

APLICAÇÃO EM LABORATÓRIO DE TÉCNICAS DE BIORREMEDIAÇÃO EM UM SOLO RESIDUAL CONTAMINADO COM DIESEL E BIODIESEL

Laboratory application of bioremediation techniques in a residual soil contaminated with diesel and biodiesel

Liliane R. R. Meneghetti*

Antônio Thomé**

Norimar Denardin***

Vinícius Girardello****

Vagner S. Berté*****

RESUMO – A contaminação de solos por vazamento de combustíveis é um tema presente nas pesquisas da área de geotecnia ambiental. Os solos contaminados com hidrocarbonetos derivados do petróleo têm grandes impactos ambientais negativos, através da contaminação de lençóis freáticos. Neste trabalho foram aplicadas as técnicas de atenuação natural, bioaugmentação e bioventing em bioreatores de laboratório, na descontaminação de um solo residual de basalto do sul do Brasil, contaminado com óleo diesel (hidrocarbonetos) e biodiesel (ácidos graxos). A quantificação microbiológica foi avaliada 30, 60, 90 e 120 dias após a contaminação. As análises por cromatografia gasosa dos contaminantes residuais no solo foram realizadas ao final do experimento, para avaliar a degradação do diesel e do biodiesel. O estudo mostrou que as bactérias nativas do solo apresentam alto potencial de biodegradação do diesel e biodiesel. Em relação às técnicas de biorremediação, os melhores resultados foram obtidos com a bioaugmentação. No bioventing, a aeração do solo mostrou ser um importante nutriente para a degradação do contaminante através das bactérias nativas, indicando a possível presença de bactérias aeróbias nesse ambiente. A atenuação natural também apresentou potencial de degradação, mais em escala bem inferior as demais técnicas.

SYNOPSIS – Ground contamination caused by fuel leak is one of the main research subjects in the geoenvironmental area. These contaminated soils generate negative environmental impacts, mainly because of the potential groundwater contamination. The research aim was evaluate the decontamination of a residual soil found in south Brazil, contaminated with diesel (hydrocarbons) and biodiesel (fatty acid), through Natural Attenuation, Bioaugmentation and Bioventing techniques. All tests were carried out in laboratory scale. The microbiological quantification was evaluated in 30, 60, 90 and 120 days after contamination. The contaminate degradation was evaluated by gas chromatography at the end of the experiment. The study showed that native soil bacteria present high potential for diesel and biodiesel biodegradation. With regard to bioremediation techniques the best results were obtained from the bioaugmentation. The aeration of the soil proved to be an important nutrient for the contaminant degradation through the native bacteria, indicating the possible presence of aerobic bacteria in this environment. Natural attenuation also presented potential of the degradation, but in below magnitude then other techniques.

PALAVRAS-CHAVE – Bioreator, biodegradação, bioventing, bioaugmentação, bactérias nativas.

* Mestre em Engenharia – UPF/ Doutoranda em Engenharia -UFRGS lilianerebechi@yahoo.com.br

** Professor/Pesquisador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia (Infra-estrutura e Meio Ambiente) – UPF thome@upf.br

*** Professora/Pesquisadora do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) – UPF norimar@upf.br

**** Mestrando em Engenharia - UFRGS vinigirardello@gmail.com

***** Acadêmico de Engenharia Ambiental – UPF vagnerberte@gmail.com

1 – INTRODUÇÃO

A crescente contaminação de solos por vazamentos de combustíveis está gerando pesquisas na área de engenharia ambiental. Isso se deve principalmente à frequência com que esses acidentes se repetem. Os hidrocarbonetos derivados do petróleo geram impactos negativos ao meio ambiente, através da contaminação dos solos e de lençóis freáticos utilizados para consumo humano e animal.

Embora os grandes acidentes ocorridos pelos vazamentos de combustíveis ocupem grande espaço nos meios de comunicação, sabe-se que as principais fontes de contaminação do solo e posterior das águas subterrâneas são pontuais e geralmente ocorrem por falhas mecânicas ou humanas ocorridas durante as operações de transporte, descarregamento e armazenagem desses produtos químicos. De acordo com a lista de áreas contaminadas da CETESB (2006), no estado de São Paulo, os postos de combustível apresentam um percentual de 73 % do total das áreas contaminadas, com 1.221 registros, seguido pela contaminação de fonte industrial com 16%, comercial com 6%, resíduos 4% e acidentais com 1%.

Esse elevado número de registros, nos últimos anos, no estado de São Paulo, tem sido ocasionado pelo aumento da fiscalização e pela exigência de licenciamento dos postos de combustíveis e as ações de remediação do solo em casos de acidentes. A existência de uma área contaminada pode gerar problemas como danos à saúde humana, comprometimento da qualidade dos recursos hídricos, restrições ao uso do solo e danos ao patrimônio público e privado, com a desvalorização das propriedades, além de danos ao meio ambiente (CETESB, 2006). No estado do Rio Grande do Sul não existem estatísticas sobre o percentual de áreas contaminadas por hidrocarbonetos.

Uma grande variedade de processos físico-químicos e biológicos têm sido utilizados na remoção de hidrocarbonetos de petróleo presentes nos vazios dos solos e dissolvidos nas águas subterrâneas. Processos como extração de vapores do solo (SVE), recuperação de produto livre, *bioventing*, extração com solventes, incineração, torres de aeração, adsorção em carvão ativado, biorreatores, biorremediação “*ex situ*”, entre outros, tem sido usados para remover contaminantes orgânicos de águas subterrâneas e sistemas de solo. Esses processos podem ser implementados para controlar o movimento de plumas contaminantes, tratar águas subterrâneas e ou descontaminar solos. No entanto, longos períodos de tempo, espaço físico, tratamento do material contaminado e altos custos estão normalmente associados com a grande maioria dos processos utilizados para remediação de áreas contaminadas. Por outro lado, a biorremediação “*in situ*” é um dos processos de remediação mais viável economicamente, apesar de muitas vezes estar limitada por dificuldades no transporte de nutrientes ou receptores de elétrons e no controle das condições de aclimatação e degradação dos contaminantes nos sistemas subterrâneos. A biorremediação continua sendo a arma mais usada e pesquisada para o controle e descontaminação de aquíferos e solos contendo compostos orgânicos. (Weber e Corseuil, 1994; Corseuil e Alvares, 1996; e Spinelli *et al.*, 2005).

