



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



**TRATAMENTO BIOLÓGICO DE SOLO  
CONTAMINADO POR BIODIESEL BRUTO**

**Uberlândia - MG**

**2013**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



**TRATAMENTO BIOLÓGICO DE SOLO  
CONTAMINADO POR BIODIESEL BRUTO**

**Diego Andrade Lemos**

**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**

**2013**

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 24 / 07 /2013.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vicelma Luiz Cardoso  
Orientadora (PPG-EQ/UFU)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Angélica Vieira  
(FEQUI/UFU)

---

Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro  
(PPG-EQ/UFU)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosângela Bergamasco  
(PPG-EQ/UEM)

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Eloi e Felicidade, sem os quais não teria chegado até aqui.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus,

Aos meus pais,

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vicelma Luiz Cardoso por toda a orientação e dedicação e a Prof<sup>a</sup>.

Dr<sup>a</sup>. Patrícia Angélica Vieira por toda contribuição e tempo dedicados a este trabalho,

Aos amigos por toda paciência e companheirismo,

Aos funcionários da FEQUI,

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química FEQUI/UFU,

A CAPES pelo apoio financeiro,

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram na realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                                         | 1         |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....                                                                                              | 5         |
| 2.1. SOLOS .....                                                                                                           | 5         |
| 2.2. BIODIESEL E SUA PRODUÇÃO.....                                                                                         | 6         |
| 2.3. BIORREMEDIAÇÃO .....                                                                                                  | 10        |
| 2.3.1. Aspectos teóricos.....                                                                                              | 10        |
| 2.3.2. Técnicas de biorremediação e tratamento de áreas contaminadas .....                                                 | 15        |
| 2.3.3. Biorreator.....                                                                                                     | 18        |
| 2.3.4. Parâmetros da biorremediação .....                                                                                  | 20        |
| 2.3.5. Legislação Vigente .....                                                                                            | 22        |
| 2.3.6. Estado da Arte da biorremediação de solos contaminados .....                                                        | 23        |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                | 26        |
| 3.1. SOLO.....                                                                                                             | 27        |
| 3.1.1 – Amostragem .....                                                                                                   | 27        |
| 3.1.2 – Caracterização Físico Química do Solo .....                                                                        | 27        |
| 3.1.2.1 Umidade .....                                                                                                      | 28        |
| 3.1.2.2 Capacidade de Retenção de Água .....                                                                               | 28        |
| 3.1.2.3 pH.....                                                                                                            | 28        |
| 3.1.2.4 Granulometria.....                                                                                                 | 29        |
| 3.1.2.5 Outros Componentes .....                                                                                           | 29        |
| 3.1.2.6 - Caracterização Microbiológica .....                                                                              | 29        |
| 3.2. BIODIESEL BRUTO: BIODIESEL DE PROCESSO .....                                                                          | 29        |
| 3.3. CULTURA MISTA.....                                                                                                    | 30        |
| 3.4. ENSAIOS PRELIMINARES .....                                                                                            | 31        |
| 3.4.1- Adaptação da Cultura Mista ao Biodiesel em Meio Líquido.....                                                        | 31        |
| 3.4.2- Adaptação da Cultura Mista ao Solo.....                                                                             | 32        |
| 3.5. EXPERIMENTOS DE BIORREMEDIAÇÃO .....                                                                                  | 33        |
| 3.5.1 Reator Abiótico e Reator de Referência.....                                                                          | 34        |
| 3.5.2 Testes Preliminares.....                                                                                             | 34        |
| 3.5.2.1 – Avaliação da Concentração de Micro-organismos .....                                                              | <b>34</b> |
| 3.5.2.2 – Avaliação da Concentração de Biodiesel Bruto.....                                                                | <b>35</b> |
| 3.5.3 Planejamento Composto Central .....                                                                                  | 36        |
| 3.5.3.1 - 1º Planejamento: Temperatura e Concentração de Biodiesel em Reator Bandeja em Sistema Fechado .....              | <b>36</b> |
| 3.5.3.2 - 2º Planejamento: Temperatura e Concentração de Biodiesel em Reator Rotativo em Sistema Fechado .....             | <b>39</b> |
| 3.5.3.3 - 3º Planejamento: Relação C:N e Relação C:P em Reator Bandeja em Sistema Fechado .....                            | <b>42</b> |
| 3.5.4 Avaliação da remoção de Biodiesel Bruto (BB) com o tempo de processo visando a validação de dados.....               | 44        |
| 3.5.4.1 - 1º Avaliação da Remoção de Biodiesel Bruto (BB): Avaliação da Temperatura Otimizada e Temperatura Ambiente. .... | <b>44</b> |
| 3.5.4.2 - 2º Avaliação da Remoção de Biodiesel Bruto (BB): Avaliação da Relação de Nutrientes Otimizada .....              | <b>45</b> |
| 3.6. ANÁLISES QUANTITATIVAS.....                                                                                           | 47        |
| 3.6.1 Quantificação Microbiológica .....                                                                                   | 47        |

|                                                                                                                |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.6.1.1 Quantificação Celular de Bactérias.....                                                                | <b>48</b> |
| 3.6.2 Quantificação de Biodiesel Bruto.....                                                                    | 48        |
| 3.6.2.1 BB (Biodiesel Bruto) .....                                                                             | <b>48</b> |
| 3.6.2.2 Cromatógrafo – Quantidade e Teor dos Ésteres .....                                                     | <b>48</b> |
| 3.6.3 Nutrientes .....                                                                                         | 49        |
| 3.6.3.1 Análise de Nitrogênio Total – Método de Kjeldahl.....                                                  | <b>49</b> |
| 3.6.3.2 Análise de Fósforo Disponível.....                                                                     | <b>49</b> |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                                | 50        |
| 4.1. SOLO.....                                                                                                 | 50        |
| 4.2. ENSAIOS PRELIMINARES .....                                                                                | 52        |
| 4.2.1- Adaptação da Cultura Mista ao Biodiesel em Meio Líquido.....                                            | 52        |
| 4.2.2- Adaptação da Cultura Mista ao Solo Contaminado .....                                                    | 55        |
| 4.3. EXPERIMENTOS DE BIORREMEDIAÇÃO .....                                                                      | 55        |
| 4.3.1 Perdas Abióticas .....                                                                                   | 56        |
| 4.3.2 Testes Preliminares.....                                                                                 | 56        |
| 4.3.2.1 – Avaliação da Concentração de Micro-organismos .....                                                  | <b>56</b> |
| 4.3.2.2 – Avaliação da Concentração de Biodiesel Bruto em TPH .....                                            | <b>58</b> |
| 4.3.3 Planejamento Composto Central .....                                                                      | 60        |
| 4.3.3.1 - 1º Planejamento: Temperatura e Concentração de Biodiesel em Reator Bandeja em Sistema Fechado .....  | <b>60</b> |
| 4.3.3.2 - 2º Planejamento: Temperatura e Concentração de Biodiesel em Reator Rotativo em Sistema Fechado ..... | <b>65</b> |
| 4.3.3.3 - 3º Planejamento: Relação C:N e Relação C:P em Reator Bandeja em Sistema Fechado .....                | <b>71</b> |
| 4.3.4 Avaliação de Remoção de Biodiesel Bruto.....                                                             | 76        |
| 4.3.4.1 - 1º Avaliação da Remoção de BB em TPH: Avaliação da Temperatura Otimizada e Temperatura Ambiente..... | <b>76</b> |
| 4.3.4.2 - 2º Avaliação da Remoção de BB em TPH: Avaliação da Relação de Nutrientes Otimizada.....              | <b>78</b> |
| 5. CONCLUSÃO .....                                                                                             | 81        |
| 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....                                                                      | 82        |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                             | 83        |
| ANEXO I .....                                                                                                  | 89        |
| Anexo A - Quantificação de Biodiesel Bruto por TPH (Total Hydrocarbon Petroleum) .....                         | <b>89</b> |
| Anexo B - Quantificação de Biodiesel Bruto por cromatógrafo – Quantidade e Teor dos Ésteres .....              | <b>89</b> |
| Anexo C - Análise de Nitrogênio Total – Método de Kjeldahl .....                                               | <b>90</b> |
| Anexo D - Análise de Fósforo Disponível.....                                                                   | <b>92</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1 - COMPOSIÇÃO DO SOLO POR CAMADAS. ....                                                                                                                          | 5  |
| FIGURA 2 - REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL. (ADAPTADO DE MOTA <i>ET AL</i> , 2009).....                                                          | 7  |
| FIGURA 3 - ESQUEMA COMPLETO DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....                                                                                                                | 8  |
| FIGURA 4 – CICLO COMPLETO DA CADEIA DE PRODUÇÃO E CONSUMO DO BIODIESEL.....                                                                                              | 9  |
| FIGURA 5 - ESQUEMA GERAL DAS ETAPAS PARA A IMPLEMENTAÇÃO DE UM PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO (GAYLORDE <i>ET AL.</i> , 2005, MODIFICADO). ....                              | 14 |
| FIGURA 6 – SOLO COLETADO NA FAZENDA DO GLÓRIA. ....                                                                                                                      | 27 |
| FIGURA 7 - LAGOA MOSTRANDO A CANALETA E O BOCAL DE DESCARGA DO EFLUENTE NA MESMA. ....                                                                                   | 30 |
| FIGURA 8 - LOCALIZAÇÃO DAS LAGOAS DE EFLUENTE DA DISTRIBUIDORA DE COMBUSTÍVEL NA FAZENDA RIO DAS PEDRAS, DE ONDE FORAM OBTIDAS AS AMOSTRAS DOS SOLOS. ....               | 31 |
| FIGURA 9 - CULTURA MISTA UTILIZADA NO TRABALHO.....                                                                                                                      | 32 |
| FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS REALIZADAS NO TESTE PRELIMINAR 1. ....                                                                                  | 35 |
| FIGURA 11 - REATORES DO TIPO BANDEJA UTILIZADOS NO DCC 1. ....                                                                                                           | 38 |
| FIGURA 12 - REATORES DO TIPO ROTATIVO UTILIZADOS NO DCC 2.....                                                                                                           | 41 |
| FIGURA 13 - APARATO COMPLETO UTILIZADO NO DCC 2. ....                                                                                                                    | 42 |
| FIGURA 14 - REATORES DO TIPO BANDEJA UTILIZADOS NO DCC 3. ....                                                                                                           | 43 |
| FIGURA 15 – ESTUFA CONFECCIONADA PARA MANTER A TEMPERATURA DOS EXPERIMENTOS CONSTANTE. ....                                                                              | 47 |
| FIGURA 16 - COMPORTAMENTO DA REMOÇÃO COM O AUMENTO GRADUAL DE CONTAMINANTES. ....                                                                                        | 53 |
| FIGURA 17 - CONCENTRAÇÃO CELULAR APÓS 7 DIAS DE PROCESSO NAS VÁRIAS CONCENTRAÇÕES DE MISTURA DE CONTAMINANTES.....                                                       | 54 |
| FIGURA 18 - PERFIL DE CRESCIMENTO CELULAR AO LONGO DOS 111 DIAS DE PROCESSO. ....                                                                                        | 57 |
| FIGURA 19 - PERFIL DE REMOÇÃO DE BB EM TPH AO LONGO DOS 111 DIAS DE PROCESSO.....                                                                                        | 58 |
| FIGURA 20 - DECAIMENTO DE BB EM TPH AO LONGO DOS 42 DIAS DE PROCESSO.....                                                                                                | 59 |
| FIGURA 21 - REMOÇÃO DE BB EM TPH PARA CADA REATOR NAS CONDIÇÕES 20.000, 30.000, 50.000 E 80.000 MG BB EM TPH.KG <sup>-1</sup> DE SOLO NO TEMPO DE 21 E 42 DIAS. ....     | 59 |
| FIGURA 22 - CRESCIMENTO CELULAR PARA CADA REATOR NAS CONDIÇÕES 20.000, 30.000, 50.000 E 80.000 MG BB EM TPH.KG <sup>-1</sup> DE SOLO NO TEMPO INICIAL, 21 E 42 DIAS..... | 60 |
| FIGURA 23 - VALORES PREDITOS POR VALORES EXPERIMENTAIS PARA A REGRESSÃO MÚLTIPLA COM AS VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS DO DCC 1 PARA A RESPOSTA REMOÇÃO DE BB EM TPH. ....     | 63 |
| FIGURA 24 - DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS PARA A REGRESSÃO MÚLTIPLA COM AS VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS DO DCC 1 PARA A RESPOSTA REMOÇÃO DE BB EM TPH. ....                      | 63 |
| FIGURA 25 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A RESPOSTA REMOÇÃO DE BB EM TPH EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO DE BIODIESEL.....                                     | 64 |
| FIGURA 26 - CURVA DE CONTORNO PARA A RESPOSTA REMOÇÃO DE BB EM TPH EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO DE BIODIESEL. ....                                         | 64 |
| FIGURA 27 - VALORES PREDITOS POR VALORES EXPERIMENTAIS PARA A REGRESSÃO MÚLTIPLA COM AS VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS DO DCC 2 PARA A RESPOSTA REMOÇÃO DE BB EM TPH. ....     | 67 |
| FIGURA 28 - DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS PARA A REGRESSÃO MÚLTIPLA COM AS VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS DO DCC 2 PARA A RESPOSTA REMOÇÃO DE BB EM TPH. ....                      | 68 |
| FIGURA 29 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A RESPOSTA REMOÇÃO DE BB EM TPH EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO DE BIODIESEL.....                                     | 69 |

|                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 30 - CURVA DE CONTORNO PARA A RESPOSTA REMOÇÃO DE BB EM TPH EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO DE BIODIESEL. ....                                         | 69 |
| FIGURA 31 – FOTO ILUSTRATIVA DO EXPERIMENTO 9, INICIALMENTE E AO FINAL DO PROCESSO<br>.....                                                                              | 72 |
| FIGURA 32 - VALORES PREDITOS POR VALORES EXPERIMENTAIS PARA A REGRESSÃO MÚLTIPLA COM AS VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS DO DCC 3 PARA A RESPOSTA REMOÇÃO DE BB EM TPH.<br>..... | 74 |
| FIGURA 33 - DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS PARA A REGRESSÃO MÚLTIPLA COM AS VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS DO DCC 3 PARA A RESPOSTA REMOÇÃO DE BB EM TPH. ....                      | 74 |
| FIGURA 34 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A RESPOSTA REMOÇÃO DE BB EM TPH EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO DE BIODIESEL.....                                     | 75 |
| FIGURA 35 - CURVA DE CONTORNO PARA A RESPOSTA REMOÇÃO DE BB EM TPH EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E DA CONCENTRAÇÃO DE BIODIESEL. ....                                         | 75 |
| FIGURA 36 - DECAIMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE BB EM TPH AO LONGO DE 28 DIAS DE PROCESSO. ....                                                                                | 76 |
| FIGURA 37 - REMOÇÃO DE BB EM TPH AO LONGO DE 28 DIAS DE PROCESSO. ....                                                                                                   | 77 |
| FIGURA 38 - CRESCIMENTO CELULAR EM CADA REATOR NAS CONDIÇÕES ESTUDADAS NO TEMPO INICIAL, 14 E 28 DIAS. ....                                                              | 77 |
| FIGURA 39 - DECAIMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE BB EM TPH AO LONGO DE 42 DIAS DE PROCESSO. ....                                                                                | 78 |
| FIGURA 40 - REMOÇÃO DE BB EM TPH AO LONGO DE 42 DIAS DE PROCESSO. ....                                                                                                   | 79 |
| FIGURA 41 - CRESCIMENTO CELULAR EM CADA REATOR NAS CONDIÇÕES 100.000 E 120.000 MG BB EM TPH.KG <sup>-1</sup> DE SOLO NO TEMPO INICIAL, 21 E 42 DIAS .....                | 79 |
| FIGURA 42 – PONTO DE VIRAGEM DA ANÁLISE DE NITROGÊNIO TOTAL CONFORME MÉTODO DE KEJLDAHL. ....                                                                            | 92 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1 - DIÂMETRO DAS PARTÍCULAS DE SOLO EM CADA FRAÇÃO .....                                                                                                                                  | 6  |
| TABELA 2 - VANTAGENS E LIMITAÇÕES DO PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO. ....                                                                                                                            | 11 |
| TABELA 3 - VANTAGENS E LIMITAÇÕES DE UM BIORREATOR. ....                                                                                                                                         | 20 |
| TABELA 4 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 01. ....                                                                                                                                          | 38 |
| TABELA 5 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 02. ....                                                                                                                                          | 40 |
| TABELA 6 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 03. ....                                                                                                                                          | 43 |
| TABELA 7 - CONDIÇÕES DOS EXPERIMENTOS DA AVALIAÇÃO 1. ....                                                                                                                                       | 44 |
| TABELA 8 - CONDIÇÕES DOS EXPERIMENTOS DA AVALIAÇÃO 2. ....                                                                                                                                       | 46 |
| TABELA 9 - CARACTERIZAÇÃO DO SOLO. ....                                                                                                                                                          | 51 |
| TABELA 10 - PORCENTAGEM DE REMOÇÃO DE DQO E COT PARA A CULTURA MISTA C1 EM<br>FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CONTAMINANTES (BIODIESEL BRUTO). ....                                                    | 54 |
| TABELA 11- ACOMPANHAMENTO DA ADAPTAÇÃO DA CULTURA EM SOLO CONTAMINADO<br>(BIODIESEL E GLICERINA 8,0%v/v), COM UTILIZAÇÃO DE UM POOL DE CULTURA MISTA NA<br>ORDEM DE 10 <sup>9</sup> UFC/mL. .... | 55 |
| TABELA 12 - VARIÁVEIS UTILIZADAS NO DCC 1 E SUA RESPOSTA .....                                                                                                                                   | 61 |
| TABELA 13 - REGRESSÃO MÚLTIPLA PARA REMOÇÃO DE BB EM TPH NO DCC 1. ....                                                                                                                          | 61 |
| TABELA 14 - REGRESSÃO MÚLTIPLA APENAS COM VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS PARA REMOÇÃO DE<br>BB EM TPH NO DCC 1.....                                                                                    | 62 |
| TABELA 15 - VARIÁVEIS UTILIZADAS NO DCC 2 E SUA RESPOSTA. ....                                                                                                                                   | 66 |
| TABELA 16 - REGRESSÃO MÚLTIPLA PARA REMOÇÃO DE BB EM TPH NO DCC 2 .....                                                                                                                          | 66 |
| TABELA 17 - REGRESSÃO MÚLTIPLA APENAS COM VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS PARA REMOÇÃO DE<br>BB EM TPH NO DCC 2.....                                                                                    | 67 |
| TABELA 18 - VARIÁVEIS UTILIZADAS NO DCC 3 E SUA RESPOSTA. ....                                                                                                                                   | 71 |
| TABELA 19 - REGRESSÃO MÚLTIPLA PARA REMOÇÃO DE BB EM TPH NO DCC 3. ....                                                                                                                          | 72 |
| TABELA 20 - REGRESSÃO MÚLTIPLA APENAS COM VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS PARA REMOÇÃO DE<br>BB EM TPH NO DCC 3.....                                                                                    | 73 |

## RESUMO

Durante o processo de exploração, refino, transporte e as operações de armazenamento de combustíveis e/ou de seus derivados podem vir a ocorrer derramamentos acidentais ocasionando a contaminação de solos, rios, atmosfera (Andrade *et al.*, 2010). Uma estratégia para eliminação de combustíveis no solo é a biorremediação, processo que transforma, por meio da atividade biológica, os contaminantes em substâncias inertes. Esse recurso é limitado por alguns fatores como a falta de micro-organismos ou condições ambientais desfavoráveis a eles. Sendo assim, este trabalho propôs o tratamento de solo contaminado por biodiesel bruto (BB) empregando cultura mista advinda de local contaminado por derivados de petróleo. Após adaptação desta cultura ao BB foi proposta a utilização de três tipos de biorreatores: a) biorreator de bandeja aberto, b) biorreator com bandejas em sistema fechado com controle de temperatura, umidade, nutrientes (N e P) c) biorreator rotativo de confecção simples com sistema de agitação eficiente. Nestes biorreatores foram estudadas as seguintes condições: biorreator bandeja e biorreator rotativo com variação de temperatura e concentração de biodiesel bruto, além de biorreator bandeja com variação da relação C:N e C:P. A proposta destes biorreatores teve como principais finalidades aumentar a remoção da carga poluidora (Biodiesel Bruto - BB) e reduzir o tempo de biorremediação. Inicialmente adaptou-se a cultura mista utilizada no trabalho ao meio líquido contendo concentrações crescentes de contaminantes. Na sequência esta mesma cultura foi adaptada ao solo contaminado. Foram também realizados testes preliminares de modo a identificar as melhores condições de trabalho quanto à concentração de inóculo inicial e a quantidade de biodiesel bruto suportado pela cultura mista. Após os testes preliminares foram realizados os Delineamento de Composto Central (DCC) averiguando as faixas das variáveis em estudo para as melhores condições. Finalmente foram realizadas as avaliações, sendo estas, os testes com as melhores condições obtidas no DCC. Ao longo do trabalho obteve-se como resultados, a concentração de 8% v/v de contaminantes como a máxima suportada por esta cultura. Nesta concentração foi obtida uma remoção de Carbono Orgânico Total (COT) de 65% com uma concentração celular final de  $10^{10}$  UFC/mL. A cultura mista quando passada para o solo para adaptação ao meio, apresentou um aumento considerável, chegando ao final dos 56 dias de processo a uma concentração celular da ordem de  $10^{10}$  UFC/ml para bactérias e fungos. Os primeiros testes preliminares realizados apresentaram a opção de 25% de inóculo (m/m) como a melhor por obter uma quantidade desejada de microbiota (na ordem de  $10^{15}$  UFC/mL) e resultados satisfatórios de remoção de contaminantes comparados com os outros testes realizados. A cultura mista suportou a mesma quantidade de contaminantes que havia no meio líquido, quando passada para o solo (80.000 mg BB em TPH.kg<sup>-1</sup> de solo). Nos Planejamentos Experimentais, cada um apresentou características específicas, onde as quantidade de remoção de BB variaram de 33,9 a 100%, 19 a 100% e 25 a 100%, nos DCC1, DCC2 e DCC3, respectivamente. Durante as avaliações, os micro-organismos apresentavam uma boa capacidade de remoção, mostrando-se bem adaptados e eficientes, provavelmente devido a estes micro-organismos já estarem adaptados ao solo, pois no caso das concentrações de 50.000 e 70.000 mg BB em TPH. kg<sup>-1</sup> de solo, o tempo de biorremediação foi de 21 dias, (tempo inferior aos apresentados nos planejamentos experimentais) enquanto nas concentrações de 100.000 e 120.000 mg BB em TPH. kg<sup>-1</sup> de solo foi de 42 dias (valores estes de concentração de biodiesel superiores ao utilizados nos planejamentos experimentais).

Palavras-Chave: biorremediação, solo contaminado, biodiesel.

## ABSTRACT

During the exploration, refining, transportation and storage operations of fuel and / or its derivatives may occur accidental spills causing contamination of soils, rivers, atmosphere (Andrade *et al.*, 2010). A strategy for the elimination of fuel in the soil is the bioremediation. Its a process that transforms from the biological activity, contaminants in inert substances. This feature is limited by factors such as lack of micro-organisms or environmental conditions unfavorable to them. The aim of this study proposed the treatment of soil contaminated by crude biodiesel (CB) using mixed culture arising site contaminated by petroleum products. After adaptation of this crop to the CB was proposed to use three types of bioreactors: a) bioreactors tray open, b) bioreactor with trays closed system with controlled environment, as the temperature , moisture, nutrients (N and P) c) rotary reactor simple system with efficient stirring. These bioreactors were studied the following conditions: tray and rotary bioreactor with varying temperature and concentration of crude biodiesel (CD), and bioreactor tray with variation in the C: N and C: P. These bioreactors have as main purpose to increase the removal of the pollutant load (Crude Biodiesel- CB) and reduce the time bioremediation. Initially at the work was adapted a mixed culture into medium containing increasing concentrations of contaminants. In the sequence culture was adapted to contaminated soil. Preliminary tests were also conducted to identify the best working conditions for the concentration of initial inoculum and the amount of crude biodiesel supported by mixed culture. After preliminary tests were performed Delineation of Central Composite (DCC) ascertaining the tracks of study variables in the best conditions. Finally evaluations were carried out, these being tests with the best conditions obtained in the DCC. Throughout the study obtained as a result, the concentration of 8% v / v contaminant was the maximum supported by this culture. At this concentration was obtained by a removal of total organic carbon (TOC) content of 65% with a final cell concentration of  $10^{10}$  CFU / mL. The mixed culture when passed to ground for adapting to the environment, showed a significant increase, reaching the end of the 56 days of the process at a cell concentration of approximately  $10^{10}$  CFU / ml for bacteria and fungi. The first preliminary tests had the option of 25% (w / w) was chosen to obtain a desired amount of microorganisms (in the order of  $10^{15}$  CFU / mL) and satisfactory results from removal of contaminants compared with other tests. The mixculture endured the same amount of contaminants in the liquid medium had when passed to the soil (80,000 mg CB.kg<sup>-1</sup> soil). In the experimental design, each specific features presented, where the amount of removal CB ranged from 33.9 to 100%, 19 to 100% and 25 to 100%, in DCC1, DCC2 and DCC3, respectively. During the assessments, the microorganisms showed a good removal capacity, being well adapted and efficient, probably due to these microorganisms are already adapted. In the case of concentrations of 50,000 and 70,000 mg CB. kg<sup>-1</sup> soil, the bioremediation time was 21 days (less time than shown in the experimental design), while the concentrations of 100,000 and 120,000 mg CB. kg<sup>-1</sup> soil, the time was 42 days (these values of concentration are higher than these biodiesel concentration used in the experimental design).

Keywords: bioremediation, contaminated soil, biodiesel

# 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, várias são as preocupações em relação à poluição do meio ambiente. Poluições do solo, da água e do ar com os mais diferentes compostos (petróleo e seus derivados, pesticidas, SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, CO, partículas finas etc.) são anunciadas constantemente nos meios de comunicação. Uma atenção em especial da comunidade científica tem sido dada aos impactos decorrentes de derrames acidentais de petróleo e seus derivados. Vários são os trabalhos científicos que abordam o tratamento biológico de solos e águas contaminados por hidrocarbonetos (VIEIRA *et al.*, 2009a, 2009b; VIEIRA *et al.*, 2007; BAPTISTA *et al.*, 2003).

A intensiva busca por fontes alternativas de energia e processos sustentáveis visando a redução da poluição ambiental e o aquecimento global do planeta tem estimulado o mercado mundial de combustíveis limpos como o biodiesel. Este representa uma alternativa renovável e ambientalmente segura aos combustíveis fósseis. O aumento da disponibilidade do biodiesel com a determinação governamental brasileira, em vigor desde janeiro de 2010, que condiciona a adição de 5% de biodiesel ao óleo diesel (além da utilização na sua forma pura) possivelmente acarretará derramamentos acidentais no ambiente (solo e água) ocasionando um potencial risco de contaminação.

O biodiesel é um combustível obtido a partir de matérias-primas vegetais ou animais. As matérias-primas vegetais são derivadas de óleos vegetais tais como soja, mamona, colza (canola), palma, girassol e amendoim, entre outros, e as de origem animal são obtidas do sebo bovino, suíno e de aves. Incluem-se entre as alternativas de matérias-primas os óleos utilizados em fritura.

Biodiesel ou ácidos graxos metil esterificados são compostos de baixa complexidade estrutural, contendo predominantemente 8 diferentes ácidos graxos (C16 - 18) metil esterificados, incluindo oleato, palmitato, estearato, linoleato, miristato, laureato e linolenato (VIEIRA *et al.*, 2006 apud NEWMAN, 1993). Os ésteres metilados presentes no biodiesel possuem relativamente alto número de octanas e são considerados uma alternativa biodegradável aos compostos oxigenados recalcitrantes da gasolina (VIEIRA *et al.*, 2006 apud LIU e SULFITA, 1994).

Na produção do biodiesel, outro potencial contaminante que é gerado como subproduto em seu processamento é o glicerol bruto (glicerina). Apesar de sua ampla aplicação em diversas áreas da indústria (bebidas, alimentos, farmacêutica, têxtil etc.) reduzir os futuros problemas

ambientais por acumulação de glicerol e tornar a produção de biodiesel mais rentável é uma preocupação constante (RIVALDI *et al.*, 2007).

O glicerol é o principal subproduto gerado na produção de biodiesel, sendo que aproximadamente 10 % do volume total de biodiesel produzido correspondem a glicerol (RIVALDI *et al.*, 2007 apud DASARI *et al.*, 2005).

O glicerol obtido resultante da transesterificação de triglicerídeos com álcool apresenta impurezas como água, sais, ésteres, álcool e óleo residual, que lhe conferem um baixo custo e compromete a sua aplicação (OOI *et al.*, 2004).

Os processos para sua purificação incluem filtração, destilação a vácuo, descoloração e troca de íons para a remoção principalmente de  $K^+$  e  $Na^+$  utilizados como catalisadores (YONG *et al.*, 2011). No entanto, os tratamentos de purificação são de custo excessivamente elevados para pequenos e médios produtores nacionais de biodiesel. Devido a este fato, uma maior quantidade de efluentes contendo glicerol poderá ser descartada no meio ambiente sem nenhum tratamento, aumentando consequentemente os problemas e riscos ambientais (RIVALDI *et al.*, 2007).

