

AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS DE HIDROCARBONETOS NO SOLO DE “LANDFARMING” UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ÓTICA NO INFRAVERMELHO.

Hencklein, F.A. (Unesp)¹ Angelis, D.F.(Unesp)¹ Domingos, R.N.(Unesp)¹ Gonçalves, R.A.(Replan), Seabra, P.N.(Cenpes)² La Scala, N.(Unesp)³

¹Departamento de Bioquímica e Microbiologia – IB - Unesp – Campus de Rio Claro; Av. 24A, 1515 Bela Vista - Caixa Postal: 199 - 13506-900 - Rio Claro, SP – Brasil
e-mail: fabi.henc@gmail.com

²Cenpes – Petrobras –Rua Horácio Macedo, 950 - Cidade Universitária - Ilha do Fundão - 21941-915 Rio de Janeiro, RJ – Brasil

³Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias –UNESP - Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n. - 14884-900 Jaboticabal, SP, Brasil

As atividades industriais apresentam riscos ambientais, tais como contaminações no solo, água e ar. Técnicas de biorremediação de solos contaminados por compostos orgânicos, baseadas nas atividades metabólicas dos microrganismos, apresentam diversas vantagens, pois estimulam os processos naturais de biodegradação, quando a atenuação natural não alcança em um tempo razoável os limites regulamentados pelos órgãos de controle ambiental. Este trabalho objetivou avaliar a biodegradação dos hidrocarbonetos presentes em solo de “landfarming” utilizando para quantificar a liberação de gás carbônico (CO₂) a metodologia da absorção na luz infravermelha. O experimento foi realizado em reatores contendo 10 litros de solo. Foram empregados dois tipos de solos com características distintas: solo de cerrado apresentando característica predominantemente arenosa e baixa concentração de matéria orgânica (MO) e o solo de “landfarming” composição argilosa e alta concentração de MO. Os solos foram peneirados e sua umidade ajustada para 70% da capacidade de campo. Utilizou-se para correção da umidade vinhaça e água. Além disso, adicionou-se casca de arroz como agente descompactante para melhorar a textura dos solos, facilitando a troca de gases. A atividade dos microrganismos foi avaliada comparativamente mediante a produção de CO₂, que foi armazenado numa câmara, colocada sobre a coluna de solo do reator. Os gases eram succionados por uma bomba que fluía no aparelho e mediante um analisador por absorção ótica no infravermelho quantificava-se o CO₂. As medições eram realizadas diariamente, durante 33 dias. Os resultados permitiram verificar que havia acúmulo do CO₂ produzido e armazenado durante o período determinado. Para quantificar o CO₂ produzido continuamente pelos microrganismos e atividade dos processos químicos é necessário manter a sucção seguida. Nas medições realizadas procedeu-se a sucção diária e intermitente por 5 minutos de cada câmara armazenadora. Os resultados demonstraram que os tratamentos contendo a mistura de casca de arroz e vinhaça produziram maiores liberações de CO₂. Nos reatores contendo mistura de solos (cerrado e “landfarming”) adicionados de vinhaça e casca de arroz ocorreu a maior liberação do gás durante o período estudado. Os experimentos foram comparados, quando a liberação de CO₂ com solo esterilizado, neste a liberação de CO₂ foi menor que nos solos não esterilizados. Pode-se concluir que a utilização de material descompactante e vinhaça auxiliam no processo de biodegradação dos compostos presentes no “landfarming” contribuindo para otimização da biorremediação. Além disso, o uso do equipamento que detecta com maior sensibilidade o CO₂ pode auxiliar no entendimento dos processos metabólicos realizados pelos microrganismos na biorremediação e biodegradação de substâncias dispersas no solo.

1.Biodegradação, 2.Resíduos de hidrocarbonetos, 3.Landfarming.

1. INTRODUÇÃO

A contaminação dos solos é uma consequência típica da atividade industrial. Muitos compostos resultantes desta atividade são transformados em outros materiais por vários processos metabólicos, que podem reduzir ou aumentar sua toxicidade. Os resíduos carbonáceos de organismos em depósitos biogênicos mostram que a decomposição microbiana ocorre também nas grandes reservas de materiais orgânicos, como carvão e petróleo, sendo assim consideradas biodegradáveis se condições ambientais apropriadas forem fornecidas. Porém, os impactos à saúde humana e a do meio ambiente associado à presença de hidrocarbonetos do petróleo na subsuperfície causa preocupação. Afinal, a grande complexidade e variedade de compostos presentes no petróleo dificultam a interpretação das taxas de biodegradação.

Os microrganismos estão associados com o petróleo na sua formação, pois estão presentes tanto nos materiais sedimentados em ambientes marinhos como na recuperação do próprio petróleo. Algumas bactérias

produzem ácido que dissolvem a formação rochosa e, desta forma, assim o óleo é liberado com maior facilidade. Além disso, os microrganismos fazem parte dos processos de decomposição do petróleo. Aproveitando-se desta propriedade muitas espécies de microrganismos são utilizadas em locais poluídos por petróleo na tentativa de degradar o óleo derramado. Porém, a capacidade de determinadas bactérias – as autótrofas – processarem ainda compostos inorgânicos pode causar sérios contratempos na recuperação do óleo, pois, se não forem controladas, podem gerar corrosão nas tubulações, além de alterar as características físicas dos fluídos.