A biorremediação “*in-situ*” permite a descontaminação no próprio local, evitando os inportáveis custos de remoção, transporte e posterior tratamento do solo contaminado. Além disso, tem como vantagens o fato de não haver contato de pessoas com o contaminante e nenhum ou quase nenhum resíduo é formado; requer poucos equipamentos e mão de obra; não interfere nas operações que já estão sendo realizadas; podem ser utilizadas em locais de difícil acesso e é a técnica mais viável economicamente para a descontaminação do solo (Meneghetti, 2007).

O princípio básico da biodegradação está relacionado com a biorremediação, no entanto a interação adequada dessas duas áreas afins necessita do conhecimento de não somente uma ou duas disciplinas, mas sim a integração de várias áreas (Alexander, 1994 e Paul e Clark, 1996).

Pelo processo de biorremediação, a biodegradação do poluente se dá pela ação dos microrganismos presentes (atenuação natural) ou inoculados no solo contaminado (bioaugmentação), podendo ocorrer naturalmente ou sendo estimulada por nutrientes como matéria orgânica, oxigênio (*bioventing*), nitrogênio entre outros, contribuindo para o desenvolvimento sustentável do meio ambiente. Este

processo de biodegradação é baseado na capacidade de populações microbianas de modificar ou decompor determinados poluentes, utilizando os hidrocarbonetos de petróleo como fonte de carbono (C) e energia ao seu crescimento nos solos. A degradação completa destes hidrocarbonetos resulta em produtos finais atóxicos como dióxido de carbono (CO₂), água (H₂O) e biomassa celular. (Meneghetti, 2007). No entanto, podem surgir temporariamente, ou não, produtos intermédios que continuam a ser tóxicos, os quais podem persistir se por qualquer razão o processo de remediação for interrompido.

A biorremediação é dependente de uma série de fatores ambientais, que incluem a aeração, o pH, a umidade, a temperatura e a concentração de nutrientes. A presença de oxigênio é fundamental para a biodegradação efetiva dos óleos. Segundo Moreira e Siqueira (2002), a capacidade dos microrganismos de crescerem e formar colônia ou consórcio microbiano competente depende da existência de genes apropriados e expressos na célula e de diversos fatores ambientais. Esses fatores, assim como os produtos da biodegradação, influenciam diferentemente a velocidade do processo e por isso são determinantes na degradação/ persistência do contaminante no solo.

As preocupações relacionadas ao potencial de contaminação dos solos e das águas subterâneas, por derramamento de combustível vêm crescendo em diversas cidades brasileiras. São Paulo-SP e Curitiba-PR possuem legislação sobre o tema, e em Joinville-SC a prefeitura realizou um estudo em todos os postos de combustível da cidade, no qual foi constatado que somente um posto não possuía vazamentos (Brito *et al.*, 2005). O estado do Rio Grande do Sul não possui nenhuma legislação específica para a contaminação de combustíveis, e os processos de remediação empregados baseiam-se principalmente no tratamento “*ex situ*” (remoção do solo para posterior tratamento).

Sabe-se que inúmeros são os registros dos acidentes ambientais no estado do Rio Grande do Sul ocasionados pelo derramamento de combustíveis. Os tratamentos destas áreas contaminadas possuem natureza eminentemente multidisciplinar, contudo, existe a necessidade de obtenção de um maior número de dados técnicos sobre tal problema para que se possa promover a recuperação do solo contaminado, sem comprometer a biodiversidade local. Portanto, pesquisar e entender a dinâmica dos processos de biorremediação torna-se fundamental para desenvolver atividades de descontaminação do meio contaminado, bem como, para aplicar técnicas de biodegradação econômica e ambientalmente viáveis. Desta forma, pesquisar e conhecer o comportamento dos solos e de seus contaminantes é fundamental para o desenvolvimento de novas técnicas de biorremediação, a fim de torná-las econômica e ambientalmente viáveis.

O objetivo desse trabalho foi avaliar três técnicas de biorremediação (atenuação natural, bioaugmentação e *bioventing*) na descontaminação do solo residual de basalto presente no sul do Brasil, contaminado por diesel e biodiesel.

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Caracterização físico-químico do solo

Amostras deformadas e indeformadas do solo residual de basalto do Campo Experimental de Geotecnia da Universidade de Passo Fundo foram retiradas a uma profundidade de 1,20 m. Na Tabela 1 encontra-se a caracterização física e química do solo natural. A caracterização física foi realizada através dos ensaios de análise granulométrica (ABNT, 1984d), de determinação dos limites de consistência (ABNT, 1984a e c), de determinação de permeabilidade, de avaliação do peso específico (ABNT, 1984b) e da determinação da umidade higroscópica. A caracterização química foi realizada pelo Método descrito por Tedesco *et al.* (1995).

Tabela 1 – Características Físicas e Químicas do Solo Natural.

Parâmetros do solo	Valores
Umidade Natural (%)	34
Peso Volumétrico Real (kN/m ³)	26,7
Peso Volumétrico Natural (kN/m ³)	16,3
Limite de Liquidez (%)	53
Limite de Plasticidade (%)	42
Índice de Plasticidade (%)	11
Índice de vazios (e)	1,19
Grau de Saturação (%)	75,7
Porosidade (%)	54
Percentual de argila (%)	68
Percentual de Silte (%)	5
Percentual de areia	27
pH	5,4
Matéria Orgânica (%)	<0,8
CTC (cmol/dm ³)*	8,6
Permeabilidade (cm/s)	1,39 x 10 ⁻⁵

*CTC – Capacidade de troca catiônica.

A classificação desse solo pelo Sistema Rodoviário de Classificação (HRB) classifica-o como A-7-5 e pelo Sistema Unificado de Classificação de Solos (UCS) esse é um solo MH – Silte de alta plasticidade. Pedologicamente o solo classifica-se como Latossolo Vermelho distrófico (Embrapa, 1999).

Na figura 1 é apresentada a curva granulométrica do solo residual de basalto. Observa-se que o solo é constituído por 70% de argila, 5% de silte, 22% de areia fina e 3% de areia média.

