a extensão dos processos de biodegradação. O estabelecimento de condições ambientais adequadas é fundamental para que o processo de biorremediação aconteça de forma eficaz. Caso isto não ocorra o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos envolvidos no processo serão severamente afetados e, conseqüentemente, a biodegradação dos compostos poluentes ficará comprometida. Estratégias de biorremediação envolvendo o aumento da atividade microbiana podem ser empregadas em ambientes contaminados, a fim de acelerar o processo natural de biodegradação desses compostos. Dentre estas, as mais utilizadas para superar as limitações da atividade microbiana e, conseqüentemente, acelerar a degradação dos hidrocarbonetos poluentes estão: bioestímulo, bioaumento ou bioenriquecimento, adição de surfactantes e adição de material estruturante.

2.8.1 Bioestímulo

O solo é um ecossistema composto por um elevado número de organismos, com predominância de microrganismos em termos quantitativos e em diversidade de espécies (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A microbiota autóctone dos solos engloba seres procariotos (archaeas e bactérias) e eucariotos (fungos, microalgas e protozoários).

A bioestimulação busca especialmente instigar o crescimento da população microbiana nativa. Isto ocorre fundamentalmente, pelo condicionamento do habitat natural desses microrganismos (ANDRADE *et al.*, 2010). Esta técnica consiste na adição de nutrientes essenciais ao metabolismo dos microrganismos – carbono, nitrogênio e fósforo, e na correção de parâmetros como oxigênio, pH, temperatura e umidade de forma a estimular o seu crescimento no solo contaminado e consequentemente a remoção dos compostos contaminantes.

A bioestimulação de populações de microrganismos autóctones com o objetivo de aumentar as taxas de biodegradação é frequentemente empregada em projetos de biorremediação (ATLAS, 1997). Para se utilizar o processo de bioestimulação, deve-se demonstrar que existe no local contaminado uma população natural de microrganismos capazes de biodegradar os contaminantes presentes e que as condições ambientais são insuficientes para se obter altas taxas de atividade microbiológica dessa população.

Algumas limitações naturais comuns à biodegradação de poluentes são: altos níveis de concentração de poluentes, falta de oxigênio, pH desfavorável, falta de nutrientes minerais, baixa umidade e temperaturas desfavoráveis. Uma variedade de métodos que modificam as condições ambientais podem ser utilizados para melhorar as taxas das atividades biodegradadoras da população microbiológica autóctone. Uma vez que as condições naturais limitantes são corrigidas, a distribuição natural existente de microrganismos permite, em muitos casos, um enriquecimento espontâneo de microrganismos apropriados.

2.8.2 Bioaumento e bioenriquecimento

A bioaugmentação é caracterizada pelo aumento da microbiota nativa através da inoculação de microrganismos exógenos (alóctones). Estes microrganismos são pertencentes à espécie não nativa de determinada região biogeográfica, introduzidos em um ecossistema, podendo persistir e até reproduzir-se por um tempo, participando ou não de interações e de transformações ecológicas (ANDRADE *et al.*, 2010).

A introdução de microrganismos não autóctones pode ser considerada em locais onde, após a contagem das bactérias heterotróficas totais e fungos, foi identificada uma insuficiência de microrganismos autóctones para a biodegradação do resíduo perigoso em questão, mesmo após a tentativa da bioestimulação (SPILBORGH, 1997). Assim, essa técnica tem como objetivo acelerar ou estimular a biodegradação através da intensificação do crescimento microbiano tanto quanto também pela otimização do ambiente em questão.

De acordo com CORSEUIL (1994), a presença de biomassa autóctone insuficiente para a degradação dos contaminantes é considerado um fator limitante da biorremediação. Baixas populações de microrganismos tipicamente presentes no solo podem resultar em significantes períodos de retardos antes do início mensurável da biodegradação, mesmo em condições favoráveis de oxigênio e nutrientes. O autor observou que estes retardos (períodos para o desenvolvimento da população) variaram inversamente com o número de microrganismos inicialmente presentes no solo, o que sugere a necessidade da obtenção de concentrações críticas de biomassa.

Leavitt e Brown (1994) fizeram um estudo comparativo entre a bioestimulação e o bioaumento para um caso de tratamento de solo contaminado com óleo cru, empregando, em um caso, microrganismos autóctones e, no outro, cultura comercial com mistura recomendada de nutrientes. Concluíram que, para algumas aplicações, a bioestimulação de microrganismos autóctones é a melhor escolha, considerando custo e desempenho.

2.8.3 Adição de surfactantes

A biodegradação de hidrocarbonetos pode ser limitada pela sorção (adsorção e absorção) desses compostos pelos componentes do solo resultando em uma redução da quantidade de hidrocarbonetos susceptíveis ao ataque microbiano. Além disso, a não emulsificação adequada dos hidrocarbonetos resulta em pequenas áreas superficiais para contato com as células microbianas. Uma tentativa de incremento da metabolização e da possibilidade de biodegradação de hidrocarbonetos contaminantes é o aumento da solubilização destes substratos e a maior dessorção destes da matriz do solo empregando-se surfactantes e emulsificantes (ALEXANDER, 1999). Os surfactantes em particular, podem interagir com os compostos presentes nos hidrocarbonetos e aumentar a solubilidade dos mesmos em água (BANERJEE *et al.*, 1995). Desta forma, a presença de surfactantes, naturais ou sintéticos, torna estes compostos disponíveis aos microrganismos e consequentemente à biorremediação.

A adição de surfactantes sintéticos aumenta a solubilidade dos hidrocarbonetos, mas a maioria desses compostos é considerada tóxica aos microrganismos e ao meio ambiente (LEAHY; COLWELL, 1990; PROVIDENTI *et al.*, 1993). Diversos pesquisadores (ALEXANDER, 1999; BANAT, 1995; BANERJEE *et al.*, 1995; LEONARDI *et al.*, 2007; MILLIOLI *et al.*, 2005; NITSCHKE; PASTORE, 2002; PROVIDENTI *et al.*, 1993; RAHMAN *et al.*, 2003) vêm investigando o uso de emulsificantes e surfactantes produzidos microbiologicamente para aumentar a biodegradação de compostos hidrofóbicos, como os hidrocarbonetos de petróleo. Uma das principais vantagens do emprego dos bioemulsificantes ou biosurfactantes (normalmente glicolipídeos) é a sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e elevada eficácia em algumas situações.

Deschênes *et al.* (1996) avaliaram o efeito de dois surfactantes (um químico e um biológico) num solo contaminado por um longo período com hidrocarbonetos. O surfactante químico era o SDS (Dodecil sulfato de sódio) e o biológico era produzido por *Pseudomonas aeruginosa*. Os surfactantes foram adicionados ao solo a cada duas semanas numa concentração de 10, 100 e 500mg/g de solo. Após 45 dias de ensaios de biodegradação, os autores observaram que os hidrocarbonetos com 3 anéis foram quase que totalmente biodegradados, quando se utilizaram as concentrações de 100 e 500mg/g, principalmente, quando se utilizou o SDS. Para os hidrocarbonetos acima de 4 anéis foi sugerida a degradação preferencial dos surfactantes já que não se observou diminuição na concentração do contaminante.

Rojas-Avelizapa *et al.* (2000) avaliaram, através de um planejamento experimental, se o ajuste da relação nutricional C:N:P e também a adição de um surfactante não iônico aumentaria os índices de biodegradação de policlorados (PCBs) que estavam presentes num solo em altas concentrações. Após 35 dias de ensaios de biodegradação observaram que o ajuste da relação nutricional C:N:P serviu para aumentar consideravelmente a atividade heterotrófica do solo porém, a grande melhora na biodegradação foi observada com a presença do Tween-80 que apresentou uma remoção de 39-60% dos PCBs.

Maier e Soberon-Chavez (2000) verificaram que a adição de um ramnolipídio pode aumentar a biodegradação de hexadecano, octadecano, n-parafinas e fenantreno em sistemas líquidos e a biodegradação do hexadecano, tetradecano, pristino e misturas de hidrocarbonetos em solo. Noordman *et al.* (2002) estudaram os efeitos do ramnolipídio e observaram que estes foram úteis quando a taxa de biodegradação era limitada. Por exemplo, no caso de solo com tamanho do poro pequeno (6 nm), o hexadecano estava aderido ao solo e sua disponibilidade

era limitada, a adição do ramnolipídio liberou o substrato e o contaminante para ação dos microrganismos.

No caso do tratamento físico, a lavagem de solo utilizando soluções de tensoativos é uma técnica que vem sendo utilizada com sucesso nos últimos anos isoladamente ou em conjunto com outras tecnologias de remediação (PARIA, 2008). Os surfactantes são utilizados para romper a tensão superficial do óleo, fazendo com que o mesmo fique em solução na forma coloidal facilitando a remoção do contaminante do solo.

Alguns autores observaram que a solubilidade dos hidrocarbonetos é dependente da concentração dos tensoativos utilizados na solução de lavagem, como se pode verificar no trabalho de Liu *et al.* (1991), onde foi observado que o incremento na solubilidade aparente de alguns hidrocarbonetos na presença de tensoativos aniônicos e não-iônicos é significativamente maior em faixas de concentrações acima da concentração micelar crítica (CMC). Em sistemas solo/água, devido à interação entre tensoativo e solo, a solubilização de diversos compostos orgânicos somente ocorrerá quando o tensoativo for utilizado em concentrações maiores que a CMC obtida em água pura (LIU *et al.*, 1991). Segundo Zheng e Obbard (2002), a concentração elevada de tensoativo que permite a efetiva solubilização dos poluentes orgânicos num sistema onde há presença de solo pode ser chamada de CMC efetiva.

2.8.4 Adição de Material Estruturante

Como mencionado anteriormente, a presença de microrganismos apropriados e em concentrações adequadas são condições necessárias para se obter elevada taxa de biodegradação em solos contaminados por hidrocarbonetos. No entanto, a eficácia dos processos de biorremediação pode ser limitada por fatores como a baixa disponibilidade dos contaminantes e dos nutrientes aos microrganismos, bem como pela aeração insuficiente do solo. Uma baixa concentração de oxigênio pode limitar a biodegradação, como tem sido comprovado por diversos autores (ALEXANDER, 1999; VASUDEVAN; RAJARAM, 2001). Sabe-se também que os fatores limitantes citados são geralmente agravados quando a permeabilidade do solo contaminado é baixa, sendo este parâmetro diretamente relacionado aos teores de argila e silte característicos de grande parte do solo brasileiro. Durante o processo biológico de tratamento, no entanto, a textura do solo, e conseqüentemente a sua permeabilidade, pode ser aumentada através da adição de materiais estruturantes.

Materiais estruturantes (“bulking agents”) são materiais de baixa densidade que, quando incorporados ao solo, são responsáveis pela melhoria de algumas características

físico-químicas do mesmo. Os materiais adicionados reduzem a densidade do solo, aumentando a sua porosidade e facilitando a difusão de oxigênio por entre as partículas sólidas. Adicionalmente pode ocorrer alteração na capacidade de retenção de água do solo. Todos esses fatores contribuem conjuntamente para o aumento da aeração do sistema solo-contaminante e, conseqüentemente, da atividade microbiana (RHYKERD *et al.*, 1999; VASUDEVAN; RAJARAM, 2001).

Os materiais estruturantes empregados como auxiliares no processo de biorremediação de solos impactados podem ser de origem inorgânica ou orgânica. Dentre os materiais de origem inorgânica utilizados pode-se citar argila calcinada, vermiculita, areia, perlita, cascalho, dentre outros (CHO *et al.*, 1997; DAVIS; WILSON, 2000). Já os de origem orgânica incluem materiais tais como composto estabilizado, grãos de café, casca de coco, casca de arroz, palha, cavaco de madeira, serragem e farelo de trigo (ALEXANDER, 1999; DAVIS; WILSON, 2000; LEE *et al.*, 2007; ROJAS-AVELIZAPA *et al.*, 2007; STRAUBE *et al.*, 2003).

Uma ampla revisão da literatura especializada indica que os materiais estruturantes de origem orgânica são os mais empregados nos processos de biorremediação de solos contaminados por petróleo (ALEXANDER, 1999; BARRINGTON *et al.*, 2002; CHO *et al.*, 1997; CHOI *et al.*, 2003; DAVIS; WILSON, 2000; ELEKTOROWICKZ, 1993; JORGENSEN *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2007; MEYSAMI; BAHERI, 2003; MOLINA-BARAHONA *et al.*, 2004; RAIMUNDO *et al.*, 2004; RHYKERD *et al.*, 1999; ROJAS-AVELIZAPA *et al.*, 2007; STRAUBE *et al.*, 2003; VASUDEVAN; RAJARAM, 2001).

Em trabalho de associação das técnicas de bioaumento (adição de inóculo microbiano composto de linhagens de fungos filamentosos) e adição de material estruturante, Meysami e Baheri (2003) verificaram que só ocorreu a colonização dos fungos no solo quando foi adicionado material estruturante ao mesmo.

Em experimentos para otimizar a biorremediação de solo contaminado com borra de petróleo, Vasudevan e Rajaram (2001) verificaram uma remoção de 76% dos hidrocarbonetos em 90 dias no experimento em que foi adicionado farelo de trigo como material estruturante. Já na condição onde houve apenas o bioestímulo da microbiota nativa do solo contaminado, essa remoção foi de 66%. A adição do material estruturante mostrou também ter um efeito sobre a população microbiana, uma vez que foi observado pelos autores um aumento de 120 vezes na concentração de microrganismos em relação à inicial.

Jorgensen *et al.* (2000) empregaram cavaco de madeira como material estruturante, em associação à técnica de bioaumento, para a biorremediação de solo contaminado com óleo lubrificante em biopilha. Os resultados obtidos indicam uma redução de 70% no teor de óleo contaminante, redução esta decorrente da adição de material estruturante, uma vez que, segundo os autores, apenas a adição de inóculo não apresentou efeito positivo no processo de biodegradação do poluente.

A adição de material estruturante torna-se também uma alternativa atraente quando o solo contaminado a ser tratado já passou por um acentuado processo de intemperização e os compostos orgânicos poluentes encontram-se fortemente aderidos à matriz do solo. Nesses casos, apesar da microbiota nativa encontrar-se adaptada à presença do contaminante, a reduzida biodisponibilidade do contaminante e dos nutrientes, bem como a reduzida concentração de oxigênio, podem ser desfavoráveis ao processo de biorremediação. A adição de materiais estruturantes orgânicos, geralmente, contribui para o aumento da atividade microbiana e, também, daqueles microrganismos degradadores específicos, como os degradadores de hidrocarbonetos de petróleo (JORGENSEN *et al.*, 2000; NAKAGAWA; ANDREA, 2006).

2.9 Microrganismos capazes de biodegradar hidrocarbonetos

Em comparação a outros organismos vivos capazes de degradar poluentes orgânicos, os microrganismos são os agentes preferenciais para desempenhar a função de restauradores da qualidade ambiental, devido a alguns aspectos principais tais como sua natureza ubíqua, sua ampla diversidade genética e catalítica e capacidade de atuação sob condições ambientais extremas (MEGHARAJ *et al.*, 2011). Além disso, podem apresentar estratégias de adaptação à presença dos contaminantes, como alteração da permeabilidade celular (CARVALHO *et al.*, 2009), produção de biossurfactantes (CHRZANOWSKI *et al.*, 2012) e ativação de bombas de efluxo para reduzir a concentração intracelular de compostos tóxicos (VAN HAMME *et al.*, 2003). Essas características têm levado à busca pela caracterização genética deste tipo de microrganismo e pelo entendimento de suas rotas bioquímicas de degradação com a finalidade de desenvolver metodologias para aplicação desses organismos a campo (MEGHARAJ *et al.*, 2011).

A comunidade microbiana envolvida na degradação de compostos xenobióticos pode ser dividida em dois grupos: os microrganismos primários e os secundários. Os primários são aqueles capazes de metabolizar o substrato principal fornecido ao sistema, enquanto os

secundários não utilizam o substrato principal, mas, os produtos liberados pelos microrganismos primários. Este processo é denominado cometabolismo (BULL; SLATER, 1982 *apud* GRADY, 1985).

Os microrganismos são os principais agentes responsáveis pela ciclagem do carbono na natureza. Em muitos ecossistemas existe uma comunidade autóctone de microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos (hidrocarbonoclasticos) (KATAOKA, 2001). Estudos científicos têm mostrado a eficiência de determinados microrganismos, como culturas puras e mistas, na degradação de derivados de petróleo presentes em água e solo após adequada etapa de adaptação destas culturas a estes poluentes (MÁRQUEZ-ROCHA *et al.*, 2005; OKERENTUGBA; EZERONYE, 2003; SOUZA *et al.*, 2005). Para Leblanc e Fitzgerald (1990), as bactérias executam melhor a degradação de hidrocarbonetos quando se encontram em culturas mistas, pois, em uma cultura mista, o produto metabólico pode ser degradado por outra espécie e o ataque de outros microrganismos pode levar a uma completa degradação do produto, mesmo que dentro da comunidade não exista um único microrganismo capaz de degradá-lo totalmente (KATAOKA, 2001).

A habilidade em degradar hidrocarbonetos não é restrita a apenas alguns gêneros de microrganismos, pois vários grupos de bactérias, fungos e actinomicetos têm mostrado possuir essa capacidade (KATAOKA, 2001). Zobell (1946), em uma extensa revisão sobre a ação dos microrganismos nos hidrocarbonetos, descreveu que muitas espécies têm a habilidade de utilizar hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia e que estes microrganismos estão amplamente distribuídos na natureza. O autor observou que mais de 100 espécies de 30 gêneros microbianos foram capazes de utilizar hidrocarbonetos. Komagata *et al.* (1964) examinaram cerca de 500 espécies de leveduras quanto à capacidade de utilizar hidrocarbonetos. Destas, 56 espécies possuíam esta capacidade, sendo que a maioria delas pertencia ao gênero *Candida*. Ahearn *et al.* (1971) isolaram espécies de *Candida*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Sacharomyces*, *Sporobolomyces* e *Trichosporom*, todas capazes de metabolizar hidrocarbonetos.

Leahy e Colwell (1990) citam os seguintes gêneros de bactérias como os mais importantes: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia* e *Pseudomonas*. Al-Hadhrani *et al.* (1995), Kadri *et al.* (1986), Shamsboom *et al.* (1990), Sorkhoh *et al.* (1990), estudando a distribuição de bactérias que degradam hidrocarbonetos, identificaram: *Acinetobacter sp.*, *Aeromonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium sp.*, *Klebsiella cepacia*, *Micrococcus luteus*, *Moraxella*

phenylpyruvica, *Nocardia* sp., *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* sp., *Proteus mirabilis*, *Vibrio* sp., *Rhodococcus* sp., *Streptomyces* sp., *Vibrio fisheri* e *Xanthomonas maltophilia*.

Venkateswaram e Harayama (1995), através do enriquecimento de culturas, isolaram uma população bacteriana capaz de degradar petróleo bruto, verificando que 28-51% da fração saturada e 0-18% da fração aromática presentes foram biodegradadas por uma cultura mista. Contudo, quando as culturas foram colocadas puras, nenhuma delas apresentou melhor degradação do que quando estavam consorciadas. As espécies isoladas foram *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas vesicularis*, *Pseudomonas diminuta*, *Moraxella* sp., *Sphingobacterium* sp. e *Ochrobactrum* sp..

Algumas cianobactérias e algas também possuem a capacidade de utilizar hidrocarbonetos, dentre elas destacando-se os gêneros: *Oscillatoria*, *Microcoleus*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Chlorella*, *Chlamydomonas* e *Ulva* (ATLAS, 1981).

Além das bactérias, os fungos representam importante papel na degradação dos hidrocarbonetos no solo, suas enzimas extracelulares podem proporcionar substratos para o crescimento de bactérias através da hidrólise de polímeros e também importantes metabólitos secundários. O mecanismo da degradação de hidrocarbonetos por fungos têm sido menos estudado, mas provavelmente envolve oxigenases induzíveis similares as apresentadas por *Mycobacterium* e *Nocardia* (RUDD *et al.*, 1996). A habilidade dos fungos em utilizar hidrocarbonetos ocorre principalmente em duas ordens: *Mucorales* e *Moniliales*. Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* possuem muitas espécies que assimilam hidrocarbonetos, contudo, esta característica é uma propriedade individual da espécie e não necessariamente uma característica particular do gênero (RISER-ROBERTS, 1992).

Ao contrário das bactérias e leveduras que mostram decréscimo na capacidade de degradação de alcanos com o aumento da cadeia do composto, os fungos filamentosos parecem ser mais hábeis em degradar ou transformar hidrocarbonetos de estrutura complexa e de cadeia longa. Entretanto, o metabolismo dos fungos geralmente resulta numa degradação incompleta que necessita da associação de bactérias para alcançar a completa oxidação do composto (RISER-ROBERTS, 1992).

A ampla capacidade dos microrganismos em degradar hidrocarbonetos derivados de combustíveis e outros compostos orgânicos, mostra que a aplicação destes também na biodegradação de biodiesel é potencialmente viável.

2.10 Mecanismo de degradação dos compostos orgânicos

Em geral, um composto orgânico quando é oxidado perde elétrons para umceptor final de elétrons, que é reduzido. O oxigênio comumente atua comoceptor final de elétrons quando presente e a oxidação de compostos orgânicos com a redução do oxigênio molecular é chamado de respiração aeróbia heterotrófica. No entanto, quando o oxigênio não está presente, microrganismos podem usar compostos orgânicos ou íons inorgânicos como aceptores finais de elétrons alternativos, condições estas chamadas de anaeróbias. A biodegradação anaeróbia pode ocorrer pela desnitrificação, redução do ferro, redução do sulfato ou condições metanogênicas (CORDAZZO, 2000).

A seguinte sequência de preferência de utilização desses aceptores foi relatada: oxigênio > nitrato > óxidos de ferro > sulfato > água. Esta sequência reflete a diminuição do potencial de oxidação dos aceptores (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996).

Os processos aeróbios e anaeróbios de biodegradação são melhor apresentados a seguir:

- Biodegradação aeróbia: quase todos os hidrocarbonetos do petróleo são biodegradados sob condições aeróbias. O oxigênio é um cossubstrato para a enzima que pode inicializar o metabolismo do hidrocarboneto e, por fim, é utilizado comoceptor final de elétrons para a geração de energia (YOUNG, 1984). Em muitos casos, a maior limitação na biodegradação aeróbia em subsuperfície é a baixa solubilidade do oxigênio em água. A extensão da biodegradação aeróbia é controlada pela quantidade de contaminantes, a taxa de transferência de oxigênio para a subsuperfície e o conteúdo original de oxigênio (BORDEN, 1994).

- Biodegradação utilizando o nitrato: quando a quantidade de oxigênio diminui e nitrato está presente (ou outras formas oxidadas de nitrogênio), alguns microrganismos anaeróbios facultativos utilizam nitrato ao invés de oxigênio comoceptor final de elétrons.

- Biodegradação utilizando o íon férrico: uma vez que as quantidades de oxigênio e nitrato reduzem, os microrganismos podem utilizar o íon férrico comoceptor de elétrons. Grandes quantidades de ferro na forma férrica estão presentes em sedimentos de solos e aquíferos e esta pode ser uma potencial fonte desse composto para a biodegradação. O ferro pode estar presente tanto em minerais cristalinos ou amorfos. As formas amorfas e pouco cristalinas de hidróxidos, oxi-hidróxidos, e óxidos de Fe (III) (LOVLEY, 1991) são mais

facilmente reduzidas. Embora o exato mecanismo de redução microbiológica dos íons férricos seja minimamente quantificado, as evidências disponíveis sugerem que a redução do ferro é um importante mecanismo na biodegradação de hidrocarbonetos dissolvidos (BORDEN *et al.*, 1995). Vários microrganismos foram identificados por apresentarem a capacidade de utilização do íon férrico como aceptor de elétrons na oxidação de compostos aromáticos incluindo o tolueno, fenol, p-cresol e benzoato (LOVLEY; LONERGAN, 1990; LOVLEY *et al.*, 1989).