As refinarias de petróleo geram grande quantidade de resíduos oleosos proveniente da decantação nos tanques de estocagem. E este resíduo é um subproduto descartável, composto de uma mistura de hidrocarbonetos, água e sedimentos sendo alguns considerados perigosos. Desta forma, faz-se necessário a seleção de microrganismos que sejam capazes de biodegradar este material também chamado de borra oleosa, pois sua disposição no ambiente final é complexa.

A atenuação (redução) natural de hidrocarbonetos do petróleo requer adequado monitoramento para assegurar-se que os contaminantes permaneçam apenas no local de estudo e sejam biodegradados pelos processos microbianos. Técnicas de biorremediação baseadas nas atividades metabólicas dos microrganismos têm certas vantagens, pois estimulam os processos naturais de biodegradação, quando a atenuação natural não alcança os limites regulamentados em um tempo razoável. Esses processos de biorremediação são recursos e opções ambientalmente responsáveis para eliminar o problema gerado pelo derramamento de óleo e de combustíveis.

Biorremediação é uma aceleração de fatos naturais e assim uma das melhores soluções para o problema de poluentes derivados do petróleo que causa problemas nos ecossistemas. Há duas formas de realizar a biorremediação. A primeira utiliza as capacidades metabólicas dos microrganismos autóctones e na segunda microrganismos exógenos são acrescentados. As tecnologias de biorremediação *in situ* para a descontaminação dos sedimentos no solo e em águas contaminadas com hidrocarbonetos do petróleo envolvem estimulação dos microrganismos autóctones capazes de degradar contaminantes orgânicos. Usando produtos contaminantes como substrato para gerar energia e crescimento, os microrganismos os transformam em outros produtos frequentemente menos perigosos. Com a liberação do CO₂ diminui a massa molecular presente gerando massa celular, humo, sais inorgânicos e água.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Alguns gêneros de bactéria como *Corynebacterium*, *Mycobacterium* e *Pseudomonas* podem utilizar os hidrocarbonetos como fonte de carbono (Richards, 1987). Gray, et al (2000) observaram lenta degradação na transformação de contaminantes no solo e esta dificuldade na biodegradação foi atribuída a fatores físicos como difusão de partículas ou forte atração destas à matéria orgânica presente no material estudado.

Sabaté et al (2004) observaram que solos possuem diferenças nas atividades metabólicas dos microrganismos naturais, afetadas pela sua estrutura, composição, características e o comportamento coligativo. Nestas condições a cinética de todo o processo de biodegradação será diferente em cada tipo de solo. O comportamento bifásico dos compostos no solo deve também ser considerado, pois pelo modelo de seqüestro, a proporção inicial de poluentes livres introduzidos no solo é fixada nos nanoporos de suas partículas tornando os compostos inacessíveis aos microrganismos. Certas frações de hidrocarbonetos podem ficar “presas” nos nanoporos do solo juntamente com os agregados tornando-os inacessíveis aos microrganismos (Admon et al, 2001). Seabra (2001) relata que vários são os fatores que influenciam a biodegradação dos hidrocarbonetos, entre eles estão: a sua composição química, concentração, estado físico e toxicidade.

A sobrevivência de microrganismos metabolizadores de hidrocarbonetos em solos diferentes demonstra a presença de uma larga variedade de organismos capazes de oxidar hidrocarbonetos (Bhatnagar e Fathepure, 1991). Mais de 10 milhões de compostos são biodegradáveis e como o número de substâncias químicas sujeitas ao catabolismo microbiano é grande (10⁶), deve haver equivalente número de enzimas e vias metabólicas ocorrendo na natureza (Wackett e Ellis, 1999). Porém os microrganismos autóctones podem não ser capazes de biodegradar diversas substâncias presentes nos compostos derivados de petróleo. Esses organismos geralmente têm dificuldade para modificar os asfaltenos e compostos aromáticos com quatro ou mais anéis, assim, o acréscimo de microrganismos exógenos adaptados pode ser uma solução viável (Atlas, 1995).

A adição de grande quantidade de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos pode ocasionar aumento nas taxas de biodegradação das substâncias presentes nas complexas misturas do petróleo. Atlas (1995), Rittmann (1992) e Kataoka (2001) relataram que a degradação somente ocorrerá se houver algumas interações, como: o contaminante deve estar próximo e disponível ao microrganismo e este deve ser capaz de participar de alguma parte do processo de degradação ou transformação (Hoeppe e Hinchey, 1994). Contudo, o simples desaparecimento do material não implica que ele foi totalmente biodegradado (Landis e Yu, 1995).

Focht (1993) recomenda o emprego de culturas consorciadas para que o metabolismo microbiano possa biodegradar compostos bifenílicos. Os interrelacionamentos entre espécies diferentes são os aspectos chaves da ação de culturas mistas e comunidades microbianas, assim, as espécies agem em cadeias e as capacidades

degradativas diferentes de cada população auxiliam outras, que nada conseguiriam sem a biotransformação de produtos químicos tóxicos à essas (Bhatnagar e Fathepure, 1991). Bottura (1994) constatou que culturas mistas de bactérias e fungos são os principais responsáveis pela biodegradação de substâncias graxas e a aplicação de um surfactante auxilia a ação dos biodegradadores, o que também foi encontrado por Kataoka (2001).