No Brasil, a produção e comercialização de biodiesel possuem importantes vantagens devido à grande disponibilidade de matéria-prima para sua produção e ao crescimento contínuo da indústria de óleos vegetais e de etanol (RIVALDI *et al.*, 2007).

É importante salientar, que estudos científicos têm mostrado a eficiência de determinados micro-organismos, 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 (SOUZA *et al.*, 2005, MÁRQUEZ-ROCHA *et al.*, 2005, OKERENTUGBA E EZERONYE, 2003). Desta forma, pode-se notar que estas culturas também apresentam grande potencial na aplicação à tratamentos de ambientes contaminados por biodiesel bruto.

Para LEBLANC E FITZGERALD (1990), as bactérias executam melhor a degradação de hidrocarbonetos quando se encontram em culturas mistas. O consórcio proporciona ou promove a degradação e até mesmo a mineralização de substâncias compostas de uma grande variedade de hidrocarbonetos, o que segundo ROBINSON *et al.* (1990), não seria possível com a utilização de uma cultura pura.

Em uma cultura mista, o produto metabólico pode ser degradado por outra espécie e o ataque de outros micro-organismos pode levar a uma completa degradação do produto, mesmo

que dentro da comunidade não exista um único micro-organismo capaz de degradá-lo totalmente (KATAOKA, 2001).

Deste modo, estudos realizados com cultura mista possuem vantagens sobre estudos realizados com cultura pura. A primeira e mais importante é que a capacidade biodegradativa de uma comunidade é muito maior quantitativa e qualitativamente. Segundo, a resistência da comunidade às substâncias tóxicas pode ser maior, porque há uma maior probabilidade de que um organismo que possa detoxificá-las esteja presente. Finalmente, o fato de que a mineralização de compostos xenobióticos algumas vezes requer a união da atividade de múltiplas enzimas (GRADY, 1985).

Os investimentos para a produção de biodiesel no Brasil estão crescendo em ritmo acelerado e conseqüentemente têm aumentado as preocupações com as possíveis contaminações de solo e água por resíduos gerados no processo, justificando esse estudo como uma importante contribuição científica para o tratamento desse tipo de ambiente, o solo.

Atualmente, pesquisas e medidas para biorremediação de solos contaminados por compostos provenientes do processamento do biodiesel ainda são escassas. Para que o processo de biorremediação de áreas contaminadas por estes compostos (biodiesel e glicerol) possam ser aplicados com sucesso, um bom planejamento inicial e seleção de uma cultura eficiente na degradação dos poluentes (em solo ou água) devem ser realizados.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo geral promover a biorremediação de solos contaminado por biodiesel bruto (BB) empregando uma cultura mista e três tipos de configuração de reatores: a) biorreatores de bandeja aberto, b) biorreatores com bandejas em sistema fechado com controle de temperatura, umidade, nutrientes (N e P) e c) biorreatores rotativos com a finalidade da escolha da melhor configuração. A escolha destas configurações de biorreatores foram empregados com a finalidade de aumentar a remoção da carga poluidora (BB) e reduzir o tempo de biorremediação.

Os objetivos específicos foram:

- adaptar a cultura mista C1 aos contaminantes em meio líquido;
- adaptar a cultura mista C1 ao solo contaminado com biodiesel bruto;
- realizar testes preliminares de modo a identificar as faixas de trabalho relacionadas à quantidade de inóculo e concentração de biodiesel bruto no 1º planejamento experimental;

- otimizar as variáveis temperatura, concentração de biodiesel (em biorreatores de bandeja e rotativo), relação C:N, relação C:P (em reatores bandeja) através da realização de planejamentos experimentais;
- realizar avaliações utilizando as condições otimizadas nos planejamentos experimentais.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Solos

O solo se divide basicamente em três fases: líquida (água e solução do solo), gasosa (vapor d'água, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> e outros gases) e sólida (partículas de solo e seres vivos). As fases líquida e gasosa são complementares e ocupam os espaços vazios formados entre os sólidos (Prevedello, 1996).

O solo normalmente contém um grande número de diversos micro-organismos incluindo bactérias, algas, fungos, protozoários e actinomicetos. Destes organismos, as bactérias são os mais numerosos e bioquimicamente ativos, particularmente a baixos níveis de oxigênio. As bactérias requerem uma fonte de carbono para o crescimento celular e uma fonte de energia para sustentar as funções metabólicas requeridas para o crescimento. As bactérias também requerem nitrogênio e fósforo para o crescimento celular. A Figura 1 apresenta a classificação da composição do solo por camadas.

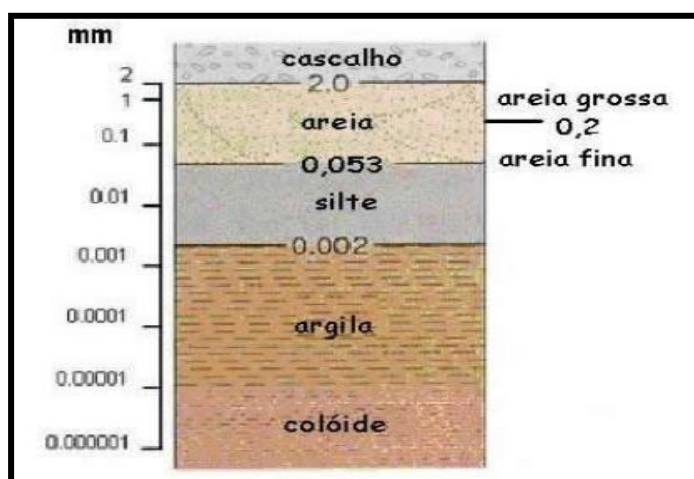


Figura 1 - Composição do solo por camadas.

Os solos são caracterizados por uma alta variação de suas propriedades físicas e químicas, tanto na distribuição horizontal quanto na vertical. LEKTOROWICZ (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. 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 (BERGER, 2005 *apud* SCHEFFER *et al*,

1998). A Tabela 1 mostra a relação do diâmetro das partículas do solo com a sua respectiva classificação.

Tabela 1 - Diâmetro das partículas de solo em cada fração

| Nome da fração | Diâmetros das partículas (mm) |
|----------------|-------------------------------|
| Cascalho       | 20-2                          |
| Areia grossa   | 2-0,2                         |
| Areia fina     | 0,2-0,05                      |
| Silte          | 0,05-0,002                    |
| Argila         | <0,002                        |

## 2.2. Biodiesel e sua produção

Conforme definição contida na Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, o biodiesel é um “biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil”. O biodiesel pode ser usado puro ou misturado ao diesel em diversas proporções. A mistura de 2% de biodiesel ao diesel de petróleo é chamada B2 e, assim sucessivamente, até o biodiesel puro, denominado B100 (CNI, 2007).

Biodiesel ou ácidos graxos metil esterificados são compostos de baixa complexidade estrutural, contendo predominantemente 8 diferentes ácidos graxos (C16 - 18) metil esterificados, incluindo oleato, palmitato, estearato, linoleato, miriato, laureato e linolenato (VIEIRA *et al.*, 2006 *apud* NEWMAN, 1993). Os ésteres metilados presentes no biodiesel possuem relativamente alto número de octanas e são considerados uma alternativa biodegradável aos compostos oxigenados recalcitrantes da gasolina (VIEIRA *et al.*, 2006 *apud* LIU e SULFITA, 1994).

No Brasil, a produção e comercialização de biodiesel possuem importantes vantagens devido à grande disponibilidade de matéria-prima para sua produção e ao crescimento contínuo da indústria de óleos vegetais e de etanol (RIVALDI *et al.*, 2007).

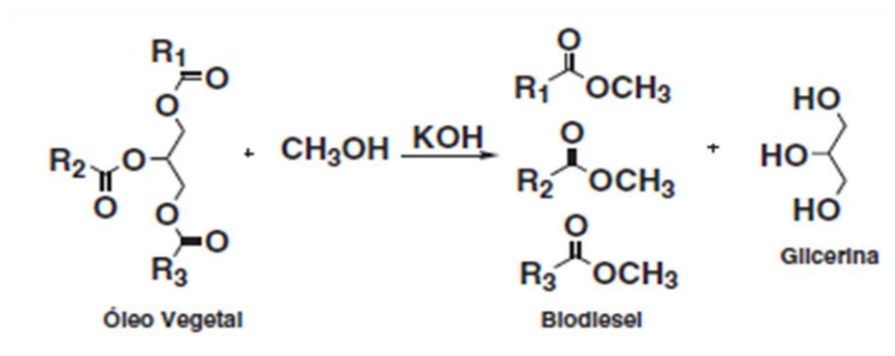
Em 2003, tiveram início os primeiros estudos concretos para a criação de uma política do biodiesel no Brasil e, em dezembro de 2004, o governo lançou o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB). O objetivo, na etapa inicial, foi introduzir o biodiesel na

matriz energética brasileira, com enfoque na inclusão social e no desenvolvimento regional (MME, 2013a).

Desde o lançamento do PNPB, a iniciativa privada vem aportando recursos, realizando investimentos na distribuição do combustível, em laboratórios, em pesquisa e na produção de matérias-primas. A mistura de biodiesel ao diesel fóssil teve início em dezembro de 2004, em caráter autorizativo. Em janeiro de 2008, entrou em vigor a mistura legalmente obrigatória de 2% (B2), em todo o território nacional. Com o perceptível amadurecimento do mercado brasileiro, esse percentual foi ampliado pelo Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) sucessivamente até atingir 5% (B5) em janeiro de 2010, antecipando em três anos a meta estabelecida pela Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005 (MME, 2013a).

Regularmente, o biodiesel é vendido misturado ao diesel de petróleo em mais de 30 mil postos de abastecimento espalhados pelo país. Vários indicadores confirmam o sucesso do PNPB. Com relação à produção desse tipo de biocombustível, saltou de 69 milhões de litros em 2006 para 2,74 bilhões de litros em 2012. Esse resultado credencia o Brasil como um dos maiores mercados mundiais de biodiesel, juntamente com a Alemanha e os Estados Unidos, que produzem e consomem este combustível renovável há muito mais tempo (MME, 2013a).

Na produção do biodiesel, uma variedade de óleos pode ser usada para produzir este biocombustível. Ele é obtido comumente a partir da reação de algum óleo ou gordura, com um álcool (normalmente metanol ou etanol) na presença de um catalisador básico – reação de transesterificação, como pode ser visto na Figura 2. Dentre os óleos que podem ser utilizados, têm-se o óleo de soja como matéria-prima virgem, sendo o mais comumente usado, além do óleo de outras culturas como a mostarda, linho, girassol, palma, coco, etc.



Produção de Biodiesel a partir da transesterificação de óleos vegetais (Adaptado de Mota *et al.* 2009).

Figura 2 - Reação de Transesterificação para Produção de Biodiesel. (Adaptado de Mota *et al.*, 2009)

Além do óleo vegetal, outros tipos de óleos e gorduras podem ser utilizados como matéria-prima na produção do biodiesel. Dentre eles têm-se o óleo vegetal residual, aqueles utilizados em frituras, que se tornaram uma possibilidade de matéria-prima ecologicamente correta. A gordura animal que inclui sebo, banha de porco, graxa amarela, gordura de frango, óleo de peixe que são fontes de gorduras e um subproduto na produção de carne, também podem ser utilizadas no processo de fabricação de biodiesel, conforme se verifica na Figura 3.

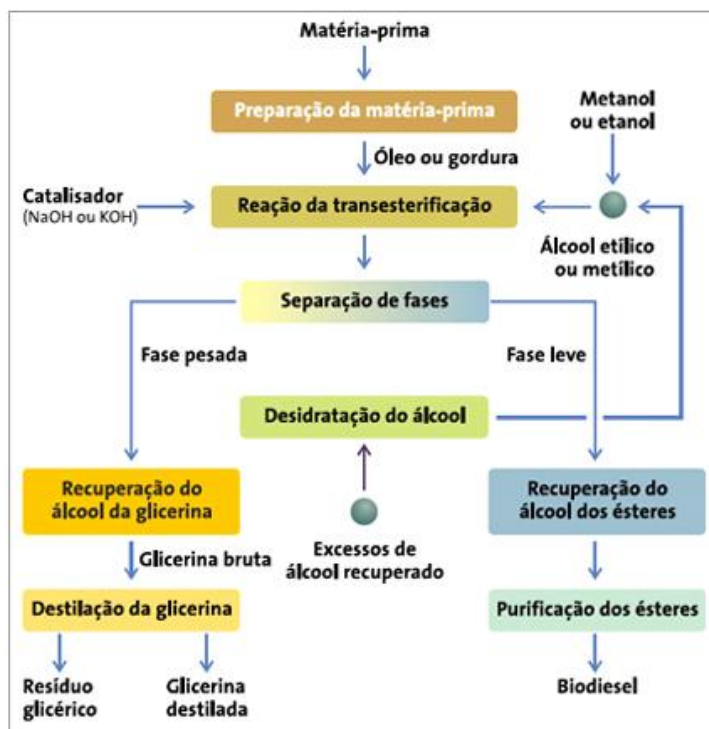


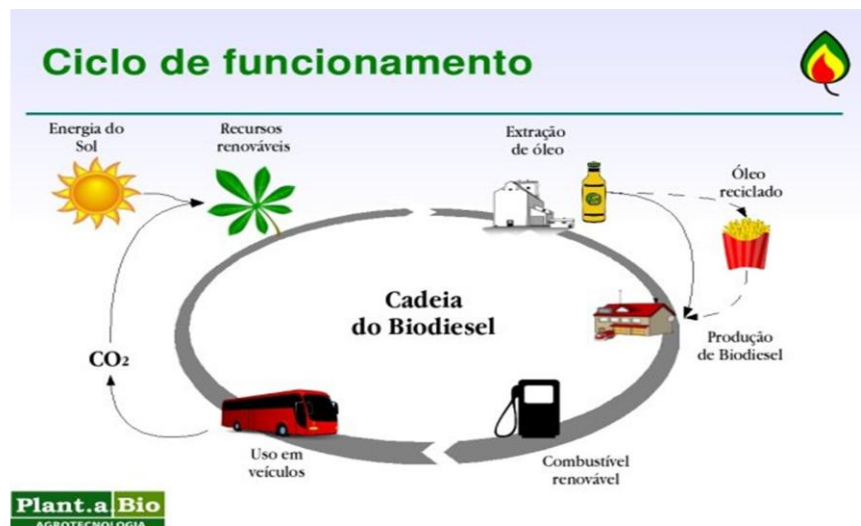
Figura 3 - Esquema Completo da Produção de Biodiesel.

Referência <[www.tnsustentavel.com.br/biodiesel](http://www.tnsustentavel.com.br/biodiesel)>

Ao se falar em biodiesel, que é um biocombustível, logo se remete a perspectiva de reduzir a poluição ambiental que é hoje um objetivo mundial. O uso de combustíveis de origem fóssil tem sido apontado como o principal responsável por isso. A Comunidade Européia, os Estados Unidos, Argentina e diversos outros países vêm estimulando a substituição do petróleo por combustíveis de fontes renováveis, incluindo principalmente o biodiesel, diante de sua expressiva capacidade de redução da emissão de diversos gases causadores do efeito estufa, a exemplo do gás carbônico e SO<sub>2</sub>. Melhorar as condições ambientais, sobretudo nos grandes centros metropolitanos, também significa evitar gastos dos governos e dos cidadãos no combate aos males da poluição (MME, 2013b).

Além das vantagens ambientais, o biodiesel contribui para o aumento de emprego nas propriedades rurais, reduzindo os fluxos migratórios campo-cidade (êxodo rural); é uma fonte

renovável, podendo ser obtido de uma série de plantas oleaginosas; reduz a dependência de fontes energéticas de origem fóssil; e é um excelente lubrificante. Na Figura 4 pode-se observar o ciclo de produção do biodiesel.



Referência: <http://biodieselunirb.blogspot.com.br/>

Figura 4 – Ciclo completo da Cadeia de Produção e Consumo do Biodiesel

Entretanto, existem opositores ao uso do biodiesel. Especialistas defendem que as áreas destinadas ao cultivo da matéria-prima deveriam ser substituídas por plantações de gêneros alimentícios para a população. Afirmam, ainda, que a intensificação do uso desse combustível poderá acarretar diversos danos ambientais: esgotamento do solo, erosão, desmatamento, etc. Outro grave problema levantado pelos opositores é com relação ao destino e tratamento dos resíduos gerados durante a produção de biodiesel.

Vale ressaltar também que além das fontes de produção de biodiesel já consolidadas, há outras possibilidades de fabricação, com o uso de algas, que podem ser cultivadas utilizando-se resíduos e sem substituição de terras atualmente utilizadas para a produção de alimentos (ARCEO, 2012).

Na produção do biodiesel, outro potencial contaminante que é gerado como subproduto em seu processamento é o glicerol bruto (glicerina). Apesar de sua ampla aplicação em diversas áreas da indústria (bebidas, alimentos, farmacêutica, têxtil etc.) reduzir os futuros problemas ambientais por acumulação de glicerol e tornar a produção de biodiesel mais rentável é uma preocupação constante (RIVALDI *et al.*, 2007).

O glicerol é o principal subproduto gerado na produção de biodiesel, sendo que aproximadamente 10 % do volume total de biodiesel produzido correspondem a glicerol (RIVALDI *et al.*, 2007 *apud* DASARI *et al.*, 2005).

O glicerol obtido resultante da transesterificação de triglicerídeos com álcool apresenta impurezas como água, sais, ésteres, álcool e óleo residual, que lhe conferem um baixo preço de venda e compromete a sua aplicação (OOI *et al.*, 2004). Os processos para sua purificação incluem filtração, destilação a vácuo, descoloração e troca de íons para a remoção principalmente de  $K^+$  e  $Na^+$  utilizados como catalisadores (YONG *et al.*, 2001). No entanto, os tratamentos de purificação são de custo excessivamente elevados para pequenos e médios produtores nacionais de biodiesel. Devido a este fato, uma maior quantidade de efluentes contendo glicerol poderá ser descartada no meio ambiente sem nenhum tratamento, aumentando consequentemente os problemas e riscos ambientais (RIVALDI *et al.*, 2007).

### **2.3. Biorremediação**

A aplicação da biorremediação no tratamento de ecossistemas contaminados com gasolina e diesel já foi alvo de alguns estudos (VIEIRA *et al.*, 2009a, 2009b; VIEIRA *et al.*, 2007; BAPTISTA *et al.*, 2003; SILVA, 2004). No entanto, poucos trabalhos deram ênfase à presença do biodiesel como contaminante. As informações disponíveis na literatura indicam que a presença de biodiesel no óleo diesel, ou mesmo o biodiesel sem misturas, apresentam diferentes resultados de remoção ou toxicidade quando comparados (LAPINSKIENE, 2006; LEME, 2012). Nesse contexto, e considerando a relevância da contaminação dos solos com combustíveis, é fundamental conhecer as possíveis implicações da interação do contaminante com o ecossistema.

#### **2.3.1. Aspectos teóricos**

A biorremediação vem se mostrando ao longo dos anos como uma alternativa promissora ao tratamento de solos contaminados e efluentes domésticos e industriais. Sua aplicação é diversificada e vasta no que tange à recuperação de áreas degradadas como antigos lixões e aterros sanitários desativados, assim como áreas (industriais ou não) que possam ter sofrido algum derramamento de substâncias químicas de potencial tóxico considerável, ou por tantas outras formas de intervenções antrópicas que venham a comprometer as condições dos solos e das águas disponíveis no meio (USEPA, 1997).

A biorremediação pode ser definida, de acordo com a Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA, 2001) como um processo de tratamento biológico/natural que utiliza

micro-organismos para transformar substâncias perigosas presentes no ambiente (solo e água) em substâncias menos ou não tóxicas, através de processos de degradação biológica.

De maneira geral, os micro-organismos presentes no solo e na água utilizam estes contaminantes como fonte de energia para o seu metabolismo, transformando-os em água e gases inofensivos como o gás carbônico (CO<sub>2</sub>). Esta transformação é denominada de mineralização dos compostos químicos, sendo que plantas e produtos biológicos como as enzimas e componentes celulares também podem ser usados como agentes biorremediadores, tais como os micro-organismos (USEPA, 1997).

Durante o processo de biorremediação pode ocorrer a geração de subprodutos com a degradação parcial de alguns contaminantes, gerando outras substâncias e sendo algumas delas tóxicas aos micro-organismos biorremediadores. Estes micro-organismos são diversificados, com bactérias e fungos mais frequentemente utilizados (SILVA, 2004).

Deste modo, estudos realizados com cultura mista possuem vantagens sobre estudos realizados com cultura pura. A primeira e mais importante é que a capacidade biodegradativa de uma comunidade é muito maior quantitativa e qualitativamente. Segundo, a resistência da comunidade às substâncias tóxicas pode ser maior, porque há uma maior probabilidade de que um organismo que possa detoxificá-las esteja presente. Finalmente, o fato de que a mineralização de compostos xenobióticos algumas vezes requerem a união da atividade de múltiplas enzimas (GRADY, 1985).

O objetivo da biorremediação, quando usada como técnica de tratamento em áreas contaminadas, é induzir ou acelerar os processos biológicos naturais de reciclagem de compostos de interesse, incluindo compostos orgânicos ou inorgânicos. Assim, o desafio principal é utilizar a capacidade intrínseca dos micro-organismos de degradar matéria orgânica para degradar compostos orgânicos tóxicos, tanto de origem natural como sintética (DIAS, 2000). Na Tabela 2 é possível verificar vantagens e limitações deste tipo de processo.

Tabela 2 - Vantagens e Limitações do processo de biorremediação.

| PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO                                                                          |                                                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| VANTAGENS                                                                                           | LIMITAÇÕES                                                                         |
| Biodegrada substâncias perigosas ao invés de apenas transferir o contaminante de um meio para outro | Necessidade de maior entendimento de seu funcionamento e qualificação profissional |
| Baixo custo (até 85%)                                                                               | Não é uma solução imediata                                                         |

| PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO                                                  |                                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| VANTAGENS                                                                   | LIMITAÇÕES                                                         |
| Produtos utilizados não apresentam risco ao meio ambiente e não são tóxicos | Acompanhamento durante o processo                                  |
| Tratamento de resíduos considerados de difícil degradação                   | Muitas moléculas não são biodegradáveis                            |
| Uso em áreas de proteção ambiental, indústria de alimentos, entre outras    | Substâncias tóxicas aos micro-organismos inviabilizam o tratamento |

A biorremediação de solos contaminados é um procedimento complexo, pois a interação solo-micro-organismo-contaminante é essencial para que a técnica tenha efetividade. Parâmetros físicos, químicos e biológicos que influenciam o processo da biodegradação não devem ser analisados separadamente e sim com o enfoque em suas interações. Segundo GAYLORDE *et al.* (2005), estes parâmetros estão estritamente relacionados com o processo da biorremediação, portanto, a implementação de um processo de remediação de um ambiente contaminado, requer a condução de estudo detalhado, com uma visão interdisciplinar, envolvendo profissionais de diversas áreas do conhecimento como microbiologia, bioquímica, biologia molecular, química orgânica, analítica e engenharia.

O solo apresenta sua complexidade natural, que dentro do processo de biorremediação se reflete nas variáveis tipo de solo (argiloso, arenoso etc.), capacidade de retenção, teor de umidade, temperatura, profundidade, capacidade de troca catiônica, oxigenação, pH e nutrientes. A caracterização físico-química do solo a ser remediado é essencial na determinação da composição C:N:P que são nutrientes limitantes no processo de biorremediação.

Quanto aos micro-organismos, os já existentes no solo (autóctones) podem ser estimulados a se desenvolverem para serem os agentes biorremediadores, mas sua identificação é essencial, pois também dependem de fatores como pH, temperatura, umidade teor de oxigênio no meio e nutrientes para se desenvolverem. Micro-organismos alóctones, ou seja, que não fazem parte da flora existente no solo, podem ser inseridos no mesmo com a função de remediá-lo, mas da mesma forma que os autóctones precisam ser identificados, de forma a facilitar a sua adaptação ao solo, haja vista não estarem acostumados a tais condições. Além disso, a disponibilidade de substrato e nutrientes no solo para o metabolismo dos micro-organismos é fator chave para que a biorremediação possa acontecer.

Outra questão importante na biorremediação é conhecer o contaminante que se deseja tratar. A sua composição química deve ser o mais similar possível da estrutura molecular de

substâncias naturais já encontradas no meio e que os micro-organismos já utilizam em suas sínteses enzimáticas. Com isso a possibilidade dos contaminantes servirem de substratos aos micro-organismos que serão o agente biorremediador, aumenta a possibilidade de mineralização deste contaminante.

GAYLORDE *et al.* (2005), afirma que as enzimas que contabilizam as degradações de compostos naturais podem apresentar baixa especificidade pelo seu substrato e, desta maneira, os contaminantes com estrutura química semelhante a compostos naturais podem ser reconhecidos pelo sítio ativo da enzima, possibilitando, assim, que sejam quimicamente transformados. Quando o contaminante tem a possibilidade de percorrer todos os passos catalíticos de uma determinada rota metabólica enzimática, provavelmente ele se torna uma possibilidade nutritiva para os micro-organismos, sendo os produtos de sua degradação aproveitados pelo seu metabolismo construtivo e energético. Porém, quando o composto é apenas parcialmente degradado, por ação de uma ou mais enzimas de uma rota metabólica sem o produto resultante contribuir para a sobrevivência do micro-organismo, esta transformação metabólica é denominada co-metabolismo. O produto do co-metabolismo, muitas vezes, pode servir de substrato para transformações enzimáticas de outras espécies microbianas, possibilitando a degradação completa do contaminante (mineralização). O co-metabolismo aparentemente uma transformação fútil quando analisada sob a ótica de um micro-organismo isolado, tem um papel importante nas biotecnologias de remediação de sítios contaminados, pois, geralmente, nenhum micro-organismo possui todas as enzimas necessárias para a metabolização completa de um contaminante. Na Figura 5 pode ser visto um esquema geral para implementação de um processo de biorremediação para se poder selecionar o tipo de tratamento mais adequado.

Segundo CORDAZZO (2000), a tecnologia da biorremediação é baseada em processos nos quais ocorrem reações bioquímicas mediadas por micro-organismos. Em geral, um composto orgânico quando é oxidado perde elétrons para umceptor final de elétrons, que é reduzido (ganha elétrons). 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, micro-organismos 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.

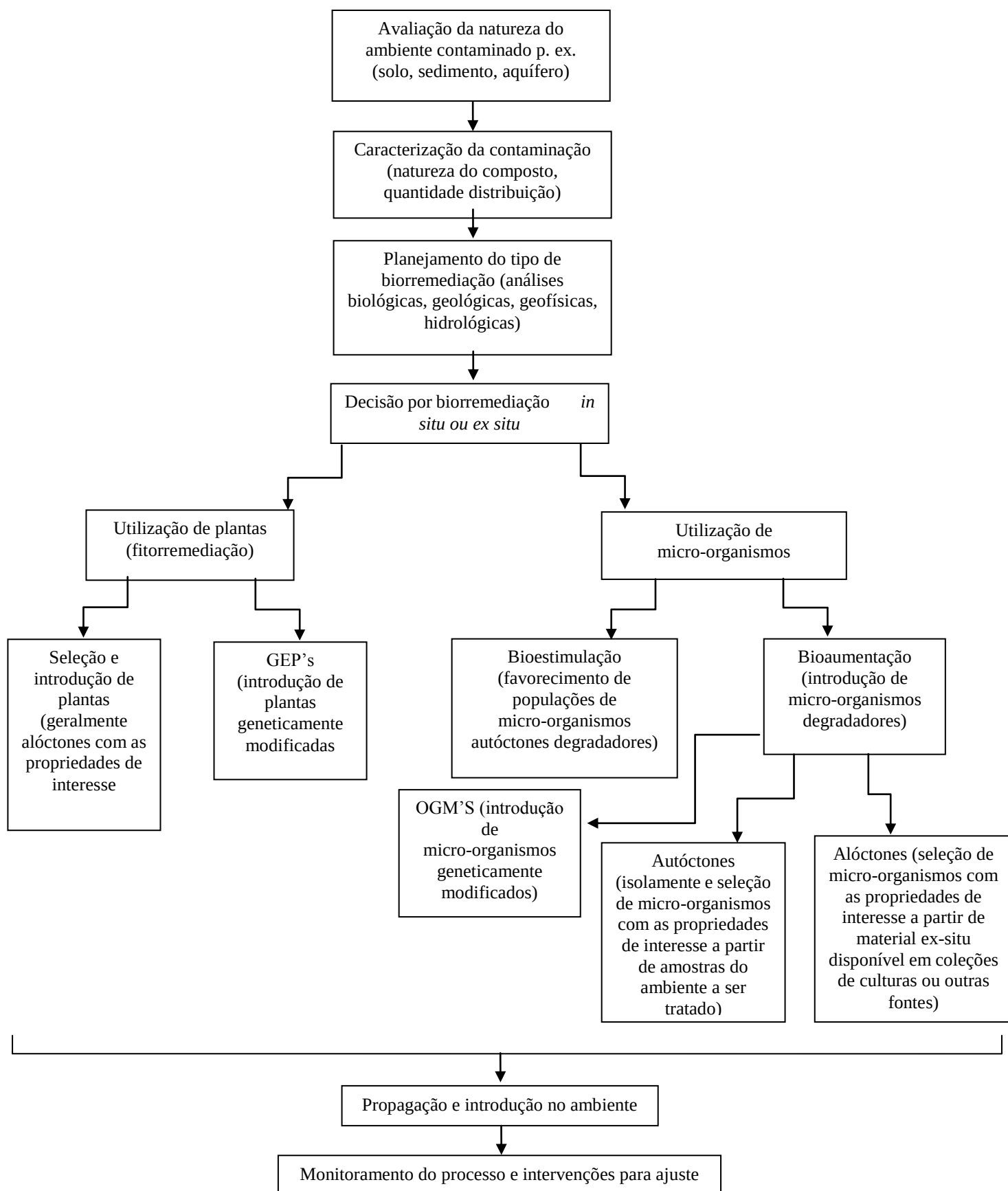


Figura 5 - Esquema geral das etapas para a implementação de um processo de biorremediação (Gaylorde *et al.*, 2005, modificado).