- Biodegradação utilizando outros aceptores: pesquisas demonstram que uma ampla variedade de compostos orgânicos pode ser biodegradada pela ação de microrganismos redutores de sulfato e/ou metanogênicos (geradores de metano). Estes compostos incluem isômeros de cresol (SMOLENSKI; SUFLITA, 1987), hidrocarbonetos mono e poliaromáticos (BERRY *et al.*, 1987), alquilbenzenos (GRBIC-GALIC; VOGEL, 1987) e hidrocarbonetos insaturados (SCHINK, 1985). Um consórcio metanogênico (grupo de microrganismos que geram metano) pode potencialmente biodegradar o tolueno (processo lento) usando água como aceptor de elétrons. Atualmente, poucos estudos de campo têm examinado o efeito dos mecanismos metanogênicos e os redutores de sulfato na biodegradação de hidrocarbonetos. Esta falta de informação deve ser causada parcialmente pelas características desses microrganismos. Consórcios sulfato-redutores e metanogênicos são conhecidos por serem sensíveis a variações das condições ambientais como a temperatura, nutrientes inorgânicos (nitrogênio, fósforo e traços de metais), contaminantes e pH (ZEHNDER, 1978). Um não balanceamento em qualquer desses fatores pode reduzir a taxa e a extensão da biodegradação anaeróbia (BORDEN *et al.*, 1995).

2.11 Monitoramento do processo de biorremediação

Para demonstrar que uma tecnologia de biorremediação é potencialmente útil, é importante verificar a biodegradação dos poluentes sob condições controladas. Experimentos laboratoriais que mais se aproximam das condições reais do ambiente são provavelmente os mais capazes de produzir resultados relevantes (BERTRAND *et al.*, 1983). Em tais experimentos é importante incluir controles que possam diferenciar fatores abióticos, como a evaporação e a fotodegradação, das taxas de biodegradação (ATLAS, 1997).

O monitoramento da biodegradação é baseado em um acompanhamento da evolução temporal e espacial da concentração de indicadores geoquímicos (pH, temperatura, etc.) no sítio contaminado. Resultados desse monitoramento podem ser usados para identificar fatores

que podem controlar a taxa de biodegradação, bem como identificar o processo microbiológico de respiração (aeróbia ou anaeróbia) em diferentes porções da pluma de hidrocarbonetos dissolvidos. A diminuição da concentração de oxigênio dissolvido na água e um aumento da concentração de dióxido de carbono são indicativos de um processo aeróbio de biodegradação, enquanto que a produção de íons Fe^{2+} ou diminuição de íons nitrato indicam a presença de processos anaeróbios. Um declínio do potencial redox de valores positivos para negativos reflete a mudança de condições oxidantes (favoráveis aos microrganismos aeróbios) para condições redutoras (melhores condições aos processos anaeróbios, que são mais lentos que os aeróbios). Um aumento nos valores de pH pode ser creditado ao consumo de íons H^+ durante a redução de íons férricos ou do nitrato (BORDEN *et al.*, 1995).

Os parâmetros tipicamente medidos em testes laboratoriais da eficiência da biodegradação incluem a contagem de microrganismos heterotróficos totais, contagem de microrganismos degradadores de um ou de vários substratos específicos, medidas da taxa de respiração microbiana (consumo de oxigênio e/ou produção de dióxido de carbono) e a determinação das taxas de degradação (desaparecimento de poluentes individualmente e/ou na totalidade) (BALBA *et al.*, 1998; KATAOKA, 2001; OH *et al.*, 2000; SONG *et al.*, 1990).

A presença de grande população de microrganismos heterotróficos totais não apresenta necessariamente correlação direta com a biodegradação, porém, a quantificação da fração da comunidade que degrada o resíduo de interesse tem sido utilizada como um dos métodos mais comuns para o monitoramento de poluição ambiental com hidrocarbonetos (KATAOKA, 2001). Song *et al.* (1990), estudando o efeito da adição de combustível de avião sobre a comunidade microbiana do solo, verificaram que, após 2 semanas, cerca de 90% dos microrganismos heterotróficos do solo eram degradadores de hidrocarbonetos, ainda que a porcentagem inicial destes microrganismos representasse somente 0,01% da população de heterotróficos aeróbios.

Os métodos respirométricos (consumo de oxigênio e/ou produção de dióxido de carbono) podem ser utilizados como um primeiro teste para se avaliar a pronta ou inerente biodegradabilidade de poluentes em solo ou água. Estes testes são geralmente conduzidos sob condições ótimas com respeito à umidade, temperatura, nutrientes minerais, inoculação microbiana e aeração (no caso de teste aeróbio). Testes que obtêm uma conversão de 30% (CETESB, 1990) ou 50 a 60% (ATLAS, 1997) a CO_2 dentro de um específico período de

tempo, indicam que, sob condições apropriadas, os poluentes serão biodegradados pelos microrganismos.

Indubitavelmente, a medida mais direta da eficiência da biodegradação é o monitoramento da taxa de consumo dos poluentes. A caracterização dos componentes individuais de uma classe específica de hidrocarbonetos exige o uso da cromatografia líquida de alta precisão (CLAE) ou cromatografia gasosa (CG) acoplada a um detector, como por exemplo, o espectrômetro de massa (CG-EM) (FERRARI, 1996). Segundo Blackburn *et al.* (1993), a combinação das técnicas CG-EM é o método mais eficaz para a quantificação de um resíduo oleoso, pois combina a resolução do ponto de ebulição com informações sobre o tipo de molécula dos compostos. Outro detector muito utilizado na determinação de hidrocarbonetos é o detector de ionização por chama (CETESB, 2003).

2.11.1 TPH

Para fazer o acompanhamento dos contaminantes ao longo da biorremediação pode utilizar-se a análise de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPH). O termo TPH é usado frequentemente para descrever a concentração de hidrocarbonetos totais em amostras ambientais. Todavia, TPH é uma designação não muito adequada porque define como sendo do petróleo ou derivados, todos os hidrocarbonetos presentes na amostra. Os métodos para a determinação deste parâmetro, não distinguem entre os hidrocarbonetos aqueles que são do petróleo e nem aqueles que são naturais ou de outras fontes antropogênicas (combustão de combustíveis fósseis) (NASCIMENTO, 2003). Assim, o TPH é a soma de todos os hidrocarbonetos presentes na amostra, ou seja, com a resposta TPH tem-se a soma da concentração de todos os hidrocarbonetos presentes na amostra e não a concentração de cada classe de hidrocarbonetos.

O TPH é considerado uma ferramenta de baixo custo e que pode ser usada para três finalidades: identificação de uma contaminação; avaliação do grau de contaminação; e avaliação do progresso de uma remediação, pois esta medida feita por espectrometria de infravermelho baseia-se na medida da absorbância da ligação C-H, dos hidrocarbonetos presentes na amostra. Isto pode ser diretamente convertido à quantidade total de óleo na amostra original se a razão do solvente com o óleo for cuidadosamente controlada, através de uma calibração.

Infelizmente, devido às diferentes metodologias usadas, tipo de solvente de extração, etapa de “clean-up”, e distintas análises instrumentais, como por exemplo, cromatografia

gasosa, gravimetria, espectrometria de infravermelho, entre outras, as concentrações de TPH provenientes destes métodos não são as mesmas. Estas variações das técnicas utilizadas podem fazer uma diferença significativa nos resultados, conduzindo a incoerências ao comparar uma mesma amostra analisada pelos diferentes métodos disponíveis para determinação de TPH. Assim pode-se dizer que TPH tem uma definição operacional e que os resultados obtidos para uma determinada amostra devem sempre especificar a técnica de detecção utilizada (NASCIMENTO, 2003).

2.12 Biorreatores

O emprego dos biorreatores vem surgindo como uma tecnologia viável e decisiva para tratamento de solo contaminado com compostos orgânicos (URURAHY, 1998). Os biorreatores facilitam o controle do processo de biodegradação dos poluentes no solo, facilitando a aclimação da microbiota e o desenvolvimento dos microrganismos.

Nos métodos clássicos de tratamento biológico de solos contaminados, o problema relacionado à manutenção da adequada homogeneização do solo durante o tratamento é sempre encontrado. As principais dificuldades incluem a introdução de aditivos (nutrientes, surfactantes, etc.) e a concentração localizada de poluentes em algumas regiões do sistema. Estes problemas podem ser significativamente reduzidos através do uso de biorreatores, onde o material é misturado de forma mais efetiva. Isto permite uma amostragem mais significativa e uma medida mais realista do sucesso do processo de descontaminação (ALEF; NANNIPIERI, 1995).

Quando comparado com as técnicas clássicas de biorremediação, como “Landfarming” e “Biopilhas”, o emprego de biorreatores apresenta como principais vantagens (ALEF; NANNIPIERI, 1995):

a) Controle das emissões atmosféricas e das águas do processo; b) Controle das condições operacionais; c) Mistura adequada; d) Controle da degradação dos poluentes através de um monitoramento mais efetivo; e) Possibilidade de incorporação de aditivos diretamente no reator; f) Sistema de aeração facilitado; g) Reduzida área requerida para instalação do sistema; h) Não há contato direto entre o conteúdo do reator e o ambiente durante o processo de tratamento, o que representa vantagem do ponto de vista ambiental e de segurança.

A seleção da configuração mais indicada de biorreator a ser adotada, bem como da técnica de biorremediação associada (bioestímulo, bioaumento, incorporação de material estruturante, dosagem de biosurfactantes, etc.) devem ser realizadas levando-se em consideração as características do solo a ser tratado (percentual de material argiloso, etc.), a natureza do contaminante (recalcitrância, viscosidade, etc.), a composição da mistura a ser tratada (sólido, água e contaminante), os microrganismos envolvidos, o grau de importância da aeração, o nível de necessidade de agitação, dentre outros.

2.12.1 Tipos de biorreatores

Para tratamento de solos contaminados sem prévia remoção das frações mais finas do solo é recomendado o uso de biorreatores horizontais (reatores de fase sólida: tambor rotativo ou tambor fixo) (ALEF; NANNIPIERI, 1995). O procedimento de lavagem de alguns solos contaminados, por sua vez, produz uma suspensão altamente contaminada contendo frações finas do solo. Os biorreatores verticais (reatores de fase semissólida ou reatores de lama) já são mais adequados ao tratamento destas suspensões.

Conforme citado por Alef e Nannipieri (1995), a maioria dos biorreatores têm incorporado à sua estrutura um sistema de agitação que assegura que o material a ser tratado seja adequadamente homogeneizado. Isto possibilita a introdução e mistura adequada de aditivos para ajuste de alguns parâmetros como teor de umidade, fontes de oxigênio e nutrientes, pH, etc. Alguns reatores, se necessário, podem também contar com um sistema de aquecimento de forma a acelerar o processo de biodegradação.

Nos reatores de fase semissólida (ou reatores de lama), o tratamento é análogo ao tratamento biológico convencional com biomassa em suspensão (ex: lodos ativados). Segundo Mueller *et al.* (1991), os biorreatores de lama podem ser projetados com diferentes configurações, de forma a otimizar fatores que normalmente são limitantes ao crescimento e atividade microbiana no solo, como a disponibilização de substrato, nutrientes inorgânicos e oxigênio. Para que este grau de otimização da atividade microbiana seja atingido, é adicionada água ao solo contaminado objetivando a formação uma lama (suspensão de solo em água). Esta lama é continuamente agitada de forma a maximizar a taxa de transferência de massa e o contato entre os contaminantes e os microrganismos capazes de degradá-los (STROO *et al.*, 1997). Os reatores de lama podem ter sua operação conduzida sob o sistema de batelada simples, batelada sequencial ou com alimentação semicontínua ou contínua, com o teor de sólidos variando na faixa de 20 a 40% p/p (ALEF; NANNIPIERI, 1995). O tratamento de solos contaminados em biorreatores de lama é considerado como um dos

métodos mais rápidos de biorremediação uma vez que os substratos são eficientemente transportados até a população microbiana (WOO; PARK, 1999). O uso deste tipo de reator apresenta também como vantagens rápidas taxas de degradação, pequena área requerida para instalação e alto grau de flexibilidade.

Os reatores de fase sólida são particularmente adequados ao tratamento de material com alto teor de sólido. Nestes tipos de biorreatores, o teor de umidade é mantido em níveis suficientes apenas para a manutenção da atividade microbiana (SANER *et al.*, 1996). Apesar das vantagens econômicas associadas à redução da incorporação de água na biorremediação de solos, relativamente poucos são os estudos que exploram os biorreatores de fase sólida, em função dos efeitos prejudiciais que a limitação da água pode vir a exercer sobre o metabolismo microbiano. Alef e Nannipieri (1995) destacam que, dentre as configurações de reatores de fase sólida mais comuns, estão as horizontais, que podem apresentar duas subconfigurações, que diferem entre si, basicamente, na forma de mistura: os tambores rotativos e os tambores fixos. Nos primeiros, a homogeneização do sistema é promovida pela rotação do tambor como um todo, em torno de seu eixo, enquanto na segunda, a mistura se deve à movimentação de um eixo central, de geometria variada. Biorreatores do tipo tambor rotativo apresentam uma combinação atrativa entre agitação efetiva, mesmo com elevados teores de sólidos (MASLIYAH *et al.* 1992), e elevadas taxas de aeração (GRAY *et al.*, 1994).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 O Solo

3.1.1 Amostragem

No presente trabalho foi utilizado solo sem histórico de contaminação, coletado na Fazenda do Glória no município de Uberlândia-MG, sendo que a coleta foi realizada conforme norma ABNT (NBR 10007/2004) que estabelece os procedimentos a serem adotados para a coleta de amostras representativas, plano de amostragem, preservação e armazenagem das amostras. Para tal, a região de coleta foi dividida em oito partes imaginárias. Os solos coletados destas oito partes imaginárias, foram então misturadas formando uma amostra composta. Após a coleta o solo foi armazenado em câmara fria a 4°C, para ser preservado até sua utilização nos ensaios.

3.1.2 Caracterização físico-química do solo

Imediatamente após a coleta foram determinadas as características físico-químicas (umidade, capacidade de retenção de água, acidez, granulometria e quantificação de nutrientes, carbono, nitrogênio e fósforo) do solo a ser utilizado no trabalho. A seguir estão descritas as metodologias utilizadas nas análises.

- Umidade: os ensaios de umidade foram realizados pela relação da perda de massa inicial com a massa final da amostra, conforme a Norma Brasileira ABNT-NBR 7180/1984, e em triplicata com 10,0 g das amostras pesada em balança semi analítica (Acculab, Sartorius Group).

- Capacidade de retenção de água: a capacidade de retenção de água pelo solo foi avaliada em triplicata conforme cita Watwood *et al.* (1991), com amostras de 2 g de solo em funil de vidro previamente coberto com papel de filtro qualitativo. Ao conteúdo de terra compacto no funil foram adicionados sucessivos volumes de 20 mL até o completo umedecimento da mesma e esgotamento da capacidade do solo de absorver a água. O sistema ficou em repouso por meia hora e avaliou-se a água retida por diferença de peso após secagem conforme procedimento descrito para umidade.

- Acidez: a acidez do solo foi avaliada em solo úmido gerado pela mistura de 10 g de solo e 25 mL de água destilada. Após a homogeneização da mistura com um agitador magnético por um período de 30 minutos, a mesma era deixada em repouso para separação

das fases e o pH real do solo decantado era determinado em potenciômetro (Digital PG 2000, GEHAKA).

Granulometria: a distribuição granulométrica do solo foi determinada no Laboratório de Geotecnia da Faculdade de Engenharia Civil da Universidade Federal de Uberlândia. O ensaio foi executado, seguindo-se a ABNT (NBR 7181/1984), que compreende as etapas de homogeneização da amostra, secagem forçada, passagem por uma série de peneiras e por fim, sedimentação em solução.

Composição de fósforo, nitrogênio e carbono total: as determinações de fósforo, nitrogênio total e carbono orgânico total (COT) foram realizadas com modificações no procedimento descrito no Standard Methods - APHA (1998) para adequação às amostras de solo. A quantificação de fósforo foi realizada por método colorimétrico em espectrofotômetro Shimadzu modelo UVmini-1240, em comprimento de onda de 660nm, através de redução com ácido ascórbico. A quantificação de nitrogênio total foi realizada pelo método Kjeldahl conforme descrito no anexo 1. A quantificação de carbono orgânico total (COT) foi realizada pela técnica de combustão catalítica a alta temperatura, empregando o aparelho Total Organic Carbon Analyzer – Module SSM5000A – Shimadzu. A relação Carbono:Nitrogênio:Fósforo (C:N:P) foi corrigida de acordo com cada etapa de estudo do trabalho. As correções foram realizadas com a adição dos compostos NH_4NO_3 e K_2HPO_4 , como fontes de N e P respectivamente.

3.1.3 Caracterização microbiológica do solo

A contagem do número de células de bactérias aeróbias foi feita utilizando a técnica “pour plate” (APHA, 1992) após 48h de incubação a $30 \pm 10^\circ\text{C}$, realizando diluições sucessivas de uma amostra de 10g de solo em 100 mL de solução salina (0,9% NaCl) previamente esterilizada. Para cada diluição, foi colocado 1 mL em placa de petri com meio ágar nutriente pH, 7,4-7,6 e composição (g/L): extrato de carne, 3,0; peptona, 10,0; K_2HPO_4 , 1,0; NaCl, 5,0; ágar-ágar, 15,0.

3.1.4 Contaminação do solo com biodiesel

Todos os ensaios foram realizados com uma mistura de solo e biodiesel em diferentes proporções na qual o solo era padronizado pela tamisação em peneira de 0,5 mm de abertura. A homogeneização do solo com o biodiesel foi realizada mantendo a mistura em tambor com rotação de 32 rpm por 2 horas, seguido por repouso por 24 horas para assegurar que o biodiesel foi totalmente adsorvido.

3.2 O biodiesel

O biodiesel purificado (sem glicerina) utilizado nesta pesquisa foi cedido pela empresa PETROBRÁS TRANSPORTE S/A, localizada na cidade de Uberlândia/MG. O fluido foi acondicionado em frascos âmbar de capacidade de 1.000 mL, com tampa rosqueada e resfriado a 4°C.

3.3 A cultura mista

A cultura mista utilizada no desenvolvimento do trabalho foi a cultura mista denominada C1 empregada nos trabalhos de Vieira *et al.* (2007 e 2010). Essa cultura foi isolada do solo de uma lagoa que recebe o efluente gerado na lavagem do pátio e dos caminhões de uma distribuidora de combustíveis situada na cidade de Uberlândia-MG. De acordo com Vieira *et al.* (2007), nesta cultura foram isolados seis membros de microrganismos, sendo quatro destes microrganismos identificados como *Pseudomonas sp.*, *Serratia sp.*, *Klebsiella* e *Bacillus sp.*.

3.3.1 Adaptação da cultura mista ao biodiesel em meio líquido

Para adaptação da cultura mista em meio líquido, foi colocado 50 mL da cultura C1 obtida do estoque de microrganismos do Núcleo de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química/UFU em erlenmeyers com capacidade de 500 mL, contendo 100 mL de meio de cultura previamente esterilizado e quimicamente definido (g/L): K₂HPO₄ 0,401; KH₂PO₄ 1,124; CaCl₂ 0,020; MnSO₄. H₂O 0,030; MgSO₄.7H₂O 0,100; NH₄NO₃ 3,386; levedura cervejeira autolizada 4,000; com pH na faixa de 7,0 a 7,2. Adicionou-se a esta solução 8,0% v/v de biodiesel como fonte de carbono para os microrganismos, conforme previamente estabelecido nos estudos de Lemos (2013).

O processo de adaptação foi realizado em reatores em batelada de 500 mL, tampados com rolha permeável a gases, sob agitação em mesa oscilatória termostatizada New Brunswick a 150 rpm e 30°C. O procedimento de areação foi realizado manualmente durante 3 minutos a cada 48h de processo (VIEIRA *et al.*, 2007).

O crescimento microbiano foi observado visualmente, através do aumento gradativo da turbidez do meio.

3.3.2 Adaptação da cultura mista ao solo

Buscando reduzir o tempo dos ensaios de biorremediação, a população microbiana autóctone do solo foi aumentada através da introdução da cultura mista exógena previamente adaptada ao contaminante. Assim, foi produzido um inóculo em fase sólida conforme metodologia desenvolvida por Baptista (2007).

O preparo do inóculo em fase sólida foi conduzido em reator estático retangular (40 cm x 80 cm x 20 cm) onde foi colocado 10 kg do solo e biomassa microbiana proveniente da centrifugação de 100 mL da cultura mista C1 em meio líquido para cada quilograma de solo, conforme descrito por Lemos (2013). A transferência da biomassa ao solo foi realizada através da suspensão desta massa, bem como dos nutrientes (C:N:P na proporção de 100:10:1) na água de reposição de umidade. O teor de umidade foi ajustado para 50% da capacidade de retenção do solo e monitorado de 2 em 2 dias. A oxigenação do reator foi feita através de revolvimento manual diário do solo. Para verificação da aclimatação dos microrganismos no solo, o parâmetro monitorado foi crescimento bacteriano.

3.4 O sistema de lavagem do solo

O equipamento utilizado no experimento de remoção mecânica foi um agitador do tipo turbina de Rushton com seis pás posicionado verticalmente no centro do reator, conforme Figura 7. O agitador foi mantido a uma velocidade constante de 600 rpm e usado para a distribuição uniforme do solo durante a lavagem. O processo de agitação foi feito em reatores de capacidade de 2.000 mL com adição de 1.500 g de mistura de solo e água proveniente do sistema de abastecimento municipal da cidade de Uberlândia e, em um segundo momento, foi utilizado água de reúso do sistema de refrigeração cedida por uma indústria de alimentos na cidade de Uberlândia.



Figura 7. Agitador mecânico e turbina de Rushton de 6 pás.

A etapa de lavagem do solo gerou três subprodutos a serem tratados conforme visto na Figura 8.

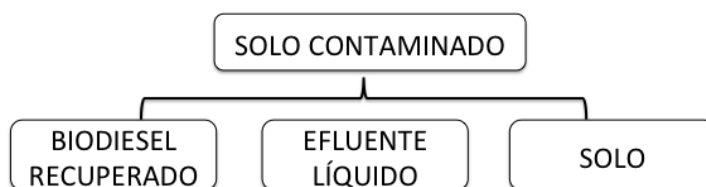


Figura 8. Subprodutos da etapa de remoção mecânica do contaminante.

3.5 Tratamento físico do solo

O solo contaminado foi misturado à solução aquosa para a concentração desejada de sólidos e agitou-se continuamente no reator descrito anteriormente (Figura 7). Os tempos de agitação variaram em 2, 4, 6 e 8 horas para os testes preliminares sem surfactante e 10, 35 e 60 minutos para os testes com utilização de surfactante.

Após a agitação, a mistura foi deixada em repouso por 12 horas para separação por decantação (Figura 9). Nos casos com concentração de sólidos acima de 45%, a separação foi feita utilizando filtração sob vácuo.