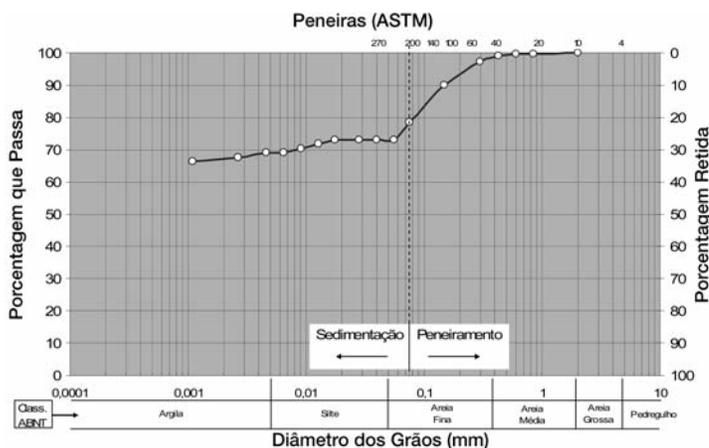


Fig. 1 – Curva granulométrica do solo residual de basalto.

Por ser um solo tão argiloso, quando contaminado por petróleo, algumas de suas características poderiam limitar a eficácia do processo de biodegradação. No entanto, em Latossolos, que apresentam uma boa estruturação, a quantidade de macroporos e porosidade são altas suficiente para que haja uma permeabilidade para migração de ar e nutrientes que favorecem a biorremediação (Meneghetti, 2007).

2.2 – Caracterização microbiológica do solo

As análises de quantificação e identificação dos microrganismos do solo natural foram realizadas através do método de diluição sucessiva em placas de Petry. O ensaio de quantificação dos microrganismos foi realizado por meio de contagem do número mais provável (Braddock e Catterall, 1999). Após a contagem direta dos microrganismos, estes foram selecionados por representatividade e isolados para identificação. A Tabela 2 apresenta os microrganismos presentes no solo natural a 1,2 m de profundidade em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por grama de solo.

Tabela 2 – Microrganismos encontrados no solo natural.

Profundidade (cm)	Microrganismos / g de solo	
	Bactérias	Actinomicetos
120	$1,93 \times 10^3$	$< 0,5 \times 10^3$

Na Figura 2 observam-se os microrganismos que cresceram e se desenvolveram num meio de cultura 523 (Kado e Heskett, 1970), indicando a presença de colônias de bactérias e actinomicetos.

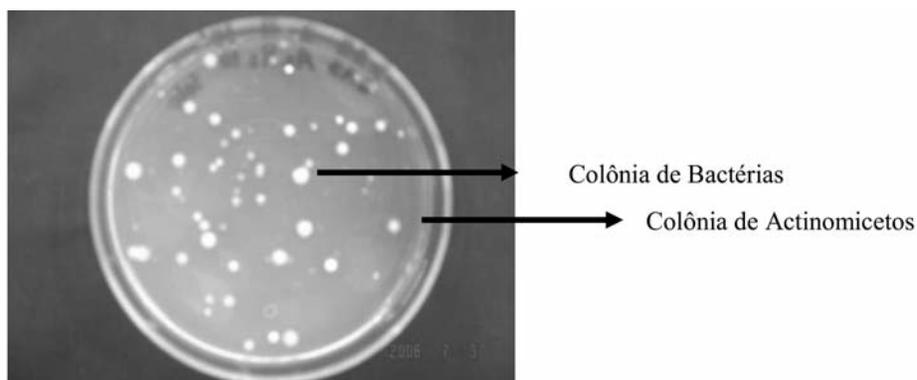


Fig. 2 – Colônia de microrganismos.

No solo natural também foram identificados os fungos: *Penicillium* ssp. (Figura 3A) e *Rizoctonia* ssp. (Figura 3B).

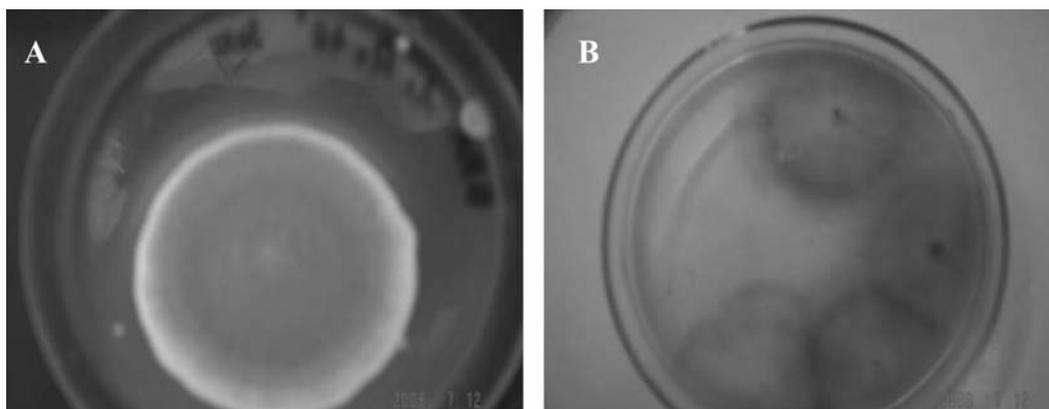


Fig. 3 – Fungos identificados no solo natural (A) *Penicillium* ssp. (B) *Rizoctonia* ssp.

A quantificação de microrganismos nativos do solo apresentou resultados superiores de bactérias, actinomicetos e fungos para a profundidade em estudo, quando comparados aos valores referenciados na literatura. Moreira e Siqueira (2002) encontraram na profundidade de 1,35 a 1,45m o total de $1,4 \times 10^3$ de bactérias (anaeróbias e aeróbias)/g de solo, não relatando a presença de fungos e actinomicetos para essa profundidade.

2.3 – Contaminantes

Para contaminação das amostras de solo foi utilizado o óleo diesel (tipo C) derivado da extração do petróleo, e biodiesel de origem animal (sebo bovino), A Tabela 3 apresenta as características físico-químicas do diesel de petróleo.

Tabela 3 – Características físico-químicas do diesel convencional (tipo C) (ANP, 2007).

Características	Óleo Diesel
Enxofre (%)	0,3
Carbono (%)	86
Hidrogênio (%)	13,4
Oxigênio (%)	0
Aromáticos (% v/v)	31,5
Viscosidade a 40 °C (cSt)	2,5 a 5,5
Número de cetano (NC)	42
Densidade 15 °C (Kg/m ³)	0,849
Ponto de névoa °C	1
Valor calorífico (MJ/Kg)	42,30
Umidade (ppm)	58

Os dados apresentados na Tabela 3 constituem os valores dos limites requeridos para a comercialização do óleo diesel segundo a Agência Nacional do Petróleo (ANP).

