



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE, TECNOLOGIA E SOCIEDADE  
MESTRADO EM AMBIENTE, TECNOLOGIA E SOCIEDADE

BRENNO DAYANO AZEVEDO DA SILVEIRA

**RECUPERAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO PELA TÉCNICA  
DA BIOESTIMULAÇÃO**

MOSSORÓ

2016

BRENNO DAYANO AZEVEDO DA SILVEIRA

**RECUPERAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO PELA TÉCNICA  
DA BIOESTIMULAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ambiente, Tecnologia e Sociedade do Programa de Pós-Graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ambiente, Tecnologia e Sociedade.

Linha de Pesquisa: Tecnologias Sustentáveis e Recursos Naturais do Semi-Árido.

Orientador: Celsemy Eleuterio Maia, Prof. Dr.

MOSSORÓ

2016

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

S587r Silveira, Brenno Dayano Azevedo da.  
Recuperação de solo contaminado com petróleo  
pela técnica da bioestimulação / Brenno Dayano  
Azevedo da Silveira. - 2016.  
102 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Celsemy Eleutério Maia.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal  
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em  
Ambiente, Tecnologia e Sociedade, 2016.

1. Biorremediação. 2. Solo. 3. Argiloso.  
4. Fertilizante. 5. NPK. I. Maia, Prof.  
Dr. Celsemy Eleutério, orient. II. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

BRENNO DAYANO AZEVEDO DA SILVEIRA

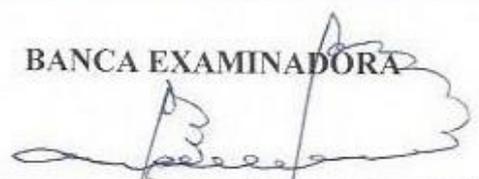
**RECUPERAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM PETRÓLEO PELA TÉCNICA  
DA BIOESTIMULAÇÃO**

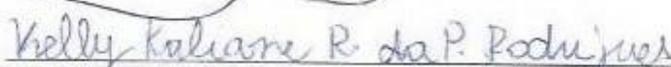
Dissertação apresentada ao Mestrado em Ambiente, Tecnologia e Sociedade do Programa de Pós-Graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ambiente, Tecnologia e Sociedade.

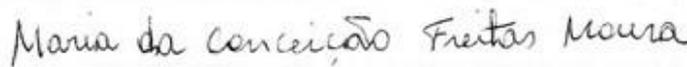
Linha de Pesquisa: Tecnologias Sustentáveis e Recursos Naturais do Semi-Árido.

Defendida em: 20 / 09 / 20 16.

**BANCA EXAMINADORA**

  
Prof. Dr. Celsemy Eleutério Maia - UFERSA  
Presidente

  
Prof.ª Dr.ª Kelly Kaliane da Paz Rodrigues - UFERSA  
Membro Examinador

  
Dr.ª Maria da Conceição Freitas Moura  
Membro Examinador

*Dedico este trabalho a Deus, a quem devemos  
toda a honra e toda gloria.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente a Deus pelo dom da vida e por ter me abençoado enormemente com saúde, paz, segurança, por ter me concedido um lar, uma família e amigos maravilhosos, por todas as coisas boas e momentos de dificuldade, cada um a seu modo e seu tempo, pois me fizeram ser quem eu sou.

Agradeço aos meus pais, Benedito Azevedo e Arlete Batista, meus maiores exemplos de união, amor e companheirismo, por sempre estarem presentes, por terem me ensinado a humildade, honestidade, perseverança e por tanto terem se privado para me proporcionar acesso à educação.

Agradeço ao meu filho, João Otávio, um homem no corpo de uma criança, detentor de um coração que não cabe nesse mundo, por me ensinar valores fundamentais como o amor incondicional, carinho, companheirismo e por ter me dado a oportunidade de ser seu pai

Agradeço a minha esposa, Priscylla Gondim por todo o amor, carinho, pelo exemplo de ser humano e profissional sempre disposta a ajudar seu próximo e pelo grande incentivo a continuar na vida acadêmica.

Agradeço Orientador Prof. Dr. Celsemy Eleuterio Maia por sempre ter sido tão receptivo e atencioso, pelas oportunidades desde a graduação na Iniciação Científica e pela valiosa orientação na pesquisa e desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a minha amiga Maria Valdete da Costa, pessoa de fundamental importância no desenvolvimento deste trabalho, por sua incansável ajuda e orientação no laboratório e a professora Elis Regina Costa de Moraes pelo apoio, atenção e valiosas contribuições.

Agradeço ao meu irmão, Brunno Delano, aos meus tios e primos paternos e maternos, pela amizade, companheirismo e torcida, em especial a minha tia Alexsandra por ter estado presente em momentos delicados da minha vida.

Agradeço a UFERSA, ao Programa de Pós-graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade e a todos os professores que o fazem, pela oportunidade de crescer e aprender.