Figura 9. Sistema solo-água-biodiesel após decantação.

Após repouso e separação, o sobrenadante foi destinado à próxima etapa do experimento. O solo foi lavado três vezes com a mesma solução aquosa utilizada na lavagem, para garantir que o biodiesel livre dessorvido nas superfícies das partículas fosse totalmente removido. Após lavagem e nova separação, o solo foi colocado em bandejas abertas e mantido por 48 horas a temperatura ambiente ($30^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) para remoção do excesso de umidade, antes de se determinar o conteúdo residual de biodiesel. Cada teste de lavagem foi conduzido em triplicata em condições ambientes de temperatura ($30^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$).

A verificação dos resultados dos experimentos de lavagem foi realizada através de análise de Carbono Orgânico Total (COT) e hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) do solo realizada através da metodologia modificada de VIEIRA *et al.* (2007), na qual a absorbância do contaminante extraído de 2 g de solo por 15 minutos de agitação com 10 mL de solvente (n-hexano), foi lida no analisador de TPH Modelo Buck HC-404 (Anexo 1).

3.5.1 Testes preliminares

3.5.1.1 Teste de tempo de agitação

O primeiro teste preliminar foi realizado com água de abastecimento da rede municipal de Uberlândia e teve por objetivo verificar o tempo de processo de lavagem que proporcionava o melhor resultado de remoção do contaminante do solo.

Este teste inicial foi realizado com uma concentração de 15% de sólidos. Portanto, 225 g de solo previamente contaminado com 5% de biodiesel foi colocado no reator com 1.275 g de água. Os tempos de lavagem avaliados foram 2, 4, 6 e 8 horas

3.5.1.2 Teste de concentração de sólidos

O segundo teste preliminar também foi realizado com água de abastecimento da rede municipal de Uberlândia e teve por objetivo verificar a relação solo/água que proporcionava o melhor resultado de remoção do contaminante do solo de forma a diminuir a quantidade de água utilizada na remediação.

Foi utilizado solo previamente contaminado com 5% de biodiesel como descrito no item 3.1.4 em concentrações de 20%, 30% e 40% de sólidos.

3.5.1.3 Teste com água de reúso

Este terceiro teste preliminar teve o objetivo de verificar se há diferença significativa no percentual de remoção do contaminante se utilizada água de reúso em substituição à água de abastecimento como base da solução extratora para lavagem. O solo previamente contaminado com 5% de biodiesel foi submetido ao mesmo ensaio descrito anteriormente, porém, nas melhores condições obtidas.

3.5.1.4 Teste com utilização de surfactante

Foi avaliado o favorecimento da remoção de hidrocarbonetos pelo uso de tensoativos no tratamento, de forma a melhorar o desempenho do processo de remediação. Foi utilizado o tensoativo aniônico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS – $C_{12}H_{25}NaO_4S$) e o tensoativo não iônico Tween 80. Estes surfactantes foram escolhidos por serem amplamente utilizados, por serem facilmente biodegradáveis e considerados não tóxicos (ZHENG; OBBARD, 2002).

O desempenho dos tensoativos na solubilização dos hidrocarbonetos presentes no solo contaminado foi avaliado para tempos de lavagem de 10, 35 e 60 minutos; nas concentrações de 30%, 45% e 60% de sólidos no sistema e contaminação inicial de 5 e 12% de biodiesel.

Ambos os surfactantes, SDS e Tween 80, foram utilizados com uma concentração de 0,5% w/v em solução com água de reúso, antes de ser adicionado ao solo.

Um experimento controle foi realizado utilizando água de reúso pura (sem adição de surfactante) nas mesmas condições dos experimentos com surfactante mencionados anteriormente. Os experimentos foram conduzidos em triplicata e em condições ambientes de temperatura ($30^{\circ}C \pm 5^{\circ}C$).

O efeito da concentração do surfactante foi avaliado nas melhores condições observadas. Nestes testes adicionais utilizou-se 0,02%, 0,1% e 0,25% (w/v) de Tween 80.

3.5.2 Teste com reúso do efluente

Neste teste foi avaliado quantas vezes a mesma água pode ser reutilizada na lavagem de outras amostras contaminadas. O esquema do procedimento utilizado neste teste está apresentado na Figura 10.

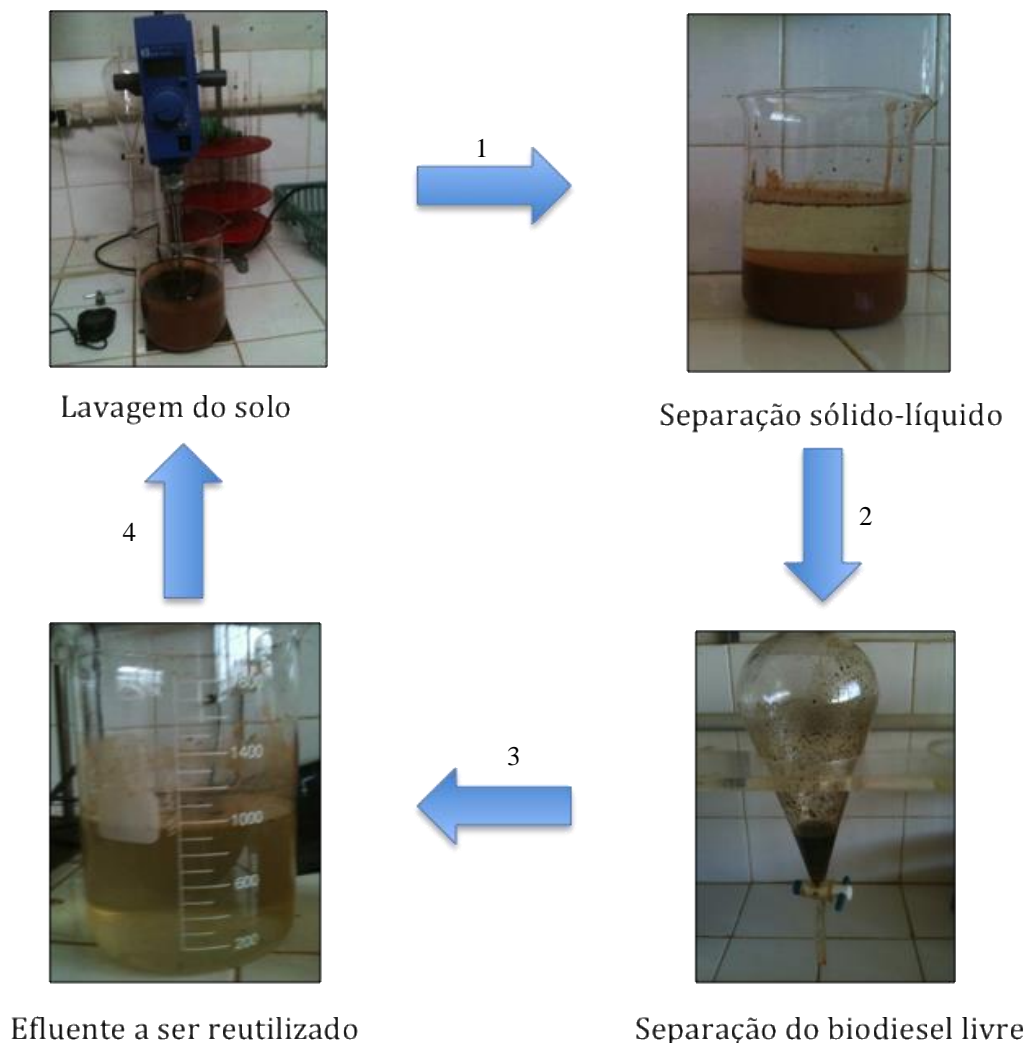


Figura 10. Esquema do procedimento de reutilização do efluente.

Assim, o experimento foi conduzido com as condições que apresentaram os três melhores resultados nos testes preliminares, sendo elas:

a) Água de reúso com adição de 0,25% (w/v) de Tween 80, 60% de sólidos e tempo de lavagem de 60 minutos;

b) Água de reúso com adição de 0,25% (w/v) de Tween 80, 45% de sólidos e tempo de lavagem de 60 minutos;

c) Água de reúso sem adição de surfactante, 30% de sólidos e tempo de lavagem de 35 minutos.

O ponto considerado para a finalização das reutilizações foi a redução na eficiência da lavagem. Isto é, quando o processo de lavagem apresentasse um resultado abaixo de 50% de remoção do contaminante, a água ou solução aquosa utilizada na lavagem não iria para outro ciclo de lavagem e o experimento seria finalizado. As relações utilizadas para comparação dos resultados foram a quantidade (gramas) de biodiesel removido por litro de água utilizada na lavagem, o volume de água utilizada por massa de solo tratado e a relação biodiesel removido (g) por quilo de solo tratado. Todos os experimentos foram realizados com solo previamente contaminado com 5 e 12% de biodiesel, em triplicata e em condições ambientes de temperatura ($30^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$).

3.6 O efluente gerado no tratamento físico do solo

3.6.1 Caracterização físico-química do efluente

As seguintes análises foram realizadas para a caracterização do efluente: fósforo disponível; nitrogênio total; carbono orgânico total (COT); pH e hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH).

- Fósforo disponível: para esta análise foi utilizado um método colorimétrico no qual o fósforo presente no efluente em forma de ortofosfato reage com o molibdato de amônio e com vanádio para formação do ácido vanadomolibdatofosfórico, de coloração amarela. A intensidade da cor amarela é proporcional à concentração do fósforo. A faixa de trabalho do método é de 1 a 10 mg/L (ppm) de fósforo em comprimento de onda de 420 nm.

Para coloração foi utilizado a solução de vanadomolibdato de amônio preparada através da mistura de duas soluções. A primeira consistiu na dissolução de 40 g de molibdato de amônio $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em 400 mL de água destilada. A segunda foi realizada dissolvendo 1 g de metavanadato de amônio NH_4VO_3 em uma mistura de 300 mL de água destilada e 200 mL de ácido nítrico concentrado. A segunda solução foi adicionada a primeira, em seguida completou esta mistura para 1.000 mL com água destilada.

Para leitura do resultado de fósforo foi transferido 50 mL da amostra para um erlenmeyer de 250 mL e adicionado 25 mL da solução de vanadomolibdato de amônio seguido de agitação vigorosa. Após 2 minutos para desenvolvimento da cor, foi determinada a absorbância das amostras em espectrofotômetro a 420 nm.

- Nitrogênio: a análise de nitrogênio presente no efluente foi feita empregando o aparelho Total Organic Carbon Analyzer, unidade TN para TOC-L, Shimadzu.

- Carbono orgânico total: a caracterização em relação ao carbono orgânico total foi realizada através da técnica de combustão catalítica a alta temperatura, empregando o aparelho Total Organic Carbon Analyzer, série TOC-L, Shimadzu.

- pH: a determinação do pH foi de acordo com o procedimento descrito em APHA (1998). A leitura do pH das amostras foi realizada pelo método potenciométrico, utilizando phmetro, introduzindo o eletrodo diretamente nas amostras líquidas.

- Hidrocarboneto total de petróleo (TPH): o percentual de biodiesel no efluente líquido foi medido através de análise de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPH). Essa metodologia é adequada para medir hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, independente de sua faixa de carbono. A luz emitida na faixa do infravermelho é usada para irradiar o extrato e medir a concentração de TPH. A análise de infravermelho utilizada para medir TPH envolve medidas de absorbância, visto que as ligações carbono-hidrogênio nos hidrocarbonetos absorvem luz na faixa do infravermelho.

Durante a análise, absorbâncias associadas com as configurações CH, CH₂ e CH₃ são medidas em um comprimento de onda próximo de 3,4 µm. O equipamento opera numa faixa de comprimento de onda de 3,38 a 3,50 µm, sendo capaz de medir as configurações CH (3,38 µm), CH₂ (3,42 µm) e CH₃ (3,50 µm) e possui o software para converter as medições em teor total de hidrocarboneto (USEPA, 2001).

Para as análises foram utilizados 10 mL de amostra de efluente e adicionado ácido clorídrico para levar o pH para valor igual ou inferior a 2,0. Posteriormente, os hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) foram extraídos utilizando o solvente hexano. A leitura foi feita no equipamento analisador de TPH Modelo Buck HC-404.

3.6.2 Biorremediação do efluente

O recipiente utilizado como biorreator foi um erlenmeyer de 1.000 mL tampado com rolha permeável a gases. O biorreator foi operado à temperatura ambiente de 30°C ± 5°C, mantido sob agitação em agitador magnético da marca IKA® C-MAG MOD HS7 (Figura 11).



Figura 11. Sistema utilizado no tratamento do efluente.

O efluente a ser tratado foi inoculado com a mesma cultura mista utilizada na biorremediação do solo, na proporção de 10 mL de meio centrifugado para 100 mL de efluente. Durante o tratamento foi realizado o monitoramento dos compostos carbono, nitrogênio e fósforo e correção da relação C:N:P na proporção 100:15:4 (SÁ *et al.*, 2008). A correção do nitrogênio foi feita com extrato de levedura e NH_4NO_3 e a correção do fósforo foi feita com K_2HPO_4 e KH_2PO_4 . O pH, quando necessário, foi ajustado para valores entre 6 e 7, com NaOH 1N. A degradação do biodiesel foi acompanhada via análise de TPH e COT. As análises foram realizadas a cada 24 horas e o tratamento prosseguiu até que o valor de TPH e COT se apresentasse constante.

3.6.3 Teste com utilização do efluente tratado

Este experimento teve por objetivo verificar se o efluente proveniente de lavagem de solo contaminado, tratado através de biorremediação, teria efeito na remoção do contaminante no caso de ser utilizado em novo tratamento físico de lavagem.

Os testes foram conduzidos com duas condições:

- a) Efluente tratado, adição de 0,25% (w/v) de Tween 80, 60% de sólidos e tempo de lavagem de 60 minutos;
- b) Efluente tratado, sem adição de surfactante, 30% de sólidos e tempo de lavagem de 35 minutos.

Os experimentos foram realizados com solo previamente contaminado com 5 e 12% de biodiesel, em triplicata e em condições ambientes de temperatura ($30^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$).

3.7 Biodiesel recuperado na etapa de lavagem

O biodiesel removido do solo foi recuperado através da separação das fases óleo-água em funil de separação (Figura 12), e então, filtrado em filtro Millipore de 0,45 μm .



Figura 12. Funil de separação utilizado na recuperação do biodiesel retirado do solo.

3.7.1 Caracterização do biodiesel recuperado

Devido às impurezas presentes no mesmo (água e resíduos provenientes do solo) foram realizadas análises de umidade, acidez e poder calorífico buscando verificar a viabilidade de reutilização do mesmo.

Para quantificação da umidade foi empregado o método de Karl Fischer, através do equipamento da Metrohn Modelo 785 KF. O pH foi medido através de potenciômetro e a análise de poder calorífico foi realizada em bomba calorimétrica IKA® - WERKE Modelo C2000 Basic.

3.8 Experimentos de biorremediação do solo

Nos experimentos de biorremediação foi utilizado solo proveniente do pré-tratamento de lavagem. Este solo foi tratado em reator rotativo escala de bancada laboratorial. Além disso, foram realizados testes em biorreator tipo tambor rotativo em escala piloto, de modo a fazer um 'scale up' do processo. Em todos os experimentos de biorremediação foram usadas as estratégias de bioaumento e bioestimulação na biorremediação do solo e foram utilizados os valores otimizados dos parâmetros encontrados por Lemos (2013).

Para a bioaugmentação, os microrganismos foram inseridos ao solo na proporção de 100 mL de biomassa centrifugada (advinda dos repiques realizados em meio líquido) por quilo de solo, de modo a se obter uma concentração inicial mínima de 10^8 células/g de solo.

A bioestimulação foi realizada analisando a cada 7 dias as concentrações de carbono, nitrogênio e fósforo e mantendo a proporção da relação C:N:P 100:10:1. A correção do nitrogênio foi feita com extrato de levedura e NH_4NO_3 e a correção do fósforo foi feita com K_2HPO_4 e KH_2PO_4 . Foi realizado o controle da umidade (equivalente a 50% da capacidade de retenção de água do solo) do solo semanalmente e houve também, o acompanhamento do pH e da temperatura ao longo do processo. A quantificação de óleo remanescente no solo foi realizada por extração com hexano e posteriormente analisado em analisador de TPH Modelo Buck HC-404 a cada 7 dias de processo e o acompanhamento do crescimento dos microrganismos foi realizada a cada 15 dias empregando a técnica “*pour plate*”. O experimento foi mantido até estabilização do valor de TPH.

De modo a fazer o acompanhamento do processo sem interferência externa, foram mantidos reatores abióticos para comparar quanto às perdas de contaminantes ao longo do tempo.

3.8.1 Reator Abiótico

No reator abiótico foram adicionados 0,7 kg de solo previamente autoclavado a uma pressão relativa de 1 atm, por 20 min e seco em estufa a 100°C, por 10 min, contaminado com 49,0 g de biodiesel, obtendo-se um solo contaminado com 70g de biodiesel/kg de solo. Umidificação e esterilização com solução de azida de sódio a 2% (m/v) realizada semanalmente.

No decorrer do processo, foi realizado a homogeneização por revolvimento do solo a cada dois dias, com auxílio de uma espátula de aço, e a quantificação de óleo remanescente no solo por extração, a cada 7 dias de processo e certificação do crescimento ou não de microrganismo, através do método “*pour plate*”. O experimento total foi realizado em 70 dias.

3.8.2 Reator rotativo em escala de bancada

Após inoculação do solo, quantificou-se a umidade e a concentração de carbono, nitrogênio e fósforo e corrigiu-se então, a relação C:N:P (100:10:1) e a umidade para o equivalente a 50% da capacidade de retenção de água do solo.

O reator empregado para este estudo foi do tipo rotativo com tombamento, feitos em material plástico apresentando uma massa total de 0,3 kg, conforme mostra a Figura 13. O aparato montado para a realização destes testes contava com uma fonte elétrica que controlava

a corrente que passava do motor para o sistema, de modo a manter uma rotação constante de cerca de 10 rpm.



Figura 13. Reatores do rotativo escala de bancada.

Tal equipamento foi projetado pela equipe da pesquisa e construído na oficina mecânica da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia (FEQ/UFU).

3.8.3 Reator rotativo em escala piloto

O emprego de reatores do tipo tambor rotativo no tratamento de solos contaminados vêm sendo frequentemente citado na literatura (BANERJEE *et al.*, 1995; KRÜGER *et al.*, 1995; TRUAX *et al.*, 1995; BRINKMANN *et al.*, 1998; WOO; PARK, 1999).

Com o objetivo de avaliar a aplicabilidade deste tipo de configuração no tratamento do solo, foi adotado o protótipo de reator ilustrado na Figura 14. O equipamento utilizado no experimento tem capacidade para 40 kg, rotação de 10 rpm e abertura para amostragem.



Figura 14. Reator tipo tambor rotativo.

O reator escala piloto foi projetado pela equipe da pesquisa e construído na oficina mecânica da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia

(FEQ/UFU). Na confecção deste protótipo foi dada atenção especial ao controle da velocidade de rotação com o uso de um inversor de frequência (Figura 15) e às aletas (Figura 16). Tal preocupação justificou-se pela possibilidade de agregação do solo e pelas afirmações feitas por Woo e Park (1999) que tambores não aletados permitem a compactação de material sólido nas paredes do reator e a formação de agregados, contribuindo para um grau de mistura deficiente.



Figura 15. Inversor de frequência do reator.



Figura 16. Parte interna do reator para visualização das aletas.

O primeiro experimento de biorremediação em escala piloto foi realizado com carga de 25 kg de solo e concentração de biodiesel de 8% (80.000 ppm). Os demais experimentos foram realizados com uma carga de 15,0 kg de solo no biorreator e com 6, 10 e 12% de biodiesel.

No decorrer do processo, as análises realizadas para quantificação de óleo remanescente, acompanhamento do crescimento dos microrganismos, umidade e correção da

relação C:N:P seguiram os mesmos métodos e tempos de realização do experimento em escala de bancada já citados anteriormente. O experimento foi mantido até estabilização do valor de TPH.

3.8.4 Análises quantitativas

Para cada determinação quantitativa foram retiradas três sub-amostras de diferentes pontos do reator ao longo de toda a profundidade. As três sub-amostras foram homogeneizadas e quarteadas até comporem uma única amostra que foi submetida às determinações de quantificação microbiológica (descrita no item 3.1.3), TPH (item 3.5), nitrogênio e fósforo (item 3.1.2) e pH (item 3.1.2).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste Capítulo, serão apresentadas as características do solo utilizado nos experimentos, os resultados obtidos nos ensaios de tratamento físico e biológico do solo na unidade laboratorial e na unidade piloto, as características do biodiesel removido do solo no processo de lavagem e os resultados de degradação do contaminante no tratamento biológico do efluente.

4.1 O Solo

Na Tabela 2 são mostrados os resultados da caracterização físico-química e microbiológica, além da composição granulométrica da amostra de solo utilizado nos experimentos. De acordo com os dados de granulometria apresentados na Tabela 2, este solo é classificado como latossolo vermelho-escuro distrófico, argilo arenoso com textura argilosa, fase cerrado tropical e com relevo suave ondulado (EMBRAPA, 1990). O solo possui pH ácido (5,31), o que é característico da maioria dos solos brasileiros.

Tabela 2. Caracterização do solo.

Físico-química	
Granulometria	Areia Grossa
	0,3%
	Areia média
	5,3%
	Areia Fina
	3,8%
	Silte
	35,5%
	Argila
	45,6%
pH	5,31 ± 0,10
Umidade	9,0%
Capacidade de retenção de água	28,0 ± 0,1 %
Matéria Orgânica (g/kg)	0,8
Microbiológica	
Bactérias aeróbias (cel/g solo)	1,0 x 10 ⁴
Inorgânica	
P assimilável (mg/kg solo)	3,01
C orgânico (g/kg solo)	12,5
N total (g/kg solo)	0,12
Relação C:N:P	100 : 0,77 : 0,019

A baixa umidade medida indica a necessidade de correção da umidade durante o processo de biodegradação. A umidade ótima para biodegradação de hidrocarbonetos,

segundo Meyer (2011), encontra-se na faixa de 25 e 85 % da capacidade de retenção de água. Silva (2004) cita que a faixa ideal para a umidade do solo deve estar entre 40 e 85% da capacidade de retenção de água do solo ou de aproximadamente 12 a 30% em peso, havendo, portanto, necessidade de correção durante o processo. A determinação da capacidade de retenção de água é importante quando se pretende trabalhar com processos em fase sólida, pois permite o conhecimento da faixa do teor de umidade que deve ser utilizado no estudo. Para este solo a capacidade de retenção de água determinada foi de 28,0 %.

Verifica-se na Tabela 2 que o solo apresenta uma considerável população de bactérias aeróbias, $1,0 \times 10^4$ cel/g solo, porém a relação C:N:P de 100:0,77:0,019 é baixa para estimular o crescimento destas. A relação C:N:P é limitante no processo de biorremediação, a relação adequada depende do sistema de tratamento a ser empregado, sendo segundo a literatura científica a relação C:N:P ideal para o metabolismo microbiano o valor de 100:10:1 (SILVA, 2004; RISER-ROBERTS, 1998). Neste caso, foi necessária a correção, mediante adição de fontes nitrogenadas e fosfatadas.