Muitos estudos têm revelado maior eficiência de biodegradação de hidrocarbonetos por culturas mistas (Dave et al, 1994; Al-Hadhrani et al, 1995; Venkateswaran, et al, 1995; Grady, 1985). Estes trabalhos comprovam que a capacidade degradativa e a resistência a substâncias tóxicas de uma comunidade são maiores que de uma cultura pura, pois a mineralização de um composto xenobiótico, com frequência, requer a união da atividade de múltiplas enzimas e fatores físico-químicos.

Constitui um fator determinante organizar as informações encontradas sobre biodegradação, pois ninguém abrange todo conhecimento sobre a química orgânica e biológica. A existência de uma organização sistemática gera recursos para a pesquisa de outros cientistas, pois muitos compostos orgânicos estão sujeitos à ação de microrganismos e o conhecimento dos processos bioquímicos para algumas classes químicas é bem sistematizado destacando-se alcanos, alquilbenzenos, fenóis e alcóois. Outros aspectos a serem estudados são as condições de como prever o tempo e prever quais os passos da biodegradação que são possíveis, pois, desta forma, as indústrias podem desenvolver produtos mais facilmente biodegradáveis (Wackett e Ellis, 1999).

Esses pesquisadores relatam ainda sobre as etapas para prever a biodegradação, para os quais são necessários conhecimentos sobre:

- Grupos orgânicos funcionais para comparar a nova estrutura química com aquelas que são conhecidas.
- Caminhos do metabolismo intermediário para deduzir como uma nova biodegradação pode metabolizar um composto de forma mais eficiente.
- Reações enzimáticas microbianas para relacionar uma determinada reação a uma enzima conhecida.
- Reações químicas orgânicas para relacionar se novas reações são quimicamente plausíveis para decompor uma substância sem precedentes disponíveis.

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

O baixo custo e o sucesso de uma aplicação da biorremediação dependem da precisão do processo de quantificação das taxas de biodegradação para que se possa prever a efetividade desta e estimar o tempo necessário para que a degradação ocorra (Davis, et al, 2003 e Skladany e Metting, 1993).

O tratamento em "landfarming", onde fertilizantes são adicionados para se obter mais rapidamente a biodegradação dos hidrocarbonetos do petróleo, é uma maneira eficiente de tratar os resíduos e impedir a contaminação do meio ambiente (Paul e Clark, 1996). Esse tratamento, por ser um processo de baixo custo para tratamento de grandes volumes de resíduos, tem sido utilizado com sucesso por décadas, no biotratamento de substâncias derivadas do petróleo e que muitas são liberadas pelas indústrias de refino de óleo (Admon et al, 2001).

Os testes para biotratamento são compostos por duas fases. A primeira envolve a caracterização microbiológica baseada na enumeração dos microrganismos heterotróficos e degradadores de hidrocarbonetos e a taxa de atividade metabólica. A fase seguinte é a identificação do tratamento mais apropriado mediante a avaliação das várias condições presentes na área que se está estudando (Sabaté et al, 2004). Devem ser realizadas ainda nesta fase testes de toxicidade para se prevenir a contaminação do local.

Brown e Nadeau (2002) recomendam a biorremediação que consiste em duas fases, nas quais há opções de tratamentos passivos e ativos para solos contendo mais do que 1% de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP). O tratamento ativo usa a aeração contínua e um revolvimento do solo, enquanto o tratamento passivo ocorre em solos estáticos e com vegetação. A fase I utiliza tanto a biorremediação passiva quanto a ativa na presença de plantas tolerantes ao petróleo. A fase I é completa quando a quantidade de HTP no solo reduziu a níveis toleráveis por plantas nativas sendo assim apropriado para uma restauração. A fase II é iniciada com o plantio de espécies nativas apropriadas para a zona climática do lugar. Essa fase completa a restauração combinando a biorremediação passiva com a revegetação final e, assim, espera-se que os contaminantes do solo sejam minimizados a níveis aceitáveis, pois as plantas podem absorver os elementos tóxicos ainda presentes no solo (Sposito, 1989).

As substâncias simples são mais rapidamente biodegradadas. Por outro lado, algumas moléculas complexas podem ser recalcitrantes, devido a sua estrutura química e tendem a serem biodegradadas lentamente e a se acumularem no solo. Desta forma, as interações abióticas podem interferir em processos biológicos, significando que a capacidade de biodegradação dos microrganismos não é o único fator, que afeta a extensão da biodegradação no solo. Admon, et al (2001) observaram que a taxa de biodegradação do segundo estágio não varia com as diferentes temperaturas, sugerindo que os processos de controle dessa fase não são biológicos. Esses processos podem envolver a capacidade de transformação e o tempo de permanência dos hidrocarbonetos no solo, tornando-os indisponíveis para os microrganismos (Sabaté et al, 2004). Assim, deve-se criar e manter

condições favoráveis para biodegradação durante o período inicial (três semanas) de tratamento para que a máxima capacidade de degradação seja atingida.