O biodiesel é definido por um éster mono-álquil dos ácidos graxos de cadeia longa, podendo ser sintetizado por vários processos tais como: Transesterificação, Pirólise e Emulsificação (Candeia *et al.*, 2006). A Tabela 4 apresenta a composição característica do biodiesel proveniente de sebo bovino.

Tabela 4 – Composição do biodiesel de sebo bovino (Schuler, 2007 e Neto *et al.*, 2000).

Características	%
Mirístico (C14:0)	5,03
Palmitico (C16:0)	29,09
Palmitoléico (C16:1)	3,22
Esteárico (C18:0)	25,33
Oléico (C18:1)	35,85
Linoléico (C18:2)	1,48
Saturados	59,45
Insaturados	40,55
Número de Cetanos	69,00
Viscosidade a 40 °C (cSt)	5,14
Ponto de névoa °C	8-10
Valor calorífico (MJ/Kg)	39,33
Umidade (ppm)	1390

2.4 – Moldagem dos corpos

Os corpos-de-prova de amostras indeformadas foram moldados em formato cilíndrico de 10 cm de altura e 7,5 cm de diâmetro, tendo sido posteriormente colocados dentro de tubos de PVC de 100 mm de diâmetro. Estes tubos foram denominados bioreatores. A fim de evitar o fluxo preferencial do contaminante pelas laterais, os corpos de prova foram revestidos com gesso (Figura 4).



Fig. 4 – Corpo de prova sendo revestido com gesso.

O solo condicionado nestes bioreatores foi contaminado com diesel (tipo C) e biodiesel de origem animal. Nas Figuras 5 A e B são apresentados a forma como foi realizada a contaminação.

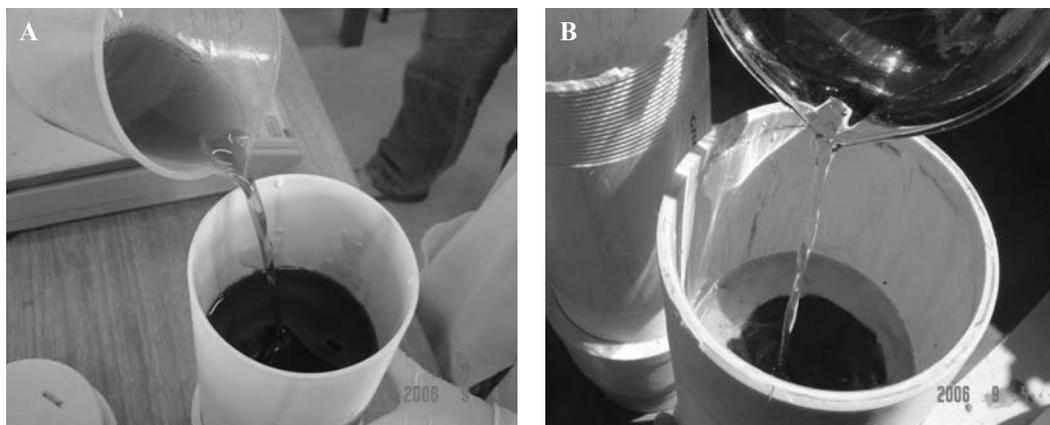


Fig. 5 – Contaminação com óleo diesel (A) e biodiesel (B).

Todos os corpos de prova foram contaminados no mesmo dia, com volumes de contaminantes iguais ao respectivo volume de vazios existente em cada amostra. As amostras foram expostas a um período de contaminação de 24 horas. Após esse período, o excesso de contaminante foi retirado, sendo observado que tanto o diesel como o biodiesel percolaram pelo solo, atingindo o objetivo esperado da contaminação. A quantidade de contaminante absorvida foi determinada pela diferença de massa, do bioreator antes e depois da contaminação, após retirado/escorrido o excesso de contaminante. O valor médio absorvido de contaminantes em todos os corpos de prova foi de 4,3%, sendo que o menor teor absorvido foi 3,8% e a maior absorção foi de 5,1%.

2.5 – Programa experimental

Para avaliar as técnicas de atenuação natural, bioaugmentação e *bioventing* o experimento foi dividido em 9 tratamentos apresentados na Tabela 5. Os tratamentos T1, T4 e T7 não receberam contaminação, sendo considerado controle. A técnica atenuação natural foi aplicada nos tratamentos T1, T2 e T3. Nestes ensaios monitorou-se a capacidade de biodegradação natural do solo em relação ao contaminante.

Tabela 5 – Tratamentos utilizados no experimento.

Tratamentos	Contaminantes	Adições	Técnicas de Biorremediação
T1	Sem	–	Atenuação Natural
T2	Diesel	–	Atenuação Natural
T3	Biodiesel	–	Atenuação Natural
T4	Sem	Bactérias $2,93 \times 10^6$ UFC	Bioaugmentação
T5	Diesel	Bactérias $2,93 \times 10^6$ UFC	Bioaugmentação
T6	Biodiesel	Bactérias $2,93 \times 10^6$ UFC	Bioaugmentação
T7	Sem	Adição de ar	Bioventing
T8	Diesel	Adição de ar	Bioventing
T9	Biodiesel	Adição de ar	Bioventing

A bioaugmentação foi aplicada nos tratamentos T4, T5 e T6. Nesta técnica as bactérias encontradas no solo foram selecionadas e bioaugmentadas até atingirem aproximadamente a concentração de $2,93 \times 10^6$ UFC / mL e foram inoculadas no solo, como apresentado na Figura 6. Nos tratamentos T5 e T6, o solo natural bioaugmentado foi contaminado com óleo diesel e biodiesel, respectivamente.



Fig. 6 – Aplicação das bactérias bioaugmentadas no solo.

Para a execução da técnica *bioventing* foi projetado e construído um equipamento de aeração (Figuras 7 e 8), através do qual foi possível a adição do ar comprimido nas amostras pelo período de 4 horas diárias. O oxigênio foi utilizado como fonte de nutrientes, estimulando a biodegradação do contaminante pelos microrganismos do solo natural. No tratamento T7 foi aplicada a técnica de *bioventing* no solo sem contaminação e nos tratamentos T8 e T9 o solo foi contaminado com óleo diesel e biodiesel, respectivamente.