NOORDMAN (1999), afirma que biorremediação de solos contaminados com compostos orgânicos pode ser limitada pelas taxas de transferência de massa. Nestas situações, os contaminantes têm uma baixa disponibilidade.

Após as etapas de análises (avaliação do ambiente, caracterização da contaminação etc.) e escolha do tipo de biorremediação, a realização do processo no meio ambiente é uma das etapas mais criteriosas devido à legislação ambiental existente referente ao tratamento de resíduos. Desta forma, deve-se avaliar bem os impactos referentes a esta etapa antes de partir para sua implementação.

No item a seguir, técnicas de biorremediação e tratamento de solos contaminados encontram-se detalhadas de forma a elucidar suas aplicações.

### *2.3.2. Técnicas de biorremediação e tratamento de áreas contaminadas*

Nesta seção serão apresentados os tipos de tratamentos mais utilizados em áreas contaminadas. O foco desta seção será nos tratamentos mais utilizados em solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo e seus derivados que podem ser também aplicados para o biodiesel bruto.

A biorremediação, como já introduzido no tópico anterior, pode ser dividida em biorremediação ‘*in situ*’ e ‘*ex situ*’ com a utilização de plantas ou micro-organismos.

Biorremediação ‘*ex situ*’: as técnicas biológicas *ex situ* de tratamento de solo contaminado podem ser divididas em três grupos básicos: em fase lama (normalmente em biorreatores); tratamento na camada reativa do solo (landfarming); empilhamento do solo (compostagem e biopilha) (SEABRA, 2005).

#### Fase Lama (biorreatores)

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 micro-organismos 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, alternativamente, pode ser submetida à biorremediação em fase sólida. Uma outra opção em termos de configuração de biorreatores são os reatores de fase sólida, onde trabalha-se com teores reduzidos de umidade no solo (10 – 20%) (RIZZO *et al*, 2007).

### Landfarming

O landfarming é o processo de biorremediação onde os resíduos contaminados com hidrocarbonetos são misturados na camada superficial do solo, em local previamente preparado. Esta tecnologia visa favorecer a biorremediação por viabilizar a redução da concentração dos contaminantes no solo por ação de micro-organismos através de operações adequadas de manejo e gestão do solo (PAULA *et al.*, 2006).

### Compostagem

Na compostagem, o resíduo orgânico é metabolizado e transformado em húmus e em subprodutos inertes, tais como dióxido de carbono, água e sais minerais, tanto em condições aeróbias como anaeróbias. Esse método de estabilização de resíduos orgânicos tem sido empregado há várias décadas (USEPA, 1998).

### Biopilhas

O tratamento por biopilhas é controlado por processos biológicos ex-situ sob condições aeróbicas. Essa técnica de biorremediação envolve basicamente a disposição do material contaminado em montes denominados de biopilhas. Para o emprego desta técnica, inicialmente o solo é escavado e, em seguida, preparado e colocado em biopilhas, onde é feita a estimulação da atividade microbiana através de aeração, da adição de nutrientes e do aumento da umidade do solo, com o propósito de promover a biodegradação dos contaminantes de interesse (ANDRADE, *et al.*, 2010).

Atualmente, muitas publicações utilizam os termos biopilha e compostagem quase como sinônimos. Contudo, de modo geral, para sistemas com revolvimento periódico das pilhas tem se empregado o termo compostagem. Além disso, a compostagem seria mais bem caracterizada quando há um grande teor de matéria orgânica a ser estabilizado, acarretando temperaturas elevadas (na faixa termofílica), o que não ocorre normalmente com os solos contaminados (SEABRA, 2005).

Biorremediação ‘in situ’: a biorremediação ‘in situ’ é realizada no próprio local, sem que haja remoção de material contaminado. Isto evita custos e distúrbios ambientais associados com o movimento de solos e águas que estão contaminados para outros locais destinados ao tratamento. De acordo com parâmetros como origem dos micro-organismos, adição ou não de nutrientes, a biorremediação in situ pode ser realizada através de três processos: biorremediação intrínseca (ou atenuação natural), bioestimulação e bioaumento (MARIANO, 2006).

### Atenuação Natural ou Biorremediação Intrínseca

É um processo que ocorre naturalmente no solo, dentro de um contexto de remediação monitorada e controlada de um sítio, em um período de tempo razoável, com objetivo de reduzir a concentração e toxicidade de contaminantes até níveis adequados à proteção da saúde humana e ao meio ambiente. Na atenuação natural monitorada, a degradação do poluente orgânico presente no solo ocorre sem adequação de qualquer condição ambiental, onde a desestruturação do poluente é realizada pelos micro-organismos nativos do local, devido à adaptação natural destes à presença do contaminante. Esses micro-organismos passam, então, a utilizar o composto orgânico poluente como fonte de carbono, ocasionando assim uma redução da sua concentração ao longo do tempo. Nesse sistema não só os processos biológicos estão envolvidos, mas também, processos físicos e químicos podem ser responsáveis pela redução da concentração do poluente (DEON *et al*, 2012 *apud* PERELO, 2010; BEZERRA, 2009).

### Bioestimulação

A bioestimulação consiste na adição de nutrientes essenciais para o metabolismo dos micro-organismos – carbono, nitrogênio e fósforo, e na correção/monitoramento de parâmetros como oxigênio, pH, temperatura e umidade de forma a estimular o seu crescimento no solo contaminado e conseqüentemente a remoção dos compostos contaminantes.

Esta técnica busca especialmente instigar o crescimento da população microbiana nativa. Isto ocorre, fundamentalmente, pelo condicionamento do hábitat natural desses micro-organismos. (ANDRADE, *et. al.*, 2010).

### Bioaumentação

A bioaumentação é caracterizada pelo aumento da microbiota nativa através da inoculação de micro-organismos exógenos (alóctones). Estes micro-organismos 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 *apud* EPA, 2004d).

### Fitorremediação

A fitorremediação utiliza sistemas vegetais (árvores, arbustos, plantas rasteiras e aquáticas) e a sua microbiota com o fim de remover, degradar ou isolar substâncias tóxicas do ambiente. A fitorremediação, como qualquer outra tecnologia, apresenta várias vantagens e desvantagens. Se o baixo custo é uma vantagem, 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. Outra limitação é que as plantas usadas com o propósito de minimizar a poluição ambiental podem entrar na cadeia alimentar, resultando, em consequências indesejáveis (PLETSCH, 2008).

Mas além da biorremediação, diversos tratamentos podem ser utilizados na recuperação de áreas degradadas (solo e água) sendo apresentados a seguir:

#### Outros tipos de tratamento de áreas contaminadas

De acordo com RIZZO *et. al.*(2007), outros tipos de tratamento aplicados a áreas contaminadas (solo e água) encontram-se descritas a seguir:

##### Bioventing

Tecnologia baseada na introdução de ar na zona insaturada do solo, suprimindo assim a necessidade de oxigênio requerida pelo processo da biodegradação aeróbia. É uma forma de bioestimulação por adição de gases estimulantes como O<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>, para aumentar a atividade microbiana decompositora (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006).

##### Biosparging

Tecnologia semelhante 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 micro-organismos capazes de degradá-los. Além disso, a biorremediação irá ocorrer em alguma extensão no aquífero devido à introdução do oxigênio.

##### Air Sparging

Tecnologia baseada na injeção de ar na zona saturada para volatilização dos contaminantes e remoção dos mesmos no sistema coletor de gases.

##### Pump-and-treat

Tecnologia baseada no bombeamento da água contaminada para a superfície e posterior tratamento em biorreatores semelhantes aos normalmente utilizados em sistemas de tratamento aeróbio de efluentes líquidos, como, por exemplo, o sistema de lodos ativados.

#### 2.3.3. Biorreator

No processo de biorremediação realizado por um biorreator, o solo ou lama contaminada é misturado com água num tanque de mistura ou lagoa. Sistemas de

biorremediação requerem que o solo ou as lamas contaminadas devem ser suficientemente e homogeneamente misturados para garantir o contato ideal com os micro-organismos presentes (USEPA, 1990d).

Para uma biorremediação do tipo “*ex situ*”, a escavação, armazenamento, mistura, e outras etapas preparatórias são realizadas antes da alimentação do solo contaminado ao biorreator. Nestes casos, a aplicação de nutrientes/substratos e micro-organismos são realizados no leito de tratamento a fim de chegar às condições de trabalho previstas (USEPA, 1997).

Os biorreatores devem ser projetados com equipamentos de monitoramento para garantir que os gases que foram produzidos não sejam emitidos diretamente para a atmosfera em níveis acima do permitido pela legislação, pois os mesmos podem gerar dióxido de carbono, metano, entre outros gases.

Frequentemente, a biorremediação não traz a concentração individual dos componentes perigosos no solo, no subsolo ou sedimento, pois se costuma fazer um acompanhamento que não contempla todos os componentes presentes. Dependendo da biodisponibilidade daqueles componentes perigosos para a população humana, as plantas ou animais selvagens, o perigo pode ou não ser controlado no material tratado (USEPA, 1997).

Uma das importantes características do biorreator se destaca, pois se trata de um ambiente isolado no qual não há contato dos contaminantes diretamente com o meio e o fato do biorreator facilitar o contato direto dos micro-organismos com os contaminantes reduz consideravelmente o tempo de tratamento (USEPA, 1997).

Sendo assim, o biorreator é um meio de biorremediação extremamente vantajoso em questão de controle, pois se tratando de um volume de controle limitado, é possível fazer todas as adições necessárias de nutrientes, manter um rigoroso controle dos fatores abióticos, manter constante a temperatura de trabalho, o que facilita a manutenção e crescimento dos micro-organismos, além de ser disponível em diferentes configurações no meio comercial. Porém vale ressaltar que devido a todas estas facilidades, este processo se torna mais oneroso quando comparado a tratamentos do tipo “*in situ*”, o que influencia na hora da escolha, pois quando o tempo de tratamento é uma variável importante, não há dúvidas quanto ao uso do biorreator (USEPA, 1997). As vantagens e limitações de um biorreator são apresentados de forma resumida na Tabela 3.

Tabela 3 - Vantagens e Limitações de um biorreator.

| BIORREATOR                                                                                                                                                                              |                                                                      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| VANTAGENS                                                                                                                                                                               | DESVANTAGENS                                                         |
| Diferentes configurações:<br>aeróbia/anaeróbia; controle rigoroso de<br>fatores abióticos; possibilidade de<br>otimização;<br>Baixo tempo de tratamento;<br>Comercialmente disponíveis. | Custo elevado quando comparado aos<br>tratamentos “ <i>In situ</i> ” |

#### 2.3.4. Parâmetros da biorremediação

Independente do tipo de processo de biorremediação utilizado, este método é considerado seguro, eficiente e mais viável economicamente para a remoção de contaminantes em relação aos processos físicos e químicos já estabelecidos. Alguns fatores limitantes podem prejudicar o processo como: fatores ambientais, disponibilidade do contaminante, limitações metabólicas, etc (USEPA, 1997).

Por outro lado processos biológicos são uma tecnologia promissora para remover esses contaminantes, principalmente devido à simplicidade e eficiência de custo quando comparados a outras alternativas (ALEXANDER, 1994). Cada caso deve ser analisado individualmente, avaliando suas particularidades.

Além da disponibilidade de nutrientes, o pH é um dos fatores essenciais para a atividade microbiana. 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 micro-organismos permite que fungos e bactérias apresentem pH ótimo desde extremamente ácido até extremamente básico. No entanto, de forma genérica, o pH ideal para o metabolismo fúngico é ligeiramente ácido, em torno de 5,0, enquanto que as bactérias são mais adaptadas a valores próximos a neutralidade, variando de 6,0 a 8,0 (MADIGAN, MARTINKO & PARKER, 2004).

Todas as aplicações de biorremediação são dependentes da especificidade e condições do ambiente ou da matriz em que a contaminação é encontrado. O meio ambiente e a situação da matriz geralmente deve ser analisado antes da escolha do método de tratamento. Por

exemplo, alguns micróbios necessitam de propriedades específicas a fim de serem eficazes (por exemplo, alta tolerância a ácido em condições do tratamento), e alguns compostos têm de ser tratados sob certas condições (por exemplo, em condições aeróbias e/ou anaeróbias) (USEPA, 1997).

Em geral, as biorremediações do tipo “*in situ*” requerem algum tempo para serem eficazes e não devem ser consideradas no caso de emergência na remoção/remediação de áreas contaminadas. No entanto, o tratamento “*ex situ*”, num biorreator pode ser apropriado. A concentração do contaminante, acima do nível de tolerância à toxicidade dos micro-organismos (o qual varia de acordo com a biodisponibilidade do composto) fará com que a biodegradação seja ineficaz ou, em outro caso, às vezes a população microbiana não consegue sobreviver por causa das concentrações de contaminantes serem muito baixas para sustentá-la. Por este motivo, um amplo leque de tratamentos ou outras alternativas devem ser considerados nestas circunstâncias (USEPA, 1997).

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).

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)

A definição proposta para TPH, segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, USEPA (2001), emprega dois conceitos. Um deles é o uso do fracionamento como uma

alternativa para medir os constituintes da mistura de petróleo, dessa forma, tudo que for medido é somado e daí se tem o dado TPH. O outro conceito sugere que TPH são todos os hidrocarbonetos que foram extraídos de uma amostra e detectados por uma técnica particular, pois não é prático medir cada uma dessas substâncias separadamente para efeito de monitoramento do progresso da remediação de uma área contaminada. Torna-se muito mais útil medir a concentração total de TPH nessa área (NASCIMENTO, 2003).

Segundo (NASCIMENTO, 2003 *apud* TPH Criteria Working Group, 1998), sugere que a resposta de TPH não pode ser usada para estimar quantitativamente o risco à saúde. As mesmas concentrações de TPH podem representar composições muito diferentes e consequentemente riscos diferentes à saúde humana e ao ambiente, pois, como foi visto anteriormente, 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. Se os dados de TPH indicarem que pode haver uma contaminação significativa do ambiente, outras análises devem ser realizadas de modo que o dano possa ser quantitativamente avaliado. O TPH é considerado uma ferramenta de baixo custo e que pode ser usada para três finalidades: (i) identificação de uma contaminação; (ii) avaliação do grau de contaminação; e (iii) 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.

#### 2.3.5. Legislação Vigente

Os procedimentos a serem adotados na identificação de passivos ambientais decorrentes de vazamentos ou derrames de combustíveis são caracterizados pela presença de contaminantes constituintes de combustíveis automotivos e de lubrificantes no subsolo, possibilitando concluir a respeito da existência ou não de contaminação na área objeto de avaliação (CETESB, 2007).

Os valores orientadores são concentrações de substâncias químicas que fornecem orientação sobre a condição de qualidade de solo e de água subterrânea e são utilizados como instrumentos para prevenção e controle da contaminação e gerenciamento de áreas contaminadas sob investigação (CETESB, 2005).

Valor de Referência de Qualidade - VRQ é a concentração de determinada substância no solo ou na água subterrânea, que define um solo como limpo ou a qualidade natural da água subterrânea, e é determinado com base em interpretação estatística de análises físico-químicas de amostras de diversos tipos de solos e amostras de águas subterrâneas de diversos aquíferos do Estado de São Paulo. Deve ser utilizado como referência nas ações de prevenção da poluição do solo e das águas subterrâneas e de controle de áreas contaminadas (CETESB, 2005).

Valor de Prevenção – VP é a concentração de determinada substância, acima da qual podem ocorrer alterações prejudiciais à qualidade do solo e da água subterrânea. Este valor indica a qualidade de um solo capaz de sustentar as suas funções primárias, protegendo-se os receptores ecológicos e a qualidade das águas subterrâneas. Foi determinado para o solo com base em ensaios com receptores ecológicos. Deve ser utilizado para disciplinar a introdução de substâncias no solo e, quando ultrapassado, a continuidade da atividade será submetida a nova avaliação, devendo os responsáveis legais pela introdução das cargas poluentes proceder o monitoramento dos impactos decorrentes (CETESB, 2005).

Valor de Intervenção – VI é a concentração de determinada substância no solo ou na água subterrânea acima da qual existem riscos potenciais, diretos ou indiretos, à saúde humana considerada um cenário de exposição genérico. Para o solo, foi calculado utilizando-se procedimento de avaliação de risco à saúde humana para cenários de exposição Agrícola – Área de Proteção Máxima – APM<sub>ax</sub>, residencial e industrial (CETESB, 2005).

A área será classificada como Área Contaminada sob Investigação quando houver constatação da presença de contaminantes no solo ou na água subterrânea em concentrações acima dos Valores de Intervenção, 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 tem como valores de intervenção para solo e água, fixados em 1.000 mg/kg e 600 µg/L respectivamente (CETESB, 2007).

#### 2.3.6. Estado da Arte da biorremediação de solos contaminados

O processo de biorremediação apresenta diversas possibilidades de tratamento, no qual o contaminante, o método escolhido, o tipo de controle, o local de tratamento, diferencia um trabalho de outro. Dentre alguns trabalhos, observa-se BARAHONA *et al* (2004) que estudaram a bioestimulação de culturas autóctones (nativas) para biorremediação de solos contaminados com diesel. Neste estudo foi empregado um planejamento fatorial de 2 níveis que

avaliou a relação C:N, % de umidade (m/m), % de resíduo de cultura e tipo de resíduo de cultura, além do controle de temperatura entre 20 e 25°C em microcosmos. Estes microcosmos eram artificialmente contaminados com diesel comercial e apresentavam 25g de solo cada que foram acompanhados por 109 dias. A relação C:N do solo era ajustada com nitrato de amônio sendo a fonte de nitrogênio, e os dois tipos de resíduo de cultura utilizados foram de milho e cana de açúcar. Em resumo, o processo por ele proposto aproveita os micro-organismos autóctones, a atividade metabólica dos mesmos e as propriedades dos resíduos de cultura para degradar os hidrocarbonetos de óleo diesel.

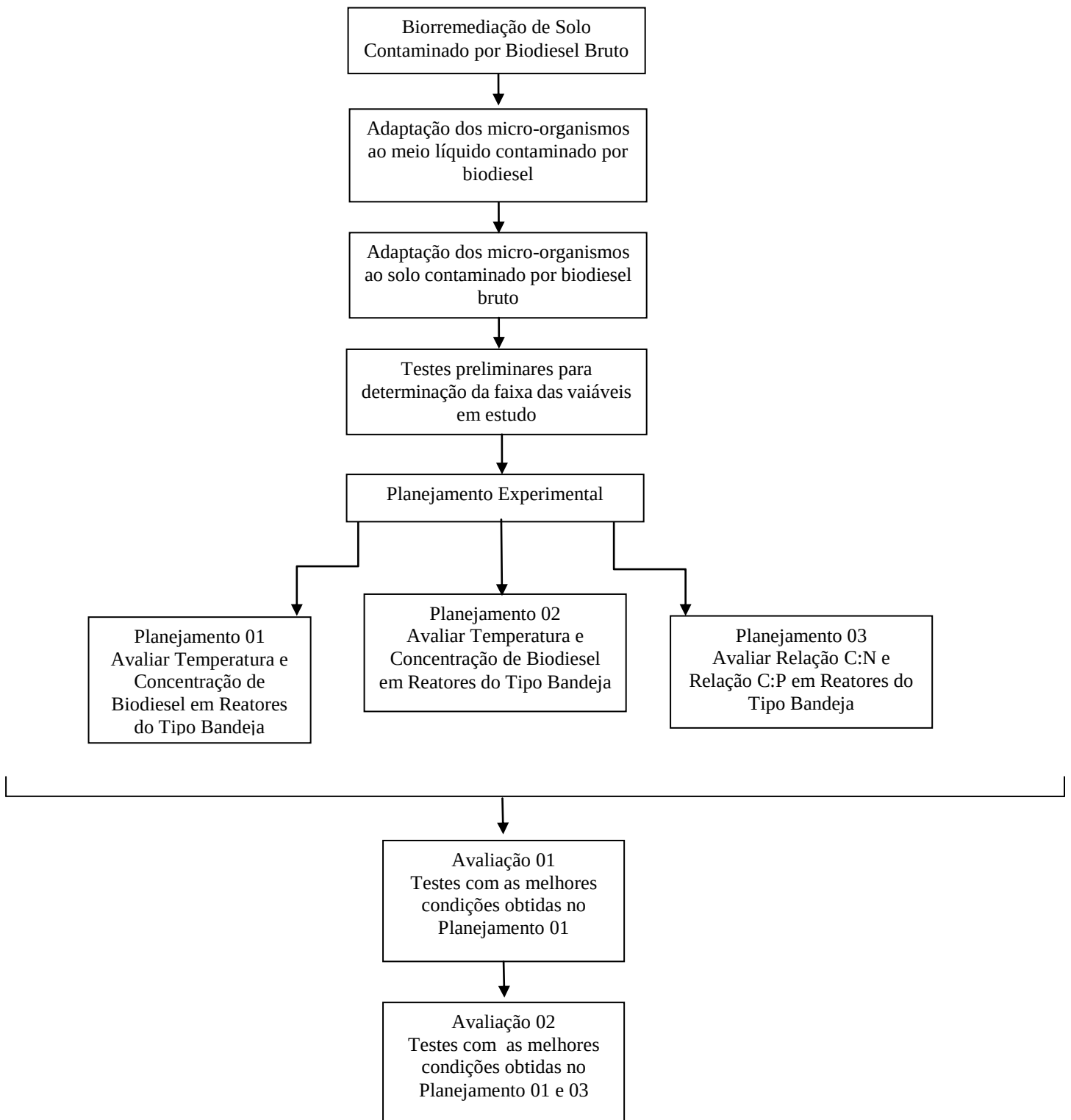
CHEMLAL *et al* (2013) e BAPTISTA *et al* (2003) avaliaram a biodegradação de solo contaminado com TPH utilizando-se de temperatura ambiente e fazendo a correção da relação C:N:P, esta essencial para que o processo de biorremediação ocorra. Porém CHEMLAL *et al* (2013) utilizaram-se de biopilhas com controle da umidade e pH de modo a estudar o metabolismo microbiano na degradação dos hidrocarbonetos. Eles realizaram o acompanhamento por 76 dias de processo, constatando a degradação das frações simples (alcanos e aromáticos) em primeiro lugar, seguido pela degradação das frações mais complexas. Enquanto BAPTISTA *et al* (2003) optaram por biorreatores em condições ambientais, fazendo primeiramente uma otimização da relação C:N:P a ser utilizada, e num segundo momento fazendo o acompanhamento da degradação de TPH além de Óleos e Graxas.

MOREIRA *et al* (2011) avaliaram a biodegradação de solo de manguezal em escala piloto contaminado com TPH durante um período de 3 meses, através da fitorremediação utilizando a espécie *Rizophora mangle L*, realizando a umidificação das mesmas 2 vezes por semana (manutenção umidade). Eles fizeram o acompanhamento do crescimento das plantas expostas as contaminantes e em referência, obtendo melhores resultados naquelas expostas aos rejeitos, sugerindo uma boa adaptação.

MEYER (2011) e COLOMBO (2010) estudaram a atenuação natural de solos contaminados com misturas diesel/biodiesel e também com biodiesel comercial puro (B100) de diferentes formas. Enquanto MEYER (2011) utilizou-se de microcosmos com umidade e adição de nutrientes controladas em dois tipos de solos, COLOMBO (2010) optou por biorreatores sem controle, onde foi verificadas dificuldades de degradação do contaminante em épocas sem precipitação da chuva (umidade não controlada). Além disso, observou-se, que em temperaturas abaixo de 21°C a taxa de degradação também foi comprometida.

Sendo assim, em meio a procura por combustíveis menos poluentes, os investimentos para a produção de biodiesel no Brasil estão crescendo em ritmo acelerado e consequentemente têm aumentado as preocupações com as possíveis contaminações de solo e água por resíduos gerados no processo, justificando esse estudo como uma importante contribuição científica para o tratamento desse tipo de ambiente, o solo.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS



Este capítulo apresenta as etapas que fizeram parte do desenvolvimento experimental deste trabalho. Inicialmente, são descritas as metodologias de coleta, caracterização do solo, dos contaminantes e da cultura mista e por fim as técnicas utilizadas e o procedimento experimental.

### **3.1. Solo**

#### **3.1.1 – Amostragem**

O solo envolvido nesta pesquisa foi coletado na Fazenda do Glória no município de Uberlândia-MG. Este local é situado às margens da BR 050 no Km 78 e pertence à Universidade Federal de Uberlândia. O solo utilizado não apresentava histórico de contaminação e estava localizado em uma região na qual não havia plantações ou pastagens.

A coleta do solo foi realizada conforme norma ABNT (NBR 10007/1987). 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 à 4 °C, para ser preservado até sua utilização nos ensaios. A Figura 6 mostra a foto do solo coletado, realizada em maio de 2012.



Figura 6 – Solo coletado na Fazenda do Glória.

#### **3.1.2 – Caracterização Físico Química do Solo**

Imediatamente após a coleta foram determinadas as características físico-químicas do solo a ser utilizado no trabalho.

### 3.1.2.1 Umidade

Os ensaios de umidade foram realizados em triplicata. As amostras foram transferidas para béqueres de capacidade de 50 mL, previamente tarados. Após a pesagem, o conjunto foi levado à estufa (Sterilifer Inox) a  $100 \pm 5^\circ\text{C}$ , por um período de vinte e quatro horas. Após este período, resfriou-se os conjuntos em dessecador contendo sílica gel ativada e então, determinou-se o peso de solo seco. O conteúdo de umidade foi calculado pela relação da perda de massa inicial com a massa final da amostra, multiplicando-se por 100 para se obter o resultado em percentagem, conforme a Norma Brasileira ABNT-NBR 7180/1984. As determinações de massa foram executadas em balança semi analítica (Acculab, Sartorius Group).

### 3.1.2.2 Capacidade de Retenção de Água

Os ensaios de capacidade de retenção de água pelo solo foram realizados em triplicata. Transferiu-se uma amostra de 2 g de solo para um funil de vidro de 5 cm de diâmetro e 5 cm de profundidade, previamente coberto com papel de filtro qualitativo. Compactou-se o conteúdo e transferiu-se o referido funil para um béquer de capacidade de 500 mL, a seguir adicionou-se água ao béquer de forma que o nível da mesma atingisse um nível pouco acima do nível do papel de filtro. Esperou-se o umedecimento da amostra. Após este procedimento, adicionou-se mais água ao béquer de forma a atingir o nível superior da superfície do solo contido no funil. O sistema ficou em repouso por meia hora. Retirou-se o funil do béquer e deixou-se escoar a água por meia hora. Em seguida, transferiu-se o solo para um béquer de capacidade de 50 mL, previamente tarado e procedeu-se a pesagem em balança analítica. O conjunto foi colocado em uma estufa a  $100 \pm 5^\circ\text{C}$ , por um período de vinte e quatro horas. Após este tempo, o conjunto foi resfriado em um dessecador contendo sílica gel ativada, até que a temperatura ambiente fosse alcançada. Pesou-se o conjunto e determinou-se o conteúdo de umidade (capacidade de retenção de água pelo solo), relacionando a perda de massa inicial com a massa final da amostra, multiplicando-se por 100 para obter-se o resultado em porcentagem (WATWOOD *et al.*, 1991).

### 3.1.2.3 pH

A um béquer de capacidade de 50 mL foram transferidos 10 g de solo, pesado em balança semi-analítica (Acculab, Sartorius Group). Com auxílio de uma proveta de capacidade de 100 mL, transferiu-se 25 mL de água destilada ao béquer. Procedeu-se à homogeneização da mistura com auxílio de uma barra magnética (“peixinho”), revestida de Teflon e de um agitador

magnético, por um período de 30 minutos. Decorrido o período de agitação, a mistura foi deixada em repouso para separação das fases, e o decantado foi transferido para um béquer com capacidade de 25 mL. Determinou-se o pH real do solo através do decantado em potenciômetro (Digital PG 2000, GEHAKA), previamente calibrado com soluções tampão de pH 4 e 7. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### *3.1.2.4 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.

#### *3.1.2.5 Outros Componentes*

As determinações de fósforo, nitrogênio total e carbono orgânico total (COT) foram realizadas com modificações no procedimento descrito no Standard Methods (1998) para adequação às amostras de solo. A quantificação de fósforo foi realizada pelo método colorimétrico por redução com ácido ascórbico, a de nitrogênio total foi realizado pelo método Kjeldahl e o COT 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  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , como fontes de N e P respectivamente.