O diesel e outros hidrocarbonetos do petróleo são degradados mais rapidamente sobre condições aeróbias, pois o início da biodegradação envolve, geralmente, a oxidação dos substratos por oxigenases (Boopathy, 2003). Hidrocarbonetos aromáticos são oxidados por dioxigenases bacterianas usando oxigênio molecular para hidrolizar intermediários e causar a clivagem dos anéis para formarem ácidos pirúvicos e mucônicos (Capone e Bauer, 1992).

Os microrganismos mais comumente usados para metabolizar de compostos aromáticos são bactérias dos gêneros *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Vibrio* e *Xantobacter* (Barbieri, 1997). As taxas de biodegradação em sistemas anaeróbios são pequenas devido ao decréscimo de acesso ao composto xenobiótico, uma vez que a distribuição da umidade pode influenciar a disponibilidade destes aos microrganismos degradadores, porém alguns compostos monoaromáticos que contêm oxigênio em sua estrutura química podem ser degradados na ausência de oxigênio, mas para muitos hidrocarbonetos o oxigênio é considerado um fator limitante em sua degradação (Davis, et al, 2003). Em termos gerais cadeias ramificadas de alcanos são degradadas mais lentamente do que seus isômeros com cadeia reta (Del'Arco e França, 1999). Davis, et al (2003) verificaram que alguns hidrocarbonetos aromáticos quando presentes em misturas são mais facilmente degradados que quando fornecidos individualmente como fonte de carbono.

As concentrações de oxigênio e dióxido de carbono na fase gasosa quando estão dispostas no solo são variáveis que podem indiretamente caracterizar aí a biodegradação (Richards, 1987). Os organismos biodegradadores de contaminantes estão localizados geralmente na superfície dos solos, indicando que a biodegradação de contaminantes hidrofóbicos é realizada em sua maioria em condições aeróbias (Schoefs et al, 2004). A evolução do crescimento microbiano e o contato entre os microrganismos e o contaminante permitem identificar duas fases limitantes: o limite do crescimento microbiano e a fase limitante de biocontato. Isso é interessante, pois indica que durante o processo de biodegradação deve-se buscar aumentar o biocontato, inserindo biosurfactantes, mudando a quantidade de água ou movimentando o solo.

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

Diante destas informações foram realizados ensaios de biodegradação de solo contaminado com hidrocarbonetos presentes na borra dos tanques de estocagem de petróleo.

3. METODOLOGIA

3.1 Solos

Foram analisados dois tipos de solos com características distintas. O solo de cerrado foi coletado na Estação Ecológica de Itirapina (EEI) de acordo com a Norma Técnica L 6.245 (1984) da Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB). Esse solo tem composição bastante arenosa e possui baixa concentração de matéria orgânica.

O solo de "landfarming" contaminado com borra oleosa foi coletado em uma das células existentes na Refinaria de Petróleo de Paulínia de acordo com a norma NBR 10007 (1987) da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

3.2 Montagem dos Reatores

O experimento foi realizado em laboratório, e a temperatura oscilou durante o período do experimento de 26°C a 36°C, em reatores de 20 litros contendo 10 litros de solo, alcançando uma coluna de solo com profundidade de 30 cm. Foram realizados três tratamentos contendo solo esterilizado em vapor úmido (autoclave) em reatores de 10 litros com 5 litros de solo alcançando uma coluna de solo de 20 cm de profundidade.

Para a montagem dos reatores os solos foram secos ao ar e peneirados em peneira ABNT com gramatura de 1,62mm. Foi medida a capacidade de campo (CC) e acertada a umidade para 70% da CC.

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

foi de 5% com relação ao volume total de solo utilizado nos tratamentos, onde esse agente descompactante foi utilizado.

Foram analisados os comportamentos dos dois solos supracitados e de uma mistura de 25% em volume de solo de “landfarming” com 75% de solo da EEI.

Os tratamentos foram realizados em triplicata, excetuando-se os tratamentos esterilizados, de acordo com protocolo.

Protocolo. Descrição das combinações dos solos estudadas nos tratamentos

Tratamentos	Descrição dos tratamentos
Ar	Ar atmosférico
SC	Solo de cerrado (SC)
SCCA	Solo de cerrado com casca de arroz (CA)
SCV	Solo de cerrado com vinhaça (V)
SCCAV	Solo de cerrado com casca de arroz e vinhaça (CAV)
SCSL	Solo de cerrado com 25% de Solo de “landfarming” (SL)
SCSLCA	Solo de cerrado com 25% de SL e casca de arroz
SCSLV	Solo de cerrado com 25% de SL e vinhaça
SCSLCAV	Solo de cerrado com 25% de SL, casca de arroz e vinhaça
SL	Solo de “landfarming”
SLCA	Solo de “landfarming” e casca de arroz
SLV	Solo de “landfarming” e vinhaça
SLCAV	Solo de “landfarming” com casca de arroz e vinhaça
SCE	Solo de cerrado esterilizado (SCE)
SCSLE	Solo de cerrado com 25% de SL esterilizado
SLE	Solo de “landfarming” esterilizado

3.3 Leituras da produção de CO₂

A atividade microbiana foi avaliada comparativamente mediante a produção de CO₂, que foi armazenado em câmaras, com volume de 2 litros, colocadas sobre a coluna de solo dos reatores. Os gases armazenados eram succionados por uma bomba de ar e fluía para o aparelho, que mediante a espectroscopia de absorção ótica no infravermelho quantificou o a concentração de CO₂. Neste estudo utilizou-se o aparelho LI-COR 820, fabricado pela companhia Li-Cor, Nebraska, EUA.