Este trabalho teve como variáveis fixas: a dimensão geométrica dos corpos de prova, a quantidade do contaminante adicionada aos corpos de prova, a quantidade de ar comprimido e o tempo de

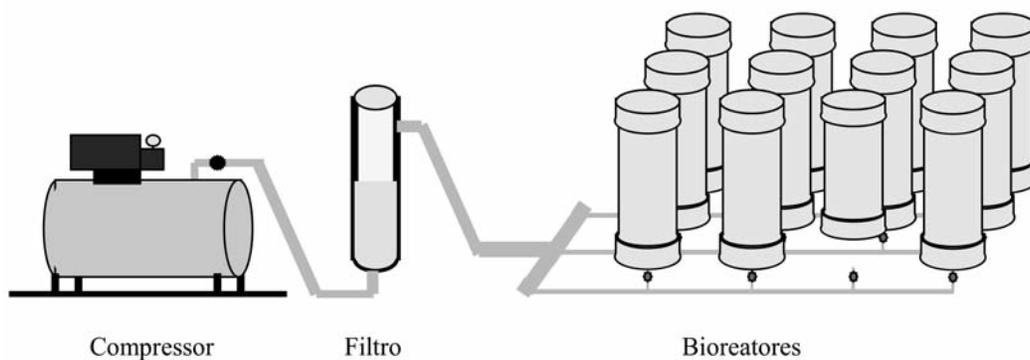


Fig. 7 – Esquema do equipamento de aeração.



Fig. 8 – Equipamento de aeração.

ação dos microrganismos. Como variável de resposta foi considerado a população dos microrganismos nos corpos de provas aos 30, 60, 90 e 120 dias. A temperatura externa foi monitorada durante todo o experimento e os fatores umidade e pH aos 30 e 120 dias.

A biodegradação dos contaminantes foi determinada no final do experimento pelo método analítico de Cromatografia Gasosa (CG). O equipamento utilizado para as análises de CG foi um cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama, fabricante VARIAN e modelo STAR 3400 CX. O procedimento analítico de esterificação dos ácidos graxos encontra-se em AOCS Official Method Ce 1f-96 (2002).

2.6 – Temperatura, umidade e pH

Durante o experimento os corpos de prova foram mantidos à temperatura ambiente do laboratório e a umidade e o pH foram avaliados aos 30 e 120 dias após o início do experimento.

A temperatura externa do laboratório variou muito durante o período do experimento, no entanto, a temperatura interna do laboratório manteve-se em torno dos 25°C (\pm 5°C). A variação da temperatura apresenta-se na Figura 9. A temperatura ideal para o desenvolvimento microbiano é de 25 a 40 °C (Moreira e Siqueira, 2002).

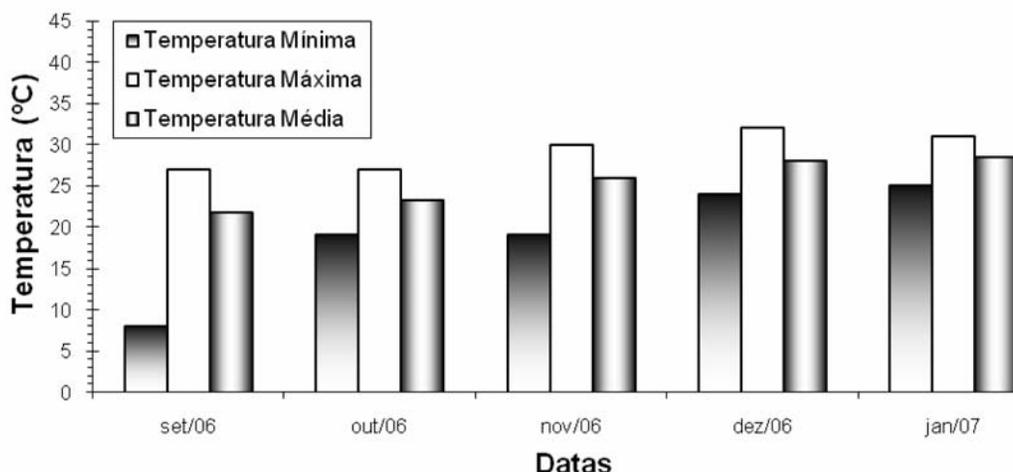


Fig. 9 – Variação da temperatura avaliada durante os 120 dias do experimento.

Ao longo do experimento a umidade nos corpos de prova, sofreu alterações significativas quando comparados ao solo natural. A Figura 10 apresenta a umidade do solo em cada tratamento, avaliado aos 30 e 120 dias do início do experimento.

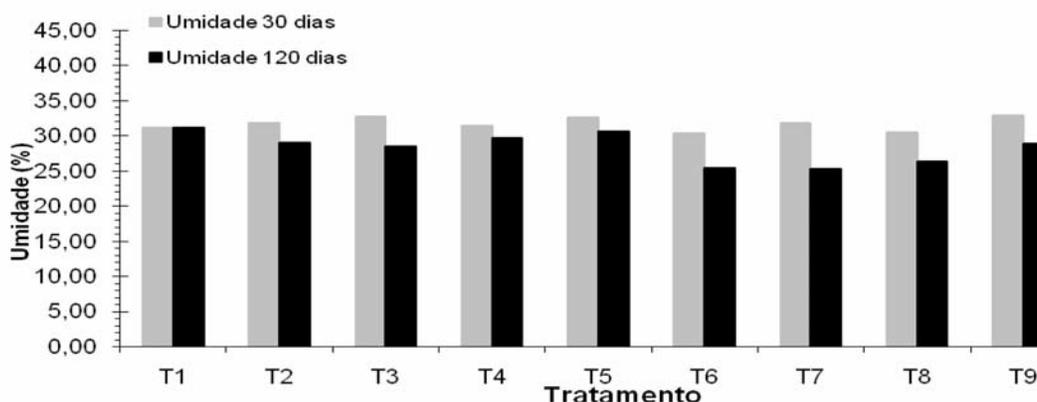


Fig. 10 – Umidade do solo avaliada aos 30 e 120 dias.

Aos 30 dias a umidade manteve-se praticamente constante, variando de 30,37% (T6) a 32,85 (T9), aos 120 dias a perda da umidade foi maior principalmente nos tratamentos por bioventing, variando de 25,25% (T7) e 31,08 (T1).

O pH do solo é um fator limitante para os microrganismos e um importante parâmetro de monitoramento. Ao longo do experimento, observou-se uma variação no pH, tornando-os mais ácidos em relação ao controle. A Figura 11 apresenta o pH dos tratamentos avaliado aos 30 e 120 dias do início do experimento.