#### *3.1.2.6 - Caracterização Microbiológica*

A contagem do número de células de bactérias aeróbias, por grama de solo, foi feita conforme será descrito no item 3.6.1.

### **3.2. Biodiesel Bruto: Biodiesel de Processo**

O biodiesel bruto (não filtrado – que contém glicerina) utilizado nesta pesquisa foi gentilmente cedido pelo PETROBRÁS TRANSPORTE S/A localizada na cidade de Uberlândia/MG. O fluido foi acondicionado em frascos âmbar de capacidade de 1000 mL, com tampa rosqueada e resfriado a 4 0C.

### 3.3. Cultura Mista

A cultura mista utilizada para o desenvolvimento do presente trabalho foi denominada de cultura mista (C1) empregada nos trabalhos de VIEIRA (2004, 2008 e 2010). A Figura 7 mostra o local de onde a cultura mista foi isolada.



Figura 7 - Lagoa mostrando a canaleta e o bocal de descarga do efluente na mesma.

A cultura mista denominada de C1 foi isolada do solo contaminado de uma lagoa, que recebe como efluente gerado a água de lavagem do pátio de uma distribuidora de combustível, onde há derrames eventuais de gasolina e óleo diesel, conforme mostram as Figuras 7 e 8 (VIEIRA, 2004). De acordo com VIEIRA (2004), nesta cultura foram isolados 6 membros de micro-organismos, dos seis isolados 4 foram identificados, sendo eles: *Pseudomonas sp.*, *Serratia sp.*, *Klebsiella* e *Bacillus sp.*.



Figura 8 - Localização das lagoas de efluente da distribuidora de combustível na Fazenda Rio das Pedras, de onde foram obtidas as amostras dos solos.

### 3.4. Ensaios Preliminares

#### 3.4.1- Adaptação da Cultura Mista ao Biodiesel em Meio Líquido

Inicialmente, uma amostra de 500 mL de cultura mista C1 foi obtida do estoque de micro-organismos do Núcleo de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química/UFU, e então foi transferido 50 mL para outros frascos erlenmeyer com capacidade de 500 mL, contendo 100 mL de meio quimicamente definido (0,4007 g/L  $K_2HPO_4$ ; 1,124 g/L  $KH_2PO_4$ ; 0,02 g/L  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 0,03 g/L  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ; 0,1 g/L  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ ; 3,386 g/L  $NH_4NO_3$ ; 4,0 g/L Levedura Cervejeira Autolizada). O meio foi anteriormente esterilizado e corrigido o seu pH usando solução de HCl 0,1 M ou solução de NaOH 0,1 M até ser alcançada a faixa de pH 7,0 – 7,2.

Adicionou-se inicialmente a esta solução, 0,25% v/v de contaminantes (0,125% v/v de biodiesel e 0,125% v/v de glicerol) como fonte de carbono e energia para os micro-organismos.

A quantidade de inóculo empregada correspondeu à massa de micro-organismo obtida pela centrifugação de 40 mL de meio fermentado. O processo foi realizado nestes reatores batelada de 500 mL, tampados com rolha de algodão e gase, sob agitação em mesa oscilatória termostatzada New Brunswick a 150 rpm e 30°C. O procedimento de areação foi realizado manualmente durante 3 minutos a cada 48h de processo (VIEIRA, 2004).

As concentrações de contaminantes foram utilizadas, sempre estabelecendo a mesma relação de volume dos contaminantes biodiesel e glicerina. O critério de seleção adotado para aumentar a concentração de contaminantes no meio foi estabelecido pela porcentagem de

remoção de Demanda Química de Oxigênio (DQO). À medida que a remoção de DQO mostrava-se maior ou igual a 60% ou no mínimo uma concentração celular da ordem de  $10^6$  UFC/mL, aumentava-se a concentração dos contaminantes no meio. A análise de Demanda Química de Oxigênio (DQO) foi realizada pela técnica colorimétrica descrita no *Standard Methods* (1998), modificada para amostras de solo. A análise de DQO foi realizada em 0 e 7 dias.

As análises de carbono orgânico total (COT) também foram realizados conjuntamente com a DQO para avaliar a biodegradação dos contaminantes. A metodologia e as condições operacionais empregadas na análise de carbono orgânico total (TOC) foram realizadas de acordo com modificações do *Standard Methods* (1998).

O crescimento microbiano foi observado visualmente. Observou-se durante o crescimento, o aumento gradativo da turbidez do meio.

Na Figura 9 é possível verificar uma placa contendo micro-organismos da cultura mista utilizada no trabalho.

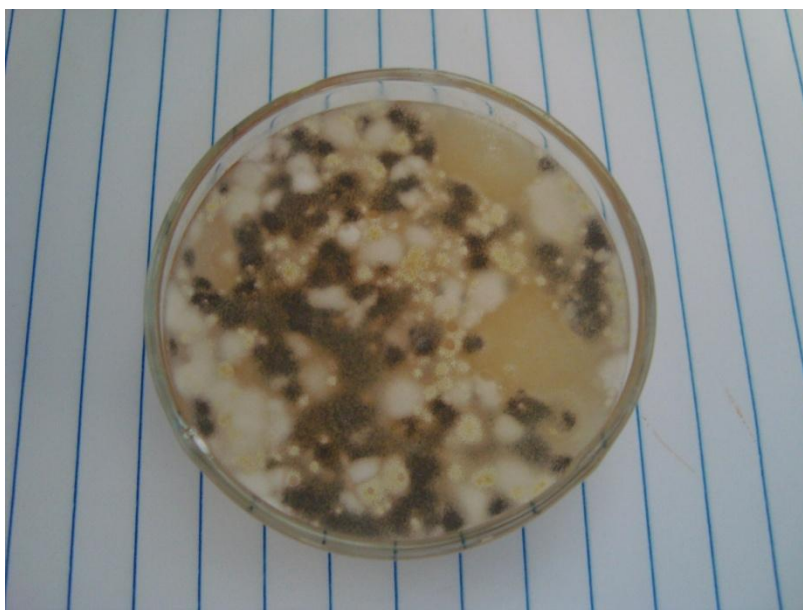


Figura 9 - Cultura Mista utilizada no trabalho

#### 3.4.2- Adaptação da Cultura Mista ao Solo

Para início da aclimação dos micro-organismos no solo, estes foram inseridos semanalmente, através da adição de 80 mL de biomassa centrifugada advinda dos repiques realizados em meio líquido, em um reator fonte - R01 (inoculo), com 1,5 kg de solo, distribuído em um recipiente plástico de forma a ocupar um volume de 25 cm x 35 cm x 15 cm (largura x comprimento x altura). O teor de umidade adotado para o R01 foi de 50% da capacidade de

retenção do solo. A umidade foi monitorada de 2 em 2 dias, além do que o reator R01 foi coberto com papel filme perfurado, para contribuir com a circulação de ar no reator. O pH do solo determinado nas análises foi de 5,31. Apesar de o valor de pH mais próximo da neutralidade ser mais adequado para o crescimento bacteriano, neste experimento o valor de 5,31 foi mantido, pois também era de interesse saber se haveria uma variação neste parâmetro ao longo do período de aclimação.

A oxigenação do reator R01 foi feita através de revolvimento manual diário do solo no reator para incorporação do ar de forma a contribuir com crescimento bacteriano e consequentemente com a remoção dos contaminantes.

Os micro-organismos (cultura C1) foram inseridos no reator R01, semanalmente, com a inserção de 80 mL de biomassa centrifugada advinda dos repiques da cultura C1 realizados em meio líquido contaminado com biodiesel e glicerina. A fim de transferir de forma eficiente e homogênea esta biomassa ao solo contaminado foi realizada a suspensão desta massa, bem como a dos nutrientes (C:N:P de 100:10:1) na água de reposição de umidade. Este procedimento foi necessário devido a testes preliminares.

Para verificação da aclimação dos micro-organismos no solo, o parâmetro monitorado foi crescimento bacteriano e determinado o valor do carbono orgânico total (COT) no início e no final do processo.

### **3.5. Experimentos de Biorremediação**

Nos reatores biológicos usados neste trabalho foram realizados os processos de biorremediação do solo sem contaminação (item 3.1). Neste trabalho, foram realizados 3 Planejamentos Experimentais do tipo Delineamento de Composto Central (DCC), cada um avaliando um conjunto de variáveis que pode influenciar no processo de descontaminação do solo, além de avaliações que visam validar os dados obtidos e por fim um teste em escala piloto, de modo a fazer um ‘scale up’ do processo otimizado.

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.

Na sequência serão descritos detalhadamente o processo utilizado nos reatores em cada planejamento experimental e avaliação realizada durante o trabalho.

### 3.5.1 Reator Abiótico e Reator de Referência

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.

Na partida do reator adotou-se o seguinte procedimento:

- Contaminação com 49,0 g de biodiesel bruto, obtendo-se um solo contaminado com 70g de biodiesel/kg de solo (equivalente a 70.000 mg BB em TPH. kg<sup>-1</sup> de solo);
- Umidificação e esterilização com de solução de azida de sódio a 2% (p/v) realizada semanalmente.

Procedeu-se então à homogeneização, com auxílio de uma espátula de aço e fez-se a contagem de micro-organismos, para conferir a eficácia do biocida, isto é, ausência de crescimento microbiano.

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

No reator de referência não foi feita a correção da relação C:N:P ao longo do processo de biorremediação para verificar as perdas naturais que ocorreriam no solo sem nenhuma interferência.

### 3.5.2 Testes Preliminares

Visando avaliar a biorremediação do solo contaminado com biodiesel bruto (biodiesel sem purificação, isto é, com glicerina) através do controle de variáveis, foram realizados testes preliminares de modo a identificar a melhor faixa de trabalho dentre as variáveis em estudo, como relação de micro-organismos nos reatores e concentração de biodiesel bruto que não fossem tóxicas aos micro-organismos.

#### 3.5.2.1 – Avaliação da Concentração de Micro-organismos

Neste estudo foi realizado um teste preliminar de modo a avaliar a melhor concentração de micro-organismos na biorremediação do solo contaminado com biodiesel bruto.

Para o desenvolvimento do teste preliminar foram escolhidos 4 valores de concentração de micro-organismos que poderiam ser utilizados nos reatores ao longo do processo. Optou-se

pelos valores de 15, 20, 25 e 30% de massa do reator inóculo (item 3.5.2) no reator de biorremediação. Todos os experimentos foram realizados com réplicas. A Figura 10 mostra o esquema com as etapas sucessivas adotadas até a obtenção dos biorreatores R1, R2, R3 e R4, respectivamente.

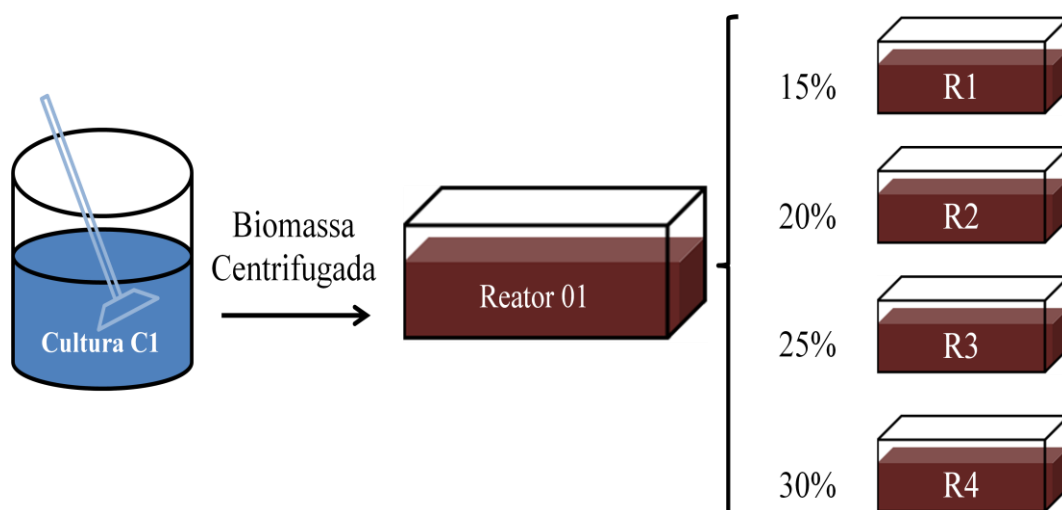


Figura 10 - Representação esquemática das etapas realizadas no Teste Preliminar 1.

Para a composição do solo nos biorreatores foi realizada a mistura de determinada massa de solo argiloso estéril (R1 – 0,595 kg; R2 – 0,560 kg; R3 - 0,525 kg e R4 – 0,490 kg) e uma determinada massa de solo retirado do reator inóculo (R1 – 0,105 kg; R2 – 0,140 kg; R3 - 0,175 kg e R4 – 0,210 kg), no qual já havia a presença de micro-organismos desenvolvidos e adaptados (cultura mista C1), totalizando 0,7 kg de solo. O reator empregado para este estudo foi do tipo bandeja e suas dimensões eram de 20 x 14 x 7,3cm. Este biorreator era do tipo bandeja aberta, o qual era coberto por um filme plástico com furos, para circulação de ar.

Nestes biorreatores foi realizada a homogeneização por revolvimento do solo, com auxílio de uma espátula de aço a cada 2 dias. 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 micro-organismos foi realizada a cada 15 dias empregando a técnica ‘pour plate’. Além disso, a correção da relação C:N:P (100:10:1) e da umidade (equivalente a 50% da capacidade de retenção de água do solo) no solo foi realizada semanalmente e o acompanhamento do pH ao longo do processo. O experimento foi realizado durante 111 dias.

#### 3.5.2.2 – Avaliação da Concentração de Biodiesel Bruto

Neste estudo foi realizado um teste preliminar de modo a avaliar a melhor concentração de biodiesel bruto na biorremediação do solo contaminado.

Para o desenvolvimento do teste preliminar foram escolhidos 4 valores de concentração de biodiesel bruto que poderiam ser utilizados nos reatores ao longo do processo. Optou-se pelos valores de 20.000, 30.000, 50.000 e 80.000 mg BB em TPH/kg de solo, que corresponderam respectivamente, aos reatores RA, RB, RC e RD. Todos os experimentos foram realizados com réplicas.

A cada biorreator foi acrescentado uma concentração fixa de biodiesel bruto de 20.000, 30.000, 50.000 e 80.000 mg BB em TPH/kg de solo, que corresponderam respectivamente, aos reatores RA, RB, RC e RD. Estes valores foram escolhidos de acordo com dados da literatura (GELLER, 2000). Nestes reatores foi realizada a homogeneização por revolvimento do solo, com auxílio de uma espátula de aço a cada 2 dias. 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 micro-organismos foi realizada a cada 15 dias empregando a técnica 'pour plate'. Além disso, a correção da relação C:N:P (100:10:1) no solo foi realizada em 21 e 35 dias (intervalo de 14 dias), da umidade a cada 7 dias de processo no valor equivalente a 50% da capacidade de retenção de água do solo e o acompanhamento do pH ao longo do processo. O experimento foi realizado durante 42 dias.

### *3.5.3 Planejamento Composto Central*

Visando avaliar a biorremediação do solo contaminado com biodiesel bruto através do estudo da influência das variáveis temperatura e concentração de Biodiesel e da correção de nutrientes (Nitrogênio e Fósforo) foi empregado dois tipos de biorreatores (bandeja e rotativo) e estabelecidos 3 planejamentos experimentais.

#### 3.5.3.1 - 1º Planejamento: Temperatura e Concentração de Biodiesel em Reator Bandeja em Sistema Fechado

Neste estudo foi realizado um planejamento composto central para avaliar a melhor temperatura e concentração de biodiesel na biorremediação do solo contaminado com biodiesel bruto no reator tipo bandeja.

Para o desenvolvimento do DCC foram escolhidos 2 variáveis em dois níveis com mais 3 repetições no ponto central e mais 4 experimentos no ponto axial, com  $\alpha$  de rotabilidade de 1,4142 e todos os experimentos com réplicas. Para análise dos resultados foi empregado o software *Statistica 7.0*. A Tabela 4 apresenta a matriz do planejamento, com as variáveis do

processo e seus respectivos valores codificados e reais, de acordo com os níveis inferiores, centrais e superiores adotados.

Este planejamento foi escolhido com o propósito de verificar a influência das variáveis (temperatura e concentração de biodiesel) no processo de remoção de BB.

As variáveis independentes deste processo foram:

X1 – Temperatura;

X2 – Concentração de Biodiesel;

No planejamento foi adotado como resposta (variável dependente) o resultado de remoção de BB. Além disto, foi realizado o acompanhamento do pH e a correção da umidade ao longo do processo. Os níveis das variáveis estudadas foram colocados na forma codificada (adimensionalizada), utilizando a seguinte equação de codificação:

$$\text{Equação geral} \quad X_n = \frac{X - X_0}{\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2}} \quad (3.1)$$

Sendo:  $X_n$  é o valor da variável na forma codificada;

$X$  é o valor real da variável a ser calculado;

$X_0$  é o valor da variável no ponto central;

$X_{+1}$  é o valor da variável no nível superior;

$X_{-1}$  é o valor da variável no nível inferior;

O valor de  $\alpha$  empregado foi de 1,4142 para que o planejamento composto central fosse rotacional, empregando três réplicas centrais.

Os 11 experimentos realizados, conforme a matriz obtida pelo DCC tiveram duração de 30 dias, para garantir o tempo necessário para que houvesse degradação dos contaminantes presentes no solo.

Tabela 4 - Matriz do planejamento experimental 01.

| Experimento | VARIÁVEIS                   |                                                                           |
|-------------|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
|             | (X1)<br>Temperatura<br>[°C] | (X2)<br>Concentração Biodiesel<br>[mg BB em TPH.kg <sup>-1</sup> de solo] |
| 1           | 30 (-1)                     | 30.000 (-1)                                                               |
| 2           | 30 (-1)                     | 70.000 (+1)                                                               |
| 3           | 40 (+1)                     | 30.000 (-1)                                                               |
| 4           | 40 (+1)                     | 70.000 (+1)                                                               |
| 5           | 28 (- $\alpha$ )            | 50.000 (0)                                                                |
| 6           | 42 (+ $\alpha$ )            | 50.000 (0)                                                                |
| 7           | 35 (0)                      | 22.000 (- $\alpha$ )                                                      |
| 8           | 35 (0)                      | 78.000 (+ $\alpha$ )                                                      |
| 9 (C)       | 35 (0)                      | 50.000 (0)                                                                |
| 10 (C)      | 35 (0)                      | 50.000 (0)                                                                |
| 11 (C)      | 35 (0)                      | 50.000 (0)                                                                |

Para a composição do solo no reator foi realizada a mistura de 0,525 kg de solo estéril e 0,175 kg de solo retirado do reator inóculo, (R01). O biorreator empregado para este estudo foi do tipo bandeja em material plástico, apresentando uma massa total de 0,7 kg com 25% de inóculo (proporção de inóculo de acordo com testes preliminares) e suas dimensões eram de 20 x 14 x 7,3cm conforme mostra a Figura 11.

Para manter as temperaturas nos valores estudados foi montado um sistema de controle de temperatura que consistia de resistências elétricas espalhadas por uma caixa, semelhante a uma estufa, já que estas resistências estavam ligadas a um controlador que mantinha a temperatura constante dentro da caixa.



Figura 11 - Reatores do Tipo Bandeja utilizados no DCC 1.

Na partida do reator houve a contaminação com cada concentração de biodiesel bruto, (Tabela 4) obtendo-se um solo contaminado de acordo com os valores propostos no DCC.

Procedeu-se então à homogeneização, com auxílio de uma espátula de aço e fez-se a contagem de micro-organismos no início e final do processo. Em seguida os reatores foram levados a estufa confeccionada de modo a manter a temperatura constante ao longo do processo.

No decorrer do processo, foi realizado a homogeneização por revolvimento do solo, com auxílio de uma espátula de aço, a cada dois dias e a quantificação de óleo remanescente no solo por extração com hexano e posteriormente analisado em analisador de TPH Modelo Buck HC-404 a cada 7 dias de processo. O acompanhamento do crescimento de micro-organismos foi verificado a cada 15 dias, empregando a técnica 'pour plate'. A umidificação do reator foi realizada semanalmente de modo a manter o solo sempre com 50% da sua capacidade de retenção de água. Na água usada para umidificação foi adicionada  $K_2HPO_4$  e  $KH_2PO_4$  (fontes de fósforo – P); como  $NH_4NO_3$  e Levedura Cervejeira Autolizada (fontes de nitrogênio – N) para a correção da relação C:N:P – 100:10:1. Foi realizado o acompanhamento do pH ao longo do processo. O experimento total foi realizado em 30 dias.

#### 3.5.3.2 - 2º Planejamento: Temperatura e Concentração de Biodiesel em Reator Rotativo em Sistema Fechado

Neste estudo foi realizado um planejamento composto central para avaliar a melhor temperatura e concentração de biodiesel na biorremediação do solo contaminado com biodiesel bruto no reator tipo rotativo.

Para o desenvolvimento do DCC foram escolhidas 2 variáveis em dois níveis com mais 3 repetições no ponto central e mais 4 experimentos no ponto axial, com  $\alpha$  de rotabilidade de 1,4142 e todos os experimentos com réplicas. Para análise dos resultados foi empregado o software *Statistica 7.0*. A Tabela 5 apresenta a matriz do planejamento, com as variáveis do processo e seus respectivos valores codificados e reais, de acordo com os níveis inferiores, centrais e superiores adotados.

Este planejamento foi escolhido com o propósito de verificar a influência das variáveis (temperatura e concentração de biodiesel) no processo de remoção de BB.

As variáveis independentes deste processo foram:

$X_1$  – Temperatura;

X<sub>2</sub> – Concentração de Biodiesel;

No planejamento foi adotado como resposta (variável dependente) o resultado de remoção de BB. Além disto, foi realizado o acompanhamento do pH e a correção da umidade ao longo do processo.

Os 11 experimentos realizados, conforme a matriz obtida pelo DCC tiveram duração de 30 dias, para garantir o tempo necessário para que houvesse degradação dos contaminantes presentes no solo.

Tabela 5 - Matriz do planejamento experimental 02.

| Experimento | VARIÁVEIS                   |                                                                           |
|-------------|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
|             | (X1)<br>Temperatura<br>[°C] | (X2)<br>Concentração Biodiesel<br>[mg BB em TPH.kg <sup>-1</sup> de solo] |
| 1           | 30 (-1)                     | 30.000 (-1)                                                               |
| 2           | 30 (-1)                     | 70.000 (+1)                                                               |
| 3           | 40 (+1)                     | 30.000 (-1)                                                               |
| 4           | 40 (+1)                     | 70.000 (+1)                                                               |
| 5           | 28 (-α)                     | 50.000 (0)                                                                |
| 6           | 42 (+α)                     | 50.000 (0)                                                                |
| 7           | 35 (0)                      | 22.000 (-α)                                                               |
| 8           | 35 (0)                      | 78.000 (+α)                                                               |
| 9 (C)       | 35 (0)                      | 50.000 (0)                                                                |
| 10 (C)      | 35 (0)                      | 50.000 (0)                                                                |
| 11 (C)      | 35 (0)                      | 50.000 (0)                                                                |

Para a composição do solo no biorreator foi realizada a mistura de 0,15 kg de solo estéril e 0,05 kg de solo retirado do reator inóculo (R01), no qual já havia a presença de micro-organismos desenvolvidos e adaptados (cultura mista C1). O reator empregado para este estudo foi do tipo rotativo feitos em material plástico apresentando uma massa total de 0,2 kg com 25% de inóculo (proporção de inóculo de acordo com testes preliminares) com um volume de 550 mL conforme mostra a Figura 12. 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 a rotação constante. Conforme mostra a Figura 13, há também um resfriador com funcionamento intermitente de modo a manter a temperatura do motor ideal e um sistema de resistências para a manutenção da temperatura constante durante o processo.



Figura 12 - Reatores do Tipo Rotativo utilizados no DCC 2.

Na partida do reator houve a contaminação com determinada massa de biodiesel bruto, obtendo-se um solo contaminado de acordo com os valores propostos no DCC (Tabela 5).

Procedeu-se então a contagem de micro-organismos, em seguida os reatores foram levados para o aparato experimental onde a temperatura era mantida constante para cada ponto do planejamento experimental. Os biorreatores possuíam uma rotação de aproximadamente 10 RPM.

No decorrer do processo, tanto as análises realizadas para quantificação de óleo remanescente e acompanhamento do crescimento dos micro-organismos quanto a umidificação e correção da relação C:N:P seguiram os mesmos métodos e tempos de realização que foram feitos no Planejamento Experimental 01. Foi realizado o acompanhamento do pH ao longo do processo. O experimento total foi realizado em 30 dias.



Figura 13 - Aparato completo utilizado no DCC 2.

#### 3.5.3.3 - 3º Planejamento: Relação C:N e Relação C:P em Reator Bandeja em Sistema Fechado

Neste estudo foi realizado um planejamento composto central para avaliar a melhor relação C:N e relação C:P na biorremediação do solo contaminado com biodiesel bruto no reator tipo bandeja.

Para o desenvolvimento do DCC foram escolhidas 2 variáveis em dois níveis com mais 3 repetições no ponto central e mais 4 experimentos no ponto axial, com  $\alpha$  de rotabilidade de 1,4142 e todos os experimentos com réplicas. Para análise dos resultados foi empregado o software *Statistica 7.0*. A Tabela 6 apresenta a matriz do planejamento, com as variáveis do processo e seus respectivos valores codificados e reais, de acordo com os níveis inferiores, centrais e superiores adotados.

As variáveis independentes deste processo foram:

$X_1$  – Relação C:N;

$X_2$  – Relação C:P;

No planejamento foi adotado como resposta (variável dependente) o resultado de remoção de BB. Além disto, foi realizado o acompanhamento do pH e a correção da umidade ao longo do processo.

Os 11 experimentos realizados, conforme a matriz obtida pelo DCC tiveram duração de 30 dias, para garantir o tempo necessário para que houvesse degradação dos contaminantes presentes no solo.

Tabela 6 - Matriz do planejamento experimental 03.

| Experimento | VARIÁVEIS                      |                                 |
|-------------|--------------------------------|---------------------------------|
|             | (X1)<br>Relação C:N<br>[100:N] | (X2)<br>Relação C:P<br>[100:P]] |
| 1           | 5 (-1)                         | 0,5 (-1)                        |
| 2           | 5 (-1)                         | 1,5 (+1)                        |
| 3           | 15 (+1)                        | 0,5 (-1)                        |
| 4           | 15 (+1)                        | 1,5 (+1)                        |
| 5           | 3 (- $\alpha$ )                | 1 (0)                           |
| 6           | 17 (+ $\alpha$ )               | 1 (0)                           |
| 7           | 10 (0)                         | 0,3 (- $\alpha$ )               |
| 8           | 10 (0)                         | 1,7 (+ $\alpha$ )               |
| 9 (C)       | 10 (0)                         | 1 (0)                           |
| 10 (C)      | 10 (0)                         | 1 (0)                           |
| 11 (C)      | 10 (0)                         | 1 (0)                           |

Para a composição do solo no reator foi realizada a mistura de 0,525 kg de solo estéril e 0,175 kg de solo retirado do reator inóculo (R01). O reator empregado para este estudo foi do tipo bandeja feitos em material plástico apresentando uma massa total de 0,7 kg com 25% de inóculo (proporção de inóculo de acordo com testes preliminares) e suas dimensões eram de 20 x 14 x 7,3cm conforme mostra a Figura 14.



Figura 14 - Reatores do Tipo Bandeja utilizados no DCC 3.

Na partida do reator houve a contaminação com 49g de biodiesel bruto. Procedeu-se então à homogeneização, com auxílio de uma espátula de aço e fez-se a contagem de micro-organismos.

No decorrer do processo, tanto as análises realizadas para quantificação de óleo remanescente e acompanhamento do crescimento dos micro-organismos quanto a umidificação e correção da relação C:N:P seguiram os mesmos métodos e tempos de realização que foram feitos no Planejamento Experimental 01. Foi realizado o acompanhamento do pH ao longo do processo. O experimento total foi realizado em 30 dias.

#### 3.5.4 Avaliação da remoção de Biodiesel Bruto (BB) com o tempo de processo visando a validação de dados.

Nos reatores biológicos usados nesta avaliação foram realizados os processos de biorremediação do solo. Neste trabalho, foram realizadas 2 avaliações de remoção de BB, cada uma avaliando um tipo de variável otimizada ao longo do DCC 1 e DCC 3, que visam validar os dados obtidos.

##### 3.5.4.1 - 1ª Avaliação da Remoção de Biodiesel Bruto (BB): Avaliação da Temperatura Otimizada e Temperatura Ambiente.

Neste estudo foram realizados 4 experimentos para avaliar a melhor temperatura na biorremediação do solo contaminado com biodiesel bruto no reator tipo bandeja. A temperatura otimizada foi obtida empregando o software *Maple 15.0* através do tratamento estatístico realizado com os valores apresentados no DCC 1. A concentração de biodiesel utilizada não foi a otimizada, devido aos baixos valores de contaminação apresentados, como a melhor condição com maior remoção de BB, quando comparados a uma contaminação real. Por isso optou-se pelo uso de 50.000 e 70.000 mg BB em TPH.kg<sup>-1</sup> de solo, valores estes já usados no DCC e que poderiam apresentar melhores resultados quando usada a temperatura otimizada ou à temperatura ambiente. A seguir é apresentada a Tabela 7 que apresenta as condições das avaliações testadas.