4.2 Tratamento físico do solo

4.2.1 Testes preliminares

Os testes preliminares serviram para nortear os ensaios de lavagem, uma vez que os trabalhos presentes na literatura com este tipo de tratamento são escassos. Os dois primeiros testes determinaram o tempo de agitação e a concentração de sólidos que devem ser utilizados quando é feita a remoção mecânica do biodiesel utilizando apenas água sem a adição de agentes emulsionantes. O terceiro teste preliminar mostrou a possibilidade de usar outras fontes de água para remoção ao invés da água de abastecimento, preservando este recurso. Os dois últimos testes preliminares permitiram verificar o tempo e a concentração de sólidos ideal para o processo, comparando a utilização de dois surfactantes (SDS e Tween 80). Vale salientar que todos os testes de lavagem do solo foram realizados em triplicata.

4.2.1.1 Teste de tempo de agitação

Este teste inicial foi realizado com uma concentração de 15% de sólidos. Tal concentração foi utilizada nos trabalhos de lavagem de solo contaminado com diesel de Feng *et al.* (2001) e lavagem de solo contaminado com óleo cru de Urum *et al.* (2005).

Na Tabela 3 estão descritos os resultados de remoção para cada um dos tempos de lavagem utilizados e na Figura 17 é apresentado o tratamento estatístico dos dados realizado

pelo teste de Tukey. Foi verificado, com uma confiabilidade de 95%, que não há diferença significativa nos resultados de remoção do contaminante para os diferentes tempos (2, 4, 6 e 8 horas) de lavagem.

Tabela 3. Resultados do teste de tempo.

Tempo (h)	Concentração Inicial Biodiesel (%)	Concentração Final Biodiesel (%)	% Remoção
2	5,00	$2,23 \pm 0,22$	$55,40 \pm 4,31$
4	5,00	$2,16 \pm 0,20$	$56,91 \pm 4,05$
6	5,00	$2,22 \pm 0,22$	$55,67 \pm 4,32$
8	5,00	$2,28 \pm 0,20$	$54,48 \pm 4,16$

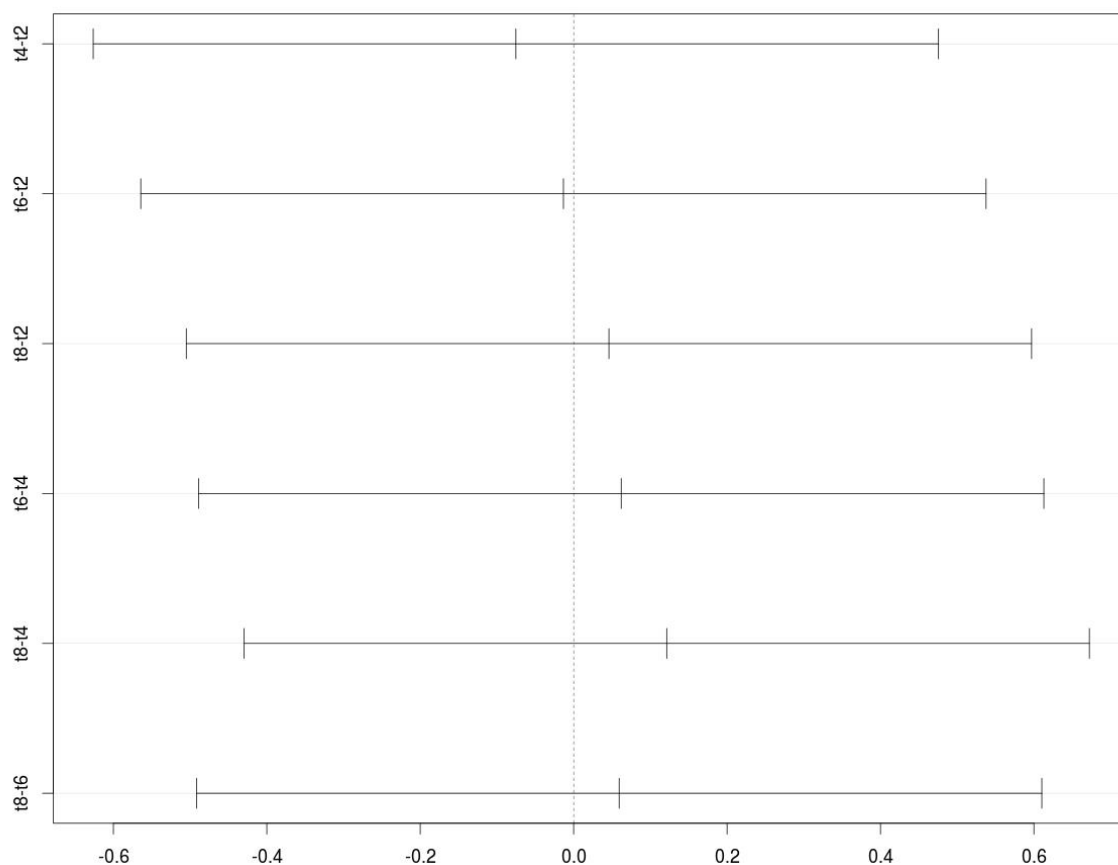


Figura 17. Comparação múltipla dos tempos de lavagem pelo teste de Tukey.

Marques (2012), em ensaios de lavagem oxidativa com solo contaminado com hidrocarbonetos derivados de combustíveis, utilizou tempos de 1, 2, 6, 8, 12 e 24 horas de lavagem e obteve resultados de remoção de hidrocarbonetos de 24,0 a 85,8%. Kalali *et al.* (2011), utilizando condições ótimas no processo de lavagem determinadas através da técnica de superfície de resposta, com 75 minutos de agitação, obtiveram 93,54% de remoção de

poluentes orgânicos hidrofóbicos no tratamento de solo poluído com hidrocarbonetos de petróleo. Liu *et al.* (1991), em estudo de solubilização de hidrocarbonetos policíclicos em suspensão de água no solo, relataram que após quatro horas de lavagem com uma solução de surfactante, o conteúdo de diesel no solo manteve-se constante, obtendo uma remoção de 97% do contaminante.

Ao analisar a Figura 17, observa-se que tempos maiores de agitação não se traduziu em maior percentual de remoção. Assim, o tempo utilizado no próximo experimento foi de 2 horas.

4.2.1.2 Teste de concentração de sólidos

Os resultados deste teste estão mostrados na Tabela 4, sendo possível comparar os resultados de remoção para as concentrações de 20%, 30% e 40% de sólidos.

Tabela 4. Percentual de remoção para diferentes concentrações de sólidos.

Concentração de sólidos (%)	Concentração Inicial Biodiesel (%)	Concentração Final Biodiesel (%)	% Remoção
20	5,00	2,16 ± 0,20	56,71 ± 3,93
30	5,00	1,98 ± 0,21	60,45 ± 4,16
40	5,00	2,46 ± 0,19	50,83 ± 3,83

A Figura 18 apresenta o resultado do tratamento estatístico dos dados através do teste de Tukey. Verifica-se que, com uma confiabilidade de 95%, não há diferença significativa no resultado de remoção do contaminante para as diferentes concentrações de sólidos utilizadas. Porém, a comparação entre as concentrações de 30% e 40% mostrou-se no limiar da área de significância.

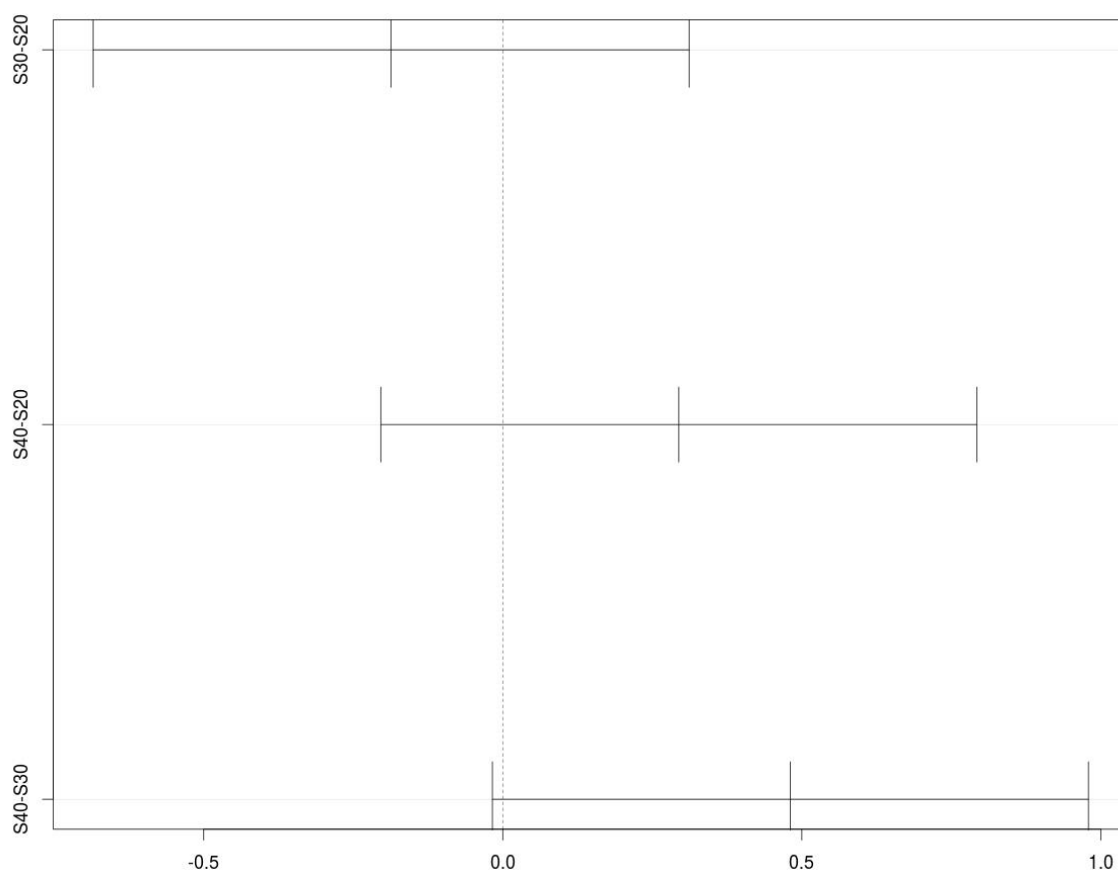


Figura 18. Comparação múltipla entre os teores de sólidos ao nível de 95% de significância.

Marques (2012), em ensaios de lavagem oxidativa com solo contaminado com hidrocarbonetos derivados de combustíveis, obteve os melhores resultados utilizando razão sólido-líquido de 0,30, que resultou em remoção de 85,8% para hidrocarbonetos.

A explicação para este resultado pode ser encontrada no trabalho de Feng *et al.* (2001), que diz que todo processo de lavagem depende do atrito das partículas umas contra as outras para retirada do contaminado da partícula do solo. Devido a isso, há uma influência da concentração de sólidos no residual do contaminante. Segundo Silva *et al.* (2005) este resultado deve-se principalmente a dois fatores: maior contato entre as duas fases, já que a dispersão dos sólidos na fase líquida é favorecida; e ao aumento no gradiente de concentração dos contaminantes, favorecendo a difusão destes para a fase líquida. No entanto, quando a concentração de sólidos foi aumentada para 40%, o biodiesel residual aumentou novamente, pois o maior teor de sólidos reduziu a fluidez da amostra dificultando a extração do biodiesel da fase sólida para a fase líquida, pois o sistema passou a ser movimentado em massa, com pouco movimento interpartículas.

4.2.1.3 Teste com água de reúso

O ensaio foi realizado com solo previamente contaminado com 5% (50.000 ppm) de biodiesel, concentração de 30% de sólidos, 2 horas de lavagem e água de reúso proveniente dos sistemas de refrigeração de uma unidade fabril da cidade de Uberlândia.

Na Tabela 5 é apresentado o resultado de remoção do biodiesel para ambos os tipos de água utilizada como base extratora. A análise estatística de comparação das médias confirmou que os resultados foram similares, isto é, a água de reúso pode ser utilizada para a lavagem do solo sem prejuízo para o resultado final do processo.

Tabela 5. Avaliação da influência do tipo de água de lavagem.

Sólidos	Concentração Inicial Biodiesel (%)	Concentração Final Biodiesel (%)	% Remoção
Água de abastecimento	5,00	$1,98 \pm 0,10$	$60,40 \pm 2,01a$
Água de reúso	5,00	$2,01 \pm 0,14$	$59,80 \pm 2,80a$

Assim, a partir deste teste, todos os ensaios passaram a ser realizados utilizando água de reúso como base da solução extratora.

4.2.1.4 Teste com utilização de surfactante

Nas Tabelas 6 e 7 estão apresentados os resultados de remoção obtidos neste teste. Percebe-se que quando a concentração do contaminante é maior, o percentual de remoção final também aumenta. Os melhores resultados foram obtidos com o sistema utilizando o surfactante Tween 80, sendo a melhor remoção obtida de 65,24% para 5% de contaminação inicial e 70,36% para 12% de contaminação inicial. Estes resultados foram obtidos utilizando um tempo de agitação de 60 minutos e concentração de sólidos de 60%.

O ensaio que utilizou 60 minutos de agitação e 45% de sólidos para o sistema com Tween 80 também apresentou bons resultados de remoção, 60,42% e 65,18% para 5 e 12% de contaminação inicial respectivamente. Resultados de remoção similares a este foram obtidos pelo sistema sem utilização de surfactante, 35 minutos de atrito e 30% de concentração de sólidos, que apresentou percentuais de remoção de 60,26% e 64,73%.

Tabela 6. Resultados de remoção (%) do teste com surfactantes para uma contaminação inicial de 5% de biodiesel.

Concentração de Sólidos	10 MINUTOS			35 MINUTOS			60 MINUTOS		
	30%	45%	60%	30%	45%	60%	30%	45%	60%
Tween 80	40,5	38,5	35,2	58,4	49,1	43,6	59,5	60,4	65,2
SDS	40,5	37,1	23,4	54,1	46,3	42,9	51,6	50,1	44,1
Sem surfactante	43,6	37,1	26,3	60,3	47,3	33,6	57,4	50,3	36,9

Tabela 7. Resultados de remoção (%) do teste com surfactantes para uma contaminação inicial de 12% de biodiesel.

Concentração de Sólidos	10 MINUTOS			35 MINUTOS			60 MINUTOS		
	30%	45%	60%	30%	45%	60%	30%	45%	60%
Tween 80	44,9	42,2	38,7	63,2	54,0	46,4	64,9	65,2	70,4
SDS	44,7	40,4	26,6	58,7	52,0	46,1	57,8	56,7	49,1
Sem surfactante	46,2	40,0	28,4	64,7	52,8	36,2	63,2	56,6	39,0

Na Figura 19 é possível avaliar como cada sistema é afetado pelo tempo de lavagem. Verifica-se que independente da concentração inicial de biodiesel, o tempo de 10 minutos é insuficiente para remoção do contaminante uma vez que os resultados variaram de 23,36% a 43,62% para uma contaminação inicial de 5% e de 26,61% a 46,18% para uma contaminação inicial de 12%.

O desempenho melhora para 35 minutos de agitação, porém, neste tempo, os melhores resultados são para concentração de sólidos de 30% cujo percentual de remoção variou de 54,10% a 60,26% e 58,67% a 64,73% para 5 e 12% de contaminação inicial, respectivamente.

O tempo de 60 minutos de lavagem aumenta a remoção para maiores concentrações de sólidos no caso de utilização do surfactante Tween 80 que obteve, para o sistema com 60% de sólidos, atingindo 65,24% para 5% de contaminação inicial e 70,36% para 12% de contaminação inicial. Para os sistemas com SDS e sem surfactante, a remoção resultante de 35 e de 60 minutos de agitação são similares.

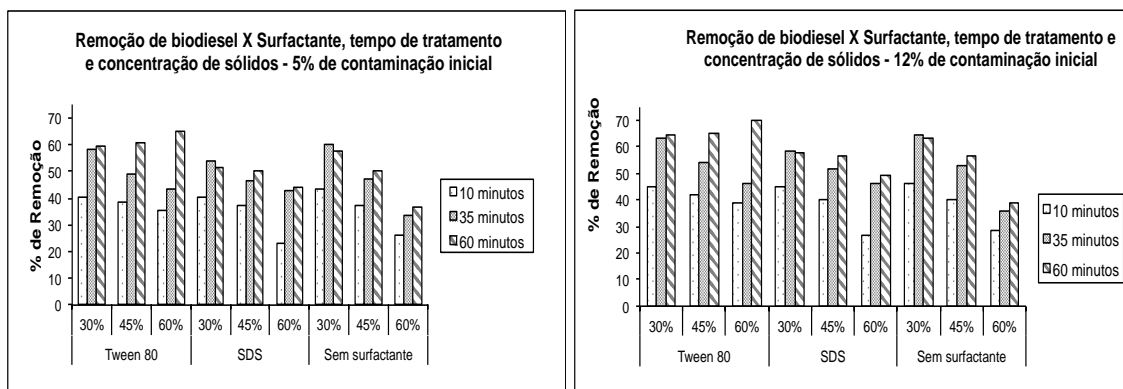


Figura 19. Resultado de remoção para uma contaminação inicial de 5 e 12% de biodiesel, variando os tempos de agitação, utilização ou não de surfactante, tipo de surfactante e concentração de sólidos no sistema.

Urum *et al.* (2005) em trabalho de remediação de solo contaminado com óleo cru combinando lavagem e “air sparging”, chegaram a 60% de remoção de óleo cru no solo utilizando um sistema com 57% de sólidos, 30 minutos de agitação e o surfactante SDS. Além disso, provaram que a medida que o tempo aumenta de 5 a 30 minutos, a remoção de óleo aumenta. O aumento da remoção de óleo pode ser atribuído ao maior tempo de contato dos agentes tensoativos com o solo contaminado.

A Figura 20 apresentam os mesmos resultados da Figura 19, porém facilita a comparação entre o desempenho dos três sistemas (Tween 80, SDS e sem surfactante) para o mesmo tempo de agitação.

Através da Figura 20 percebem-se comportamentos similares dos três sistemas para tempos de agitação de 10 e 35 minutos, em que os percentuais de remoção reduzem a medida que aumenta a concentração de sólidos. Além disso, verifica-se que, para 10 minutos de agitação, os sistemas possuem resultados de remoção semelhantes quando trabalhados com 30 e 45% de sólidos indicando que este tempo de tratamento é insuficiente.

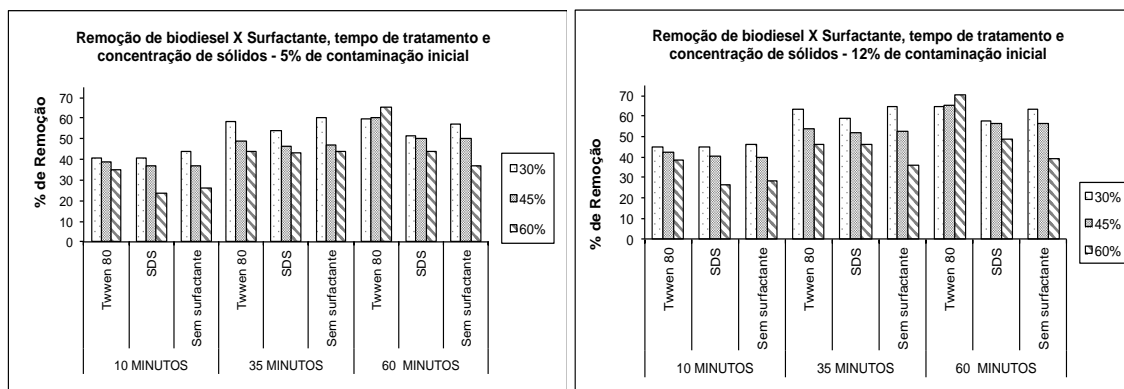


Figura 20. Resultado de remoção para uma contaminação inicial de 5 e 12% de biodiesel, variando os tempos de agitação, utilização ou não de surfactante, tipo de surfactante e concentração de sólidos no sistema.

O fato mais importante deste ensaio é percebido quando utilizado o tempo de 60 minutos. O sistema com o surfactante Tween 80, que já apresentava melhores resultados de remoção, obteve seu melhor desempenho com uma concentração de sólidos de 60%. Tal fato possibilita o tratamento de maior quantidade de solo contaminado com um menor gasto de água.

Marques (2012), trabalhando com lavagem oxidativa de solo contaminado com hidrocarbonetos derivados de combustíveis, obteve uma remoção de hidrocarbonetos totais de petróleo de 85,8% trabalhando com uma concentração de sólidos de 30% e uma remoção de 54,6% quando esta concentração subiu para 56%. Uhmman e Aspray (2012), em estudo de lavagem de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo, obtiveram valores de remoção que variaram de 4 a 56%, trabalhando com 0,5% de Tween 80, 50% de concentração de sólidos no sistema e 20 minutos de agitação. Feng *et al.* (2001) mantiveram um sistema com 20% de areia contaminada com óleo diesel e 80% de água sem surfactante, em atrito por 30 minutos e obtiveram uma remoção de 64,3%.

Nas Tabelas 8 e 9 é mostrado o resultado da avaliação do efeito da concentração do surfactante em ensaios com concentrações de 0,02%, 0,1% e 0,25% (w/v) de Tween 80, nas condições que apresentaram melhor resultado de remoção no teste anterior (concentração de 60% de sólidos e 60 minutos de lavagem). Independente da contaminação inicial de biodiesel, a concentração de 0,25% de Tween 80 na solução aquosa apresentaram os melhores valores de remoção, apesar do resultado ser similar ao obtido quando utilizado uma concentração de 0,5% deste surfactante, segundo análise estatística. De acordo com a especificação técnica do produto, a concentração micelar crítica (CMC) do Tween 80 é 0,01%, entretanto, não houve diferença significativa entre os resultados de remoção de biodiesel comparando-se o sistema

sem surfactante e o sistema com 0,02% de Tween 80. Porém, em concentrações bem superiores a CMC (0,25% e 0,5%), o surfactante exerce sua ação, melhorando o desempenho do processo de lavagem.

Tabela 8. Avaliação da concentração do surfactante utilizando 5% de contaminação inicial.

Concentração Tween 80 (%)	Concentração Inicial Biodiesel (%)	Concentração Final Biodiesel (%)	% Remoção
0,00	5,00	3,16 ± 0,17	36,86 ± 3,30a
0,02	5,00	2,96 ± 0,20	40,78 ± 3,98a
0,10	5,00	2,34 ± 0,21	53,21 ± 4,25ab
0,25	5,00	1,71 ± 0,20	65,81 ± 4,03b
0,50	5,00	1,74 ± 0,17	65,18 ± 3,48b

Tabela 9. Avaliação da concentração do surfactante utilizando 12% de contaminação inicial.

Concentração Tween 80 (%)	Concentração Inicial Biodiesel (%)	Concentração Final Biodiesel (%)	% Remoção
0,00	12,00	7,32 ± 0,17	39,03 ± 1,43a
0,02	12,00	6,52 ± 0,19	45,67 ± 1,56a
0,10	12,00	5,18 ± 0,22	56,82 ± 1,68b
0,25	12,00	3,42 ± 0,19	71,48 ± 1,56c
0,50	12,00	3,56 ± 0,17	70,32 ± 1,37c

Ahn *et al.* (2008) comparou a eficiência de lavagem do solo com quatro tensoativos não iônicos diferentes: Tween 40, Tween 80, Brij 30 e Brij 35 e obteve os melhores resultados de remoção de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos utilizando Tween 80 quando utilizada a concentração 0,2% (w/v) deste surfactante.