Muitas espécies de microrganismo sobrevivem a faixas extremas de pH, no entanto, o pH neutro é o ideal para o seu crescimento. O pH ideal para o desenvolvimento das bactérias é de 6,0 a 9,0 (Moreira e Siqueira, 2002). Para a obtenção de melhores resultados de biorremediação, é fundamental o monitoramento do pH ao longo de todo o período do experimento.

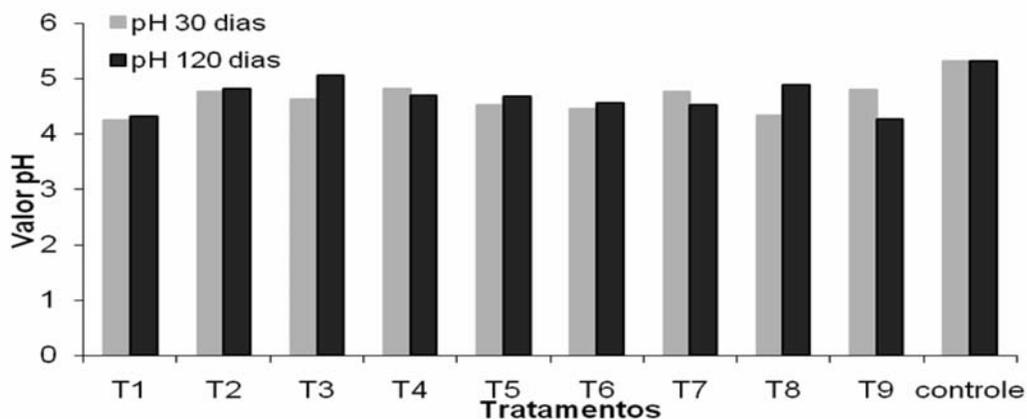


Fig. 11 – pH do solo avaliado aos 30 e 120 dias.

3 – RESULTADOS

3.1 – Quantificação microbiológica

Pela quantificação microbiológica pode-se avaliar o comportamento das bactérias ao longo do experimento. As Figuras 12, 13 e 14 mostram a população das bactérias das técnicas estudadas durante o período de 120 dias. A atenuação natural atingiu a maior concentração de microrganismos aos 30 dias da pesquisa, enquanto que, as outras duas técnicas, atingiram a maior concentração de microrganismos aos 60 dias. Ao estimularmos a biodegradação dos contaminantes, seja pela adição de nutrientes (ar) ou pelo inóculo de culturas (bactérias), os microrganismos necessitam de um período maior de adaptação ao meio. Por isso a maior população de microrganismos foi observada mais tardia nas técnicas de bioaugmentação e bioventing.

A Figura 12 mostra a população de bactérias da atenuação natural dos tratamentos T1, T2 e T3. A atenuação natural apresentou resultados satisfatórios, quanto à população microbiana. Aos 30 dias, o tratamento T3 foi o que obteve melhores resultados com $18,83 \times 10^3$ UFC/g de solo, mostrando que a presença do biodiesel foi uma excelente fonte de nutrientes. Observou-se que após esta data a população de microrganismos começou a diminuir neste tratamento. Aos 60 dias, as bactérias que estavam em contato com o diesel (T2) apresentaram aumento da população atingindo o seu pico máximo com $9,39 \times 10^3$ UFC/g de solo.

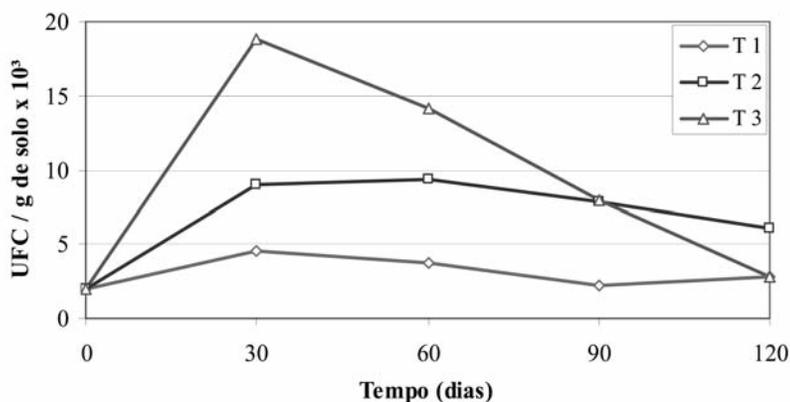


Fig. 12 – Quantificação microbiológica da técnica atenuação natural.

A Figura 13 apresenta a quantificação de bactérias na técnica de bioaumentação. Observou-se que esta técnica foi a que apresentou melhores resultados devido à inoculação das bactérias consorciadas. Os tratamentos T4, T5 e T6 tiveram um comportamento semelhante durante 30 dias, com aumento da população de microrganismos. Sem a presença de contaminante (T4), a melhor adaptação das bactérias ocorreu aos 30 dias. Nos tratamentos contaminados com diesel (T5) e biodiesel (T6) a maior concentração de bactérias ocorreu aos 60 dias, pela necessidade de adaptação dos microrganismos aos contaminantes, com $11,18 \times 10^3$ UFC/g de solo e $8,186 \times 10^3$ UFC/g de solo, respectivamente. A partir daquele período as bactérias iniciaram a fase de declínio.

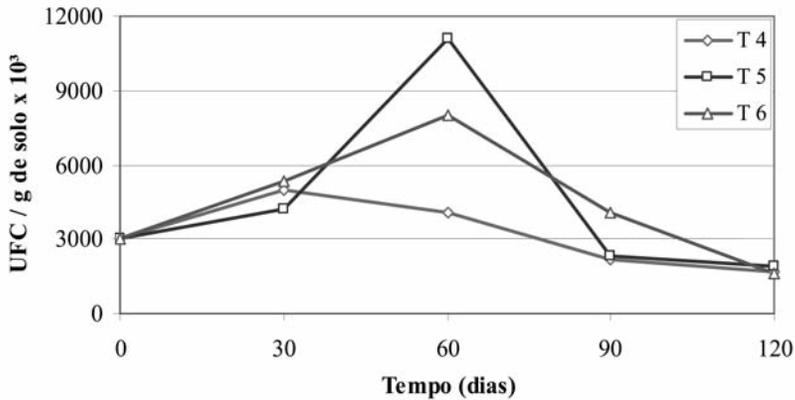


Fig. 13 – Quantificação microbiológica da técnica bioaumentação.