Tabela 7 - Condições dos experimentos da Avaliação 1.

| Experimento | VARIÁVEIS                   |                                                                           |
|-------------|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
|             | (X1)<br>Temperatura<br>[°C] | (X2)<br>Concentração Biodiesel<br>[mg BB em TPH.kg <sup>-1</sup> de solo] |
| 1           | Ambiente (28±2)             | 50.000                                                                    |
| 2           | Ambiente (28±2)             | 70.000                                                                    |
| 3           | Otimizada                   | 50.000                                                                    |
| 4           | Otimizada                   | 70.000                                                                    |

Na avaliação foi adotado como resposta a remoção de BB. Além disto, foi realizado o acompanhamento do pH e a correção da umidade ao longo do processo.

Os 4 experimentos realizados, com réplicas, tiveram duração de 21 e 28 dias nas temperaturas otimizada e ambiente, respectivamente, para garantir o tempo necessário para que houvesse degradação dos contaminantes presentes no solo.

Para a composição do solo no reator foi realizada a mistura de 0,525 kg de solo estéril e 0,175 kg de solo retirado do reator inóculo (R01). O reator empregado para este estudo foi do tipo bandeja feitos em material plástico apresentando uma massa total de 0,7 kg com 25% de inóculo (proporção de inóculo de acordo com testes preliminares) e suas dimensões eram de 20 x 14 x 7,3cm.

Na partida do reator houve a contaminação com determinada massa de biodiesel bruto, obtendo-se um solo contaminado de acordo com os valores propostos na avaliação (Tabela 7).

Procedeu-se então à homogeneização, com auxílio de uma espátula de aço e fez-se a contagem de micro-organismos. Em seguida os reatores foram deixados no ambiente (R1 e R2) e outros levados a estufa confeccionada (R3 e R4) de modo a manter a temperatura constante ao longo do processo.

No decorrer do processo, tanto as análises realizadas para quantificação de óleo remanescente e acompanhamento do crescimento dos micro-organismos quanto a umidificação e correção da relação C:N:P seguiram os mesmos métodos e tempos de realização que foram feitos no Planejamento Experimental 01. Foi realizado o acompanhamento do pH ao longo do processo.

#### 3.5.4.2 - 2º Avaliação da Remoção de Biodiesel Bruto (BB): Avaliação da Relação de Nutrientes Otimizada

Neste estudo foram realizados 2 experimentos para avaliar a influência da correção da relação C:N:P na biorremediação do solo contaminado com biodiesel bruto no reator tipo bandeja. Esta relação C:N:P foi otimizada utilizando o software *Maple* 15.0 através do tratamento estatístico realizado com os valores apresentados no DCC 3, vale salientar que a temperatura otimizada usada na avaliação 1, também foi utilizada nestes experimentos. A concentração de biodiesel utilizada não foi a otimizada no DCC 1 e nem mesmo a obtida como melhor concentração no estudo da avaliação 1. Devido aos bons resultados obtidos na Avaliação 1, optou-se por aumentar as concentrações de contaminantes empregados nesta etapa a valores que pudessem corresponder à escala de um grande acidente, ou seja, com altas

concentrações de contaminantes. Por isso utilizou-se 100.000 e 120.000 mg BB em TPH.kg<sup>-1</sup> de solo, valores estes bem superiores aqueles utilizados no DCC e que poderiam apresentar resultados satisfatórios quando usada a temperatura e a relação C:N:P otimizada. A seguir é apresentada a Tabela 8 com as condições desta avaliação:

Tabela 8 - Condições dos experimentos da Avaliação 2.

| Experimento | VARIÁVEIS                   |                                                                           |
|-------------|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
|             | (X1)<br>Temperatura<br>[°C] | (X2)<br>Concentração Biodiesel<br>[mg BB em TPH.kg <sup>-1</sup> de solo] |
| 1           | Otimizada                   | 100.000                                                                   |
| 2           | Otimizada                   | 120.000                                                                   |

Na avaliação foi adotado como resposta a remoção de BB. Além disto, foi realizado o acompanhamento do pH e a correção da umidade ao longo do processo.

Os 2 experimentos realizados com réplicas, tiveram duração de 42 dias na temperatura e relação C:N:P otimizada, para garantir o tempo necessário para que houvesse degradação dos contaminantes presentes no solo.

Para a composição do solo no reator foi realizada a mistura de 0,525 kg de solo estéril e 0,175 kg de solo retirado do reator inóculo (R01). O reator empregado para este estudo foi do tipo bandeja feitos em material plástico apresentando uma massa total de 0,7 kg com 25% de inóculo (proporção de inóculo de acordo com testes preliminares) e suas dimensões eram de 20 x 14 x 7,3cm.

Na partida do reator houve a contaminação com determinada massa de biodiesel bruto, obtendo-se um solo contaminado de acordo com os valores propostos na avaliação.

Procedeu-se então à homogeneização, com auxílio de uma espátula de aço e fez-se a contagem de micro-organismos. Em seguida os reatores foram levados a estufa confeccionada (R1 e R2) de modo a manter a temperatura constante ao longo do processo. A Figura 15 mostra a estufa confeccionada utilizada.



Figura 15 – Estufa confeccionada para manter a temperatura dos experimentos constante.

No decorrer do processo, tanto as análises realizadas para quantificação de óleo remanescente e acompanhamento do crescimento dos micro-organismos quanto a umidificação e correção da relação C:N:P seguiram os mesmos métodos e tempos de realização que foram feitos no Planejamento Experimental 01. Foi realizado o acompanhamento do pH ao longo do processo.

### **3.6. 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 quantitativas.

#### **3.6.1 Quantificação Microbiológica**

Todo o material usado na quantificação microbiológica foi devidamente esterilizado, autoclavado-se a pressão relativa de 1 atm por 15 minutos, os meios contendo ágar eram autoclavados a pressão relativa de 0,5 atm por 15 min, e todo o procedimento foi realizado em câmara bacteriológica (Labconco purifier class II) ou em presença de chama.

#### 3.6.1.1 Quantificação Celular de Bactérias

Uma amostra de 10g de solo era transferida para um erlenmeyer de capacidade 250 mL, e adicionava-se 100 mL de solução salina (0,9% NaCl) esterilizada, e agitava-se o sistema a fim de homogeneizar a amostra no meio. A seguir eram realizadas diluições sucessivas, de acordo com o tempo de processo, a partir de 1 mL desta solução, em 9 mL de solução salina. Uma amostra de 3 mL de cada diluição era coletada de forma a distribuir 1 mL para cada placa de petri, e empregando-se a técnica *pour plate* (APHA, 1992), em cada placa era adicionado o meio ágar nutriente (Extrato de carne, 3 g/L; Peptona, 10 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,00 g/L; NaCl, 5 g/L; ágar-ágar, 15-20 g/L; pH, 7,4-7,6) e posteriormente as amostras eram incubadas a 30 ± 10°C por 48 horas. Procedia-se a contagem de unidades formadoras de colônias e determinava-se o número de células por grama de amostra.

#### 3.6.2 Quantificação de Biodiesel Bruto

##### 3.6.2.1 BB (Biodiesel Bruto)

A análise foi realizada através da metodologia modificada de VIEIRA *et al* (2007). Antes de cada análise, foi pesada uma amostra de 2 g de solo da qual o contaminante era extraído pela adição de 10 mL de solvente (n-hexano) em um béquer sob agitação por 15 minutos. Após a separação de fases, a amostra da fase orgânica era retirada com uma pipeta volumétrica (100 µL), colocada em uma cubeta para leitura da absorbância no analisador de TPH Modelo Buck HC-404, e através de uma curva de calibração feita previamente, era quantificada a concentração de contaminantes no solo. A análise de TPH, citada na literatura, pode caracterizar o teor de óleo presente no biodiesel bruto, pois a determinação de TPH 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 (NASCIMENTO, 2003).

##### 3.6.2.2 Cromatógrafo – Quantidade e Teor dos Ésteres

O acompanhamento do teor de ésteres presente no solo ao longo do processo foi realizado de acordo com a DIN EN 14103, como é mostrado no anexo I.

### 3.6.3 Nutrientes

#### 3.6.3.1 Análise de Nitrogênio Total – Método de Kjeldahl

A análise de nitrogênio total de solos geralmente é realizada através do método de Kjeldahl, através do qual a amostra é digerida com ácido sulfúrico concentrado sob aquecimento, o que transforma todo o nitrogênio orgânico em íons amônio. Numa etapa subsequente, a solução obtida é alcalinizada com hidróxido de sódio concentrado e a amônia produzida nessa etapa é destilada e captada por uma solução de ácido bórico, que então é titulada com ácido padronizado (EMBRAPA, 2010). No anexo I pode ser encontrado o método detalhadamente.

#### 3.6.3.2 Análise de Fósforo Disponível

O objetivo da análise química do fósforo do solo é determinar qual a quantidade deste nutriente que o solo será capaz de fornecer aos micro-organismos para se realizar a biorremediação. Assim, as formas de fósforo do solo têm diferentes capacidades de dessorção e abastecimento da solução do solo, segundo sua natureza química e energia de ligação. No anexo I está a análise detalhada. Esta análise é usada e foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Análise de Solos – LABAS do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neste Capítulo, será abordada a classificação e características apresentadas pelo solo no início dos trabalhos, os testes preliminares realizados para determinação de faixas de trabalho ao longo do planejamento composto central, além dos efeitos da temperatura com concentração de biodiesel e relação C:N com relação C:P na biorremediação do solo, aplicando um planejamento composto central e avaliando as respostas de biorremoção de biodiesel bruto. Analisando-se subsequentemente o efeito das variáveis, que apresentaram melhores resultados do DCC, em avaliações de modo a validar os dados obtidos.

### **4.1. Solo**

Na Tabela 9 são mostrados os resultados da caracterização físico-química e microbiológica, além da composição granulométrica da amostra de solo usado.

Ao analisar os dados de granulometria apresentados na Tabela 9, pode-se classificar o solo empregado neste estudo como argila arenosa, conforme o diagrama triangular das classes textuais do solo apresentado por PREVEDELLO (1996).

Segundo o Serviço Nacional de Levantamento e Conservação do Solo (EMBRAPA, 1990), este solo é classificado como Latossolo vermelho-escuro distrófilo, argilo arenoso com textura argilosa, fase cerrado tropical e com relevo suave ondulado.

Utilizando a classificação unificada dos solos (CETESB, 1992) para os dados granulométricos do solo, através do diagrama triangular de Ferit, conclui-se que este solo configura-se como uma mistura de areia, argila e material ligante (aglutinante argiloso), sendo que mais de 30% dos seus grãos passaram pela peneira Tyler 200#.

O solo possui pH ácido, 5,31, o que é característico da maioria dos solos brasileiros. A análise do solo mostra ainda que este é extremamente pobre em nitrogênio e fósforo, elemento limitante em processos de biodegradação, mostrando a necessidade de correções.

Tabela 9 - Caracterização do solo.

| Físico-química                                |              |                        |
|-----------------------------------------------|--------------|------------------------|
| Granulometria                                 | Areia Grossa | 0,3%                   |
|                                               | Areia média  | 5,3%                   |
|                                               | Areia Fina   | 3,8%                   |
|                                               | Silte        | 35,5%                  |
|                                               | Argila       | 45,6%                  |
| Limite de liquidez                            |              | 42,5                   |
| Limite de plasticidade                        |              | 29,2                   |
| Índice de plasticidade                        |              | 13,3                   |
| pH                                            |              | 5,31 ± 0.10            |
| Umidade (visual)                              |              | 14 %                   |
| Capacidade de retenção de água (método funil) |              | 28,0 ± 0,01 %          |
| Matéria Orgânica (g/kg)                       |              | 0,8                    |
| Microbiológica                                |              |                        |
| Bactérias aeróbias (cels/ g solo)             |              | 1,10 x 10 <sup>4</sup> |
| Inorgânica                                    |              |                        |
| Passimilável (mg/kg solo)                     |              | 3,01                   |
| Corgânico (g/kg solo)                         |              | 12,5                   |
| Ntotal (g/kg solo)                            |              | 0,12                   |
| Relação C:N:P                                 |              | 100 : 0,77 : 0,019     |

Segundo a CETESB (1992), o solo argilo arenoso apresenta comportamento hídrico, que é dependente das condições de manipulação impostas (nível de incorporação de água, forma de revolvimento, etc). Esse fato explica a formação de aglomerados de tamanhos variados durante a manipulação do mesmo, isto é, quando era realizada sua homogeneização, durante o procedimento de adição de água, para controle da umidade. O tamanho e a forma dos aglomerados gerados pode decorrer do tipo de argilo mineral presente e principalmente de sua estrutura, já que a forma de arranjo das partículas e a organização de cargas na superfície dos mesmos determinam a intensidade de forças de atração ou repulsão, refletindo, consequentemente no grau de coesão do solo como um todo (CETESB, 1992).

A umidade higroscópica desse solo é baixa, indicando a necessidade de correção da umidade durante o processo de biodegradação. A umidade ótima para biodegradação de hidrocarbonetos segundo MEYER (2011 *apud* PAUL & CLARK, 1989) encontra-se na faixa de 25 e 85 % da capacidade de retenção de água. Outro autor, SILVA (2004 *apud* EPA, 1994) 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. Neste trabalho a capacidade de retenção de água adotada foi de 28,0 %, conforme metodologia no item 3.2.2.

Verifica-se na Tabela 9 que o solo apresenta uma considerável população de bactérias aeróbias,  $1,10 \times 10^4$  cels/g solo, mesmo com estes valores de bactérias presentes a relação C:N:P de 100:0,77:0,019 é baixa. Neste caso, para o processo de biorremediação, torna-se necessário a correção, mediante adição de fontes nitrogenadas e fosfatadas.

A relação C:N:P é limitante no processo de biorremediação. No caso de Nitrogênio e Fósforo, a relação adequada C:N:P 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 *apud* ARROYO & QUESADA, 2002; RISER-ROBERTS, 1998).

## **4.2. Ensaio Preliminares**

### **4.2.1- Adaptação da Cultura Mista ao Biodiesel em Meio Líquido**

A Figura 16 apresenta a evolução da capacidade de biodegradação da cultura mista, que foi acompanhada pela análise de remoção de DQO e COT. O critério de aumento das concentrações de combustível empregado foi relacionado com a eficiência de remoção de DQO. Quando a eficiência era superior ou igual a 60% cultivava-se a cultura previamente adaptada em meio contendo maior concentração de contaminantes. Este mesmo procedimento foi adotado por VIEIRA (2004) em seu estudo de adaptação de culturas mistas ao efluente contendo óleo diesel e gasolina. De acordo com KATAOKA (2001) *apud* OLIVEIRA (2008), alguns fatores que podem interferir na taxa de crescimento e consequentemente na taxa de biodegradação como a biodegradabilidade, a toxicidade e a quantidade do poluente. Para a biodegradação recomenda-se colocar o substrato em menores parcelas com maior frequência ao invés de uma maior acrescentada de uma única vez.

Pode-se observar pela Figura 16 que até a concentração de 4% v/v de contaminantes a remoção de DQO e COT obtida foi em média de 82,0 e 85,8%, o que indicou que o critério estabelecido para o aumento progressivo de contaminante foi atingido (acima de 60% de remoção de DQO), mostrando que a cultura foi capaz de biodegradar os contaminantes. Como o critério de seleção foi atingido, conduziu-se o aumento gradativo de concentração da mistura de

contaminante até a concentração máxima conseguida de 8%v/v. Nesta concentração apesar da remoção ter caído para 61%, em virtude do aumento da matéria orgânica, a concentração de células obtida foi da ordem de  $10^{10}$  UFC/mL, mostrando que a cultura ainda apresentou período de adaptação (Tabela 10).

Além disto, na Figura 16 pode-se verificar a variação da porcentagem de remoção de COT que variou de 65 a 84%, mostrando que a cultura foi capaz de biodegradar o biodiesel bruto.

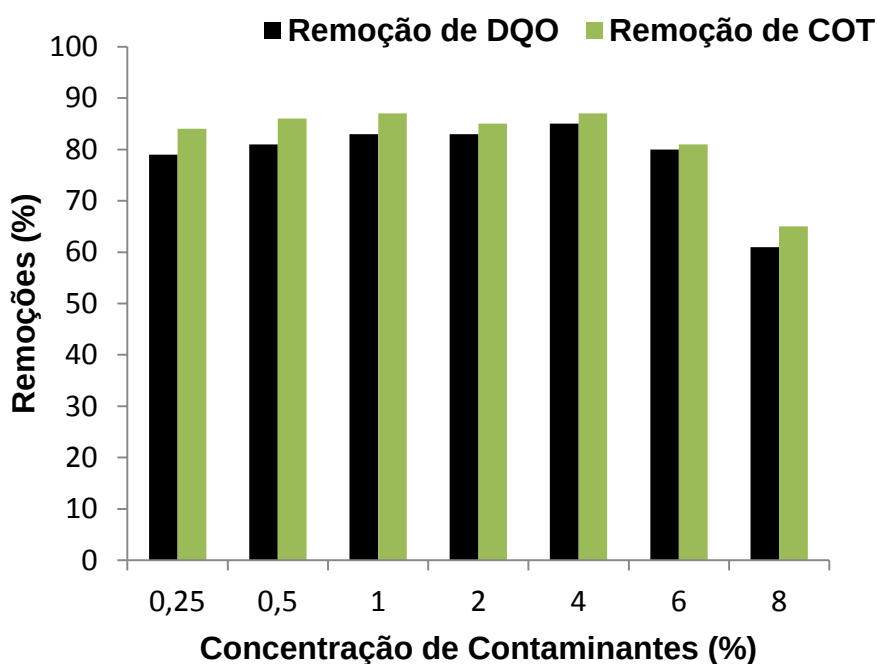


Figura 16 - Comportamento da remoção com o aumento gradual de contaminantes.

Vale salientar, que para todos os experimentos o tempo de processo foi fixado em 7 dias, mas em algumas concentrações (4, 6 e 8%v/v) este tempo não foi suficiente para obter uma remoção de no mínimo de 60%, então o processo teve duração de 14 dias. Para estes casos foi realizado um novo cultivo (reaclimação) nas mesmas concentrações. Por isto, o tempo na Tabela 10 apresenta-se variável.

Tabela 10 - Porcentagem de remoção de DQO e COT para a cultura mista C1 em função da concentração de contaminantes (biodiesel bruto).

| <b>Contaminantes<br/>(% v/v de biodiesel +<br/>glicerina)</b> | <b>Eficiência de<br/>Remoção<br/>de DQO (%)</b> | <b>Eficiência de Remoção de<br/>COT (%)</b> | <b>Tempo de<br/>Operação<br/>(dias)</b> |
|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 0,25                                                          | 79,0 ± 2                                        | 84 ± 4                                      | 7                                       |
| 0,50                                                          | 81,0 ± 3                                        | 86 ± 2                                      | 7                                       |
| 1,0                                                           | 83,0 ± 4                                        | 87 ± 3                                      | 7                                       |
| 2,0                                                           | 83,0 ± 3                                        | 85 ± 1                                      | 7                                       |
| 4,0                                                           | 85,0 ± 4                                        | 87 ± 3                                      | 14                                      |
| 6,0                                                           | 80,0 ± 2                                        | 81 ± 2                                      | 14                                      |
| 8,0                                                           | 61,0 ± 2                                        | 65 ± 2                                      | 14                                      |

A Figura 17 apresenta o comportamento do crescimento da cultura nas diversas concentrações estudadas, mostrando que a cultura se adaptou às variações de concentrações dos contaminantes estudados. A concentração celular em 0 dias de processo foi da ordem de  $10^3$  UFC/mL.

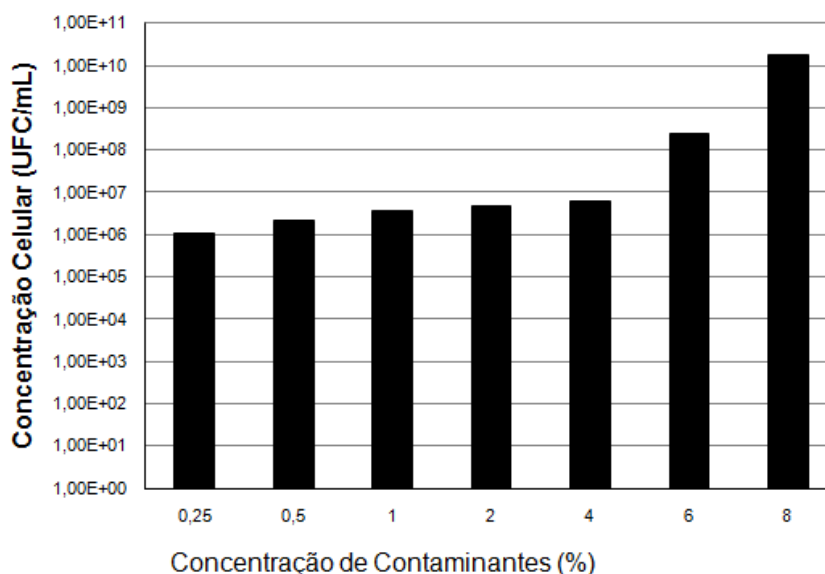


Figura 17 - Concentração celular após 7 dias de processo nas várias concentrações de mistura de contaminantes.

Por meio da Figura 17, observa-se que a cultura estudada apresentou crescimento significativo, mostrando que os repiques da cultura foram importantes para adaptá-la aos meios

com variáveis concentrações de contaminantes. O fato da cultura C1 ser advinda de local com histórico de contaminação por derivados de petróleo pode possivelmente justificar o seu desempenho frente a estes novos contaminantes.

#### 4.2.2- Adaptação da Cultura Mista ao Solo Contaminado

Após adaptação da cultura mista C1 aos contaminantes (biodiesel bruto) em meio líquido iniciou-se a adaptação da cultura ao solo contaminado.

O aumento de micro-organismos já adaptados aos contaminantes ao meio líquido para a inoculação no solo do reator R01 foi de  $10^9$  UFC/ml. Após 1 semana, a concentração microbiológica foi da ordem de  $10^2$  UFC/ml. Esta redução se deve ao início da adaptação microbiana em um meio onde a difusão dos nutrientes (essenciais às sínteses e para funções normais dos componentes celulares) é bem mais complexa quando comparado ao meio líquido.

Após 56 dias de processo, com o monitoramento da umidade e a realização da oxigenação do solo através de seu revolvimento no reator R01, a concentração celular determinada foi da ordem de  $10^{10}$  UFC/ml para bactérias e fungos. A Tabela 11 apresenta este acompanhamento.

Tabela 11- Acompanhamento da adaptação da cultura em solo contaminado (biodiesel e glicerina 8,0%v/v), com utilização de um *pool* de cultura mista na ordem de  $10^9$  UFC/mL.

| Micro-organismos                | Quantidade (UFC/mL) |                      |
|---------------------------------|---------------------|----------------------|
|                                 | 7 dias              | 56 dias              |
| Bactérias Heterotróficas Totais | $2 \times 10^2$     | $5,0 \times 10^{10}$ |
| Fungos                          | $8,5 \times 10^6$   | $1,0 \times 10^{10}$ |

A Tabela 11 também apresenta a quantificação de fungos da ordem de  $10^6$  UFC/ml após 1 semana com aumento considerável após os 56 dias de processo para  $10^{10}$  UFC/ml.

O valor de carbono orgânico total inicial verificado no solo contaminado apresentava 91,1g/kg de C, após 56 dias o valor do COT no reator passou para 36,2g/kg, o que significa uma redução de 60,2% de remoção de C do solo, mostrando que houve uma adaptação dos micro-organismos ao solo contaminado.

### 4.3. Experimentos de Biorremediação

Nos reatores biológicos usados neste trabalho foram realizados os processos de biorremediação do solo. Neste tópico são abordados os resultados dos 3 Planejamentos

Experimentais do tipo Delineamento Composto Central (DCC) realizados. Cada planejamento avaliou variáveis que poderiam interferir no processo de descontaminação do solo, além de avaliações que visaram validar os dados obtidos.

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.

#### *4.3.1 Perdas Abióticas*

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

Para inibição dos micro-organismos do reator abiótico, optou-se por autoclavar o solo, a 1 atm por 20 min, antes da adição de biodiesel bruto, umidificou-se o solo com uma solução de azida de sódio (2% p/v) durante o tempo de processo, observando-se, então a ausência de crescimento microbiano durante o experimento, conforme descrito por GUIMARÃES (2003).

A degradação abiótica do BB em TPH foi de  $4,16 \pm 0,28$  %. Esse resultado foi contabilizado nos valores de biodegradação do BB em TPH em todos os resultados realizados.

#### *4.3.2 Testes Preliminares*

Nesta seção encontram-se os resultados dos testes preliminares realizados de modo a identificar a melhor faixa de trabalho dentre as variáveis em estudo, como relação de micro-organismos nos reatores e concentração de biodiesel bruto que não sejam tóxicas aos micro-organismos.

##### 4.3.2.1 – Avaliação da Concentração de Micro-organismos

As Figuras 18 e 19 apresentam os comportamentos de crescimento celular e remoção de BB em TPH ao longo dos 111 dias de processo nos 4 biorreatores.

Pode-se observar pela Figura 18, que a quantidade inicial de micro-organismos encontra-se relacionada à fração adicionada de inóculo ao solo contaminado, onde maiores frações de inóculo proporcionaram maiores quantidades de micro-organismos inicialmente, mostrando que o procedimento adotado de inoculação foi adequado. Além disso, pelo perfil apresentado nesta mesma figura observa-se que após a inoculação (0 dias) a concentração de micro-organismos sofreu variações ao longo do processo de operação nos 4 biorreatores (R1 a R4) com acréscimos e decréscimos na concentração de micro-organismos. Este comportamento

sugere que durante o processo ocorreu uma readaptação dos micro-organismos às novas condições ambientais.

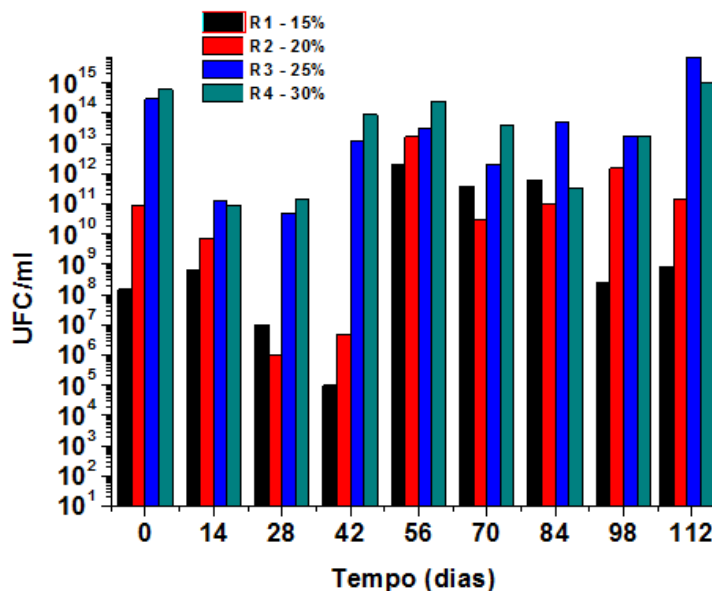


Figura 18 - Perfil de crescimento celular ao longo dos 111 dias de processo.

De modo geral, verifica-se na Figura 18, que as maiores frações de inóculo empregadas no início do processo promoveram aumento de micro-organismos ao final de 111 dias. Isto pode ser observado pelos resultados apresentados pelos reatores R3 e R4. Da mesma maneira, por meio da Figura 19 observa-se que os maiores valores de remoção foram observados nesses mesmos biorreatores (R3 e R4) com remoções de 45 e 51%, respectivamente. Sendo assim, para efetuar este trabalho foi escolhido a opção de 25% de inóculo (m/m) em cada biorreator já que as percentagens de remoção foram próximas e pela Figura 18 observou-se uma quantidade de micro-organismos muito semelhante ao final do experimento.

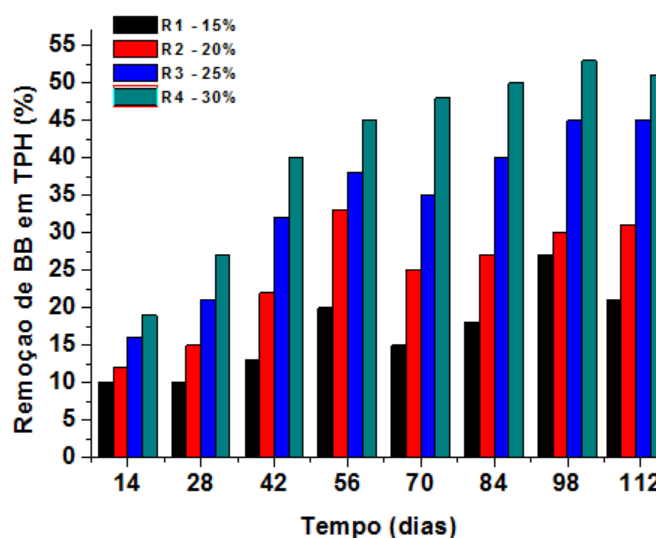


Figura 19 - Perfil de remoção de BB em TPH ao longo dos 111 dias de processo.

#### 4.3.2.2 – Avaliação da Concentração de Biodiesel Bruto em TPH

Na Figura 20 é apresentada a relação de decaimento dos contaminantes ao longo do processo de biorremediação.