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

Para quantificar o CO₂ produzido continuamente pelos microrganismos é necessário realizar sucção seguida durante certo tempo para que o valor registrado no equipamento apresente diminuição, desta forma consegue-se fazer a quantificação do CO₂ presente dentro da câmara.

Nas medições realizadas estabeleceu-se um tempo pré-determinado de sucção. Nas observações verificou-se que uma sucção por 5 minutos de cada câmara armazenadora era suficiente.

4. RESULTADOS

Os dados quantitativos de CO₂ permitiram verificar que há acúmulo de CO₂ produzido e armazenado durante o período estudado. O gás carbônico pode ter sido produzido mediante respiração microbiana e também pelos processos químicos de mineralização do carbono presente no solo.

Os resultados demonstraram que a adição de vinhaça proporcionou aumento na liberação de CO₂ quando se compara com os tratamentos em que esta substância não estava presente. Esta constatação foi verificada também por Crivelaro (2005) e Hencklein et al (2006a,b) que observaram a influência do período de adaptação dos microrganismos sobre sua capacidade de metabolizar compostos (Figura 1A, B e C). Porém, Mariano et al (2006) não encontraram eficiência na biodegradação de hidrocarbonetos em solos fertilizados com vinhaça.

Os tratamentos contendo casca de arroz, como agente descompactante, apresentaram resultados satisfatórios quanto a liberação de CO₂ (Figura 1A, B e C), o que também foi verificado no trabalho de Hencklein et al (2006b). Sendo que sua associação com vinhaça induziu os maiores valores em ppm de gás carbônico (Figura 1B e C).

Nos reatores contendo mistura de solos (cerrado e “landfarming”) houve aumento na liberação de CO₂ quando comparado com os outros tratamentos em que não há essa associação dos solos (Figura 1). Quando adicionou-se vinhaça e casca de arroz ocorreu a maior liberação do gás durante o período estudado.

Os experimentos foram comparados, quando a liberação de CO₂ com solo esterilizado, neste a liberação de CO₂ foi menor que nos solos não esterilizados. Os valores destes tratamentos aproximaram-se daqueles obtidos pela medição do gás carbônico presente no ar atmosférico do ambiente onde os reatores encontravam-se (Figura 1D).

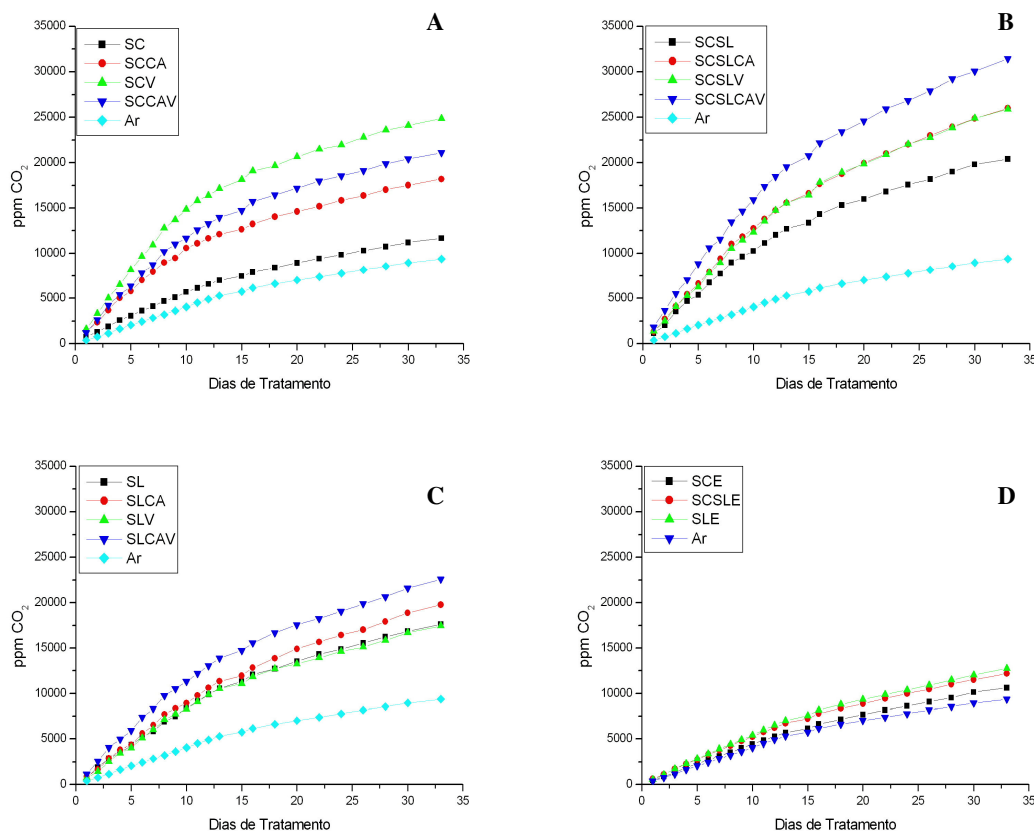


Figura 1. Gás carbônico acumulado no período de 33 dias de tratamento. A – Solo de cerrado com as associações; B- Solo de cerrado misturado com 25% de solo de “landfarming” e associações; C – Solo de “landfarming” e associações; D – Solos esterilizado com vapor úmido.