A Figura 14 apresenta a quantificação de bactérias na técnica de *bioventing*. Verifica-se que o crescimento das bactérias até aos 30 dias foi praticamente o mesmo nos três tratamentos. Aos 60 dias, as bactérias na presença do diesel (T8) diminuíram a sua concentração, enquanto que as bactérias dos tratamentos T7 e T9 continuaram a se multiplicar. Esta técnica diferencia-se da atenuação natural pela adição de ar comprimido como estimulante na degradação dos contaminantes. No entanto, ao comparar os dados das duas técnicas observou-se que aos 30 dias a população microbiológica do *bioventing* é inferior à população da atenuação natural, quando da presença do contaminante. No entanto, aos 60 dias, enquanto que as bactérias da atenuação natural diminuíram ou mantiveram a sua concentração, as bactérias do *bioventing* foram estimuladas e atingiram o seu maior pico. Desta forma, o solo em estudo, possivelmente, apresenta bactérias aeróbias ou facultativas

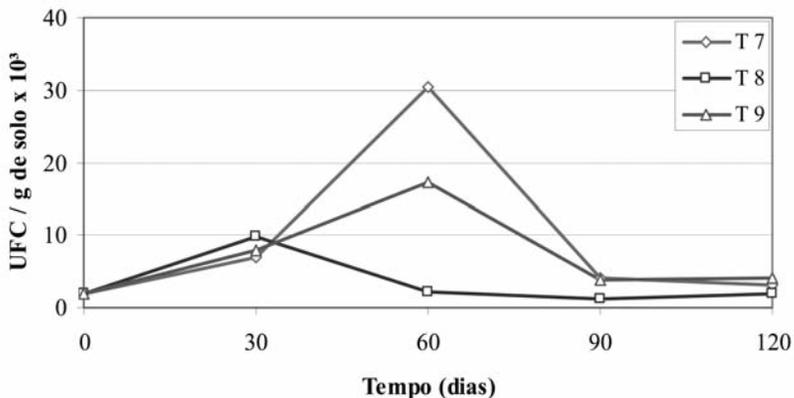


Fig. 14 – Quantificação microbiológica da técnica *bioventing*.

aeróbias. Pode-se inferir também, que as bactérias aeróbias são inibidas pela presença do diesel, pois após os 30 dias ocorreu um declínio da quantidade de microrganismos no tratamento T8.

3.2 – Cromatografia Gasosa (CG)

O potencial de biodegradação das bactérias foi obtido pela diferença de áreas analisadas no perfil cromatográfico para cada técnica. No solo contaminado com diesel, devido à falta de padrão específico, não foi possível reconhecer os hidrocarbonetos presentes. Os resultados foram apresentados na forma de percentual de degradação para cada pico (A, B, C, D, E, F e G), pela comparação de área dos picos apresentados pelo controle (óleo diesel puro). O percentual de degradação do óleo diesel obtido pela análise cromatográfica apresenta-se na Figura 15.

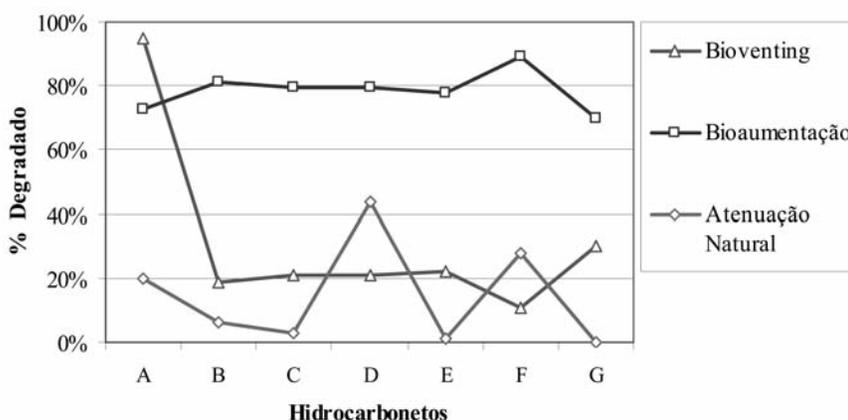


Fig. 15 – Percentual de carbono degradado do óleo diesel aos 120 dias.

A Figura 15 mostra o percentual degradado de diesel através das técnicas de atenuação natural, bioaugmentação e bioventing analisados aos 120 dias. Observa-se que a bioaugmentação foi a técnica que apresentou a melhor degradação do diesel na maioria dos hidrocarbonetos (acima de 70%), chegando a 88,54% de degradação do hidrocarboneto F. A técnica de bioventing manteve a uniformidade na degradação dos hidrocarbonetos B, C, D, E, F e G, com exceção do hidrocarboneto A, que atingiu 95,30% de degradação. Por atenuação natural observou-se que a maior degradação foi do hidrocarboneto D, com 44,53%, seguido do hidrocarboneto F, com 27,89%.

Na análise cromatográfica do biodiesel, os ácidos graxos característicos foram reconhecidos e identificados. O percentual de degradação dos ácidos graxos obtido pela análise cromatográfica do biodiesel encontra-se na Figura 16.

Na Figura 16 apresenta-se o percentual degradado de biodiesel através das técnicas de atenuação natural, de bioaugmentação e de bioventing analisados aos 120 dias. As técnicas de bioaugmentação e bioventing atingiram, aproximadamente, 99% e 97% de degradação dos ácidos gordos C16:0 (ácido palmítico), C18:0 (ácido esteárico) e C18:1 (ácido oléico), indicando a degradação quase completa desses compostos. A atenuação natural manteve a degradação de aproximadamente 57% do ácido gordo C14:0 (ácido mirístico) e 68% do C18:1 (ácido oléico).

Tanto nos tratamentos com diesel como com biodiesel, os melhores resultados de degradação dos contaminantes foram obtidos nas técnicas de bioaugmentação e *bioventing*. A atenuação natural também apresentou resultados satisfatórios de degradação.