É possível perceber pela Figura 20 que até 21 dias de processo praticamente não houve remoção considerável de BB em TPH, e que a partir deste período houve uma considerável queda na concentração de BB em TPH. Este período de maior queda na concentração de BB em TPH (a partir de 21 dias) coincide com a primeira correção na relação C:N:P (100:10:1) do processo. Isto mostra, efetivamente a importância da correção na relação C:N:P para o metabolismo dos micro-organismos envolvidos no processo e que consequentemente conduzem a uma maior biodegradação dos contaminantes.

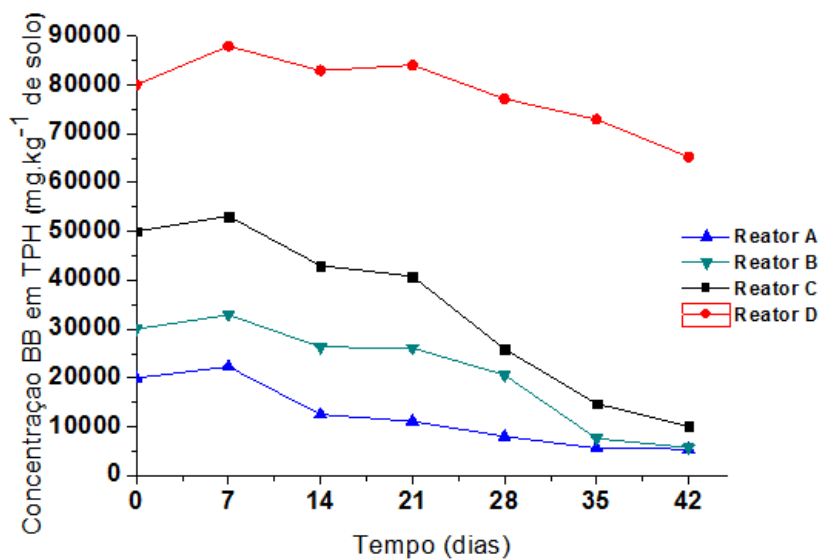


Figura 20 - Decaimento de BB em TPH ao longo dos 42 dias de processo.

As Figuras 21 e 22 mostram a diferença nas remoções de BB em TPH, bem como nas concentrações de micro-organismos com e sem ajuste da relação C:N:P.

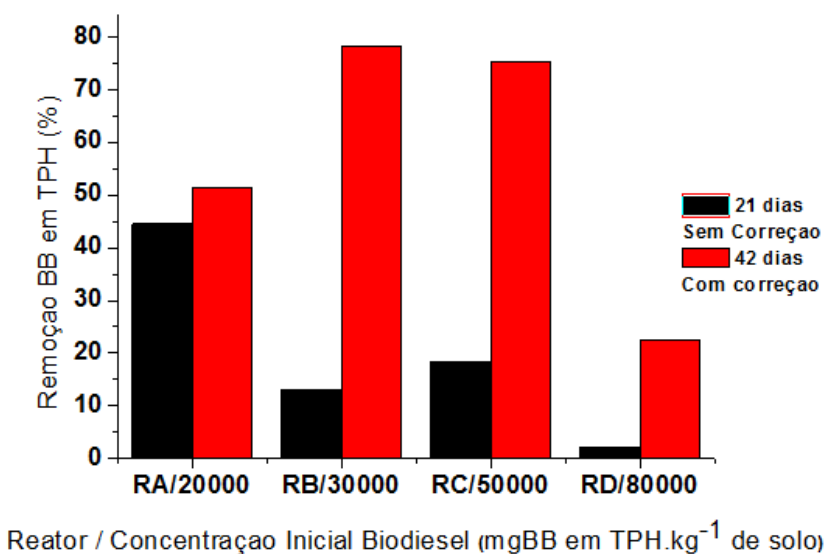


Figura 21 - Remoção de BB em TPH para cada reator nas condições 20.000, 30.000, 50.000 e 80.000 mg BB em TPH.kg<sup>-1</sup> de solo no tempo de 21 e 42 dias.

O ajuste da relação C:N:P, essencial na biorremediação, pois o seu controle aumentou em até 6 vezes o valor da remoção de contaminantes no solo, como no caso do RB (30.000 mg BB em TPH.kg<sup>-1</sup> de solo) onde até 21 dias houve 13,0% de remoção, enquanto no período de 21 a 42 dias (onde houve ajuste da relação C:N:P) obteve-se 78,16% de remoção de BB em TPH. É também importante salientar que houve um aumento considerável na quantidade de micro-organismos devido à correção de nutrientes, pois até 21 dias os reatores passaram da ordem de 10<sup>5</sup> a 10<sup>6</sup>, enquanto após correção atingiram valores de 10<sup>8</sup> no caso do RA, RB e RD.

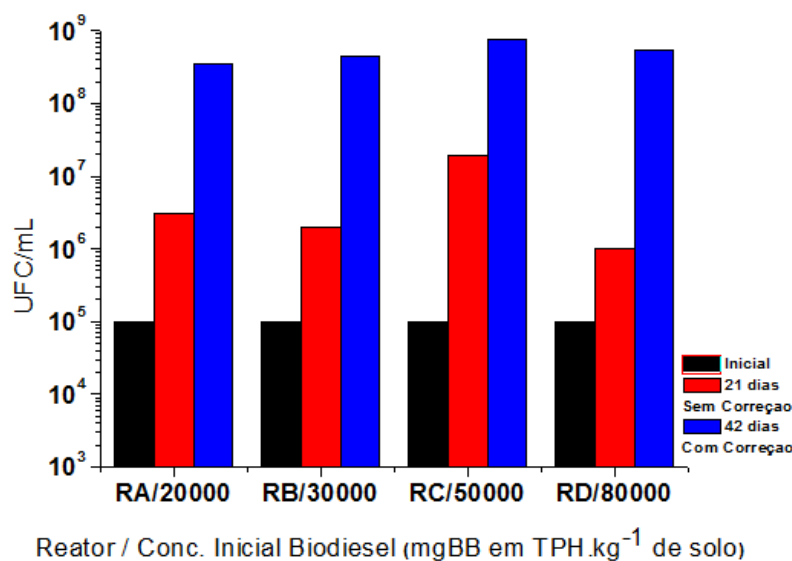


Figura 22 - Crescimento celular para cada reator nas condições 20.000, 30.000, 50.000 e 80.000 mg BB em TPH.kg<sup>-1</sup> de solo no tempo Inicial, 21 e 42 dias.

#### 4.3.3 Planejamento Composto Central

Nesta etapa do trabalho foi possível avaliar o quanto as variáveis influenciaram na biorremediação do solo contaminado com biodiesel bruto através do controle de variáveis (Temperatura e Concentração de Biodiesel) e da correção de nutrientes (Nitrogênio e Fósforo) utilizando dois tipos de biorreatores e para isso foram estabelecidos 3 planejamentos experimentais.

##### 4.3.3.1 - 1º Planejamento: Temperatura e Concentração de Biodiesel em Reator Bandeja em Sistema Fechado

A Tabela 12 mostra os valores codificados e originais das variáveis de estudo e a resposta remoção de BB em TPH. Observa-se nesta Tabela que a remoção de BB em TPH variou de 33,9% (experimento 8) a 100% (experimentos 3 e 7). Verifica-se também que os pontos centrais apresentaram uma pequena variação para a resposta, indicando uma boa repetibilidade dos resultados de remoção de BB em TPH do processo. Os resultados de remoção de BB em TPH mostraram-se promissores, pois para concentração de biodiesel bruto menor que 30.000 mg BB em TPH .kg<sup>-1</sup> de solo a remoção foi maior que 97% e os experimentos com concentração de biodiesel bruto de 50.000 mg BB em TPH .kg<sup>-1</sup> de solo apresentaram valor em torno de 90%, valor este que pode ser considerado alto, pois de acordo com GELLER (2000), concentrações de ordem maior que esta, podem ter efeito tóxico sobre os micro-organismos e assim inibir um tratamento eficaz.

Tabela 12 - Variáveis utilizadas no DCC 1 e sua resposta

| Experimento | X1               | X2                                                              | Remoção de BB em TPH (%) |
|-------------|------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------------|
|             | Temperatura (°C) | Concentração de Biodiesel (mg BB em TPH .kg <sup>-1</sup> solo) |                          |
| 1           | 30 (-1)          | 30.000 (-1)                                                     | 97,5                     |
| 2           | 30 (-1)          | 70.000 (1)                                                      | 62,1                     |
| 3           | 40 (1)           | 30.000 (-1)                                                     | 100,0                    |
| 4           | 40 (1)           | 70.000 (1)                                                      | 40,0                     |
| 5           | 28 (- $\alpha$ ) | 50.000 (0)                                                      | 91,6                     |
| 6           | 42 ( $\alpha$ )  | 50.000 (0)                                                      | 42,0                     |
| 7           | 35 (0)           | 22.000 (- $\alpha$ )                                            | 100,0                    |
| 8           | 35 (0)           | 78.000 ( $\alpha$ )                                             | 33,9                     |
| 9 (C)       | 35 (0)           | 50.000 (0)                                                      | 89,6                     |
| 10 (C)      | 35 (0)           | 50.000 (0)                                                      | 90,2                     |
| 11(C)       | 35 (0)           | 50.000 (0)                                                      | 90,8                     |

MEYER (2011) estudou contaminação com biodiesel comercial (B100) em dois tipos de solos, arenoso e argiloso, obtendo remoção de 74,52 e 97,00% respectivamente, em uma contaminação inicial de 26.400 mg.kg<sup>-1</sup>de solo. Por meio deste resultado é possível averiguar que neste trabalho foram alcançados resultados semelhantes nesta faixa de concentração.

A Tabela 13 mostra os coeficientes de regressão das variáveis e interações com parâmetros significativos e não significativos para a resposta remoção de BB em TPH, bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos.

A partir desta análise foi obtida a Equação 4.1:

$$\text{Remoção de BB em TPH (\%)} = 90,09 - 11,24.X_1 - 9,71.X_1^2 - 23,73.X_2 - 9,64.X_2^2 - 6,15.X_1.X_2 \quad (4.1)$$

Tabela 13 - Regressão múltipla para remoção de BB em TPH no DCC 1.

| Variáveis e interações             | Coeficiente de Regressão | Desvio   | t(5)     | p        |
|------------------------------------|--------------------------|----------|----------|----------|
| Termo Independente                 | 90,0867                  | 5,581999 | 16,13879 | 0,000017 |
| (X1) Temperatura (L)               | -11,2424                 | 6,871901 | -3,27200 | 0,022150 |
| Temperatura (Q)                    | -9,7134                  | 8,249115 | -2,35501 | 0,065153 |
| (X2) Concentração de Biodiesel (L) | -23,7298                 | 6,871901 | -6,90633 | 0,000975 |
| Concentração de Biodiesel (Q)      | -9,6368                  | 8,249115 | -2,33646 | 0,066673 |
| X1.X2                              | -6,15                    | 9,669621 | -1,27202 | 0,259313 |
| R <sup>2</sup> =0,932              |                          |          |          |          |

A Tabela 14 mostra os coeficientes de regressão das variáveis e interações com níveis de significância (p) menores que 10% para a resposta remoção de BB em TPH, após a eliminação de parâmetros não significativos.

O parâmetro não significativo, que foi desprezado para o nível de significância adotado foi apenas a interação entre as variáveis temperatura e concentração de biodiesel.

Tabela 14 - Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para remoção de BB em TPH no DCC 1.

| Variáveis e interações             | Coeficiente de Regressão | Desvio   | t(6)     | p        |
|------------------------------------|--------------------------|----------|----------|----------|
| Termo Independente                 | 90,0867                  | 5,862449 | 15,36674 | 0,000005 |
| (X1) Temperatura (L)               | -11,2424                 | 7,217158 | -3,11547 | 0,020704 |
| Temperatura (Q)                    | -9,7134                  | 8,663565 | -2,24235 | 0,066133 |
| (X2) Concentração de Biodiesel (L) | -23,7298                 | 7,217158 | -6,57594 | 0,000593 |
| Concentração de Biodiesel (Q)      | -9,6368                  | 8,663565 | -2,22468 | 0,067760 |
| R <sup>2</sup> =0,910              |                          |          |          |          |

A Equação 4.2 representa o modelo com as variáveis significativas codificadas para a resposta remoção de BB em TPH.

$$\text{Remoção de BB em TPH (\%)} = 90,09 - 11,24.X_1 - 9,71.X_1^2 - 23,73.X_2 - 9,64.X_2^2 \quad (4.2)$$

O coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>) obtido após o ajuste foi de 0,910, indicando que os resultados foram explicados pela equação empírica proposta com 91,0% da variabilidade dos dados. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 23.

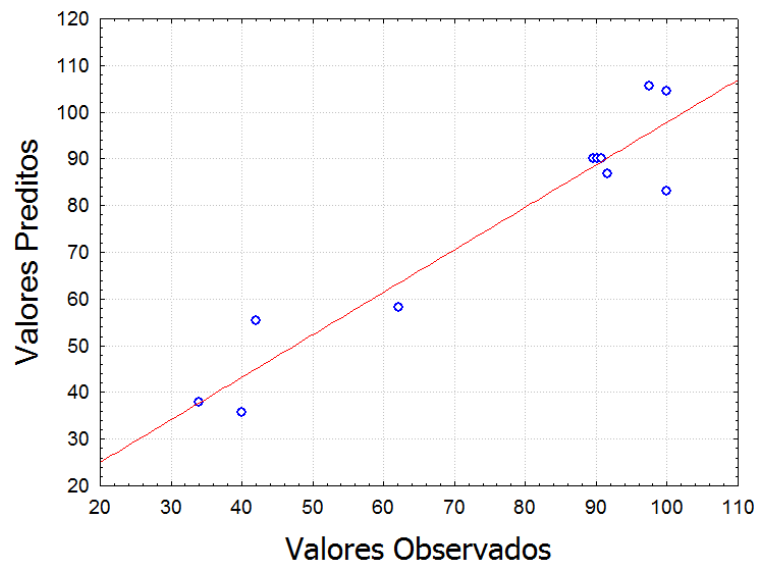


Figura 23 - Valores preditos por valores experimentais para a regressão múltipla com as variáveis significativas do DCC 1 para a resposta remoção de BB em TPH.

Na Figura 24 observa-se que os erros de ajustamento se mostram independentes e normalmente distribuídos em torno da reta, o que indica normalidade para a resposta remoção de BB em TPH.

Como o modelo foi significativo, foi possível construir as superfícies de resposta e definir regiões de interesse. A Figura 25 e 26 ilustram, respectivamente, a superfície de resposta e a curva de contorno em função da Temperatura (X1) e Concentração de Biodiesel (X2) para a remoção de BB em TPH.

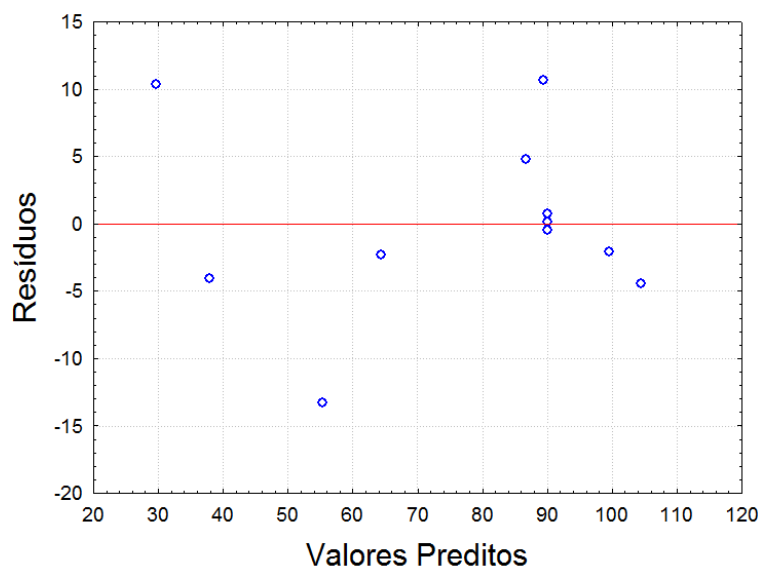


Figura 24 - Distribuição dos resíduos para a regressão múltipla com as variáveis significativas do DCC 1 para a resposta remoção de BB em TPH.

Nas Figuras 25 e 26 pode-se verificar que tanto a região de alta concentração de biodiesel bruto quanto de maiores temperaturas apresentam condição de mínima remoção de BB em TPH. Na Figura 26, pode-se observar que a região de otimização da temperatura foi de 28 – 36°C e a de concentração de biodiesel foi de 25.400 mg BB em TPH.kg<sup>-1</sup> de solo.

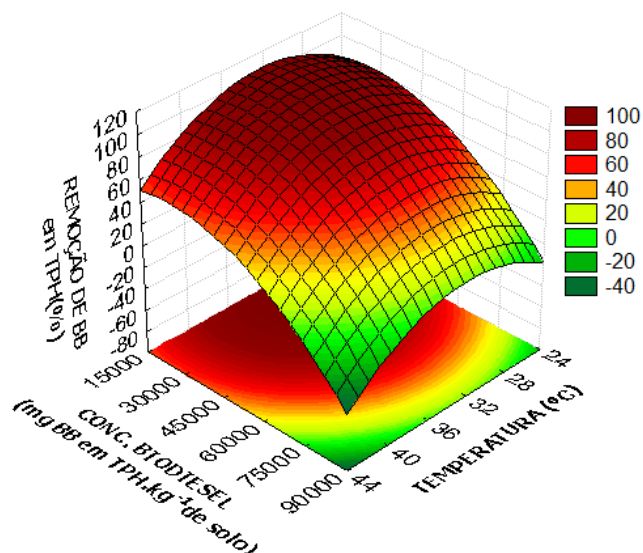


Figura 25 - Superfície de resposta para a resposta remoção de BB em TPH em função da temperatura e da concentração de Biodiesel.

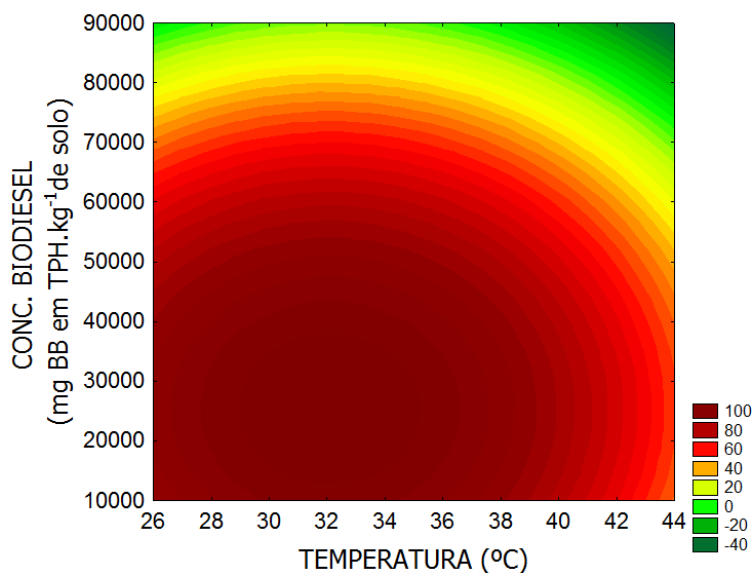


Figura 26 - Curva de contorno para a resposta remoção de BB em TPH em função da temperatura e da concentração de Biodiesel.

Na Figura 26 é importante salientar a influência da temperatura na remoção de BB em TPH, isto deve-se, principalmente, ao fato que em caso de acidentes não é possível escolher a quantidade de biodiesel bruto derramada e consequentemente sua concentração no solo. COLOMBO (2010) utilizou de atenuação natural como forma de biorremediação de solo contaminado com óleo diesel em diversas frações de biodiesel, além dos dois componentes

puros. Ele observou no caso do biodiesel puro (B100) com uma concentração inicial de 4%, uma remoção de 74,42% em 165 dias de testes em condições ambientes, o que segundo ele dificultou a degradação, pois havia épocas sem precipitação da chuva (umidade não controlada) além de concluir que em temperaturas abaixo de 21°C havia influência negativa na taxa de degradação. No caso deste trabalho que a temperatura foi alvo de estudo, quando esta foi mantida constante a 35°C em concentração de biodiesel de 50.000 mg BB em TPH.kg<sup>-1</sup> de solo, foram obtidas remoções de até 90,8% em 30 dias de processo, o que caracteriza como essencial ao estudo a variável temperatura.

Da mesma forma, BAPTISTA *et al* (2003) avaliou a biodegradação de solo contaminado com uma concentração inicial de aproximadamente 1% de TPH, em biorreatores em condições ambientes fazendo a correção C:N:P, esta essencial às atividades de biodegradação de óleos, obtendo remoção máxima de 44% de TPH em 45 dias de processo. Neste caso é importante observar que além da temperatura, a correção de nutrientes é extremamente vantajosa na biorremoção de contaminantes, e por esse motivo, este presente trabalho também teve o cuidado de realizar a cada 15 dias esta correção (C:N:P – 100:10:1) para obter estes bons resultados.

A discussão anterior mostra as vantagens da análise conjunta da influência das variáveis, utilizando o planejamento de experimento.

#### 4.3.3.2 - 2º Planejamento: Temperatura e Concentração de Biodiesel em Reator Rotativo em Sistema Fechado

A Tabela 15 mostra os valores codificados e originais das variáveis de estudo e a resposta remoção de BB em TPH. Observa-se nesta Tabela que a remoção de BB em TPH variou de 19,0% (experimento 4) a 100% (experimentos 1 e 5). Verifica-se também que os pontos centrais apresentaram uma pequena variação para a resposta, indicando uma boa repetibilidade do processo. O resultado de remoção de BB em TPH se mostrou promissor, principalmente para temperaturas menores, em torno de 28±2°C, onde foram encontradas as maiores remoções de BB em TPH independente da concentração inicial de biodiesel, chegando a valores de remoção de BB em TPH de 100%.

Tabela 15 - Variáveis utilizadas no DCC 2 e sua resposta.

| Experimento | X1               | X2                                                              | Remoção de BB em TPH (%) |
|-------------|------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------------|
|             | Temperatura (°C) | Concentração de Biodiesel (mg BB em TPH .kg <sup>-1</sup> solo) |                          |
| 1           | 30 (-1)          | 30.000 (-1)                                                     | 100                      |
| 2           | 30 (-1)          | 70.000 (1)                                                      | 70,3                     |
| 3           | 40 (1)           | 30.000 (-1)                                                     | 56                       |
| 4           | 40 (1)           | 70.000 (1)                                                      | 19                       |
| 5           | 28 (- $\alpha$ ) | 50.000 (0)                                                      | 100                      |
| 6           | 42 ( $\alpha$ )  | 50.000 (0)                                                      | 27                       |
| 7           | 35 (0)           | 22.000 (- $\alpha$ )                                            | 80                       |
| 8           | 35 (0)           | 78.000 ( $\alpha$ )                                             | 43                       |
| 9 (C)       | 35 (0)           | 50.000 (0)                                                      | 60                       |
| 10 (C)      | 35 (0)           | 50.000 (0)                                                      | 65                       |
| 11 (C)      | 35 (0)           | 50.000 (0)                                                      | 63,3                     |

CHEMLAL *et al* (2013) avaliou a biodegradação de solo contaminado com uma concentração inicial de aproximadamente 13.000 mg.de TPH.kg<sup>-1</sup> de solo, em biopilhas em condições controladas da relação C:N:P (100:10:1), umidade, pH e temperatura (15 a 40°C). A remoção máxima obtida por este autor foi de 85% de TPH em 76 dias de processo. Neste presente trabalho foram alcançados resultados semelhantes em maiores faixas de concentração (100% de remoção de BB em TPH em 30.000 e 50.000 mg BB em TPH.kg<sup>-1</sup> de solo) em menores tempos de processo, neste caso, 30 dias.

A Tabela 16 mostra os coeficientes de regressão das variáveis e interações com parâmetros significativos e não significativos para a resposta remoção de BB em TPH, bem como os valores dos níveis de significância. A partir desta análise foi obtida a Equação 4.3:

$$\text{Remoção de BB em TPH (\%)} = 62,78 - 24,94.X_1 + 0,07.X_1^2 - 14,96.X_2 - 0,95.X_2^2 - 1,82.X_1.X_2 \quad (4.3)$$

Tabela 16 - Regressão múltipla para remoção de BB em TPH no DCC 2

| Variáveis e interações             | Coeficiente de Regressão | Desvio   | t(5)     | p        |
|------------------------------------|--------------------------|----------|----------|----------|
| Termo Independente                 | 62,7834                  | 1,813192 | 34,6259  | 0,000000 |
| (X1) Temperatura (L)               | -24,9366                 | 2,232189 | -22,3427 | 0,000003 |
| Temperatura (Q)                    | 0,0673                   | 2,679547 | 0,0502   | 0,961899 |
| (X2) Concentração de Biodiesel (L) | -14,9624                 | 2,232189 | -13,4061 | 0,000041 |
| Concentração de Biodiesel (Q)      | -0,9531                  | 2,679547 | -0,7114  | 0,508630 |
| X1.X2                              | -1,8244                  | 3,410968 | -1,1617  | 0,297803 |
| R <sup>2</sup> =0,993              |                          |          |          |          |

A Tabela 17 mostra os coeficientes de regressão das variáveis e interações com níveis de significância (p) menores que 10% para a resposta remoção de BB em TPH, após a eliminação de parâmetros não significativos.

Os parâmetros não significativos que foram desprezados para o nível de significância adotado foram os de termo quadrático das duas variáveis (temperatura e concentração de biodiesel) e a interação entre as variáveis (temperatura e concentração de biodiesel).

Tabela 17 - Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para remoção de BB em TPH no DCC 2.

| Variáveis e interações             | Coeficiente de Regressão | Desvio   | t(8)     | p        |
|------------------------------------|--------------------------|----------|----------|----------|
| Termo Independente                 | 62,1455                  | 0,881120 | 70,5302  | 0,000000 |
| (X1) Temperatura (L)               | -24,9366                 | 2,076820 | -24,0142 | 0,000000 |
| (X2) Concentração de Biodiesel (L) | -14,9624                 | 2,076820 | -14,4090 | 0,000001 |
| $R^2=0,99$                         |                          |          |          |          |

A Equação 4.4 representa o modelo com as variáveis significativas codificadas para a resposta remoção de BB em TPH.

$$\text{Remoção de BB em TPH (\%)} = 62,14 - 24,94.X_1 - 14,96.X_2 \quad (4.4)$$

O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) obtido após o ajuste foi de 0,99, indicando que os resultados foram explicados pela equação empírica proposta com 99,0% da variabilidade dos dados. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 27.

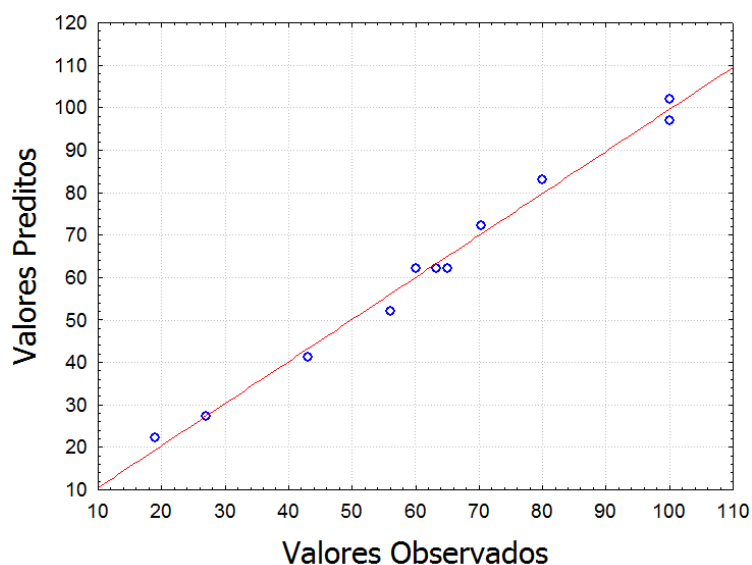


Figura 27 - Valores preditos por valores experimentais para a regressão múltipla com as variáveis significativas do DCC 2 para a resposta remoção de BB em TPH.

Na Figura 28 observa-se que os erros de ajuste se mostram independentes e normalmente distribuídos em torno da reta, o que indica normalidade para a resposta remoção de BB em TPH.

Como o modelo foi significativo, foi possível construir as superfícies de resposta e definir regiões de interesse. As Figuras 29 e 30 ilustram, respectivamente, a superfície de resposta e a curva de contorno em função da Temperatura (X1) e Concentração de Biodiesel (X2) para a remoção de BB em TPH.