Na avaliação das médias comparadas dos experimentos pode-se observar que há grande variação nos valores máximos e mínimos e erro padrão nos tratamentos contendo solo de cerrado (Figura 2A e B). As diferenças são menores no tratamento contendo somente solo de “landfarming” e quase nulas naqueles onde o solo foi esterilizado (Figura 2 C e D).

Essas variações aconteceram durante o período de 33 dias. Desta forma, cada tratamento reagiu de forma diferente, embora todos tenham sido submetidos às mesmas condições ambientais.

Assim, podem-se verificar as mudanças no comportamento microbiano, pois os tratamentos esterilizados apresentaram pequenas variações nos parâmetros analisados (Figura 2 D). Sendo assim, as variações ocorridas no período estudado podem indicar mudanças na população de microrganismos.

Essa análise indica que o tratamento em que houve maior liberação de CO₂ foi aquele onde se fez uma mistura de solos e acrescentou-se casca de arroz como agente descompactante e a vinhaça como corretora de umidade. Também se pode observar que essa mistura proporcionou um aumento na liberação de CO₂ em todos os experimentos que a continham (Figura 2 B) se comparados com os demais tratamentos (Figura 2 A e C).

Os tratamentos contendo somente solo de “landfarming” apresentaram pequenos valores de liberação de gás carbônico, quando comparados com aqueles em o solo estava esterilizado (Figura 2 C e D). Esse dado corrobora a hipótese anterior, de que a mistura de solos proporcionou um aumento nesta liberação.

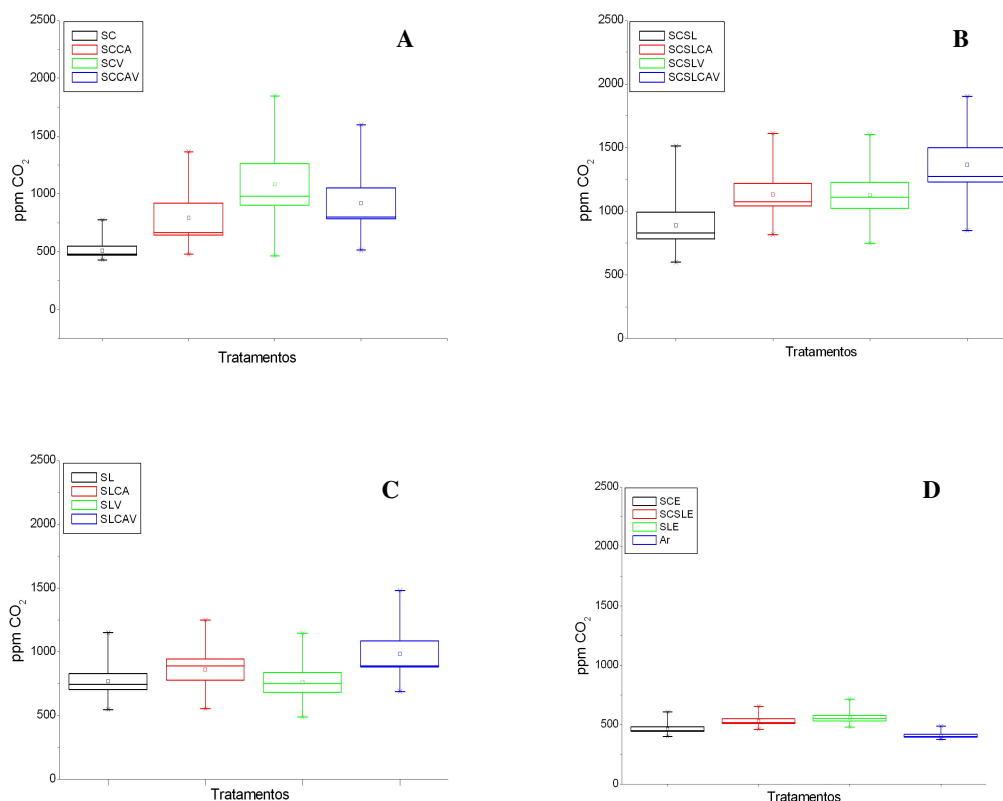


Figura 2. Gráficos em Box Plot dos tratamentos realizados no período de 33 dias. Analisando os valores máximos e mínimos, média, mediana e erro padrão.

5. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a utilização de material descompactante e vinhaça auxiliam no processo de biodegradação dos compostos presentes no “landfarming” contribuindo para otimização da biorremediação. Além disso, o uso do equipamento que detecta CO₂ com maior sensibilidade pode auxiliar no entendimento dos processos metabólicos realizados pelos microrganismos na biorremediação e biodegradação de substâncias dispersas no solo.

6. REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR - 10.007**: Amostragem de resíduos. Rio de Janeiro, 2004. 25p.
- ADMON, S.; GREEN, M.; AVNIMELECH, Y. Biodegradation kinetics of hydrocarbons in soil during land treatment of oily sludge. **Biorem. J.**, Philadelphia, v.5, n.3, p.193-209, 2001.
- AL-HADHRAMI, M. N.; LAPPIN-SEOH, H.M.; FISHER, P. J. Bacterial survival and n-alkane degradation within Omani crude oil and a mousse. **Mar. Pollut. Bullet.**, Oxford, v.30, n.6, p. 403–408, 1995.
- ATLAS, R. M. Biorremediation of petroleum pollutants. **Intern. Biodet. Biodegrad.**, Edinburg, v.35, n.1, p.317-327, 1995.
- BARBIERI, S. M. Biodegradação de compostos aromáticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Microbiologia Ambiental**. EMBRAPA, São Paulo. p. 211-242, 1997
- BHATNAGAR, L., FATHEPURE, B.Z. Mixed cultures in detoxification of hazardous waste. In: ZEIKUS, G., JOHNSON, E.A. (Org.) **Mixed cultures in biotechnology**. New York: McGraw-Hill, 1991. p.293-340.
- BOOPATHY, R. Use of anaerobic soil slurry reactors for the removal of petroleum hydrocarbons in soil. **Intern. Biodet. Biodegrad.**, Edinburg, v.52, n.3, p.161-166, 2003.

- BOTTURA, G. **Biodegradação de substâncias graxas por microrganismos, visando despoluição ambiental**. 1994. 49 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- BOUWER, E. J. Biorremediation of organic contaminants in the subsurface. In: MITCHEL, R. (Ed.) **Environmental Microbiology**. New York: Wiley-Liss, 1992. Cap.11, p.287-318.
- BROWN, J. L.; NADEAU, R. J. Restoration of petroleum-contaminated soil using phased bioremediation. **Biorem. J.**, Philadelphia, v.6, n.4, p. 315-319, 2002.
- CAPONE, D. G.; BAUER, J. E. Microbial processes in coastal pollution. In: MITCHEL, R. (Ed.) **Environmental Microbiology**. New York: Wiley-Liss, 1992. Cap.8, p.197-237.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL. **Norma Técnica L6.245: Solos – Coleta e preparação de amostras – Procedimentos**. São Paulo, 1984. 25p.
- CRIVELARO, S. H. R. **Associação de borra oleosa de refinaria de petróleo e vinhaça visando a biodegradação**. 2005. 62f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ecologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro.
- DAVE, H.; RAMAKRISHMA, C.; BHATT, B. D.; DESAI, J. D. Biodegradation of slop oil from a petrochemical industry and bioreclamation of slop oil contaminated soil. **W. J. Microbiol. Biotechnol.**, Paris, v.10, n.6, p. 653-656, 1994.
- DAVIS, C.; CORT, T.; DAI, D.; ILLANGASEKARE, T. H.; MUNAKATAMARR, J. Effects of heterogeneity and experimental scale on the biodegradation of diesel. **Biodegrad.**, Evanston, v.14, n.6, p.373-384, 2003.
- DEL'ARCO, J. P.; FRANÇA, F. P. Biodegradation of crude oil in sandy sediment. **Intern. Biodet. Biodegrad.**, Edinburg, v.44, n.2, p.87-92, 1999.
- FOCHT, D. D. Microbial degradation of chlorinated biphenyls. In: BOLLAG, J. M., STOTZKY, G. **Soil Biochemistry**. New York: Marcel Dekker, 1993, vol. 8, Cap9, p.341-407.
- GRADY, C. P. L. Biodegradation: its measurement and microbiological basis. **Biotech. Bioeng.**, New Jersey, v.27, n.5, p. 660-674, 1985.
- GRAY, M. R.; BANERJEE, D. K.; DUDAS, M. J.; PICKARD, M. A. Protocols to enhance biodegradation of hydrocarbon contaminants in soil. **Biorem. J.**, Philadelphia, v.4, n.4, p.249-257, 2000.
- HENCKLEIN, F. A.; ANGELIS, D. F.; FURLAN, L. T.; GONÇALVES, R. A.; SEABRA, P. N. Ação de agentes descompactantes e de vinhaça na biodegradação de resíduos de hidrocarbonetos no solo. In: **X ENAMA**. Goiânia/ GO, 28/novembro-01/dezembro, 2006a.
- HENCKLEIN, F. A.; ANGELIS, D. F.; FURLAN, L. T.; GONÇALVES, R. A.; SEABRA, P. N. Biodegradação de resíduos de hidrocarbonetos no solo de "landfarming" utilizando agentes descompactantes. In: **V Simp. Intern. Qual. Amb.** Porto Alegre/RS, 22-24 maio, 2006b.
- HOEPEL, R.E.; HINCHEE, R.E. Enhanced biodegradation for on-site remediation of contaminated soils and groundwater. In: WILSON, D.J.; CLARKE, A.N. (Ed.). **Hazardous waste site soil remediation. Theory and application of innovative technologies**. New York: Marcel Dekker, 1994. Cap.7, p. 311-431.
- KATAOKA, A. P. A. G. **Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de "landfarming"**. 2001. 202 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- LANDIS, W. G.; YU, M. **Introduction to environmental toxicology: Impacts of chemicals upon ecological systems**. Boca Raton: CRC Press, 1995.
- MARIANO, A.P., CRIVELARO, S.H.R., ANGELIS, D.F, BONOTTO, D.M. Use of vinasse, an ethanol distillery waste, as an amendment to bioremediation of diesel oil contaminated soils. In: **XXII Interam. Cong. Chem. Engin.** Buenos Aires/ARG, 1-4 outubro, 2006.
- PAUL, E. A.; CLARK, F. E. **Soil microbiology and biochemistry**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1996.
- RICHARDS, B. N. **The microbiology of terrestrial ecosystems**. New York: Longman Scientific & Technical, 1987.
- RITTMANN, B.E. –Innovations in biological processes for pollution control. In: MITCHELL, R. (ed.) **Environmental Microbiology**. New York : Wiley-Liss, 1992. p. 265-286
- ROSATO, Y. B. Biodegradação do petróleo In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Org.) **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1997. p.307-334.
- SABATÉ, J.; VIÑAS, M.; SOLANAS, A. M. Laboratory-scale biorremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. **Intern. Biodet. Biodegrad.**, Edinburg, v.54, n.1, p.19-25, 2004.
- SCHOEFS, O.; PERRIER, M.; SAMSON, R. Estimation of contaminant depletion in unsaturated soils using a reduced-order biodegradation model and carbon dioxide measurement. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Münster, v.64, n.1, p.53-61, 2003.
- SEABRA, P. N. Uso da Biorremediação em Áreas Impactadas pela Indústria do Petróleo. In: MELO, I.S.; SILVA, C.M.M.S.; SCRAMIN, S.; SPESSOTO, A. (Ed.) **Biodegradação**. Jaguariúna. EMBRAPA, 2001. p.41-60.