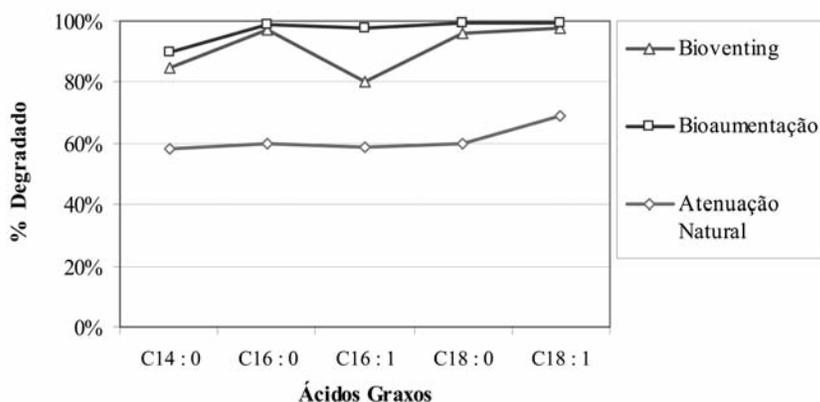


Fig. 16 – Degradação dos ésteres de ácidos graxos do biodiesel aos 120 dias.

4 – CONCLUSÕES

Este estudo avaliou o potencial de biodegradação das bactérias nativas do solo residual de basalto contaminado com diesel e biodiesel, através das técnicas de atenuação natural, bioaumentação e bioventing. A partir dos resultado foi possível chegar as seguintes conclusões:

- A bioaumentação foi a técnica que apresentou maior biodegradação para ambos contaminantes;
- No *bioventing*, a aeração do solo mostrou ser um meio eficiente de permitir a entrada de oxigênio no sistema do solo e estimular o desenvolvimento de bactérias aeróbias nativas;
- A atenuação natural apresentou potencial de degradação, no entanto requer um período mais longo de observação para a obtenção de resultados mais expressivos;
- A degradação dos contaminantes foi observada nas três técnicas de biorremediação, indicando que as bactérias nativas do solo apresentam um elevado potencial de biodegradação tanto dos ácidos graxos presentes no biodiesel como dos hidrocarbonetos encontrados no óleo diesel.

5 – AGRADECIMENTOS

Ao projeto PRONEX-FAPERGS Processo 04/0841.0 pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento da pesquisa, a CAPES a bolsa de doutorado concedida ao primeiro autor e ao CNPQ pela bolsa de pesquisador (PQ) concedida ao segundo autor.

6 – REFERÊNCIAS

- Agência Nacional do Petróleo (2007). Especificações e limites para o óleo diesel. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>. Acesso em: fev. 2007.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas. (1984a). NBR 6459: Solo – Determinação do limite de liquidez. Rio de Janeiro.

- Associação Brasileira de Normas Técnicas. (1984b). NBR 6508: Grãos de solo que passam na peneira 4,8 mm – Determinação da massa específica. Rio de Janeiro.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas. (1984c). NBR 7180: Solo – Determinação do limite de plasticidade. Rio de Janeiro.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas. (1984d). NBR 7181. Solo: Análise granulométrica. Rio de Janeiro.
- Alexander, M. (1994). *Biodegradation and Bioremediation*. San Diego: Academic Press. 302p. California.
- Aocs Official Methods Ce 1f-96. (2002). Determination of cis-and trans- Fatty Acids in Hydrogenated and Refined Oil and Fats by Capillary GLC, Reapproved 1997 – Revised 2002.
- Braddock, J. F. e Catterall, P. H. (1999). A simple method for enumerating gasoline – and diesel – degrading microorganisms. *Bioremediation Journal*, V.3, n, p81-84.
- Brito, F. V.; Oliveira, A. S.; Neves, H. C.; Azevedo, J. A. T.; Bhening, D. L.; Reis, S. M.; Machado, M. C. S.; Azevedo, G. C. e Carvalhães, G. K. (2005). Estudo da Contaminação de Águas Subterrâneas por BTEX oriundas de postos de distribuição no Brasil. IN.: 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás. Salvador.
- Candeia, R. A.; Freitas, J. C. O.; Conceição, M. M.; Silva, F. C.; Santos, I. H. G. e Sousa, A. G. (2006). Análise comparativa do biodiesel derivado de óleo de soja obtido com diferentes álcoois. Disponível em: www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/armazenamento/analise_comparativa_2.pdf> Acesso em: abril. 2008.
- Cardoso, E. J. B. N.; Tsai, S. M.; Neves, M. C. P. (1992). *Microbiologia do solo*. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 360p.
- Cetesb. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo. (2006). Meio Ambiente. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br>. Acesso em Nov. 2006.
- Corseuil, H. X. e Alvarez, P. J. J. (1996). Natural bioremediation perspective for BTEX – contaminated ground water in Brazil. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 27, n.º 1, p. 43-50.
- Embrapa. Centro Nacional de Pesquisas em Solos. 1999. Sistema Brasileiro de Classificação de solos. Brasília: Embrapa Produção de Informação. Rio de Janeiro: Embrapa Solos.
- Kado, C. I. e Heskett, M. G. (1970). Selective media for isolation of Agrobacterium, Corynebacterium, Erwinia, Pseudomonas, and Xantomonas. *Phytopathology*, v.60, p.969-976.
- Meneghetti, L. R. R. (2007). *Biorremediação na descontaminação de um solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel*. Dissertação de Mestrado em Engenharia. Programa de Pós Graduação em Engenharia. Universidade de Passo Fundo. 112p.
- Moreira, F. M. S. e Siqueira, J. O. (2002). *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. Lavras: Ed. UFLA.
- Neto, P. R. C.; Rossi, L. F. Zagonel e G. F. Ramos, L. P. (2000). Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química Nova*, v.23, p 531-537, abr.
- Paul, E. A. e Clark, F. E. (1996). *Soil Microbiology and Biochemistry*. San Diego: Academic Press. 340p. California.

- Schuler, A. (2007). Produção de biodiesel e controle de qualidade por cromatografia. Disponível em: <<http://www.perkinelmer.com.br/home/seminarios/biodiesel>. Acesso em: Jan. 2007.
- Spinelli, L. F. Schnaid; F. Selbasc, P.A. Bento e F. M. Oliveira, J.R. (2005). Enhancing bioremediation of diesel oil and gasoline in soil amended with an agroindustrial sludge. *Journal of the Air & Waste Management Association*. vol. 55: 421-429, April.
- Tedesco, M. J.; Gianello, C.; Bissani, C. A.; Bohnem, H; Volkweiss, S. J. (1995). Análise de solo, plantas e outros materiais. Boletim técnico n° 5, Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 174 p.
- Weber Jr., W. J. e Corseuil, H. X. (1994). Inoculation of contaminated subsurface soils with enriched indigenous microbes to enhance bioremediation rates. *Water Research, Oxford*, v. 28, n.º 6, p. 1415 – 1423.