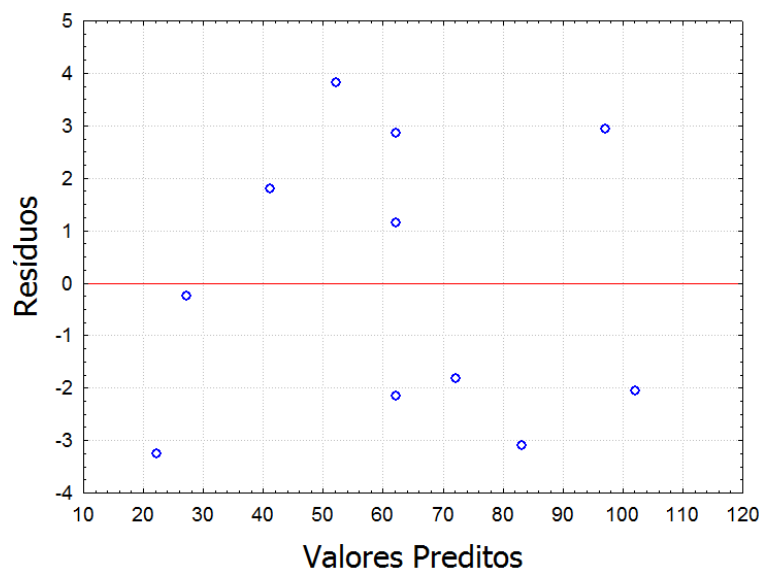


Figura 28 - Distribuição dos resíduos para a regressão múltipla com as variáveis significativas do DCC 2 para a resposta remoção de BB em TPH.

Nas Figuras 29 e 30 pode-se verificar que tanto a região de alta concentração de biodiesel bruto quanto de maiores temperaturas apresentam condição de mínima remoção de BB em TPH. Na Figura 30, pode-se observar que a região de otimização da temperatura foi de 26 – 30°C (região em vermelho escuro).

Pode-se observar que a temperatura de 28°C se encontra dentro da região de otimização e nesta temperatura também foi verificada a melhor remoção de BB em TPH, de acordo com a Tabela 15.

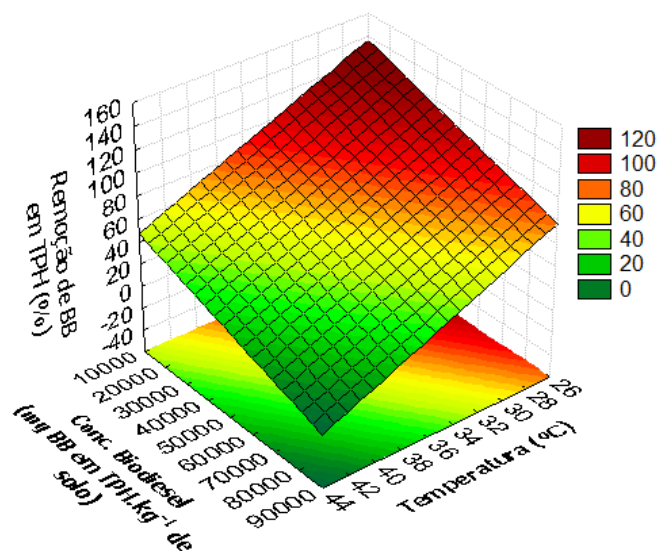


Figura 29 - Superfície de resposta para a resposta remoção de BB em TPH em função da temperatura e da concentração de Biodiesel.

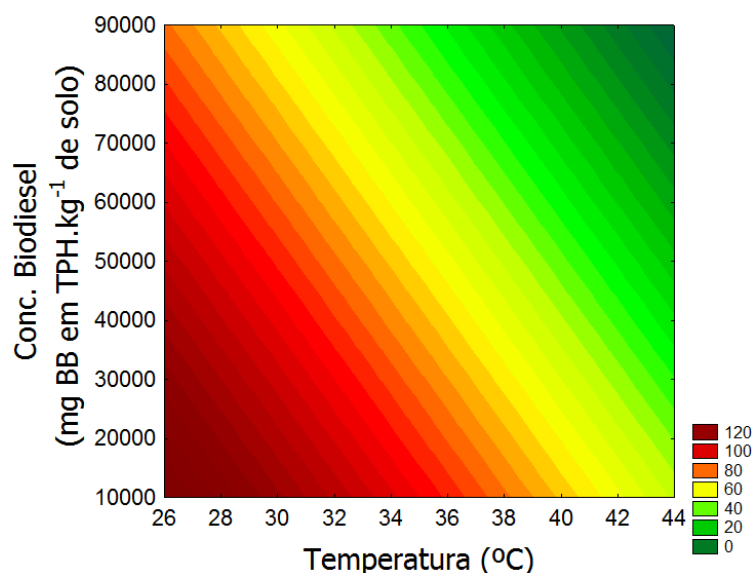


Figura 30 - Curva de contorno para a resposta remoção de BB em TPH em função da temperatura e da concentração de Biodiesel.

Na Figura 30 é importante salientar a influência da temperatura na remoção de BB em TPH, pois para valores abaixo de 35°C observa-se maior remoção de BB em TPH, mesmo quando as concentrações de biodiesel são maiores (próximos a 70.000 mg BB em TPH.kg<sup>-1</sup> de solo). Para valores de temperatura superiores a 35°C, independente da concentração inicial de biodiesel não se encontram na região de ótimo.

BARAHONA *et al* (2004) em seu estudo de bioestimulação de culturas autóctones (nativas) para biorremediação de solos contaminados com biodiesel, com concentração inicial de biodiesel de 40.000 mg.kg<sup>-1</sup> de solo, observou uma remoção de 67% de contaminantes em 109 dias de processo. Este autor empregou um planejamento fatorial de 2 níveis que avaliou a

relação C:N, % de umidade (m/m), % de resíduo de cultura e tipo de resíduo de cultura, além do controle de temperatura entre 20 e 25°C em microcosmos. No presente trabalho nas faixas de estudo utilizadas por BARAHONA *et al* (2004) obteve-se valores superiores ou bem próximos em 30 dias de processo, (100% de remoção para 30.000 mg BB em TPH.kg<sup>-1</sup> de solo; 100, 60, 65 e 63,3% de remoção para 50.000 mg BB em TPH.kg<sup>-1</sup> de solo), o que caracteriza como essencial ao estudo além da manutenção das condições de trabalho, a escolha do processo correto de biorremediação.

No DCC 1 (para reatores de bandeja) é possível perceber que os valores de remoção de BB em TPH são maiores na maior parte dos casos quando comparados ao DCC 2 (para reatores rotativos). Porém, vale ressaltar o fato de que nas condições onde a temperatura de trabalho é menor (Experimento 1, 2 e 5, com valores de temperatura de 30, 30 e 28°C, respectivamente) os resultados do DCC 2 superam o anterior (DCC 1). O fato observado, sugere que pode estar relacionado a disponibilidade (pelo efeito da mistura) dos contaminantes nos biorreatores rotativos serem maiores no DCC 2, e os micro-organismos degradadores apesar do movimento de rotação, não sentem tanto as condições de temperatura empregadas tendo assim uma maior atividade metabólica. Vale ressaltar que nestes experimentos a concentração de biodiesel encontra-se nos 3 níveis estudados (+1) 70.000 mg BB em TPH.kg<sup>-1</sup> de solo (experimento 2), (0) 50.000 mg BB em TPH.kg<sup>-1</sup> de solo (experimento 5) e (-1) 30.000 mg BB em TPH.kg<sup>-1</sup> de solo (experimento 1). Este fato pode ser confirmado pelas equações dos modelos apresentados, no reator de bandeja o efeito da temperatura ( $X_1$ ) foi menor do que o efeito da concentração de biodiesel ( $X_2$ ) (Eq. 4.2) e o contrário ocorreu para o reator rotativo (Eq.4.4), em ambos os casos no sentido de menor concentração e menor temperatura.

Outro ponto importante quando comparados esses dois planejamentos, está no fato de quando o DCC 2 apresenta um ponto de maior remoção (43%), este não passa de 21% de superioridade em relação ao mesmo experimento no DCC 1 (33,9%) (experimento 8), enquanto no inverso, este valor passa de 50% de superioridade em remoção de BB em TPH (experimento 4). O ponto central, importante na análise de eficiência do processo, mostrou que para o DCC 1 este apresentou, na média, 30% a mais de remoção quando comparado ao DCC 2 (Média Ponto Central no DCC 1 foi de 90,2%, enquanto no DCC 2 foi de 62,77%). Em linhas gerais pode-se afirmar que, para as faixas de variáveis estudadas, o DCC 1 apresenta melhores resultados de remoção de BB em TPH.

A discussão anterior mostra as vantagens da análise conjunta da influência das variáveis utilizando o planejamento de experimento, além da escolha do tipo de processo correto para ocorrer a biorremediação.

#### 4.3.3.3 - 3º Planejamento: Relação C:N e Relação C:P em Reator Bandeja em Sistema Fechado

A Tabela 18 mostra os valores codificados e originais das variáveis de estudo e a resposta remoção de BB em TPH. Observa-se nesta Tabela que a remoção de BB em TPH variou de 25,0% (experimento 6) a 100% (experimentos 11). Verifica-se que os pontos centrais apresentaram uma pequena variação para a resposta, indicando uma boa repetibilidade do processo. O resultado de remoção de BB em TPH se mostrou promissor, principalmente para relação C:N 100:10 e C:P 100:1, valores estes já comuns na literatura (MOLINA-BARAHONA *et al*, 2004; PALA, 2002) e onde foram encontradas as maiores remoções de BB em TPH, chegando a valor de remoção de BB em TPH de 100%.

Tabela 18 - Variáveis utilizadas no DCC 3 e sua resposta.

| Experimento | X1<br>C:N<br>(100:N) | X2<br>C:P<br>(100:P) | Remoção de BB<br>em TPH (%) |
|-------------|----------------------|----------------------|-----------------------------|
| 1           | 5 (-1)               | 0,5 (-1)             | 53                          |
| 2           | 5 (-1)               | 1,5 (1)              | 43                          |
| 3           | 15 (1)               | 0,5 (-1)             | 46                          |
| 4           | 15 (1)               | 1,5 (1)              | 32                          |
| 5           | 3 (- $\alpha$ )      | 1 (0)                | 75                          |
| 6           | 17 ( $\alpha$ )      | 1 (0)                | 25                          |
| 7           | 10 (0)               | 0,3 (- $\alpha$ )    | 65                          |
| 8           | 10 (0)               | 1,7 ( $\alpha$ )     | 40                          |
| 9 (C)       | 10 (0)               | 1 (0)                | 95                          |
| 10 (C)      | 10 (0)               | 1 (0)                | 91                          |
| 11 (C)      | 10 (0)               | 1 (0)                | 100                         |

MOREIRA *et al* (2011) avaliou a biodegradação de solo de manguezal em escala piloto contaminado com uma concentração inicial de 33.200 mg.de TPH kg<sup>-1</sup> de solo, através da fitorremediação utilizando a espécie *Rizophora mangle L*, as regando 2 vezes por semana (manutenção umidade). A remoção obtida por este autor foi de 87% de TPH em 90 dias de processo. Comparando os resultados deste autor é possível averiguar que no presente trabalho foram alcançados resultados semelhantes em maiores faixas de concentração (70.000 mg BB em TPH.kg<sup>-1</sup> de solo) em tempos menores de processo (30 dias). Apesar de se tratar de tipos de

solos diferentes, é possível verificar que cada método utilizado está intimamente ligado com a concentração de contaminante e o tempo que foi requerido para realizar a biorremediação.

A Figura 31, mostra a diferença na intensidade da coloração entre o solo contaminado inicialmente e após a sua biorremediação do experimento 9, quando foi utilizado uma concentração de biodiesel de 70.000 mg BB em TPH .kg<sup>-1</sup> de solo e ao final houve uma remoção de 95,0%. O biorreator da esquerda representa o solo inicialmente contaminado, o biorreator da direita representa a aparência do solo descontaminado ao final do experimento.



Figura 31 – Foto ilustrativa do experimento 9, inicialmente e ao final do processo

A Tabela 19 mostra os coeficientes de regressão das variáveis e interações com parâmetros significativos e não significativos para a resposta remoção de BB em TPH, bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos.

A partir desta análise foi obtida a Equação 4.5:

$$\text{Remoção de BB em TPH (\%)} = 95,42 - 11,11.X_1 - 24,92.X_1^2 - 7,45.X_2 - 23,65.X_2^2 - 1.X_1.X_2 \quad (4.5)$$

Tabela 19 - Regressão múltipla para remoção de BB em TPH no DCC 3.

| Variáveis e interações | Coeficiente de Regressão | Desvio   | t(5)     | p        |
|------------------------|--------------------------|----------|----------|----------|
| Termo Independente     | 95,4246                  | 5,78887  | 16,48415 | 0,000015 |
| (X1) Relação C:N (L)   | -11,1111                 | 7,12658  | -3,11822 | 0,026305 |
| Relação C:N (Q)        | -24,9225                 | 8,55483  | -5,82654 | 0,002104 |
| (X2) Relação C:P (L)   | -7,4495                  | 7,12658  | -2,09062 | 0,090828 |
| Relação C:P (Q)        | -23,6470                 | 8,55483  | -5,52834 | 0,002654 |
| X1.X2                  | -1,0000                  | 10,02798 | -0,19944 | 0,849774 |
| R <sup>2</sup> =0,928  |                          |          |          |          |

A Tabela 20 mostra os coeficientes de regressão das variáveis e interações com níveis de significância (p) menores que 10% para a resposta remoção de BB em TPH, após a eliminação de parâmetros não significativos.

O parâmetro não significativo, que foi desprezado para o nível de significância adotado foi apenas a interação entre as variáveis.

Tabela 20 - Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para remoção de BB em TPH no DCC 3.

| Variáveis e interações | Coeficiente de Regressão | Desvio   | t(6)     | p        |
|------------------------|--------------------------|----------|----------|----------|
| Termo Independente     | 95,4246                  | 5,305470 | 17,98608 | 0,000002 |
| (X1) Relação C:N (L)   | -11,1111                 | 6,531471 | -3,40233 | 0,014454 |
| Relação C:N (Q)        | -24,9225                 | 7,840459 | -6,35742 | 0,000710 |
| (X2) Relação C:P (L)   | -7,4495                  | 6,531471 | -2,28111 | 0,062704 |
| Relação C:P (Q)        | -23,6470                 | 7,840459 | -6,03205 | 0,000938 |
| R <sup>2</sup> =0,928  |                          |          |          |          |

A Equação 4.6 representa o modelo com as variáveis significativas codificadas para a resposta remoção de BB em TPH.

$$\text{Remoção de BB em TPH (\%)} = 95,42 - 11,11.X_1 - 24,92.X_1^2 - 7,45.X_2 - 23,65.X_2^2 \quad (4.6)$$

Verifica-se na equação do modelo (Eq. 4.6), que o maior efeito na remoção de BB em TPH foi a relação C:N, seguido da relação C:P. O coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>) obtido após o ajuste foi de 0,928, indicando que os resultados foram explicados pela equação empírica proposta com 92,8% da variabilidade dos dados. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 32.

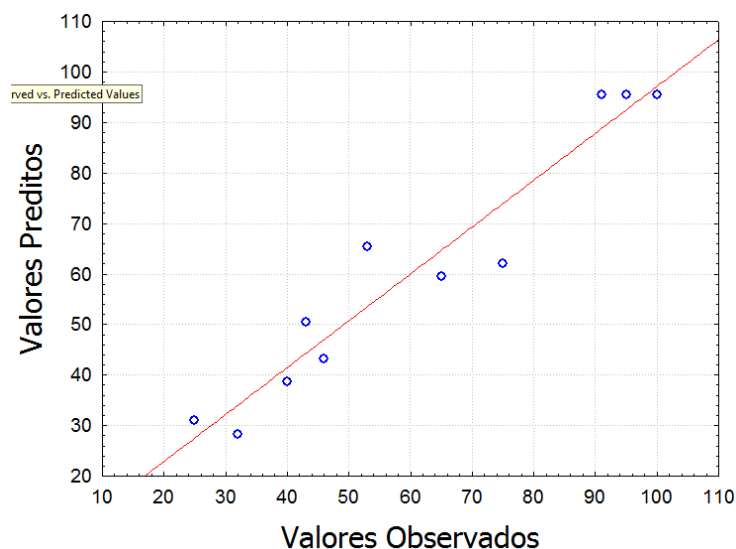


Figura 32 - Valores preditos por valores experimentais para a regressão múltipla com as variáveis significativas do DCC 3 para a resposta remoção de BB em TPH.

Na Figura 33 observa-se que os erros de ajustamento se mostram independentes e normalmente distribuídos em torno da reta, o que indica normalidade para a resposta remoção de BB em TPH.

Como o modelo foi significativo, foi possível construir as superfícies de resposta e definir regiões de interesse. A Figura 34 e 35 ilustram, respectivamente, a superfície de resposta e a curva de contorno em função da relação C:N (X1) e relação C:P (X2) para a remoção de BB em TPH.

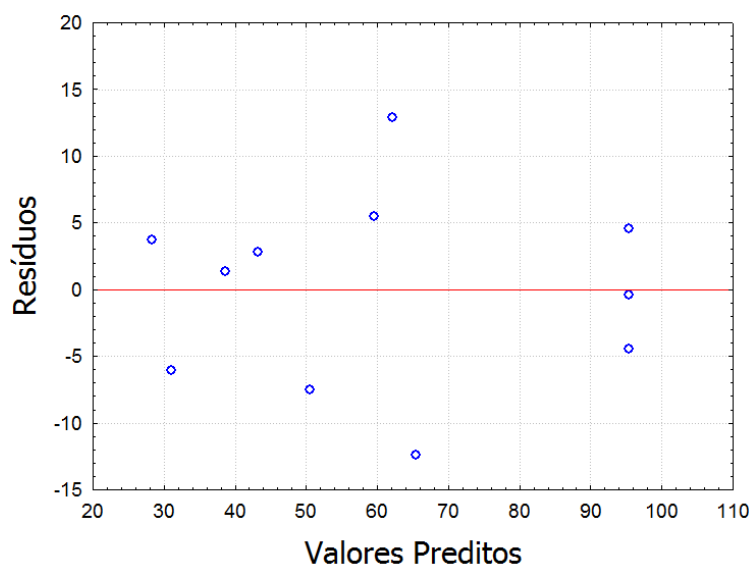


Figura 33 - Distribuição dos resíduos para a regressão múltipla com as variáveis significativas do DCC 3 para a resposta remoção de BB em TPH.

Nas Figuras 34 e 35 pode-se verificar que a região central é a que apresenta condição de máxima remoção de BB em TPH. Na Figura 35, pode-se observar que próximo relação C:N –

100:10 e relação C:P – 100:1 está a região com melhor remoção de BB em TPH, fato este evidenciado na Tabela 18.

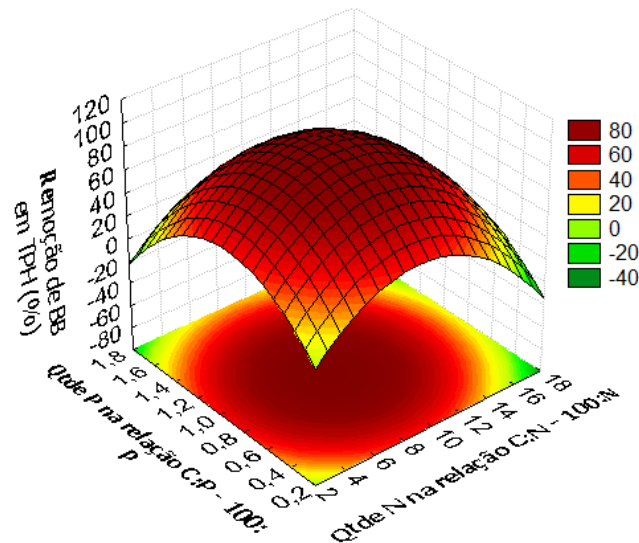


Figura 34 - Superfície de resposta para a resposta remoção de BB em TPH em função da temperatura e da concentração de Biodiesel.

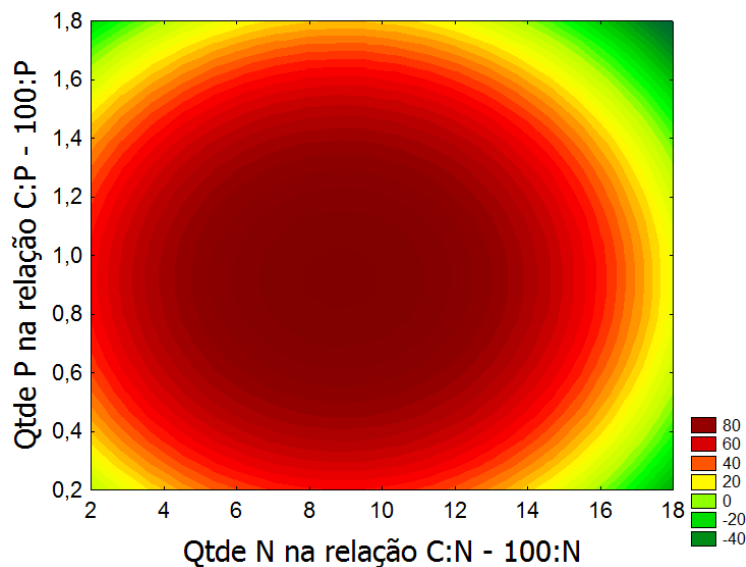


Figura 35 - Curva de contorno para a resposta remoção de BB em TPH em função da temperatura e da concentração de Biodiesel.

No DCC 3, um ponto importante a ser analisado, quando se trata do ponto central que usa a relação C:N:P – 100:10:1, que é a mesma utilizada nos outros planejamentos 1 e 2, houve uma diferença nos valores de remoção de BB em TPH. Com a utilização da correção de nutrientes semanalmente, no caso dos outros era feita a cada 15 dias, percebe-se que nas mesmas condições de temperatura (experimento 5) do DCC 1 a porcentagem de remoção de BB em TPH foi a mesma, em torno de 90% de remoção, porém no caso do DCC 1 a concentração

inicial de biodiesel era de 50.000 e na condição de DCC 3 foi de 70.000 mg BB em TPH. kg<sup>-1</sup> de solo.

#### 4.3.4 Avaliação de Remoção de Biodiesel Bruto

Após os testes preliminares e planejamento composto central foi realizado o estudo da avaliação da remoção do BB em TPH e crescimento dos micro-organismos. Foram realizadas 2 avaliações com temperatura, concentração inicial de biodiesel e relação C:N:P otimizadas.

Em todas as avaliações foi acompanhado o pH do solo e houve aeração com espátula de aço a cada 2 dias. Semanalmente foram realizadas as análises de BB em TPH e quinzenalmente as análises de crescimento dos micro-organismos.

##### 4.3.4.1 - 1ª Avaliação da Remoção de BB em TPH: Avaliação da Temperatura Otimizada e Temperatura Ambiente

Nas Figuras 36 e 37 são apresentadas a relação de decaimento da concentração de BB em TPH ao longo do processo de biorremediação e a porcentagem de remoção.

É possível observar pela Figura 36, que houve remoção considerável dos contaminantes desde o início do processo, principalmente aqueles que estavam sob temperatura controlada. O fato da utilização e controle de condições otimizadas de temperatura (32±1°C) além do ajuste de umidade semanalmente, contribuiu de maneira efetiva na obtenção dos resultados apresentados. Em apenas 21 dias de processo já havia remoção de valores próximos de 100%.

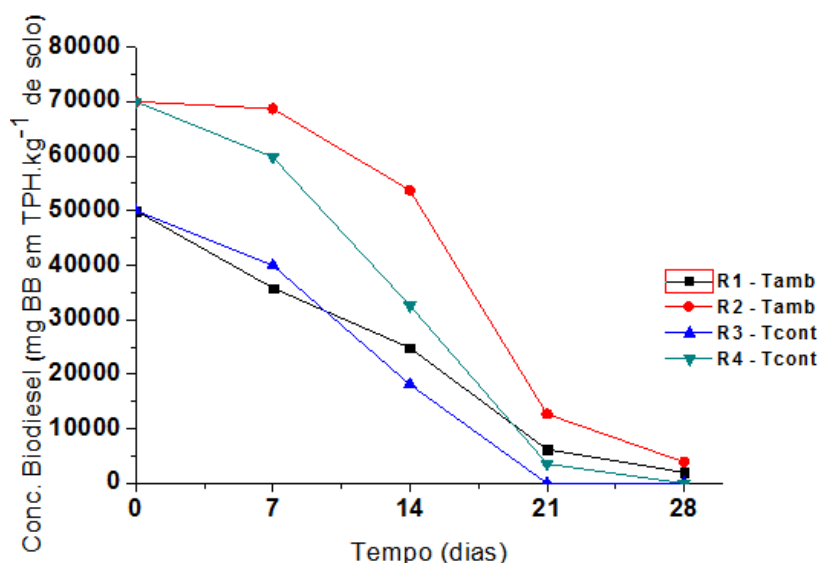


Figura 36 - Decaimento da concentração de BB em TPH ao longo de 28 dias de processo.

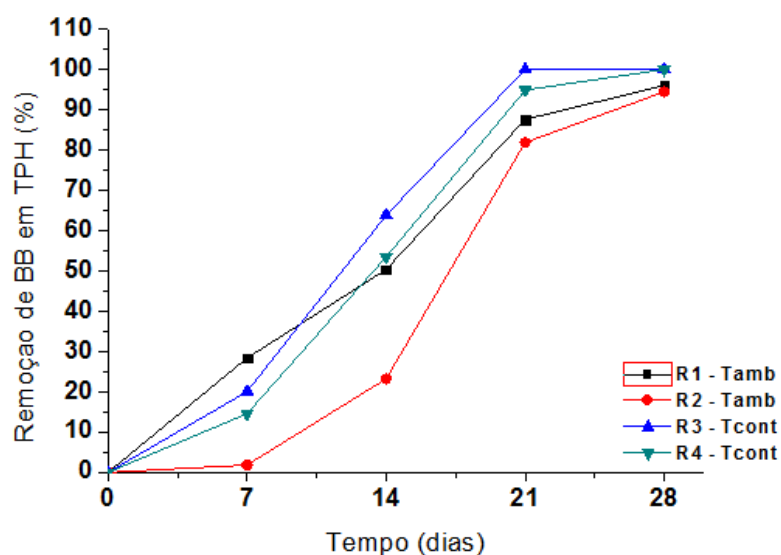
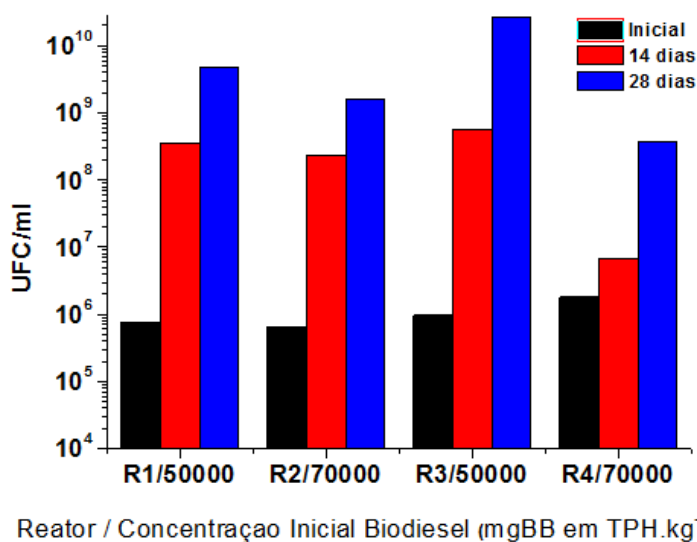


Figura 37 - Remoção de BB em TPH ao longo de 28 dias de processo.

Pela Figura 38 é possível afirmar que não houve morte dos micro-organismos ao longo do processo de biorremediação para todas as concentrações elevadas testadas. Isso sugere que as condições empregadas (relação C:N:P – 100:10:1 otimizada corrigida semanalmente; temperatura otimizada  $32\pm1^{\circ}\text{C}$ ; umidade corrigida semanalmente, pH controlado) promoveram o desenvolvimento e crescimento dos micro-organismos na ordem de  $10^{10}$  no caso do reator 3, no qual empregou-se concentração inicial de biodiesel de  $50.000 \text{ mg BB em TPH.kg}^{-1}$  de solo.



Reator / Concentração Inicial Biodiesel ( $\text{mgBB em TPH.kg}^{-1}$  solo)

Figura 38 - Crescimento celular em cada reator nas condições estudadas no tempo Inicial, 14 e 28 dias.

Isto mostra a importância da temperatura controlada bem como a umidificação do solo em intervalos de tempo necessários para o processo de biorremediação. Quando comparado aos reatores deixados à temperatura ambiente verifica-se que estes reatores demoraram 7 dias a mais para chegar ao mesmo nível de remoção daqueles que estavam sob temperatura

controlada. Em termos de porcentagem, esses valores chegam a 25% de tempo a menos quando se manteve a temperatura sob controle, mostrando a eficiência do processo.

A otimização, ajuste e controle da temperatura são essenciais no processo de biorremediação, pois o controle desta variável fez com que praticamente toda a carga contaminante de BB presente no solo fosse extraída em um tempo considerado curto quando se trata de processos biológicos de tratamento de solo (21 dias). Vale salientar, que mesmo com pouco espaço de tempo, os micro-organismos apresentaram boa capacidade de remoção, mostrando-se bem adaptados e eficientes, como observado nas Figuras 37 e 38. Isto provavelmente pode estar relacionado a estes micro-organismos já estarem adaptados desde o reator inóculo.

#### 4.3.4.2 - 2ª Avaliação da Remoção de BB em TPH: Avaliação da Relação de Nutrientes Otimizada

Nas Figuras 39 e 40 são apresentadas a relação de decaimento da concentração de BB em TPH ao longo do processo de biorremediação e a porcentagem de remoção para a concentração de contaminante de 100.000 e 120.000 mg BB em TPH.kg<sup>-1</sup> de solo.