4.2.2 Teste com reúso do efluente

A realização dos ensaios com reutilização do efluente foi motivada mais uma vez pela preservação do recurso da água. O objetivo era verificar o ponto de saturação da água para a lavagem, isto é, utilizar este recurso até a sua capacidade máxima de extração.

Os resultados de remoção utilizando água de reúso com adição de 0,25% (w/v) de Tween 80 como base aquosa, 60% de sólidos e tempo de lavagem de 60 minutos estão apresentados na Figura 21. Com a alta concentração de sólidos no sistema e a alta remoção que este cenário apresenta, a solução extratora suportou apenas dois ciclos de lavagem, apresentando já no segundo ciclo, percentuais de remoção de 27,7% e 42,5% para as duas contaminações iniciais utilizadas. Assim, concentrações inferiores a 60% de sólidos devem ser avaliadas com o objetivo de aumentar o número de ciclos de lavagem.

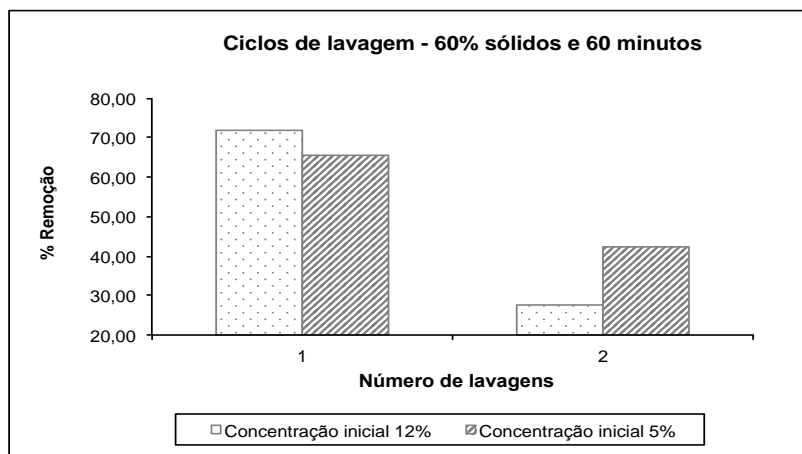


Figura 21. Remoção de biodiesel com reutilização do efluente (60% de sólidos e 60 minutos).

Os ensaios utilizando água de reúso com adição de 0,25% (w/v) de Tween 80, 45% de sólidos e tempo de lavagem de 60 minutos apresentaram os resultados mostrados na Figura 22.

A redução de sólidos surtiu efeito sobre o número de lavagens, e a solução extratora suportou três ciclos de utilização segundo o critério de não efetuar novos ciclos para remoção inferior a 50%. Os resultados de remoção foram 51,1% e 50,47% na segunda utilização e 38,5 e 29,5% na terceira utilização para as duas contaminações iniciais utilizadas.

Na Figura 22, pode ser observado que, para uma contaminação inicial de 12%, a remoção no primeiro ciclo de uso da água é mais alta que no caso de uma contaminação inicial de 5% de biodiesel. Porém, este melhor resultado de remoção se inverte para os demais ciclos de lavagem.

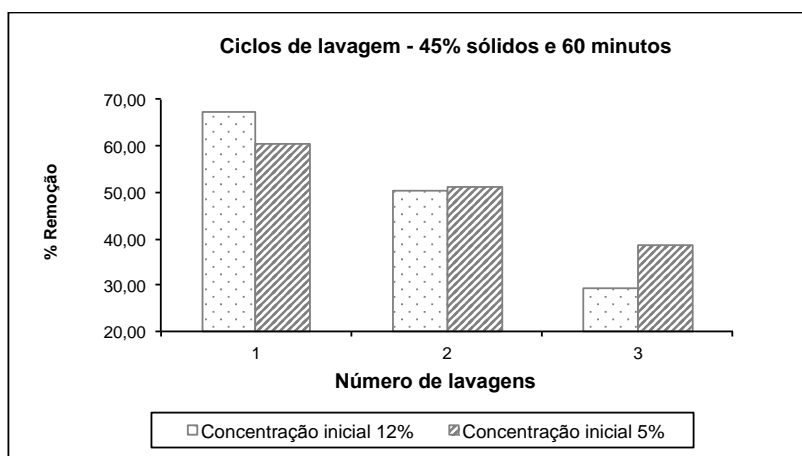


Figura 22. Remoção de biodiesel com reutilização do efluente (45% de sólidos e 60 minutos).

O sistema utilizando água de reúso sem adição de surfactante, 30% de sólidos e tempo de lavagem de 35 minutos apresentou, no teste de comparação com os surfactantes, o terceiro melhor resultado de remoção. A maior quantidade de água utilizada neste sistema permitiu executar quatro ciclos de lavagem antes da saturação da solução extratora. Os resultados de remoção para cada um dos ciclos são mostrados na Figura 23.

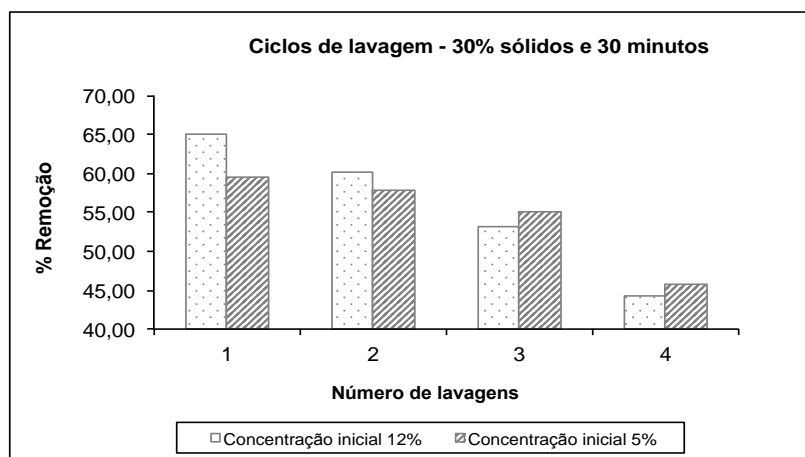


Figura 23. Remoção de biodiesel com reutilização do efluente (30% de sólidos e 30 minutos).

Para comparação dos resultados e verificação de qual tipo de sistema é mais vantajoso em termos de economia de água e remoção do contaminante, foi utilizado como indicadores a quantidade (gramas) de biodiesel removido por litro de água utilizada na lavagem, o volume de água utilizada por massa de solo tratado e a relação biodiesel removido (g) por quilo de solo tratado. A Tabela 10 apresenta os resultados.

Tabela 10. Comparativo dos resultados de remoção com reutilização do efluente para sistemas com diferentes concentrações de sólidos.

Concentração de sólidos	Inicial 5%			Inicial 12%		
	30%	45%	60%	30%	45%	60%
Biodiesel removido (g)	49,27	50,60	42,08	120,85	119,27	98,92
Número lavagens	4	3	2	4	3	2
Volume de solo tratado (kg)	1,800	2,025	1,800	1,800	2,025	1,800
Volume de água utilizado (L)	1,050	0,825	0,600	1,050	0,825	0,600
Biodiesel removido/volume água (g/L)	46,92	61,33	70,13	115,10	144,57	164,87
Volume água utilizada/massa solo tratado (L/kg)	0,58	0,41	0,33	0,58	0,41	0,33
Biodiesel removido/massa solo (g/kg)	27,37	24,99	23,38	67,14	58,90	54,96

Os resultados mostram que, independente da concentração inicial de biodiesel, o sistema com 60% de sólidos, mesmo permitindo apenas dois ciclos de lavagem, é o sistema que apresenta a melhor relação remoção/quantidade de água utilizada. Esta relação se torna menor a medida que a concentração de sólidos nos sistemas é menor, mesmo realizando maior número de ciclos de lavagem. Para este indicador, o resultado referente a utilização de 60% de sólidos é 1,5 vezes maior que o resultado referente a 30% de sólidos. Referente a análise de quantidade de biodiesel removido pela quantidade de solo tratado, tem-se o contrário do observado pelo indicador discutido anteriormente, ou seja, a situação na qual o teor de sólidos é 30% apresenta a melhor relação biodiesel removido por quilo de solo tratado. Entretanto, a amplitude da diferença entre os resultados é menor que a do indicador anterior. O melhor resultado apresenta-se 1,2 vezes maior que o pior resultado. Na outra abordagem proposta para avaliação dos resultados, é verificado o volume de água utilizado por quilo de solo tratado. Neste caso, quanto maior a proporção de sólidos no sistema, melhor o indicador.

4.3 O efluente gerado no tratamento físico do solo

Após a separação do solo e da solução aquosa utilizada na lavagem, as análises de fósforo disponível; nitrogênio total; carbono orgânico total (COT); pH e hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) foram realizadas para a caracterização do efluente. A Figura 24 mostra a aparência do efluente antes do tratamento.



Figura 24. Aparência do efluente após separação da parte sólida.

Nas Tabelas 11 e 12 estão os resultados das análises de caracterização do efluente para duas concentrações diferentes de contaminante. Estas concentrações são provenientes do biodiesel extraído pela lavagem na etapa anterior do experimento.

Tabela 11. Caracterização do efluente proveniente da lavagem de solo contaminado com 5% de biodiesel.

Conc. Biodiesel (%)	1,77
Carbono (mg/L)	183,68
Nitrogenio (mg/L)	25,7
Fósforo (mg/L)	5,94
C:N:P	100:14,46:3,34
pH	6,52

Tabela 12. Caracterização do efluente proveniente da lavagem de solo contaminado com 12% de biodiesel.

Conc. Biodiesel (%)	7,44
Carbono (mg/L)	458,27
Nitrogenio (mg/L)	28
Fósforo (mg/L)	5,65
C:N:P	100:6,46:1,30
pH	6,83

Nas Tabelas 11 e 12 pode-se observar que uma maior concentração de biodiesel acarreta em maior quantidade de carbono no efluente. Os valores de nitrogênio, fósforo e pH são similares nos dois casos, não sendo influenciado pela concentração do biodiesel. Já o ajuste da relação C:N:P se torna mais importante nos casos onde o efluente possui maior carga contaminante, uma vez que a relação C:N:P utilizada para tratamento biológico do efluente é 100:15:4 conforme trabalho de Sá *et al.* (2008).

4.3.1 Biorremediação do efluente

A Figura 25 apresenta a cinética de degradação do contaminante nos termos de redução do percentual de biodiesel e da quantidade de carbono orgânico total para as concentrações iniciais de 1,77% e 7,44% de biodiesel, respectivamente.

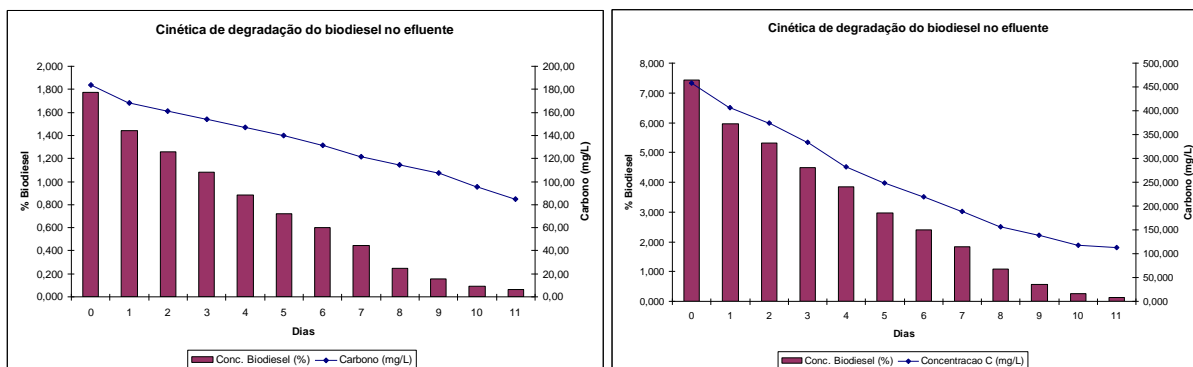


Figura 25. Redução da concentração de biodiesel e do COT na biorremediação do efluente para concentrações iniciais de 1,77% e 7,44% de biodiesel, respectivamente.

Para uma contaminação inicial de biodiesel de 1,77%, foi obtido 96,5% de degradação do biodiesel e 53,8% de remoção do COT em 11 dias de processo. É importante salientar que a concentração de carbono orgânico total na água de abastecimento na rede pública é por volta de 60,0 mg/L. No caso da contaminação inicial de 7,44%, obteve-se 98,3% de degradação do biodiesel e 75,4% de remoção do COT.

Sá *et al.* (2008), em condições ótimas de processo, obteve uma remoção de hidrocarbonetos de 71,0% com 3 dias de tratamento do efluente. Vieira (2009), realizando a biodegradação de efluente de terminais de combustíveis utilizando culturas mistas, mostrou resultados de 75% de remoção de hidrocarbonetos com 31 dias de processo de tratamento e 80,4% de redução do COT neste mesmo tempo, sendo a concentração final de carbono orgânico no efluente tratado de 360 mg/L. Esta concentração é maior que a mostrada no presente trabalho cuja concentração final de carbono orgânico no efluente tratado foi de 85,7 e 113,1 mg/L. Mrayyan e Battikhi (2005), utilizando cultura mista e reposição de nutrientes em tratamento de lodo de petróleo, mostraram uma remoção de carbono orgânico total de 43% após 10 dias de processo em aerobiose.

A Figura 26 mostra a diferença na aparência do efluente antes e após o tratamento e após a centrifugação para retirada dos microrganismos inoculados para o tratamento biológico.



Figura 26. Comparação da aparência do efluente antes e após o tratamento, e após retirada dos microrganismos.

4.3.2 Teste com utilização do efluente tratado

O principal objetivo de um tratamento é fazer com o que meio contaminado volte a possuir suas características originais. Assim, o efluente tratado foi centrifugado para retirada das bactérias que foram inoculadas para a biorremediação e submetido novamente, como base extratora, ao tratamento de remoção mecânica do contaminante do solo.

Foram realizados ensaios utilizando o efluente tratado com adição de 0,25% (w/v) de Tween 80, 60% de sólidos e tempo de lavagem de 60 minutos (Tabela 13); e, utilizando o efluente tratado sem adição de surfactante, 30% de sólidos e tempo de lavagem de 35 minutos (Tabela 14). Foram realizados cinco ensaios, com a concentração inicial de 5 e 12% de biodiesel.

Tabela 13. Resultados de lavagem utilizando o efluente tratado, concentração de 30% de sólidos e 35 minutos de agitação.

Ensaio	Concentração de sólidos (%)	Tempo de lavagem (min)	Concentração Inicial Biodiesel (%)	Concentração Final Biodiesel (%)	% Remoção
1	30	35	5,00	2,02	59,58
2	30	35	5,00	1,99	60,26
3	30	35	5,00	2,09	58,14
4	30	35	5,00	2,01	59,72
5	30	35	5,00	2,03	59,36
6	30	35	12,00	4,31	64,05
7	30	35	12,00	4,65	61,24
8	30	35	12,00	4,40	63,37
9	30	35	12,00	4,48	62,69
10	30	35	12,00	4,61	61,55

Tabela 14. Resultados de lavagem utilizando o efluente tratado, concentração de sólidos de 60% e 60 minutos de agitação.

Ensaio	Concentração de sólidos (%)	Tempo de lavagem (min)	Concentração Inicial Biodiesel (%)	Concentração Final Biodiesel (%)	% Remoção
1	60	60	5,00	1,76	64,74
2	60	60	5,00	1,69	66,18
3	60	60	5,00	1,73	65,46
4	60	60	5,00	1,75	64,96
5	60	60	5,00	1,78	64,40
6	60	60	12,00	3,55	70,41
7	60	60	12,00	3,45	71,26
8	60	60	12,00	3,53	70,57
9	60	60	12,00	3,40	71,65
10	60	60	12,00	3,61	69,94

Através dos resultados mostrados nas Tabelas 13 e 14, é possível afirmar que a remoção obtida utilizando o efluente tratado é similar a remoção encontrada nos experimentos anteriormente realizados com água de reúso, validando assim, o tratamento biológico do efluente e a utilização deste para os mesmos fins da água de reúso.

4.4 Biodiesel recuperado na etapa de lavagem

Em relação à recuperação do biodiesel, não há trabalhos semelhantes disponíveis na literatura que permita comparar e avaliar os resultados. Nos ensaios cuja concentração inicial do contaminante era de 12% (120.000 ppm), apenas com o processo físico de separação das fases por diferença de densidade foi possível recuperar um valor próximo a 31,5% da quantidade de biodiesel inicial no solo. Este resultado foi considerado satisfatório uma vez que condições reais de acidentes ambientais acarretam um montante de solo muito maior do que o usado nos experimentos, gerando uma quantidade significativa de biodiesel recuperado que poderá ser usado como matéria prima ou fonte de energia.

Nos testes onde foram utilizadas concentrações maiores do contaminante (12%), foi possível notar claramente a separação do biodiesel retirado do solo durante o processo de lavagem (Figura 27) e que quanto maior a concentração de biodiesel na amostra inicial, maior a quantidade de óleo livre no sistema.



Figura 27. Separação do biodiesel após o processo de lavagem.

A Figura 28 mostra a aparência do biodiesel recuperado após filtração.

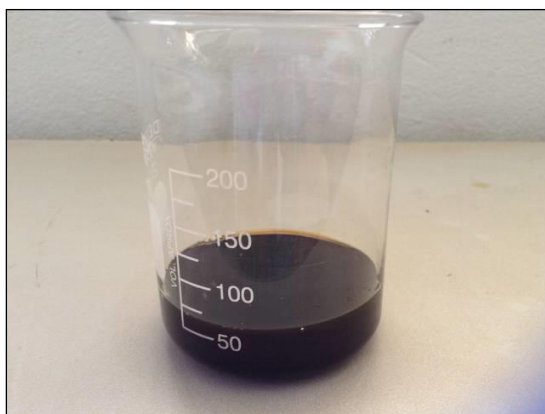


Figura 28. Aparência do biodiesel recuperado do solo.

O poder calorífico superior a volume constante determinado para o biodiesel recuperado foi em média 15.491 kJ/kg, para um conjunto de 6 amostras, nas quais os valores obtidos variaram entre 14.235 e 16328 kJ/kg. Mesmo sendo um valor mais baixo que o biodiesel puro, que apresenta poder calorífico de 36.425 kJ/kg, este produto tem capacidade comburentes pois a condição mínima para que um resíduo mantenha-se em combustão e possa ser utilizado em tratamentos térmicos é que seu poder calorífico seja superior a 10.467 kJ/kg (GUIMARÃES, 2007). O pH apresentou um valor médio de 6,80, indicando portanto, que o material de estudo não é corrosivo, o que favorece seu uso em uma maior variedade de caldeiras e outros equipamentos destinados a recuperação do valor energético do mesmo.

O teor de água livre no material recuperado mostrou-se próximo a 2.000 ppm (variando de 1.600 a 2.300 ppm), enquanto no biodiesel puro o padrão utilizado é de no máximo 500 ppm. Porém, Alves (2003) citando possibilidades de aplicação de resíduos de combustíveis, afirma que a utilização de borra de petróleo com até 30% de água no processo de fabricação de blocos cerâmicos facilita a homogeneização da massa, diminuindo a

necessidade de seu umedecimento. Segundo Alves (2003), pequenas quantidades de borra de petróleo misturados à massa cerâmica traz economias no consumo de energia pois a combustão interna desse material diminui a exigência de energia externa para queima. Este tipo de economia sugere que, além da queima, há a possibilidade de outros usos para o biodiesel recuperado.

4.5 Experimentos de biorremediação do solo

Nos reatores biológicos usados neste trabalho foram realizados os processos de biorremediação do solo utilizando a estratégia de bioaumentação e bioestimulação, buscando manter a relação C:N:P 100:10:1 e corrigindo a umidade do solo para 14%, o que corresponde a 50% da capacidade de retenção de água medida para este solo. Cada planejamento avaliou variáveis que poderiam interferir no processo de descontaminação do solo, além de avaliações que visaram validar os dados obtidos.

Neste Capítulo também será mostrado o resultado do acompanhamento do processo sem interferência externa, reatores abióticos, de modo a fazer um levantamento quanto às perdas de contaminantes ao longo do tempo.

4.5.1 Reator Abiótico

Normalmente as perdas abióticas são ocasionadas por fenômenos físicos como evaporação e físico-químicos como dissolução, foto-oxidação e oxidação química.

Para inibição dos microrganismos do reator abiótico, optou-se por autoclavar o solo, a 1 atm por 20 min, antes da adição de biodiesel. Durante o processo, o solo era umidificado com uma solução de azida de sódio (2% p/v) observando-se então, a ausência de crescimento microbiano durante o experimento.

A degradação abiótica do biodiesel foi de $3,86 \pm 0,21$ %. Esse resultado foi contabilizado nos valores de biodegradação do biodiesel em todos os resultados realizados.

4.5.2 Reator rotativo escala de bancada

Foram realizados seis ensaios de biorremediação em reator rotativo em escala de bancada laboratorial, utilizando o solo proveniente do pré-tratamento de lavagem escolhidos aleatoriamente. Devido a isso, a concentração inicial do contaminante em cada um dos

ensaios foi variável. Os parâmetros do tratamento de lavagem que cada solo destinado a biorremediação foi submetido e a concentração final do biodiesel após o pré-tratamento estão descritos a seguir:

Ensaio 1. Concentração inicial de biodiesel de 5%, base extratora sem surfactante, 30% de sólidos e 35 minutos de agitação, concentração final de 1,95%;

Ensaio 2. Concentração inicial de biodiesel de 5%, base extratora sem surfactante, 45% de sólidos e 35 minutos de agitação, concentração final de 2,65%;

Ensaio 3. Concentração inicial de biodiesel de 12%, base extratora com 0,25% (w/v) de Tween 80, 60% de sólidos e 60 minutos de agitação, concentração final de 3,59%;

Ensaio 4. Concentração inicial de biodiesel de 12%, base extratora sem surfactante, 30% de sólidos e 35 minutos de agitação, concentração final de 4,26%;

Ensaio 5. Concentração inicial de biodiesel de 12%, base extratora com 0,5% (w/v) de Tween 80, 30% de sólidos e 35 minutos de agitação, concentração final de 4,31%;

Ensaio 6. Concentração inicial de biodiesel de 12%, base extratora sem surfactante, 60% de sólidos e 60 minutos de agitação, concentração final de 7,60%.

Antes de iniciar a biorremediação, as concentrações de carbono, nitrogênio e fósforo foram medidas para ajuste da relação C:N:P para 100:10:1 (SILVA, 2004; RISER-ROBERTS, 1998). Além disso, a umidade foi medida e corrigida para 14% para que se iniciasse o processo nas condições ótimas requeridas. A Tabela 15 mostra a umidade e a relação C:N:P antes da correção, confirmando a necessidade de ajuste desses parâmetros. Durante o experimento as medições e correções destes itens foi realizada a cada sete dias.

Tabela 15. Valores de C, N, P e umidade antes do início da biorremediação.