- SKALADANY, G. J.; METTING, F. B. Jr. Bioremediation of contaminated soil. In: METTING, F. B. Jr. (Ed.) **Soil microbial ecology**. New York: Marcel Dekker, 1993, Cap. 17, p. 483-513.
- SPOSITO, G. **The chemistry of soils**. New York: Oxford University Press, 1989.
- VENKATESWARAN, K.; HARAYAMA, S. Sequential enrichment of microbial population exhibiting enhanced biodegradation of crude oil. **Can. J. Microbial.**, Ottawa, v. 41, n.9, p. 767-775, 1995.
- WACKETT, L. P.; ELLIS, L. B. M. Predicting biodegradation. **Environ. Microbiol.**, Braunschweig, v.1, n.2, p.119-124, 1999.

BIODEGRADATION EVALUATION OF HYDROCARBONS RESIDUES IN LANDFARMING SOIL USING INFRARED ABSORPTION SPECTROSCOPY

Industrial activities present environmental risks such as soil contamination. The bioremediation techniques of organic compounds polluted soils based on metabolic activities of the microorganisms, present several advantages. They stimulate the natural biodegradation processes, when the natural attenuation does not reach the regulatory limits established by the environmental control agencies in a reasonable time. This work aimed to evaluate the hydrocarbon biodegradation presented in two types of soils using the infrared (IR) absorption spectroscopy to quantify the carbon dioxide (CO₂) produced. The two types of soils used present different characteristics a tropical savanna soil with a sandy texture and low organic matter (OM) concentration and a soil from landfarming quite loamy and with high concentration of OM. The experiment was carried out in reactors with 10 liters of soil. The soils were screened and the moisture was corrected to 70% of its water holding capacity. To correct the soil moisture was used sugarcane vinasse and water. In addition, rice hulls were added as bulking agent to improve the soil texture, improving the gas mass transfer. The activity of the microorganisms was evaluated by the CO₂ production that was trapped in a chamber put above the column reactor. Using a bomb the outlet gases were passed thru the IR detector to quantify CO₂. The measurements were accomplished everyday, during a period of 33 days. It was observed an accumulation and storage of produced CO₂ during the certain period. For immediate measures of CO₂ it is necessary to accomplish continuous suction during a certain time to quantify the produced CO₂ by microbial respiration and also from the chemical carbon mineralization. To accomplish the measurements it was proceeded the suction for 5 minutes in each storage chamber. The results shown that the treatments using rice hull and vinasse produced larger liberations of CO₂. In the reactors using a soil mixture (savanna and landfarming) with vinasse and rice amendments shown the largest CO₂ liberation. The liberation of CO₂ with sterilized soil was smaller than in the non-sterilized soils. It can be concluded that the use of bulking material and vinasse increased biodegradation of the organic compounds presented in the "landfarming". Besides, the use of the infrared absorption spectroscopy can help to understand the metabolic processes accomplished by the microorganisms in the bioremediation and biodegradation of dispersed substances in the soil.

1.Biodegradation, 2.Hydrocarbons residues, 3.Landfarming.

Os autores são os únicos responsáveis pelo conteúdo deste artigo.