É possível observar pela Figura 40, que houve remoção considerável dos contaminantes desde o início do processo, sendo observado maior decaimento entre o 7º e 21º dia. O fato da utilização e controle de condições otimizadas de temperatura (32±1°C) e relação C:N:P – 100:10:1, além do ajuste de umidade semanalmente, contribuiu de maneira efetiva na obtenção dos resultados apresentados.

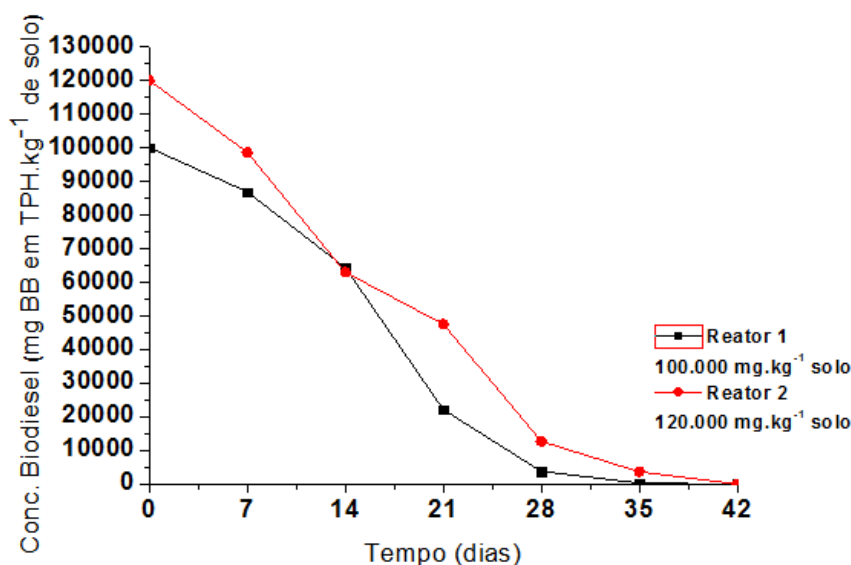


Figura 39 - Decaimento da concentração de BB em TPH ao longo de 42 dias de processo.

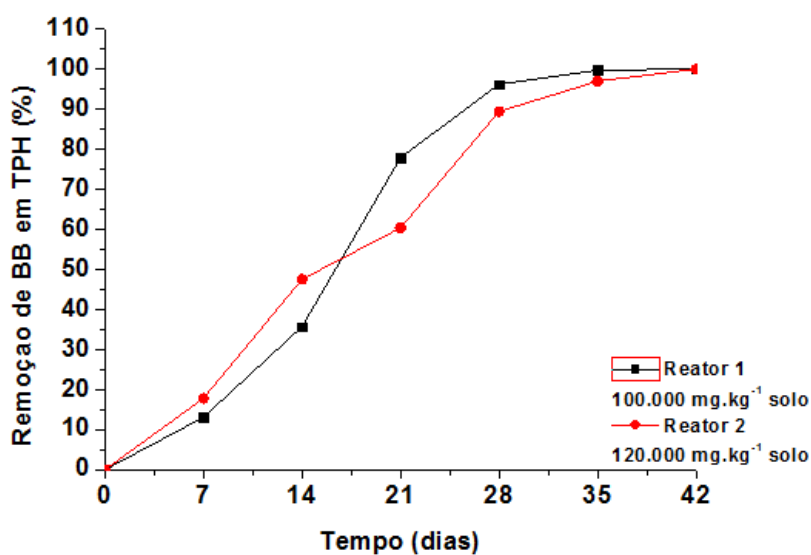


Figura 40 - Remoção de BB em TPH ao longo de 42 dias de processo.

Pela Figura 41 é possível afirmar que houve uma boa adaptação dos micro-organismos às condições otimizadas, pois os valores foram aumentando substancialmente ao longo do processo de biorremediação chegando a altos valores de concentração de micro-organismos, na ordem de  $10^{11}$  UFC/mL no caso do biorreator 1 com concentração inicial de biodiesel de 100.000 mg BB em TPH.kg<sup>-1</sup> de solo.

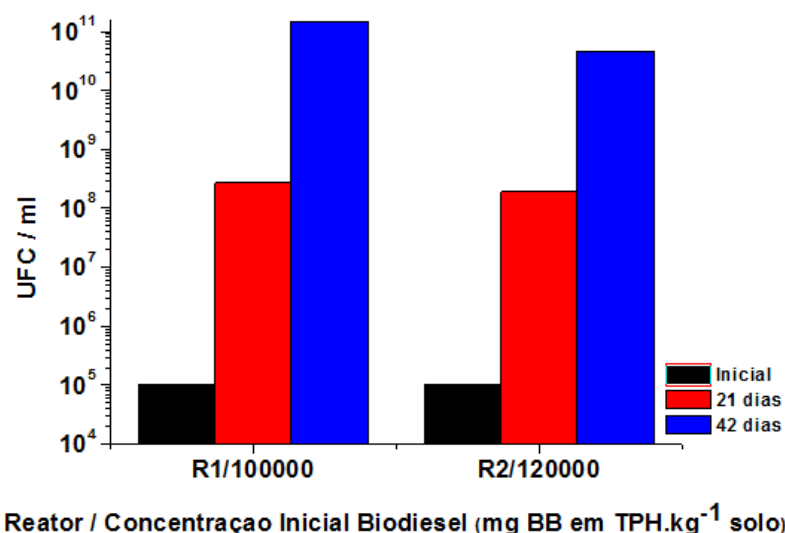


Figura 41 - Crescimento celular em cada reator nas condições 100.000 e 120.000 mg BB em TPH.kg<sup>-1</sup> de solo no tempo Inicial, 21 e 42 dias

Isto mostra a importância da correção na relação C:N:P bem como a umidificação do solo em intervalos de tempo necessários para o processo de biorremediação. Além disso, os resultados sugerem que estes parâmetros otimizados foram responsáveis por promover maior metabolização dos contaminantes pelos micro-organismos e obter uma remoção de

aproximadamente 100% ao final de 42 dias para concentrações de contaminantes 100.000 e 120.000 mg BB em TPH.kg<sup>-1</sup> de solo, valores estes de contaminação consideráveis, mostrando a eficiência do processo.

A otimização, ajuste e controle da relação C:N:P, umidade e temperatura é essencial no processo de biorremediação, pois o controle destas três variáveis simultaneamente fez com que toda a carga contaminante em altas concentrações de BB presentes no solo fosse consumida. Vale salientar, que as quantidades utilizadas neste trabalho são superiores às encontradas na literatura, mesmo com esta carga elevada os micro-organismos apresentaram capacidade de remoção, mostrando-se bem adaptados e eficientes.

Ao final destas duas avaliações é possível afirmar que o trabalho atingiu um elevado valor de remoção de BB em TPH. Nestes casos em que tanto a temperatura quanto a relação de nutrientes C:N:P foram selecionadas, as porcentagens de remoções foram satisfatórias atingindo todas acima de 90% de remoção de BB em TPH. No caso das concentrações de 50.000 e 70.000 mg BB em TPH. kg<sup>-1</sup> de solo, este tempo foi de 21 dias, enquanto nas concentrações de 100.000 e 120.000 mg BB em TPH. kg<sup>-1</sup> de solo foi de 42 dias. Isso se justifica pelo fato de em concentrações maiores de contaminantes os micro-organismos necessitam de um maior tempo de biodegradação, já que no último caso os valores de contaminação foram muito elevados.

## 5. CONCLUSÃO

O presente trabalho apresentou as seguintes conclusões:

- A cultura mista isolada de local contaminado por derivados de petróleo foi capaz de se adaptar em meio líquido quanto no solo de maneira eficiente e satisfatória para a realização do trabalho.
- A relação de 25% de inoculo (m/m) para cada biorreator foi a condição escolhida para este trabalho devido a apresentar a melhor relação fração inicial de inoculo por eficiência de remoção de contaminante.
- Durante adaptação dos micro-organismos ao solo verificou-se, que a não correção da relação C:N:P (100:0,77:0,019) dificultava o processo de biorremediação.
- No DCC 1 (reatores de bandeja) os valores de remoção de BB foram maiores na maior parte dos casos quando comparados ao DCC 2 (reatores rotativos), exceto nas menores temperaturas (abaixo de 30°C).
- No DCC 3, o qual avaliava a relação C:N e C:P, no ponto central (relação C:N – 100:10 e C:P – 100:1), que foi a mesma condição utilizada nos DCC 1 e 2, percebe-se uma mesma porcentagem de remoção mesmo em valores de contaminação de biodiesel bruto superiores.
- A otimização, ajuste e controle da temperatura foram importantes no processo de biorremediação, pois o controle desta variável ( $32 \pm 1^\circ\text{C}$ ) em conjunto com a correção da relação C:N:P – 100:10:1 (otimizada), umidade e pH controlado fez com que praticamente toda a carga contaminante de BB presente no solo da Avaliação 1 fosse removida em um tempo considerado curto (21 dias) quando comparado a outros tipos de processo de biorremediação.
- A cultura mista se mostrou eficiente mesmo em situações complexas de biodegradação, em termos de elevada concentração de contaminantes, pois no caso das concentrações de 50.000 e 70.000 mg BB em TPH.  $\text{kg}^{-1}$  de solo, no tempo de 21 dias, enquanto nas concentrações de 100.000 e 120.000 mg BB em TPH.  $\text{kg}^{-1}$  de solo foi de 42 dias.

## **6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

As sugestões para desenvolvimento de trabalhos futuros relacionados à biorremediação de solo contaminado com biodiesel bruto (BB) são:

- Desenvolver novos tipos de reatores biológicos para o processo de biorremediação de solos contaminados com biodiesel bruto;
- Realizar experimentos em escala piloto aplicando condições definidas;
- Avaliar diferentes configurações de chicanas, ângulos de trabalhos de chicanas, temperatura em reatores do tipo rotativo;
- Estudar componentes inertes que possam auxiliar na oxigenação do solo durante o processo de biorremediação do mesmo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 7181: Solo – Análise granulométrica. Rio de Janeiro: ABNT, 1984. 13p.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 7180 – Solo - Análise granulométrica- 1984.
- APHA- American Public Health Association. Satandart Methods for examination of water and wastewater. Maryland, USA, 18a edição, 1992.
- AENOR – Asociación Española de Noormalización y Certificación. UNE-EN 14103: Productos derivados de aceites y grasas. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) Determinación de los contenidos de éster y de éster metílico de ácido linoleico. Madrid: AENOR, 2003. 15p.
- ALEXANDER, M. Biodegradation and Bioremediation. San Diego: Academic Press. 1994.
- ANDRADE, J.A. et.al. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. Eclética Química, São Paulo, 35 - 3: 17 – 43, 2010. [www.scielo.br/eq](http://www.scielo.br/eq). Acessado em 04 de Abril de 2013.
- APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed. APHA: Washington, 1998.
- ARCEO, A.A. Produção de biodiesel mediante o processo de Hidroesterificação da biomassa das microalgas *Scenedesmus dimorphus* e *Nannochloropsis oculata*. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química. Tese de Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Rio de Janeiro, 2012.
- BAPTISTA, S.J., CAMMAROTA, M.C., FREIRE, D.D.C. Avaliação da Bioestimulação em Solos Argilosos Contaminados com Petróleo. In: 2º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo & Gás, Rio de Janeiro, 2003.
- BARAHONA, L.M., VÁZQUEZ, R.R., VELASCO, M.H., JARQUÍN, C.V., PÉREZ, O.Z., CANTÚ, A.M., ALBORES, A. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. *App. Soil Ecology*, 27, 165-175, 2004.
- BERGER, T.M. Biorremediação de Solos Contaminados com Hidrocarbonetos Totais de Petróleo – Enfoque na Aplicação do Processo Terraferm®. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências – Tese de Doutorado em Ecologia, 9p, 2005.
- BRASIL, MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA – GOVERNO FEDERAL, Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel < <http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/biodiesel/pnpb.html>>. Acessado em: 4 de Abril de 2013a.
- BRASIL, MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA – GOVERNO FEDERAL, Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel – Perguntas Frequentes <

<http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/biodiesel/perguntas.html>>. Acessado em: 4 de Abril de 2013b.

- CARDOSO, V. L.; NEVES, R. B. S. M.; CARDOSO, S. L.; FERREIRA, J. S.; VIEIRA, P. A. Estudo da biodegradação em meio líquido da mistura de biodiesel e glicerina. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos (Sinaferm). Caxias do Sul. 24 a 27 de julho, 2011.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. Decisão de Diretoria Nº 195 – 2005 de 23 de Novembro de 2005.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. 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.
- CHEMLAL, R., ABDI, N., LOUNICI, H., DROUICHE, N., PAUSS, A., MAMERI, N. Modeling and qualitative study of diesel biodegradation using biopile process in Sandy soil. Intern. Biodeter. & Biodegrad., 78, 43-48, 2013.
- COLOMBO, R. Atenuação Natural Monitorada em Latossolo Contaminado por Misturas de Diesel e Biodiesel. Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Dissertação de Mestrado em Infraestrutura e Meio Ambiente, 92p, 2010.
- CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA – CNI. O Mercado de Biodiesel no Brasil. Relatório Conselho Permanente de Infra-estrutura – Coinfra, Fev. 2007.
- CORDAZZO, J. Modelagem e simulação numérica do derramamento de gasolina acrescida de álcool em águas subterrâneas. Dissertação de Mestrado. UFSC, 2000.
- DEON, M.C.; ROSSI, A.; DAL'MAGRO, C.; REINEHR, C.O.; COLLA, L.M. Biorremediação de Solos Contaminados com Resíduos Oleosos Através de Bioaugmentação e Atenuação Natural. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v.33, n.1, p. 73 – 82, Jan./Jul. 2012.
- DIAS, A.E.X.O. Biorremediação de áreas afetadas por resíduos sólidos tóxicos. In: SISINNO, C.L.S.; OLIVEIRA, R.M. (Org.) Resíduos Sólidos, Ambiente e Saúde: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 142 p., 2000.
- ELEKTOROWICZ, M. Bioremediation of petroleum-contaminated clayey soil with pretreatment. Environmental Technology, v.15, pp. 373-380, 1993.
- EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. Implementação de Análise de Nitrogênio Total em Solo pelo Método de Dumas. Documentos 115. ISSN 1518 – 4277. Dezembro, 2010.
- 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.

- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA (EUA). How to evaluate alternative cleanup technologies for underground storage tank sites: a guide for corrective action plan reviewers. (EPA 510-B-94-003 and EPA 510-B-95-007) 1994. Disponível em: < <http://www.epa.gov/swerust1/pubs/tums.htm>>. Acessado em: 16 de setembro de 2012.
- GAYLARDE, C.C. et al. BIORREMEDIACÃO: Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, [www.biotecnologia.com.br/revista/bio34/biorremediacao\\_34.pdf](http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio34/biorremediacao_34.pdf). n. 34, pp. 36-43, jan/junho 2005. Acessado em 04 de Abril de 2013.
- GELLER, A. Grundlagen der biologischen Bodensanierung. In: BMBF – BUNDESMINISTERIUM FÜR BILDUNG UND FORSCHUNG. Leitfaden Biologische Verfahren zur Bodensanierung. Berlin: BMBF, 2000.
- GRADY, C.P.L. Biodegradation: its measurement and microbiological basis. Biotech. Bioeng., 27(5), 660-674, 1985.
- GUIMARÃES, K.O.R. Biorremediação aeróbia e anaeróbia de solo argiloso contaminado com óleo cru. Uberlândia: UFU, 2003, 80p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2003.
- KATAOKA, A.P.A.G. Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microorganismos isolados de “landfarming”. Rio Claro, 2001, 202p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.
- JÖNSSON, B. et al. Em Surfactants and Polymers in Aqueous Solutioneds; Jönsson, B.; Lindman, B.; Holmberg, K.; Kronberg, B., eds.; Wiley: New York, cap. 1, 1998.
- LAPINSKIENE, A., MARTINKUS, P., REBZDAITE, V. Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil. Environmental Pollution, 142, 432 – 437, 2006.
- LEBLANC, L.; FITZGERALD, A. Striking Successes in spill cleanup, but obstacles remain. Off Shore, 50(9), 26-30, 1990.
- 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, 199 – 200, 343 – 349, 2012.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. 2004. Microbiologia. 10 ed. Editora Pearson/Prentice Hall. 624 p.
- 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, 55(1), 17–23, 2005.

- MARIANO, A. P. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. 162 f. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista- Rio Claro, Instituto de Geociências e Ciências Exatas, 2006.
- 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, 53p, 2011.
- MOLINA-BARAHONA, L.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; HERNÁNDEZ-VELASCO, M.; VERGA-JAQUÍN, 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, n.2, p.165 – 175, 2004.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. 2006. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. 2ª ed. Editora UFLA. 729p.
- MOREIRA, I.T.A., OLIVEIRA, O.M.C., TRIGUIS, J.A., SANTOS, A.M.P, QUEIROZ, A.F.S., MARTINS, C.M.S., SILVA, C.S., JESUS, R.S. Phytoremediation using *Rizophora mangle* L. In mangrove sediments contaminated by persistent total petroleum hydrocarbons (TPH's). *Microchemical Journal*, 99, 376 – 382, 2011.
- MOTA, C. J. A.; da SILVA, C. X. A; GONÇALVES, V. L. C., *Quim. Nova*, v. 32, n. 3, p. 639-648, 2009.
- NASCIMENTO, A. R. Avaliação do desempenho do método de determinação de TPH (Total Petroleum Hydrocarbon) em areia por detecção no infravermelho. Dissertação de Mestrado - PUC-Rio, Departamento de Metrologia para a Qualidade Industrial, 2003.
- NOORDMAN, W. H. Biosurfactant-enhanced soil remediation: effect of rhamnolipid on the bioavailability & microbial capture of hydrophobic compounds. University Library Groningen. 1999. Disponível em :<<http://dissertations.ub.rug.nl/faculties/science/1999/w.h.noordman/>>. Acessado em: 16 de Setembro de 2012.
- 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*, 2 (9), 288-292, 2003.
- OOI, Y., ZAKARIA, R., MOHAMED, R., BHATIA, S. Catalytic conversion of palm oil-based fatty acid mixture to liquid fuel. *Biomass and Bioenergy*, 27, 477 – 484, 2004.
- PALA, D.M. Estudo da biorremediação de solo impactado por petróleo. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto Alberto Luiz Coimbra (COPPE). Dissertação de Mestrado em Tecnologia Ambiental. Rio de Janeiro. 114p. 2002.
- PAULA, A.M., SOARES, C.R.F.S., SIQUEIRA, J.O.. Biomassa, atividade microbiana e fungos micorrízicos em solo de landfarming de resíduos petroquímicos. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 10, n. 2, pp. 448-455, 2006.

- PLETSCH, M. et al. Fitorremediação de solo e águas poluídos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, [www.biotecnologia.com.br/revista/bio11/fito.pdf](http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio11/fito.pdf), n. 11, pp. 26-29, 2008. Acessado em 16 de Setembro de 2012.
- PREVEDELLO, C.L. 1996. Física do solo. Salesward-Discovery, Curitiba – PR. 446 p.
- RISER-ROBERTS, E. 1998. Remediation of petroleum contaminated soil: Biological, Physical and Chemical processes. Lewis Publishers, Boca Raton. 542p.
- RIVALDI, J.D.; SARROUH, B.F.; FIORILO, R.; SILVA, S.S. Glicerol de biodiesel. *Revista Eletrônica: Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 37, 44-51, 2007.
- RIZZO, A. C. L et al. Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2007.
- ROBINSON, K.G.; KIM, K.; FARMER, W.S.; NOVAK, J.T. Bioremediation Removes Gasoline Residues. *Pollut. Engen.* 22(8), 76-79, 1990.
- SILVA, E.P. Avaliação Preliminar do Potencial de Aplicação da Tecnologia de Biopilhas para a Biorremediação do Solo de Guamaré – RN. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Natal – RN, 2004.
- U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – (USEPA). How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers. Chapter XII – Enhanced Aerobic Bioremediation, EPA 510-B-94-003; EPA 510-B-95-007 and EPA 510-R-04-002, 2004d. 73p.
- U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – (USEPA). Use of Monitored Natural Attenuation at Superfund, RCRA Corrective Action, and Underground Storage Tank Sites. Disponível em: <http://www.epa.gov/oust/directiv/d9200417.pdf>, 1999. Acessado em 04 de Novembro de 2012.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). An Analysis of Composting as an Environmental Remediation Technology. Office of Solid Waste and Emergency Response, EPA-530-R-98-008, 1998.
- 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](http://www.epa.gov/wastes/hazard/correctiveaction/resources/guidance/rem_eval/bmpfin.pdf), 1997. Acessado em 04 de Novembro de 2012.
- U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – (USEPA). Handbook on In Situ Treatment of Hazardous Waste – Contaminated Soils, EPA/540/2-90/002, Office of Research and Development. 1990d. 75p.
- SEABRA, P. N. C. Aplicação de Biopilha na Biorremediação de Solos Argilosos Contaminados com Petróleo. 169 p., COPPE/UFRJ, D.Sc., Engenharia Química. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

- SILVA, E.P. Avaliação Preliminar do Potencial de Aplicação da Tecnologia de Biopilhas para a Biorremediação do Solo de Guimarães-RN. Dissertação de Mestrado, UFRN, 2004.
- SOUZA, C.S.; DE MIRANDA, R.C.M.; SENA, K.X.F.R.; ARAÚJO, J.M.; CHIAPPETA, A.A.; SOUSA, M.F.V.Q. Isolamento e seleção de micro-organismos degradadores de derivados de petróleo. In: 3º CONGRESSO BRASILEIRO DE P&D EM PETRÓLEO & GÁS, 2005, Salvador. Anais... Salvador, 2005. p. 1-7.
- 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, J. Hazard. Mater., 184(1-3), 177-183, 2010.
- VIEIRA, P.A.; FARIA, S.; VIEIRA R.B.; RIBEIRO E.J.; CARDOSO, V.L. Biodegradation of diesel oil and gasoline contaminated effluent employing intermittent aeration. Journ. Hazard. Mat., 168(2-3), 1366–1372, 2009b.
- VIEIRA, P.A.; FARIA, S.; VIEIRA, R.B.; DE FRANÇA, F.P.; CARDOSO, V.L. Statistical analysis and optimization of nitrogen, phosphorus and inoculums concentrations for the biodegradation of petroleum hydrocarbons by response surface methodology. World J. Microbiol Biotechnol., 25 (3), 427-438, 2009a.
- VIEIRA, P.A. Biotratamento de efluente contaminado por hidrocarbonetos de petróleo. Uberlândia: UFU, 2008. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.
- VIEIRA, P.A.; VIEIRA, R.B.; DE FRANÇA, F.P.; CARDOSO, V.L. Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. Journ. Hazard. Mat., 140(1-2), 52-59, 2007.
- VIEIRA, T.M.; SILVA, E.P.; ANTONIOSI FILHO, N.R.; VIEIRA, J.D.G. Determinação e quantificação da degradação bacteriana de biodiesel de óleo de palma. In: I CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DO BIODIESEL, 2006, Brasília. Anais... Brasília, 2006, p. 1-6.
- VIEIRA, P. A. Avaliação da Biodegradação de Efluente Contendo Óleo Diesel e Gasolina Empregando Culturas Mistas. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Uberlândia - Faculdade de Engenharia Química, 2004.
- WATERS, J. Em Recent Developments in the Analysis of Surfactants; Porter, M. R., ed.; Crown House: UK, cap. 6, 1991.
- 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, n.3, p.717-720, 1991.
- YONG, S., Ye J., Zhang Y., Yuan Y., Wu H. Glycerol extracting dealcoholization for the biodiesel separation process, Bioresource Technology 102 4759-4765, 2011.

## ANEXO I

### *Anexo A - Quantificação de Biodiesel Bruto 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 BB
- 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  $\mu\text{L}$ ), 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  $2925\text{ cm}^{-1}$  (3,42  $\mu\text{m}$ ) com uma banda passante de  $30\text{ cm}^{-1}$  (0,04  $\mu\text{m}$ ), fazendo leitura em transmitância, concentração e absorbância.

### *Anexo B - Quantificação de Biodiesel Bruto por cromatógrafo – Quantidade e Teor dos Ésteres*

#### Preparação do Padrão Interno

- Pesou-se 500 mg de heptadecanoato de metila num balão de 50 mL e completou-se com heptano para obter solução de 10 mg / mL de concentração.

#### Preparação da Amostra

- Pesou-se 250 mg da amostra num frasco de 10 mL e adicionou-se 5 mL de heptadecanoato de metila preparado no item anterior.

#### Equipamento

Cromatógrafo a gás GC-2010AF com injetor split / splitless da Shimadzu e Autoinjeter AOC-20i.

- Coluna : Rtx-Wax( 30 m x 0,25 mm x 0.25 $\mu$ m)

#### *Condições usadas na análise*

- Gás de arraste: Hélio;
- Modo de controle de fluxo: Velocidade linear;
- Modo de injeção: Split;
- Split ratio: 1:50;
- Velocidade linear: 45 cm/s;
- Temperatura do injetor e detector: 250°C;
- Sampling rate: 40 ms;
- Filter Time Const.: 200 ms;
- Volume de injeção: 1 $\mu$ l.
- Programa de Temperatura do Forno

120°C (2min) - (10°C/min.) 180°C (3min) - (5°C/min) 230°C (2min)

#### *Anexo C - 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 ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) 2% m/v contendo mistura de indicadores 1% v/v;
- Ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ) 0,01 mol L<sup>-1</sup>;
- Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) P.A.;
- Água deionizada;
- Catalisador: sulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) + sulfato de cobre pentaidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), 10:1 em massa;
- Hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) 50% m/v;
- Mistura de indicadores (verde de bromocresol 0,1%, hidróxido de sódio 0,12% e vermelho de metila 0,05%).

#### Procedimento analítico

- i) Preparou-se todos os reagentes e soluções necessários para a análise;
- ii) Pesou-se 350 mg da amostra de solos para tubo de digestão de 250 mL;
- iii) Faz-se teste em branco (todas as soluções, exceto a amostra) e amostra - controle com teor de nitrogênio total certificado;
- iv) Ligou-se bloco digestor em temperatura de 350°C;
- v) 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;
- vi) 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);
- vii) Após digestão, esfriou-se e transferiu-se com água deionizada, utilizando uma pisseta e o bastão de vidro, para volume final de 100 mL;
- viii) Homogeneizou-se. Aguardou-se a decantação;
- ix) Tomou-se uma alíquota de 25 mL e transferiu-se para o tubo de digestão 250 mL;
- x) 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;
- xi) 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<sup>-1</sup> e anotou-se o volume. A viragem foi de verde-claro para vinho-claro, conforme mostra a Figura 42.

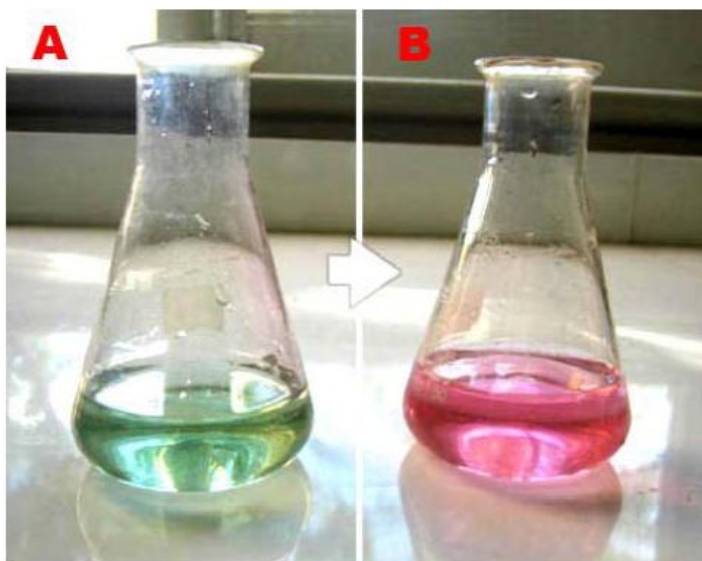


Figura 42 – Ponto de viragem da análise de nitrogênio total conforme método de Kjeldahl.

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<sub>Am</sub> = volume de ácido gasto na titulação da amostra, em mL;

V<sub>Br</sub> = volume de ácido gasto na titulação da prova em branco, em mL;

C = concentração de ácido clorídrico titulante, em mol L<sup>-1</sup>;

M = massa de amostra usada, em g.

#### *Anexo D - Análise de Fósforo Disponível*

##### Instrumentação

- Balança semianalítica;

- Espectrofotômetro;
- Mesa agitadora;

#### Reagentes / Soluções

- Solução extratora ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,025 N e HCl 0,05 N): medir 43 mL de HCl e 6,9 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 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  $\text{H}_2\text{SO}_4$  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 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) P.A.;
- Ácido clorídrico (HCl) P.A.;
- Água destilada;

#### Procedimento analítico

- Preparar todos os reagentes e soluções necessários para a análise;
- Pesar 5 g da amostra de solo em copo plástico com tampa;
- Adicionar 50 mL de solução extratora ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,025 N e HCl 0,05 N);
- Agitar 5 minutos em uma mesa agitadora a 220 rpm;
- Deixar em repouso por aproximadamente 16 horas e/ou filtrar a amostra em papel filtro;
- 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.