Ensaio	Concentração Biodiesel (%)	Umidade	P (mg/Kg)	C (g/Kg)	N (g/Kg)	C: N: P
1	1,95	10,24%	1,89	46,28	0,06	100: 0,130: 0,004
2	2,65	11,31%	2,13	48,84	0,09	100: 0,184: 0,004
3	3,59	9,85%	1,76	49,24	0,06	100: 0,122: 0,004
4	4,26	12,02%	2,08	52,46	0,07	100: 0,133: 0,004
5	4,31	10,47%	1,99	56,24	0,09	100: 0,160: 0,004
6	7,60	10,86%	2,04	63,32	0,04	100: 0,063: 0,003

Na Figura 29 estão os resultados de degradação do biodiesel, explicitando a remoção deste contaminante ao longo do tempo requerido para o processo. Todos os ensaios resultaram em valores de 100% ou próximos a 100% de degradação do contaminante. Apenas o experimento iniciado com 7,60% de biodiesel necessitou de 42 dias para degradar completamente o contaminante. Os demais experimentos foram finalizados com 35 dias de biorremediação.

Molina-Barahona *et al.* (2004) avaliando os efeitos da suplementação de nutrientes e da adição de resíduos de colheita, para bioestimular os microrganismos autóctones na biodegradação de diesel, com concentração inicial de biodiesel de 4%, observou uma remoção de 67% de contaminantes em 109 dias de processo. Estes autores utilizaram um planejamento fatorial de 2 níveis que avaliou a relação C:N, % de umidade (m/m), % de cultura e tipo de cultura, além do controle de temperatura entre 20 e 25°C. No presente trabalho foram obtidos valores superiores em 30 dias de processo quando comparados aos resultados de Molina-Barahona *et al.* (2004) (100% de remoção para 3% de biodiesel; 100, 60, 65 e 63,3% de remoção para 5% de biodiesel inicial no solo), o que caracteriza como essencial ao estudo além da manutenção das condições de trabalho, a escolha do processo correto de biorremediação.

A Figura 29 é importante para verificar a cinética de degradação do biodiesel nos experimentos. A partir desta figura percebe-se o comportamento similar de degradação para os cinco primeiros experimentos, cujas concentrações iniciais de biodiesel foi inferior a 4,3%. Apenas o experimento sete, que iniciou com 7,6% do contaminante, a curva da cinética não seguiu a mesma tendência das demais. Assim, é possível verificar a influência da concentração inicial na remoção do biodiesel, que pode ser explicada pela maior dificuldade de adaptação dos microrganismos a um meio com maior concentração do contaminante.

A afirmação anterior é corroborada pela Figura 30, em que, no experimento sete (com maior concentração de biodiesel), apenas no 28º dia, a concentração de bactérias atingiu seu valor máximo de 10^{10} UFC/g solo, enquanto, nos demais experimentos, a concentração máxima de bactérias foi atingida no 14º dia, lembrando que tal medida foi realizada a cada 14 dias.

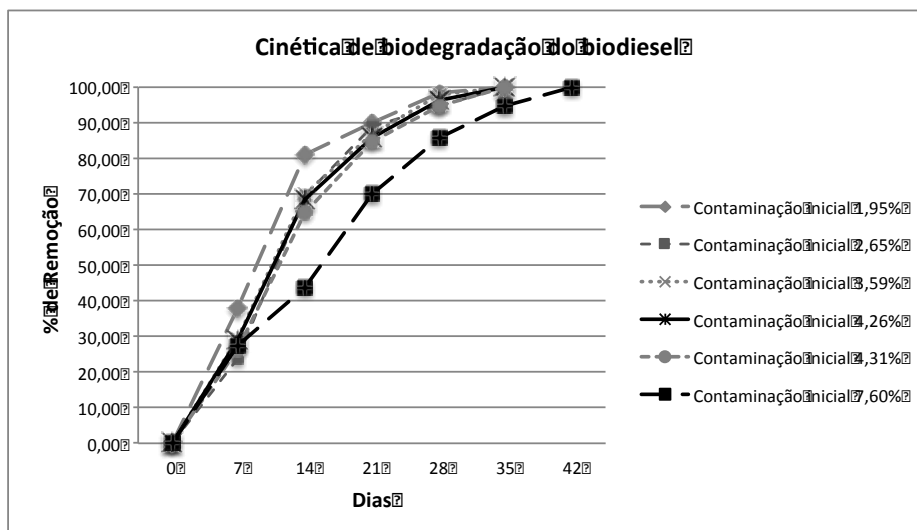


Figura 29. Cinética da degradação do biodiesel na biorremediação.

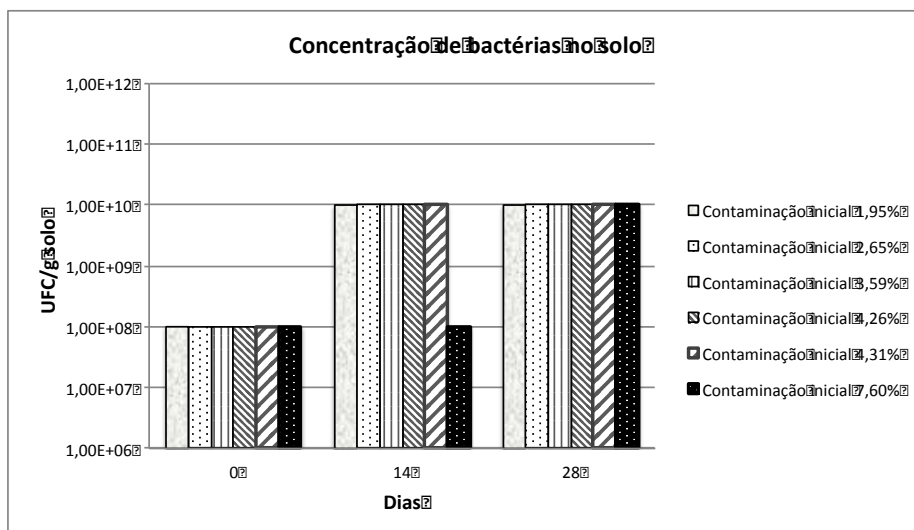


Figura 30. Concentração de bactérias no solo na biorremediação.

A temperatura, medida diariamente, permaneceu entre 28 e 31°C; e o pH medido e corrigido semanalmente, manteve-se entre 6,58 e 7,60, valores considerados ideais para a atividade microbiana. A umidade, também ajustada semanalmente para o valor de 14%, apresentou o valor mínimo de 12,49%.

Os resultados de degradação similares e a pouca oscilação das variáveis indicam a boa repetitividade dos experimentos, provavelmente devido ao tipo de reator utilizado, que permite melhor homogeneização do meio, a disponibilização dos nutrientes e do contaminante, e a dissipação do calor gerado pelas reações químicas decorrentes da degradação do biodiesel.

4.5.3 Reator rotativo escala piloto

O primeiro experimento de biorremediação em escala piloto foi realizado no reator com rotação de 15 rpm e inclinação de 60° em relação a horizontal, com carga de 25,0 kg de solo e a concentração de biodiesel foi de 8%. A análise de TPH indicou uma concentração de biodiesel de 5,51% de biodiesel ao final de 42 dias. Isso corresponde a uma redução de 31,13% na concentração de biodiesel. A Figura 31 apresenta o comportamento da curva de remoção de biodiesel ao longo do tratamento de biorremediação. O experimento foi finalizado com 42 dias pois ocorreu a estabilização do valor de TPH neste tempo.

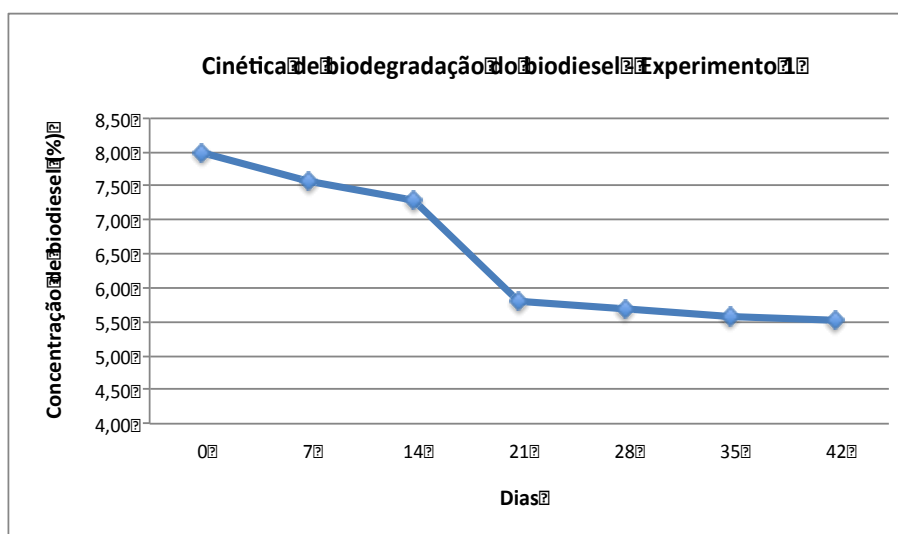


Figura 31. Cinética de degradação do biodiesel no primeiro experimento de biorremediação.

Lemos (2013) obteve, para a contaminação de 7% de biodiesel bruto, 70,3% de remoção a 30°C e 19% de remoção a 40°C após 42 dias de experimento. Apesar dos resultados terem sido compatíveis aos encontrados na literatura, eles foram considerados insatisfatórios, pois esperava-se valores maiores de remoção. Assim, de posse dos resultados do experimento, foram realizadas avaliações de modo a encontrar melhores condições para de maximizar a degradação do contaminante.

A Figura 32 mostra os valores de temperatura medidos ao longo do processo. Foi observado que a alta temperatura (acima de 35°C) pode ter reduzido a eficiência de sistema, pois Lemos (2013) em estudo de otimização das variáveis, determinou que o intervalo de 28 a 32°C apresentavam os melhores resultados de remoção. Para minimizar este problema, foi alterada a localização geográfica do biorreator. Nos demais experimentos, ele permaneceu em local onde a temperatura ambiente se apresentava mais baixa que no primeiro experimento.

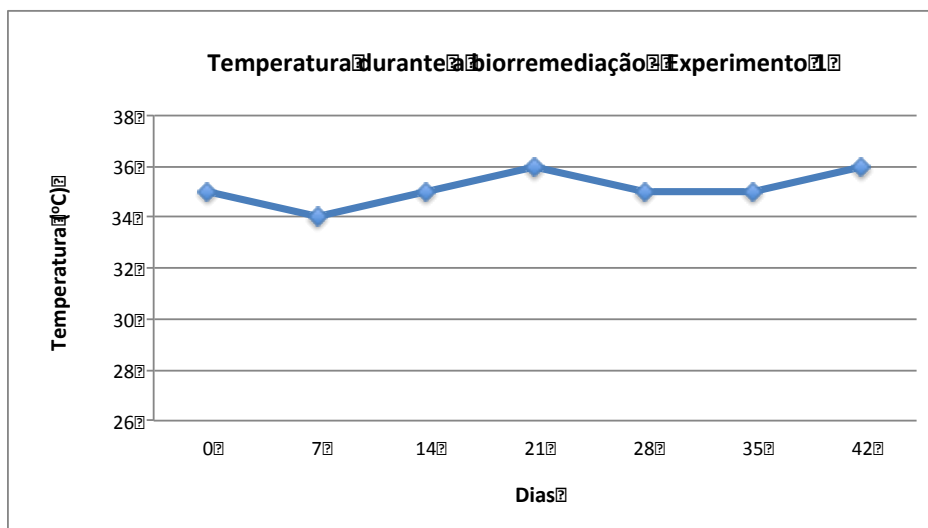


Figura 32. Temperatura durante o primeiro experimento de biorremediação.

Além disso, havia sinais de que o revolvimento da terra estava sendo insuficiente o que acarretou a formação de grumos que indisponibilizavam a degradação do contaminante desta parte. Para correção deste problema, foi reduzida a quantidade de terra a ser tratada de 25 kg para 15 kg, reduzindo a taxa de ocupação do reator de 62,5% para 37,5% visto que a ineficiência no revolvimento da terra pode ser devido a relação do tamanho do reator e a quantidade de terra a ser tratada. Nos trabalhos encontrados na literatura predominam baixas taxas de ocupação dos biorreatores: Banerjee *et al.* (1995) – 10 a 25%; Krüger *et al.* (1995) – 20%; Truax *et al.* (1995) – 24 a 29% e Woo e Park (1999) – 56%. Foi reduzido o ângulo de inclinação do tambor para 30° e também foi reduzida a velocidade de rotação para 10 rpm visando melhorar o aproveitamento das chicanas e proporcionar um melhor tombamento da terra.

Outra alteração visando melhores resultados de remoção do biodiesel foi reduzir a contaminação inicial de 8% para 6% de biodiesel. Esta decisão foi devido aos resultados de remoção apresentados por Lemos (2013) serem melhores em concentrações mais baixas no caso dos ensaios em temperaturas mais próximos a realidade do experimento atual (35°C).

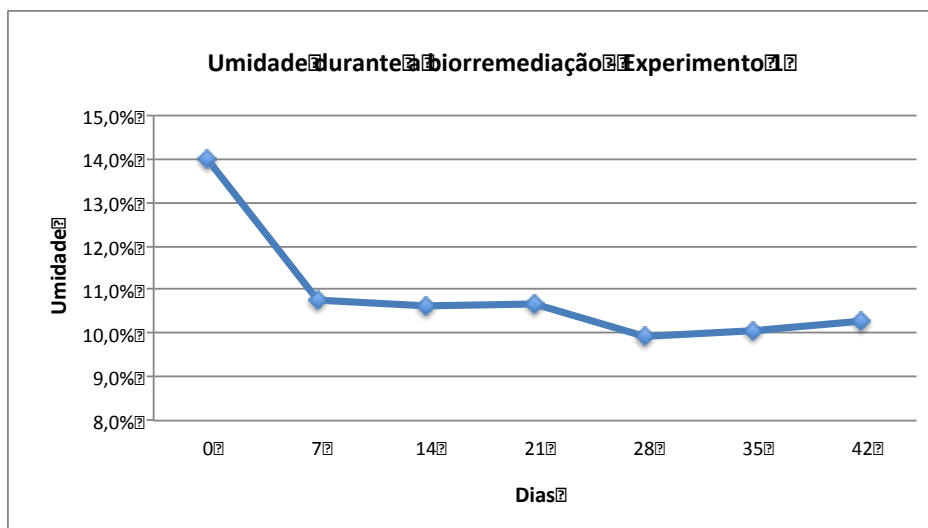


Figura 33. Umidade durante o primeiro experimento de biorremediação.

Por meio da Figura 33 pode-se perceber que a correção da umidade a cada 7 dias foi insuficiente para mantê-la próxima ao esperado de 14%. Devido a isso, a correção deste parâmetro no reator escala piloto passou a ser feita a cada três dias e a umidade passou a ser ajustada para 15%, para que no decorrer do processo esta permanecesse em torno de 14%, visto que as condições climáticas na cidade de Uberlândia favorecem a perda de umidade do sistema.

As condições inadequadas aos microrganismos degradadores fica evidente na Figura 34, onde é possível verificar a redução da população microbiana no 42º dia.

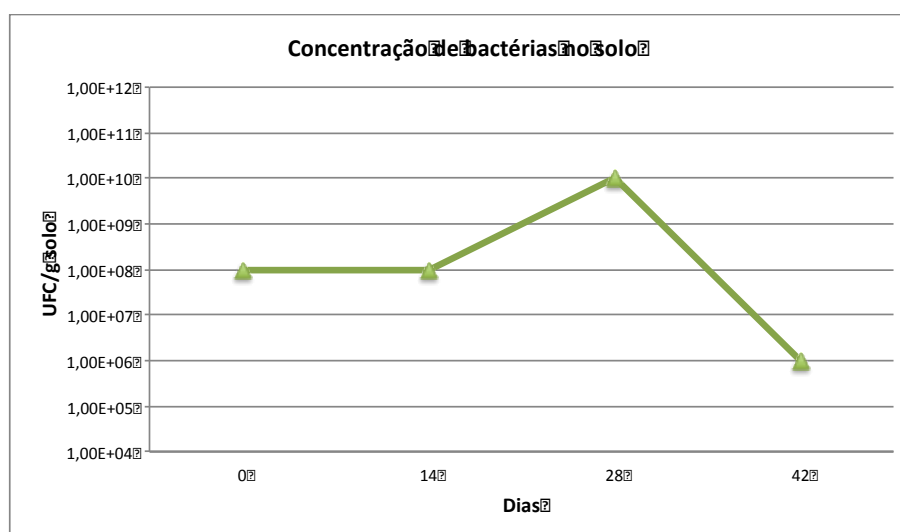


Figura 34. Concentração dos microrganismos no primeiro experimento de biorremediação.

Corrigidas as deficiências citadas no primeiro experimento, foi possível observar pela Figura 35, que nos experimentos posteriores, com contaminação inicial de 6%, 10% e 12% de biodiesel, para os mesmos 42 dias de biorremediação houve remoção superior aos 31% observados no experimento inicial, o que sugere que as modificações propostas melhoraram o funcionamento do reator. Nesta figura também pode ser observado valores de remoção próximos a 100% com 70 dias de biorremediação.

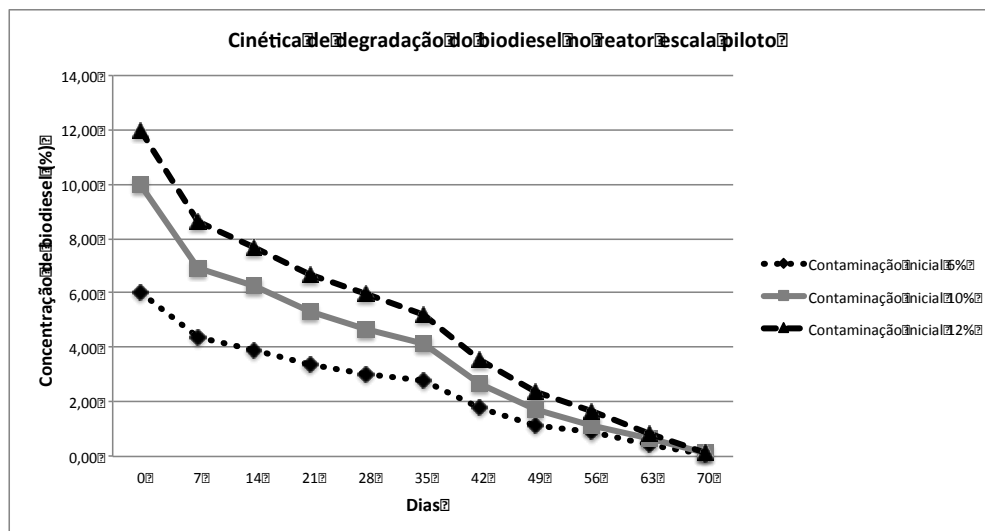


Figura 35. Cinética de degradação do biodiesel no reator escala piloto.

Estes resultados são melhores que os encontrados por Berger (2005) em trabalho de biorremediação de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo em escala piloto utilizando biopilhas, cujos percentuais de remoção foram de 54,7% a 98,0% com 60 dias de tratamento.

Os bons resultados de remoção obtidos mostram a importância da temperatura, bem como a umidificação do solo em intervalos de tempo necessários para o processo de biorremediação. Nas Figuras 36 e 37 pode-se perceber o melhor controle destes parâmetros nos experimentos 2, 3 e 4 de biorremediação.

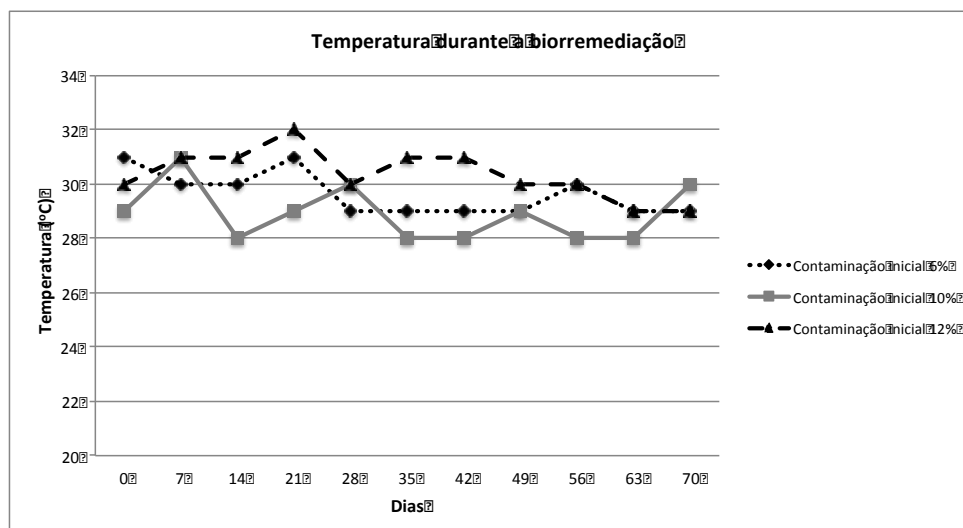


Figura 36. Temperatura no reator durante a biorremediação.

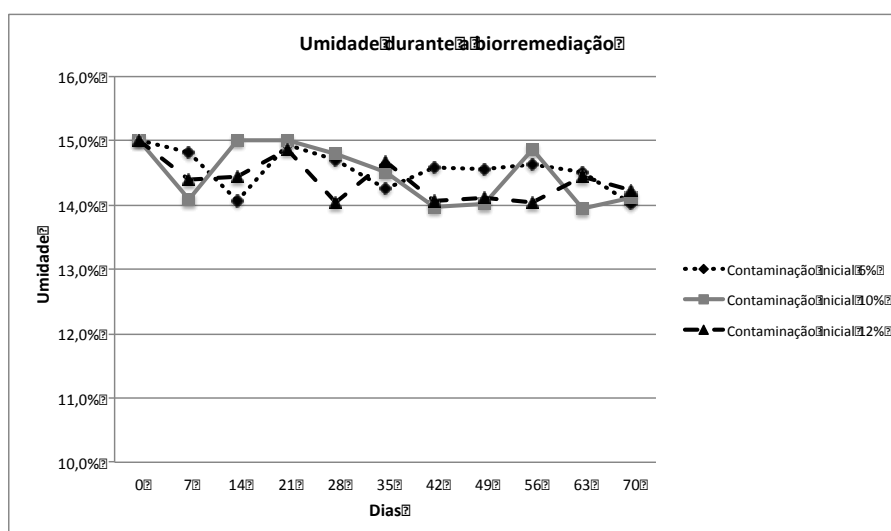


Figura 37. Umidade no reator durante a biorremediação.

Analisando a Figura 38 foi possível afirmar que houve uma boa adaptação dos microrganismos às condições do meio, pois os valores foram aumentando substancialmente ao longo do processo de biorremediação chegando a altos valores de concentração de microrganismos, na ordem de 10^{10} UFC/g de solo. Por esta figura, é possível verificar também, que o período de adaptação dos microrganismos em sistemas com maiores concentrações de contaminante (experimentos 3 e 4) é mais longo.

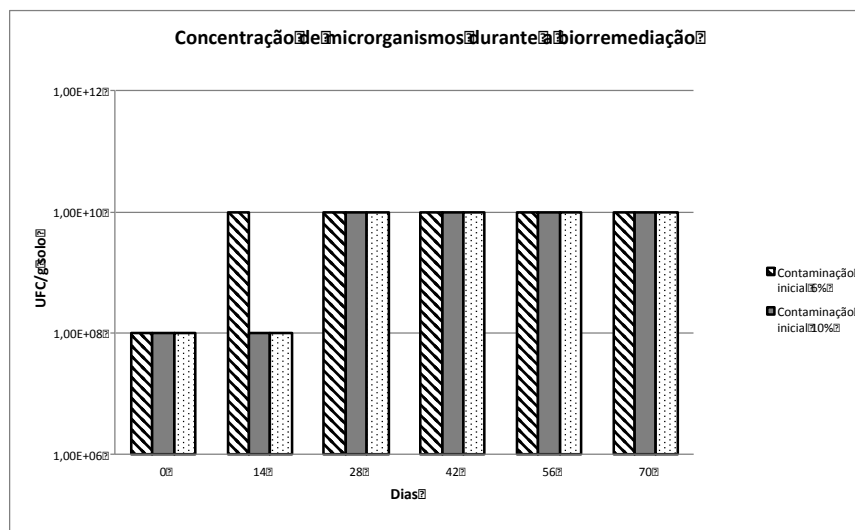


Figura 38. Concentração dos microrganismos na biorremediação.

Ao final destas avaliações conclui-se que o trabalho atingiu um elevado valor de remoção de biodiesel. Vale salientar que as quantidades de contaminante utilizadas neste trabalho são superiores às encontradas na literatura e, mesmo com esta carga elevada, os microrganismos apresentaram capacidade de remoção, mostrando-se bem adaptados e eficientes e que a configuração do reator proposto contribuiu para o sucesso do tratamento.

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho apresentou as seguintes conclusões:

Referente ao processo de lavagem do solo com agitação mecânica seguido de tratamento biológico

- O uso de lavagem de solo utilizando agitação mecânica é uma alternativa eficiente na redução do tempo do tratamento completo em no mínimo 40% (70 para 42 dias), sendo que maiores tempos de agitação não necessariamente se traduzem em maiores percentuais de remoção;
- A água de reúso proveniente dos sistemas de refrigeração da indústria pode ser utilizada na lavagem, em substituição à água de abastecimento, sem prejuízo para o resultado final;
- A utilização do surfactante Tween 80 permite o uso de maiores concentrações de sólidos no sistema (60%), porém necessitam de 60 minutos de agitação para apresentar os melhores resultados. Esta configuração de sistema chegou a percentuais de remoção em torno de 71%.

Referente ao biodiesel recuperado do solo contaminado

- A recuperação do biodiesel reduz a carga contaminante do efluente a ser tratado e o biodiesel recuperado possui características que possibilitam sua reutilização como fonte de energia em determinados processos.

Referente à biorremediação do solo

- A concentração inicial de biodiesel tem influência sobre a população microbiana, visto que concentrações acima de 7% acarretou um crescimento mais lento dos microrganismos até adaptação ao meio;
- O biorreator tipo tambor rotativo em escala piloto é viável para o tratamento de solo contaminado com biodiesel, apresentando resultados próximos a 100% de remoção do contaminante em 70 dias de biorremediação;
- O controle da temperatura é essencial no processo de biorremediação, pois esta variável em valores de $30\pm 2^{\circ}\text{C}$, em conjunto com a relação C:N:P – 100:10:1 e a

umidade para 14%, fez com que praticamente toda a carga contaminante presente no solo fosse extraída;

- A correção semanal da umidade mostrou-se insuficiente sendo necessário aumentar a frequência de medição e correção deste parâmetro para a cada três dias.

Referente ao tratamento do efluente gerado

- A cultura mista previamente adaptada foi capaz de degradar o contaminante também em meio líquido;
- O tratamento do efluente apresentou valores próximos a 100% de remoção do contaminante com 11 dias de biorremediação, e concentração de carbono orgânico total próximo ao da água de abastecimento;
- Os resultados de remoção de biodiesel do solo quando utilizado o efluente tratado como base extratora do processo de lavagem, foram similares aos resultados obtidos quando utilizado água de reúso.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A seguir são apresentadas sugestões para desenvolvimento de trabalhos futuros relacionados ao tratamento de solo contaminado com biodiesel:

- Realizar estudo experimental de diferentes tipos de reatores destinados a realização da lavagem do solo com agitação e injeção de ar concomitantemente;
- Estudar outras variáveis como pH, temperatura e tamanho das partículas que afetam no processo de remoção mecânica;
- Estudar componentes inertes que possam auxiliar na oxigenação do solo durante o processo de biorremediação do mesmo;
- Estudar a utilização de surfactantes na biorremediação do solo;
- Estudar a reintegração do solo tratado ao meio ambiente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIOVE – Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. Cadeia produtiva de oleaginosas e biodiesel, estatísticas. Disponível em: <
<http://www.abiove.org.br/site/index.php?page=estatistica&area=NC0yLTE=>>. Acesso em: 11 de Fevereiro de 2015.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10007 – Amostragem de Resíduos: Procedimento. Rio de Janeiro, 2004. 21p.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 7180 – Solo - Análise granulométrica-1984.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 7181: Solo – Análise granulométrica. Rio de Janeiro: ABNT, 1984. 13p.
- AHEARN, D. G.; MEYRES, S. P.; STANDARD, P. G. The role of yeasts in the decomposition of oils in marine environments. *Developments in Industrial Microbiology*, v. 12, p. 126-134, 1971.
- AHN, C.K.; KIM, Y.M.; WOO, S.H.; PARK, J.M. Soil washing using various nonionic surfactants and their recovery by selective adsorption with activated carbon. *Journal of Hazardous Materials*. v. 154, p. 153-160, 2008.
- AL-HADHRAMI, M. N.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; FISHER, P. J. Bacterial survival and n-alkane degradation within Omani crude oil and a mousse. *Marine Pollution Bull.*, v. 30, n. 6, p. 403-408, 1995.
- ALEF, K. e NANNIPIERE, P. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. London: Academic Press. 576pp. 1995.
- ALEXANDER, M. *Biodegradation and Bioremediation*. 2a ed., San Diego, U.S.A: Academic Press, 1999, 453 pp.
- ALVES, M. R. F. V. *Reciclagem de borra oleosa: uma contribuição para a gestão sustentável dos resíduos da indústria de petróleo em Sergipe*. Dissertação (Mestrado). Núcleo de Estudos do Semi-árido da Universidade Federal de Sergipe, Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente. São Cristóvão. 2003.
- ANDRADE J. A.; AUGUSTO F.; JARDIM I. C. S. F. *Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados*. *Eclética Química*, Brasil, v. 35, n. 3, p. 17-43, 2010.
- ANDRADE, J. A. *Otimização da reação de Fenton visando aplicações na remediação in situ e ex-situ de águas subterrâneas*. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Campinas: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2005. 212 pp.
- APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20th ed. Washington, 1998.
- APHA- American Public Health Association. *Standard Methods for examination of water and wastewater*. Maryland, USA, 18ª edição, 1992.
- ATLAS, R. M. *Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective*. *Microbiol. Rev.*, v. 45, n. 1, p. 180-208, 1981.
- ATLAS, R. M. *Petroleum Microbiology*. New York: Macmillan Publishing Company, 1984. 632p.

- ATLAS. Applicability of bioremediation to eastern European pollution problems. In: Training workshop of ICS-Unido on "Soil environmental assesment and biorremediation technologies", 1997.
- BALBA, M. T.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, v. 32, p. 155-164, 1998.
- BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. *Bioresource Technology*, v. 51, p. 1-12, 1995.
- BANERJEE, S. K.; ZAPPI, M. E.; TEETER, C.L., GUNNISON, D.; CULLINANE, M. J.; MORGAN, R. T. "Bioremediation of soils contaminated with petroleum hydrocarbons using bioslurry reactors". U.S. Army Corps of Engineers, Washington, DC, 61p., 1995.
- BAPTISTA, S. J. Avaliação do emprego de biossurfactante na biorremediação de solos contaminados com óleo diesel. Tese (Doutorado em Tecnologia dos Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.
- BARRINGTON, S.; CHOINIÈRE, D.; TRIGUI, M.; KNIGHT, W. Effect of carbon source on compost nitrogen and carbon losses. *Bioresource Technology*, v. 83, p. 189–194, 2002.
- BARTHA, R. Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. *Microbial Ecology*. v. 12, p. 155-172, 1986.
- BERGER, T. M. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos totais de petróleo. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Porto Alegre. 2005.
- BERRY, D. F.; FRANCIS, A. J.; BOLLAG, J. M. Microbial degradation of toluene under sulfate-reducing conditions and the influence of iron on the process. *Microbiology Review*, v. 51, p. 43-59, 1987.
- BERTRAND, J. C.; RAMBELOARISOA, E.; RONTANI, J. F.; GIUSTI, G.; MATTEI, G. Microbial degradation of crude oil in sea water in continuous culture. *Biotechnology Letters*, v. 5, p. 567-572, 1983.
- BLACKBURN, J. W.; HARNER, E. J.; ROBBINS, W. K.; PRINCE, R. C.; CLARK, J. R.; ATLAS, R. M.; WILKINSON, J. B. Experimental linkage issues of petroleum site bioremediation. *Biodegradation*, v. 4, p. 207-230, 1993.
- BORDEN, R. C.; GOMEZ, C. A.; BECKER, M. T. Geochemical indicators of intrinsic bioremediation. *Ground Water*, v. 33, n. 2, p. 180-189, 1995.
- BORDEN, R. C. Natural bioremediation of hydrocarbon-contaminated ground water. In: *Handbook of Bioremediation*. CRC Press, Boca Ratón, FL. p. 177-199, 1994.
- BRINKMANN, D.; RÖHRS, J.; SCHÜGERL, K. bioremediation of diesel fuel contaminated soil in a rotating bioreactor. Part I: Influence of oxygen saturation. *Chemical Engineering Technology*, v. 21, p.168-172, 1998.
- CARVALHO, C.C.C.R.; WICK, L.Y.; HEIPIEPER, H.J. Cell wall adaptations of planktonic and biofilm *Rhodococcus ery-thropolis* cells to growth on C5 to C16 n-alkane hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Alemanha, v. 82, p. 311–320, 2009.

- CERQUEIRA, V.S. Biorremediação de borra oleosa proveniente de indústria petroquímica. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 196 pp., 2011.
- CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Sistema de Licenciamento de Postos – IV Procedimento para Identificação de Passivos Ambientais em Estabelecimentos com Sistema de Armazenamento Subterrâneo de Combustíveis (SASC). Código: S701V01. Data: 02/02/2007.
- CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Decisão de Diretoria Nº 195 – 2005 de 23 de Novembro de 2005.
- CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL Norma Técnica L 6.350 - Solos – Determinação da Biodegradação de Resíduos – Método Respirométrico de Bartha. São Paulo. 9 pp., 1990.
- CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Manual de gerenciamento de áreas contaminadas. Relatório técnico, 2003.
- CHO, B.; CHINO, H.; TSUJI, H.; KUNITO, T.; NAGAOKA, K.; OTSUKA, S.; YAMASHITA, K.; MATSUMOTO, S.; OYAIZU, H. Laboratory-scale bioremediation of oil- contaminated soil of Kuwait with soil amendment materials. *Chemosphere*, v. 35, n. 7, p. 1599-1611, 1997.
- CHOI, S.; LEE, Y.; OH, Y. Treatability tests for the bioremediation of unsanitary landfill waste soils. *The Journal of Microbiology*, v. 41, n. 2, p. 169-173, 2003.
- CHYZANOWSKI, L.; LAWNICZAK, L.; CZACZYK, K. Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Holanda, v. 28, p. 401–419, 2012.
- CNI - CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA. O Mercado de Biodiesel no Brasil. Relatório Conselho Permanente de Infraestrutura – Coinfra, Fev. 2007.
- CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 420, de 28 de dezembro de 2009. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/index.cfm>>. Acesso em: 16 de Dezembro de 2014.
- COOKSON, J. T. Jr. Bioremediation engineering: design and application. New York: McGraw-Hill Inc., 1995. 524 pp.
- CORDAZZO, J. Modelagem e simulação numérica do derramamento de gasolina acrescida de álcool em águas subterrâneas. Dissertação (mestrado) – Departamento de Engenharia Mecânica, UFSC – Florianópolis, SC, 2000.
- CORRÊA, S. M.; ARBILLA, G. Aromatic hydrocarbons emissions in diesel and biodiesel exhaust. *Atmosphere Environmental*, v. 40, p. 6821-6826, 2006.
- CORSEUIL, H. X. Limitações da Biomassa Autóctone na Degradação de Compostos Tóxicos em Subsolos. *Revista Bio*, v. 3, n. 2, p. 46-56, 1994.
- CORSEUIL, H. X.; ALVAREZ, P. J. J. Natural bioremediation perspective for BTX- contaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol. *Wat. Sci. Tech.*, v. 34, p. 311-318, 1996.
- COUTINHO, R. C. P. & GOMES, C. C. Técnicas para biorremediação de aquíferos contaminados por vazamentos de derivados de petróleo em postos de combustíveis. XVII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos. 2006.

- CRAVO Jr., W. B. Biodegradação de querosene de aviação por culturas mistas e por *Pseudomonas aeruginosa*. Orientador: Francisca Pessoa de França. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 1998. 68pp. Dissertação.(Mestrado em ciências).
- DAVIS, J. G.; WILSON, C. R. Choosing a soil amendment. Gardening Series, n. 7.235, Colorado State University, Cooperative Extension 6/00, 2000.
- DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Conversion and Management*, Reino Unido, v. 50, p. 14-34, 2009.
- DEMIRBAS, A. Biodiesel: a realistic fuel alternative for diesel engines, Springer-Verlag London Limited, Espanha, 208 pp., 2008. ISBN 978-1-84628-995-8. e-ISBN 978-1-84628-995-8. DOI 10.1007/978-1-84628-995-8.
- DENNIS, R.M.; DWORKING, D.; LOWE, W.L.; ZUKPO, A.J. Evaluation of commercially available soil-washing processes for site remediation. *Journal of Hazardous Industrial Wastes*, v. 24, p. 515-525, 1992.
- DESCHÊNES, L.; LAFRANCE, P.; VILLENEUVE, J. P.; SAMSOM, R. Adding sodium dodecyl sulfate and *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactant inhibits polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in a weathered creosote contaminated soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 46, n 5-6, p. 638-646, 1996.
- ELEKTOROWICZ, M. Bioremediation of petroleum-contaminated clayey soil with pretreatment. *Environmental Technology*, v. 15, p. 373-380, 1993.
- EMBRAPA, Acordo de mapeamento de solos- Empresa de pesquisa agropecuária de Minas Gerais- Departamento de Recursos Naturais Renováveis. In: Comitê de Publicações do Serviço Nacional de Levantamento e Conservação do Solo, Boletim de pesquisa no1, Rio de Janeiro, 1990, 526p.
- FENG D.; LORENZEN L.; ALDRICH C.; MARÉ P.W. Ex situ diesel contaminated soil washing with mechanical methods. *Minerals Engineering*, v. 14, n. 9, p. 1093-1100, 2001.
- FEPAM. Fundação Estadual de Proteção Ambiental. Disponível em: <<http://www.fepam.rs.gov.br>>. Acesso em: 16 de Dezembro de 2014.
- FERRARI, M. D. Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y su aplicación en la biorremediación de suelos y lodos contaminados. *Review Argentina Microbiology*, v. 28, p. 83-98, 1996.
- GAYLARDE, C. C.; BELLINASO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação: Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, <www.biotecnologia.com.br/revista/bio34/biorremediacao_34.pdf> n. 34, p. 36-43, 2005. Acesso em 15 de Dezembro de 2014.
- GERIS, R.; SANTOS, N.A.C.; AMARAL, B.A.; MAIA, I. S.; CASTRO, V. D.; CARVALHO, J.R.M. Biodiesel de soja: reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. *Química Nova*, Brasil, v. 30, n. 5, p. 1369-1373, 2007.
- GIBOTTI, M., J. Subsídios geológico-geotécnicos para a implantação de tanques de armazenagem subterrânea de combustíveis: estudo de caso em um solo da Formação Rio Claro. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Unesp – Rio Claro, 1999.
- GRADY, C. P. L. Biodegradation: its measurement and microbiological basis. *Biotechnological Bioengineering*, v. 27, p. 660-674, 1985.

- GRAY, M. R.; BANERJEE, D. K.; FEDORAK, P. M.; HASHIMOTO, A.; MASLIYAH, J. H.; PICKARD, M. A. Biological Remediation of Anthracene-contaminated Soil in Rotating Bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 40, p. 933-940, 1994.
- GRBIC-GALIC, D.; VOGEL, T. M. Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 53, p. 254-260, 1987.
- GRIFFITHS, R.A. Soil-washing technology and practice. *Journal of Hazardous Materials*, v. 40, n. 2, p. 175, 1995.
- GUIMARÃES, A. K. V. Extração do óleo e caracterização dos resíduos da borra de petróleo para fins de reúso. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação na Engenharia Química. 2007. 154 f.
- JACQUES, R. J. S.; SILVA, K. J.; BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. *Ciência Rural, Brasil*, v. 40, p. 310-317, 2010.
- JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. In: *Ciência Rural, Brasil*, v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007.
- JOHNSEN, A.R.; WICK L.Y.; HARMS H. Principles of microbial PAH degradation in soil. *Environmental Pollution*, Oxford, v. 133, n. 1, p. 71- 84, 2005.
- JORGENSEN, K. S. In situ bioremediation. *Advances in Applied Microbiology*, Reino Unido, v. 61, p. 285–305, 2007.
- JORGENSEN, K. S.; PUUSTINEN, J.; SUORTTI, A. M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental Pollution*, v. 107, p. 245-254, 2000.
- KADRI, M. H., SALEM, A. A., SALMA, M. Oil degrading bacteria in Kuwait Bay. *Journal of Marine Science*, v. 15, p. 50-51, 1986.
- KALALI, A.; EBADI, T.; RABBANI, A.; MOGHADDAM, S. S. Response surface methodology approach to the optimization of oil hydrocarbon polluted soil remediation using enhanced soil washing. *Environmental Science & Technology*. v. 8, p. 389–400, 2011.
- KATAOKA, A. P. A. G. Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de “landfarming”. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 2001.
- KNOTHE, G. Biodiesel and renewable diesel: a comparison. *Progress in Energy and Combustion Science*, Reino Unido, v. 36, p. 364–373, 2010.
- KOMAGATA, K.; NAKASE, T.; KATSUYA, N. Assimilation of hydrocarbons by yeasts – I Preliminary screening. *Journal of General and Applied Microbiology*, v. 10, p. 313-321, 1964.
- KRÜGER, M.; HARRISON, A. B.; BETTS, W. B. Treatment of hydrocarbon contaminated soil using a rotating-drum bioreactor. *Microbios*, v. 83, p. 243-247, 1995.
- LAPINSKIENE, A., MARTINKUS, P., REBZDAITE, V. Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil. *Environmental Pollution*, v. 142, p. 432 – 437, 2006.

- LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environmental. *Microbiological Reviews*, v. 54, n. 3, p. 305-315, 1990.
- LEAVITT, M.; BROWN, K. L. Biostimulation versus bioaugmentation – three case studies. *Hydrocarbon bioremediation*. Lewis Publishers. Boca Raton, FL. 72pp., 1994.
- LEBLANC, L.; FITZGERALD, A. Striking Successes in spill cleanup, but obstacles remain. *Off Shore*, v. 50, n. 9, p. 26-30, 1990.
- LEE, S. -H.; OH, B., -II; KIM, J. -G. Effect of various amendments on heavy mineral oil bioremediation and soil microbial activity. *Bioresource Technology*, doi:10.1016/j.biortech.2007.04.039, 2007.
- LEITE, R.C.C & LEAL, M.R.L.V. O biocombustível no Brasil. *Novos Estudos - CEBRAP*, Brasil, v. 78, p. 15-21, 2007.
- LEME, D.M., GRUMMT, T., HEINZE, R., SEHR, A., RENZ, S., REINEL, S., OLIVEIRA, D.P., FERRAZ, E.R.A., MARCHI, M.R.R., MACHADO, M.C., ZOCCOLO, G.J., MARIN-MORALES, M.A. An overview of biodiesel soil pollution: Data based on cytotoxicity and genotoxicity assessments. *Journal of Hazardous Materials*, p. 199-200, 343-349, 2012.
- LEMO, A.L. Tratamento Biológico de Solo Contaminado por Biodiesel Bruto. 2013. 107f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2013.
- LEONARDI, V.; SASEK, V.; PETRUCCIOLI, M.; DÁNNIBALE, A.; ERBANOVA, P.; CAJTHAM, T. Bioavailability modification and fungal biodegradation of PAHs in aged industrial soils. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 60, p. 165-170, 2007.
- LIN, L.; CUNSHAN, Z.; VITTAYAPADUNG, S.; XIANGQIAN, S.; MINGDONG, D. Opportunities and challenges for biodiesel fuel. *Applied Energy*, Reino Unido, v. 88, p. 1020–1031, 2011.
- LIU, Z.; LAHA, S.; LUTHY, R. G. Surfactants solubilization of polycyclic hydrocarbons compounds in soil–water suspension. *Water Science and Technology*, v. 23 p. 357-367, 1991.
- LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Química Nova*, Brasil, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.
- LOVLEY, D. R. Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reduction. *Microbiology Review*, v. 55, p. 259-287, 1991.
- LOVLEY, D. R.; BAEDECKER, M. J.; LONERGAN, D. J.; COZZARELLI, I. M.; PHILLIPS, E. J. P.; SEIGEL, D. I. Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction. *Nature*. v. 339, p. 297-299, 1989.
- LOVLEY, D. R.; LONERGAN, D. J. Anaerobic oxidation of toluene, phenol, and p-cresol by dissimilatory iron-reducin organism, GS-15. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, p. 1858-1864, 1990.
- MADSEN, E.L. Determining in situ biodegradation – Facts and challenges. *Environmental Science & Technology*, USA, v. 25, n. 10, p. 1662-1673, 1991.
- MAGALHÃES, F. C. Blendas sebo/soja para produção de biodiesel: Proposta de um processo batelada homogêneo. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Química, Programa de Pós-graduação em Química Tecnológica e Ambiental. Rio Grande. 2010.

- MAIER, R. M.; SOBERON-CHAVEZ, G. Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potential application. *Applied Microbiology and biotechnology*, v. 54, p. 625-633. 2000.
- MARQUES, E. J. N. Remediação de solo contaminado com hidrocarbonetos derivados de combustíveis utilizando lavagem oxidativa. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. Campinas, SP. 2012.
- MÁRQUEZ-ROCHA, F. J.; OLMOS-SOTOA, J.; ROSANO-HERNÁNDEZ, M. C.; MURIEL-GARCÍA, M. Determination of the hydrocarbon degrading metabolic capabilities of tropical bacterial isolates. *International Biodeterioration & Biodegradation*. v. 55, n. 1, p. 17–23, 2005.
- MASLIYAH, J. H.; AFACAN, A.; WONG, A. K. M. Flow of slightly settling slurries in a horizontal rotary drum. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, v. 70, p. 1083-1089, 1992.
- MEGHARAJ, M.; RAMAKRISHNAN, B.; VENKATESWARLU, K.; SETHUNATHAN, N.; NAIDU, R. Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective. *Environment International*, USA, v. 37, p. 1362–1375, 2011.
- MEYER, D. D. Avaliação da biodegradabilidade de misturas de Diesel e de Biodiesel (B0, B20 e B100) em dois solos com diferentes granulometrias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, 53pp., 2011.
- MEYSAMI, P.; BAHERI, H. Pre-screening of fungi and bulking agents for contaminated soil bioremediation. *Advances in Environmental Research*, v. 7, p. 881-887, 2003.
- MILLIOLI, V. S.; SANTOS, L. C.; RIZZO, A. C. L.; SANTOS, R. L. C.; SORIANO, A. U. Evaluation of optimum concentration of two anionic surfactant in the biodegradation of crude oil contaminated soil. In: CONSOIL, 3-7 outubro, Bordeaux, França, 2005. Proceedings of the 9th International FZK/TNQ Conference on Soil-Water Systems, CD-ROM, 2005.
- MIROSLAV, N.; HORAKOVA, D. Mixture of microorganisms, its use for biodegradation of hydrocarbons, as well as process for its application. Patent Number: US 5575998. 1996.
- MME – MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. Boletim Mensal de Combustíveis Renováveis. 2014. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/>. Acesso em: 18 de Dezembro 2014.
- MOLINA-BARAHONA, L.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; HERNÁNDEZ-VELASCO, M.; VEGA-JARQUÍN, C.; ZAPATA-PÉREZ, O.; MENDOZA-CANTÚ, A.; ALBORES, A. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. *Applied Soil Ecology*, v. 27, p. 165–175, 2004.
- MORAES, M. S. A. Biodiesel de sebo: avaliação de propriedades e testes de consumo em motor a diesel. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de Pós-graduação em Química. Porto Alegre. 2008.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. 2ª ed. Editora UFLA. 729pp. 2006.
- MRAYYAN, B.; BATTIKHI, M. N. Biodegradation of total organic carbons (TOC) in Jordanian petroleum sludge. *Journal of Hazardous Materials*. v. 120, n. 1-3, p. 127–134, 2005.
- MUELLER, J. G.; LANTZ, S. E.; BLATTMANN, B. O.; CHAPMAN, P. J. Benchscale evaluation of alternative biological treatment processes for the remediation of pentachlorophenol and creosote-contaminated materials: slurry-phase bioremediation. *Environmental Science and Technology*, v. 25, p. 1055-1061, 1991.

- MUKRED, A. M.; HAMID, A. A.; HAMZAH, A.; YUSOFF, W. M. W. Development of three bacteria consortium for the bioremediation of crude petroleum-oil in contaminated water. On Line Journal of Biological Sciences, v. 8, n. 4, p. 73-79, 2008.
- NAKAGAWA, L. E.; ANDRÉA, M. M. Efeito de alterações nas características do solo sobre a degradação de hexaclorobenzeno. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 30, p. 575-582, 2006.
- NASCIMENTO, A. R. Avaliação do desempenho do método de determinação de TPH (Total Petroleum Hydrocarbon) em areia por detecção no infravermelho. 2003. 108f. Dissertação (Mestrado em Metrologia para Qualidade Industrial). Centro Técnico Científico, Programa de Pós-graduação em Metrologia para Qualidade Industrial, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. Química Nova, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.
- NOORDMAN, W. H.; WACHER, J. J. J.; BOER, G. L.; JANSSEN, D. B. The enhancement by biosurfactants of hexadecane degrade by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate availability. Journal of Biotechnology, v. 94, p. 195-211, 2002.
- OH, Y. S.; CHOI, W. Y.; LEE, Y. H.; CHOI, S. C.; KIM, S. J. Biological treatment of oil-contaminated sand: comparison of oil degradation based on thin-layer chromatography/flame ionization detector and respirometric analysis. Biotechnology Letter, v. 22, n. 5, p. 595-598, 2000.
- OKERENTUGBA, P. O.; EZERONYE, O. U. Petroleum Degrading Potentials Of Single And Mixed Microbial Cultures Isolated From Rivers And Refinery Effluent In Nigeria. African Journal Of Biotechnology, v. 2, n. 9, p. 288-292, 2003.
- OLIVEIRA, J. B. 2008. Pedologia Aplicada. 3 ed. FEALQ, São Paulo. 592 p.
- PALOMINO-ROMERO, J. A.; LEITE, O. M.; EGUILUZ, K. I. B.; SALAZAR-BANDA G. R.; SILVA, D. P.; CAVALCANTI, E. B. Tratamentos dos efluentes gerados na produção de biodiesel. Química Nova, v. 35, n. 2, p. 367-378, 2012.
- PARIA, S. Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. Advances in Colloid and Interface Science, v. 138, p. 24-58, 2008.
- PASSMAN, F.; DOBRANIC, J. Relative biodegradability of B-100 biodiesel and conventional low sulfur diesel fuels. In: 9th International Conference on Stability, Handling and Use of Liquid Fuels, pp. 18-22, 2005.
- PORTER, M.R. Handbook of surfactants. Blackie Academic & Professional. Second Edition. 324pp. 1994.
- PROVIDENTI, M. A.; LEE, H.E. TREVORS, J. T. Selected Factors Limiting the Microbial Degradation of Recalcitrant Compounds". Journal of industrial Microbiology, v. 12, p. 379-395, 1993.
- RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; KOURKOUTAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. Bioresource Technology, v. 90, p. 159-168, 2003.

- RAIMUNDO, R. S.; MACEDO, R. C.; RIZZO, A. C. L. Tratamento de solo contaminado por petróleo empregando material estruturante. In: 44º Congresso Brasileiro de Química, de 20 a 24 de Setembro de 2004, Fortaleza, Ceará. Anais ..., 2004.
- REUTERS. Governo avalia mistura maior de biodiesel; pode aliviar Petrobras. 2013. (Reportagem de Nestor Rabello e Fabíola Gomes). Disponível em <http://br.reuters.com/article/businessNews>. Acesso em: out. 2014.
- 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. *Bioresource Technology*, v. 67, p. 279-285, 1999.
- RISER-ROBERTS, V. Remediation of petroleum contaminated soil: biological, physical, and chemical process. Lewis Publishers. 542pp., 1998.
- RISER-ROBERTS, E. Bioremediation of petroleum contaminated sites. Boca Raton, FL. CRC Press, 1992.
- RIVALDI, J.D.; SARROUH, B.F.; FIORILO, R.; SILVA, S.S. Glicerol de biodiesel. *Revista Eletrônica: Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 37, p. 44-51, 2007.
- RIZZO, A. C. L. Desenvolvimento de biorreator não convencional para o tratamento de solos contaminados por petróleo. Tese (doutorado) – Rio de Janeiro: UFRJ/ Escola de Química/Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 188 pp., 2008.
- ROJAS-AVELIZAPA, N. G.; ROLDAÍN-CARRILO, T.; ZEGARRA-MARTYNEZ, H.; MUNOZ-COLUNGA, A. M.; FERNANDEZ-LINARES, L. C. A field trial for an ex-situ bioremediation of a drilling mud-polluted site. *Chemosphere*, v. 66, p. 1595-1600, 2007.
- ROJAS-AVELIZAPA, N.G.; RODRIGUEZ-VALQUEZ, R.; SAVAL- BOHORQUEZ, S.; ALVAREZ, P.J.J. Effect of C/N/P ratio and non-ionic surfactant on polychlorinated biphenyl biodegradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. v. 16, n. 4, pp. 319- 324, 2000.
- ROSENBERG, E. Exploiting microbial growth on hydrocarbon: new markets. *Trends biotechnology*, v. 11, p. 419-424, 1993.
- RUDD, L. E.; PERRY, J. J.; HOUK, U. S.; WILLIAMS, R. W.; CLAXTON, L. D. Changes in mutagenicity during crude oil degradation by fungi. *Biodegradation*, v. 7, p. 335-343, 1996.
- SÁ, E. M.; VIEIRA, P. A.; CARDOSO, V. L. Estudo da otimização de variáveis de processo na biodegradação de efluente contaminado com hidrocarbonetos. XII Seminário de Iniciação Científica UFU. 2008. Disponível em : <https://ssl4799.websiteseuro.com/swge5/seg/cd2008/PDF/IC2008-0340.PDF>. Acesso em : 04 de Janeiro de 2015.
- SANCHES, L. E. A. Desativação de empreendimentos industriais: um estudo sobre o passivo ambiental. Tese (Livre Docência) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 1998.
- SANER, M.; BACHOFEN, R.; SCHNEIDER, K. Simulation of on site vacuum heap aeration and soil surface enlargement by a closed agitated soil bioreactor. *Microbiological Research*, v. 151, p. 29-35, 1996.
- SCHEFFER, F.; SCHACHTSCHABEL, P.; BLUME, H. P.; BRÜMMER, G.; HARTGE, K. H.; SCHWERTMANN, U. *Lehrbuch der Bodenkunde*. 14 ed., Editora Ferdinand Enke, Stuttgart, 1998. ISBN 3-432-84774-2.

- SCHINK, B. Degradation of unsaturated hydrocarbons by methanogenic enrichment cultures. *FEMS Microbiology Letters*, v. 31, p. 69-77, 1985.
- SCRAGG, A. *Environmental Biotechnology*. Ed. Oxford, Nova York, 2a ed., 447 p., 2005.
- SEABRA, P. N. Capítulo 24: Biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. In: *Microbiologia Ambiental*, 2a ed. rev. ampl. – Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 547-570, 2008.
- SHAMSHOUM, S. M.; ZIARA, T. S.; ABDUL-RITHA, A. N.; YACCOUB, A. E. Distribution of oil bacteria in the north-west Arabian Gulf. *Marine Pollution Bull.*, v. 21, p. 38-40, 1990.
- SHENKER, M. Scottish Scientists Export Remediation Tech. *Renew Canada Blog*. Posted on March 22, 2010. Disponível em: <<http://renewcanada.net/2010/scottish-scientists-export-remediation-tech/>>. Acesso em: 20 de Dezembro de 2014.
- SHUCHRDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, M. Transesterification of vegetable oils: a review. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 9, p. 199-210, 1998.
- SILVA, A.; DELERUE-MATOS, C.; FIÚZA, A. Use solvent extraction to remediation soils contaminated with hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials*, v. 124, p. 224-229, 2005.
- SILVA, E. P. Avaliação Preliminar do Potencial de Aplicação da Tecnologia de Biopilhas para a Biorremediação do Solo de Guamaré-RN. Dissertação de Mestrado, UFRN, 2004.
- SILVA, M. J.; SOUZA, S. N. M.; SOUZA A. A.; MARTINS, G. I.; SECCO, D. Motor gerador ciclo diesel sob cinco proporções de biodiesel com óleo diesel. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.16, n.3, p.320-326, 2012.
- SMITH, G.D.J.; FELL, R.; PHILLIPS, T.; GERRARD, C. Washing technology for the descontamination of soil and sediment. *Geotechnical Management of Waste and Contamination: Proceedings of the Conference*, Sydney, p. 455-462, 1993.
- SMOLENSKI, W. J.; SUFLITA, J. M. Biodegradation of cresol isomers in anoxic aquifers. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, p. 710-716, 1987.
- SONG, H. G.; WANG, X.; BARTHA, R. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, p. 652-656, 1990.
- SORKHOH, N. A.; GHANNOUM, M. A.; IBRAIM, A. S.; STRETTON, R. J.; RADWAN, S. S. Crude oil and hydrocarbon-degrading strains of *Rhodococcus rhodochous* isolated from soil and marine environment in Kuwait. *Environmental Pollution*, v. 65, p. 1-17, 1990.
- SOUZA, C. S.; MIRANDA, R. C. M.; SENA, K. X. F. R.; ARAÚJO, J. M.; CHIAPPETA, A.; SOUSA, M. F. V. Q. Isolamento e seleção de microrganismos degradadores de derivados de petróleo. In: 3º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás. Salvador-BA-Brazil, 2005.
- SPILBORGH, M. C. F. Biorremediação de aquífero contaminado com hidrocarboneto. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, 1997.
- STRAUBE, W. L.; NESTLER, C. C.; HANSEN, L. D.; RINGLEBERG, D.; PRITCHARD, P. H.; JONES-MEEHAN, J. Remediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) through landfarming with biostimulations and bioaugmentation. *Acta Biotechnological*, v. 23, n. 2-3, p. 179-196, 2003.

- STROO, H. F.; SMITH, J. R.; TORPY, M. F.; COOVER, M. V.; KABRICK, R. M. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated solids using liquid/solids contact reactors. *Bioremediation*, p. 332-337, 1997.
- SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S.M.P.; MENEGHETTI, M.R. e WOLF, C.R. Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. *Química Nova*, Brasil, v. 30, p. 667-676, 2007.
- TRINDADE, P. V. O.; SOBRAL, L. G.; RIZZO, A. C. L.; LEITE, S. G. F.; LEMOS, J. L. S. Evaluation of biostimulation and bioaugmentation techniques in the bioremediation process of petroleum hydrocarbons contaminated soil. In: 9th INTERNATIONAL PETROLEUM ENVIRONMENTAL CONFERENCE, New Mexico, USA, 2002.
- TRUAX, D. D.; BRITTO, R. E SHERRARD, J. H. Bench-scale studies of reactor-based treatment of fuel-contaminated soils. *Waste Management*, v. 15, n. 5/6, p. 351-357, 1995.
- TYAGI, M.; FONSECA, M. M. R.; CARVALHO, C. C. C. R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation process. *Biodegradation*, Holanda, v. 22, p. 231-241, 2011.
- U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – (USEPA). Best Management Practices (BMPs) for Soils Treatment Technologies, Suggested Operational Guidelines to Prevent Cross - Media Transfer of Contaminants During Cleanup Activities. Disponível em: http://www.epa.gov/wastes/hazard/correctiveaction/resources/guidance/rem_eval/bmpfin.pdf, 1997. Acesso em 15 de Dezembro de 2014.
- U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – (USEPA). Innovative technology verification report. Fiel measurement technologies for TPH in soil. Horiba instruments incorporated – OCMA-350 oil content analyzer. EPA/600/R- 01/089. Washington D.C., 2001
- UHMANN A.; ASPRAY T. J. Potential benefit of surfactants in a hydrocarbon contaminated soil washing process: Fluorescence spectroscopy based assessment. *Journal of Hazardous Materials*, v. 219–220 p. 141–147, 2012.
- URUM K.; PEKDEMIR T.; ROSS D.; GRIGSON S. Crude oil contaminated soil washing in air sparging assisted stirred tank reactor using biosurfactantes. *Chemosphere*, v. 60, p. 334–343, 2005.
- URURAHY, A. F. P. Biodegradação de resíduos oleosos proveniente de refinaria de Petróleo. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 127pp., 1998.
- VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, USA, v. 67, n. 4, p. 503–549, 2003.
- VASUDEVAN, N.; RAJARAM, P. Bioremediation of oil sludge contaminated soil. *Environmental International*, v. 26, p. 409-411, 2001.
- VENKATESWARAM, K.; HARAYAMA, S. Sequential enrichment of microbial populations exhibiting enhanced biodegradation of crude oil. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 41, p. 767-775, 1995.
- VIEIRA, P. A.; VIEIRA, R. B.; DE FRANÇA, F. P.; CARDOSO, V. L. Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. *Journal of Hazardous Materials*, v. 140, n.1-2, p. 52-59, 2007.

- VIEIRA, P. A.; VIEIRA, R. B.; RIBEIRO E. J.; CARDOSO V. L. The sedimentation of mixed cultures used in the treatment of effluents generated from terrestrial fuel distribution terminals, *Journal of Hazardous Materials*, v. 184, n.1-3, p. 177-183, 2010.
- VIEIRA, R. B. Estudo da coagulação de cultura mista utilizada na biodegradação de efluente de terminais de combustíveis. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2009.
- VOLKERING, F.; BREURE, A. M.; RULKENS, W. H. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation*. v. 8, p. 401-417, 1998.
- WATWOOD, M. E.; WHITE, C. S.; DAHN, C. N. Methodological modifications for accurate and efficient determination of contaminant biodegradation in unsaturated calcareous soils. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, p.717-720, 1991.
- WOO, S. H.; PARK, J. M. Evaluation of drum bioreactor performance used for decontamination of soil polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 74, p. 937-944, 1999.
- YOUNG, L. Y. Anaerobic degradation of aromatic compounds. In Gibson DT, editor, *Microbial degradation of organic compounds*. Marcel Dekker Inc., New York, NY, p. 487-523, 1984.
- ZANETTI, M. Dissertação (Mestrado). Produção de biodiesel a partir da gordura abdominal de frangos. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-graduação em Engenharia. Florianópolis. 2012.
- ZEHNDER, A. J. B. Ecology of methane formation. In: *Water Pollution Microbiology*, v. 2, Mitchell, R. (ed.). Wiley Interscience, New York. p. 349-376, 1978.
- ZHANG, Z.; GAI, L.; HOU, Z.; YANG, C.; MA, C.; WANG, Z.; SUN, B.; HE, X.; TANG, H.; XU, P. Characterization and biotechnological potential of petroleum degrading bacteria isolated from oil contaminated soils. *Bioresource Technology*, Holanda, v. 101, p. 8452–8456, 2010.
- ZHENG, Z.; OBBARD, J. P. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Removal from Soil by Surfactant Solubilization and *Phanerochaete chrysosporium* Oxidation. *Journal of Environmental Quality*, v. 31, p. 1842-1847, 2002.
- ZHU, L.; LU, L.; ZHANG, D. Mitigation and remediation technologies for organic contaminated soils. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China*, v. 4, n. 4, p. 373–386, 2010.
- ZOBELL, C. E. Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriological Reviews*, v. 10, p. 1-49, 1946.

ANEXO I

Quantificação de Biodiesel por TPH (Total Hydrocarbon Petroleum)

Preparação da Amostra

- Para a confecção da amostra foram utilizados os métodos EPA 418.1/413.2, além do EPA 1664 Hexane Method modificados.
- Pesou-se 2 g de solo em balança semi-analítica;
- Pipetou-se 10 mL de hexano que foi acrescentado ao béquer contendo a amostra de solo na qual seria extraída a fase contendo biodiesel;
- Agitou-se a amostra com hexano durante 15 minutos em agitador magnético e após este tempo deixou-se a amostra descansar para a separação das fases;
- Usando uma pipeta volumétrica (100 µL), retirou-se esta alíquota do sobrenadante que foi levada até a cubeta;
- Evaporou-se o hexano;
- Colocou-se a cubeta no equipamento para fazer a leitura da absorbância;

Equipamento

Total Hydrocarbon Analyzer Buck HC – 404;

Este equipamento realiza análises de hidrocarbonetos - óleos e graxas totais, em amostras de água, solos, lamas e lodos completos. Atende aos métodos EPA 413.2/418.1, utilizando solventes alternativos como: carbono, cloro de etileno e hexano. Utiliza um comprimento de onda fixo à 2925 cm^{-1} (3,42 micron) com uma banda passante de 30 cm^{-1} (0,04 micron), fazendo leitura em transmitância, concentração e absorbância.

Análise de Nitrogênio Total – Método de Kjeldahl

Instrumentação

- Balança semianalítica;
- Bureta;
- Bloco digestor com controlador de temperatura;
- Capela de exaustão;
- Destilador de Nitrogênio Kjeldahl;

- Reagentes / Soluções
- Ácido bórico (H_3BO_3) 2% m/v contendo mistura de indicadores 1% v/v;
- Ácido clorídrico (HCl) 0,01 mol L⁻¹;
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) P.A.;
- Água deionizada;
- Catalisador: sulfato de potássio (K_2SO_4) + sulfato de cobre pentaidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 10:1 em massa;
- Hidróxido de sódio (NaOH) 50% m/v;
- Mistura de indicadores (verde de bromocresol 0,1%, hidróxido de sódio 0,12% e vermelho de metila 0,05%).

Procedimento analítico

- Preparou-se todos os reagentes e soluções necessários para a análise;
- Pesou-se 350 mg da amostra de solos para tubo de digestão de 250 mL;
- Faz-se teste em branco (todas as soluções, exceto a amostra) e amostra - controle com teor de nitrogênio total certificado;
- Ligou-se bloco digestor em temperatura de 350°C;
- Adicionou-se aproximadamente 1,0 g de catalisador e 15 mL de ácido sulfúrico e agitou-se para melhor contato do ácido com a amostra;
- Levou-se as amostras ao bloco digestor e deixou-se digerir por aproximadamente 1 hora a 350°C - (o final da digestão é indicado pelo aparecimento da cor verde - azulada (algumas amostras apresentam coloração amarelada) ou intensa formação de vapores brancos);
- Após digestão, esfriou-se e transferiu-se com água deionizada, utilizando uma pisseta e o bastão de vidro, para volume final de 100 mL;
- Homogeneizou-se. Aguardou-se a decantação;
- Tomou-se uma alíquota de 25 mL e transferiu-se para o tubo de digestão 250 mL;
- Pipetou-se 10 mL de ácido bórico 2% m/v contendo mistura de indicadores 1% v/v para o béquer de 100 mL ou erlenmeyer de 125 mL;
- Acoplou-se o béquer e/ou o erlenmeyer na saída do destilador para receber o destilado;

xii) Acoplou-se o tubo de digestão 250 mL no destilador;

xiii) Adicionou-se 30 mL de hidróxido de sódio 50% m/v no recipiente apropriado do destilador, procedeu-se ao escoamento vagarosamente;

xiv) Destilou-se aproximadamente 60 mL;

xv) Procedeu-se à titulação com ácido clorídrico 0,01 mol L⁻¹ e anotou-se o volume.

A viragem foi de verde-claro para vinho-claro.

Figura 1 – Ponto de viragem da análise de nitrogênio total conforme método de Kjeldahl.

Para os cálculos das concentrações de nitrogênio total foi utilizada a fórmula a seguir:

$$\% N = \frac{(V_{Am} - V_{Br}) * C * 14,01 * 100\%}{1000 * M}$$

Sendo:

V_{Am} = volume de ácido gasto na titulação da amostra, em mL;

V_{Br} = volume de ácido gasto na titulação da prova em branco, em mL;

C = concentração de ácido clorídrico titulante, em mol L⁻¹;

M = massa de amostra usada, em g.

Análise de Fósforo Disponível

Instrumentação

- Balança semianalítica;
- Espectrofotômetro;
- Mesa agitadora;

Reagentes / Soluções

- Solução extratora (H₂SO₄ 0,025 N e HCl 0,05 N): medir 43 mL de HCl e 6,9 mL de H₂SO₄, ambos concentrados, diluindo em 10 litros com água destilada e homogeneizar bem;
- Solução Concentrada de Molibdato:
- Pesar 0,5 g de subcarbonato de bismuto, passar para balão de 500 mL contendo 100 mL de água destilada, adicionar 69 mL de H₂SO₄ P.A. concentrado para total dissolução do sal de bicarbonato e deixar esfriar;

- Pesar 10 g de molibdato de amônio, passar para Becker contendo 80 mL de água destilada e aquecer levemente até completa dissolução e deixar esfriar;
- Depois de frio, juntar A + B e completar o volume com água destilada;
- Complexo B: pipetar 100 mL de solução concentrada de molibdato, passar para balão de 500 mL e adicionar 1 g de ácido ascórbico recém-pesado, agitar, homogeneizar e completar volume com água destilada;
- Ácido ascórbico;
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) P.A.;
- Ácido clorídrico (HCl) P.A.;
- Água destilada;

Procedimento analítico

- i) Preparar todos os reagentes e soluções necessários para a análise;
- ii) Pesar 5 g da amostra de solo em copo plástico com tampa;
- iii) Adicionar 50 mL de solução extratora (H_2SO_4 0,025 N e HCl 0,05 N);
- iv) Agitar 5 minutos em uma mesa agitadora a 220 rpm;
- v) Deixar em repouso por aproximadamente 16 horas e/ou filtrar a amostra em papel filtro;
- vi) Pipetar 5 mL do extrato em béquer plástico de 50 mL;
- vii) Adicionar 5 mL de solução de Complexo B;
- viii) Deixar em repouso por 45 minutos;
- ix) Fazer leitura em espectrofotômetro a 660 nm;
- x) Através de uma curva de calibração feita previamente, foi quantificada a concentração de fósforo disponível no solo.