*“Ninguém pode voltar atrás e fazer um novo começo. Mas qualquer um pode recomeçar e fazer um novo fim”.*

*(Chico Xavier)*

## RESUMO

Dentre os impactos ambientais ocasionados pelas atividades petrolíferas, cita-se os vazamentos de petróleo bruto no solo, que acarretam prejuízos aos ecossistemas e consequentemente efeitos negativos para a sociedade. Para recuperação dessas áreas tem-se como alternativa, viável e eficaz, de simples aplicação e baixo custo, a biorremediação, uma técnica que utiliza microrganismos capazes de degradar contaminantes, através da estratégia da bioestimulação que se baseia na otimização das condições ambientais para favorecer a atividade microbiana. Objetivou-se avaliar o efeito da bioestimulação com aplicação do fertilizante NPK 10:30:20 na degradação de petróleo em um Vertissolo. Para isso o solo foi contaminado artificialmente com petróleo em níveis crescentes de 0, 1, 3, 5 e 10 % base em massa e bioestimulado com fertilizante NPK 10:30:20, dosagem única no início do experimento em níveis de concentração equivalente a 0, 250, 500, 1.250 e 2.500 kg ha<sup>-1</sup>. O controle da degradação do contaminante foi realizado pelo método respirométrico, através da produção de CO<sub>2</sub> medido a cada 7 dias ao longo dos 91 dias de experimento. Observou-se maior produção de CO<sub>2</sub> nos tratamentos bioestimulados com o fertilizante, maior produção de CO<sub>2</sub> em todos os tratamentos nos primeiros 14 dias de experimento e que o modelo matemático obtido pelo Método da Superfície de Resposta foi capaz de estimar a dose da formulação NPK 10:30:20 para diferentes níveis de contaminação de petróleo. Conclui-se que a técnica da bioestimulação com aplicação de fertilizante NPK na proporção 10:30:20 teve efeito significativo no aumento da produção de CO<sub>2</sub> no Vertissolo com diferentes níveis de contaminação por petróleo evidenciando efeito positivo da bioestimulação na otimização da degradação do contaminante.

**Palavras-chave:** Biorremediação. Solo. Argiloso. Fertilizante. NPK.

## ABSTRACT

Among the environmental impacts caused by oil activities the oil leaks in the soil are cited, which cause damage to ecosystems and consequently negative effects to society. For recovery these areas bioremediation is an alternative, viable, effective, simple application and low-cost, uses microorganisms able to degrade contaminants, through the biostimulation strategy which is based on the optimization of environmental conditions to promote microbial activity. This study aimed to evaluate the effect of biostimulation with application of NPK fertilizer 10:30:20 on oil degradation in a Vertisol. The soil was artificially contaminated with oil in increasing levels of 0, 1, 3, 5 and 10 % mass base and the biostimulation was made with NPK fertilizer 10:30:20, single dose only in the beginning of the experiment in equivalent concentrations levels to 0, 250, 500, 1,250 and 2,500 kg ha<sup>-1</sup>. The control of contaminant degradation was realized by respirometric method, through the CO<sub>2</sub> production measured every 7 days along the 91 days of experiment. It was observed higher CO<sub>2</sub> production in the treatments with fertilizer, increased CO<sub>2</sub> production in all treatments in the first 14 days of experiment and the mathematical model obtained by Response Surface Method was able to estimate the dose of NPK formulation 10:30: 20 for different petroleum contamination levels. It is concluded that the biostimulation technique with NPK fertilizer application in proportion 10:30:20 had a significant effect on the increase of CO<sub>2</sub> production in Vertisoil with different levels of oil contamination by showing the positive effect of the biostimulation in the contaminant degradation optimization.

**Keywords:** Bioremediation. Soil. Clay. Fertilizer. NPK.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação química dos hidrocarbonetos de petróleo. ....	21
Figura 2 - Velocidades de crescimento características de diferentes tipos de microrganismos em resposta à temperatura. ....	50
Figura 3 - Local de coleta do solo. ....	58
Figura 4 - Localização do ponto de coleta do solo em relação ao município de Mossoró, estado do Rio Grande do Norte. ....	59
Figura 5 - Coleta do solo. ....	60
Figura 6 - Solo secando ao ar. ....	60
Figura 7. Amostras de solo pesadas com 2,0 kg cada em sacos plásticos para contaminação com petróleo nas respectivas porcentagens de 0, 1, 3, 5 e 10 %. ....	63
Figura 8. Contaminação das amostras de solo com petróleo em saco plástico para homogeneização. ....	63
Figura 9. Frascos de vidro lacrados com filme PVC, hermeticamente fechados com tampa (respirômetros de Bartha adaptados). ....	64
Figura 10. Titulação da solução de NaOH contendo o CO <sub>2</sub> produzido nos respirômetros, titulados com HCl, utilizando fenolftaleína como indicador.....	65

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Temperaturas registradas durante a execução do experimento. ....	64
Gráfico 2. Produção absoluta de CO <sub>2</sub> em relação aos dias do experimento com 0 % de óleo e doses crescentes de NPK. ....	68
Gráfico 3. Produção absoluta de CO <sub>2</sub> em relação aos dias do experimento com 1 % de óleo e doses crescentes de NPK. ....	69
Gráfico 4. Produção absoluta de CO <sub>2</sub> em relação aos dias do experimento com 3 % de óleo e doses crescentes de NPK. ....	70
Gráfico 5. Produção absoluta de CO <sub>2</sub> em relação aos dias do experimento com 5 % de óleo e doses crescentes de NPK. ....	71
Gráfico 6. Produção absoluta de CO <sub>2</sub> em relação aos dias do experimento com 10 % de óleo e doses crescentes de NPK. ....	73
Gráfico 7. Produção acumulada de CO <sub>2</sub> em relação aos dias do experimento com 0 % de óleo e doses crescentes de NPK. ....	74
Gráfico 8. Produção acumulada de CO <sub>2</sub> em relação aos dias do experimento com 1 % de óleo e doses crescentes de NPK. ....	75
Gráfico 9. Produção acumulada de CO <sub>2</sub> em relação aos dias do experimento com 3 % de óleo e doses crescentes de NPK. ....	76
Gráfico 10. Produção acumulada de CO <sub>2</sub> em relação aos dias do experimento com 5 % de óleo e doses crescentes de NPK. ....	77
Gráfico 11. Produção acumulada de CO <sub>2</sub> em relação aos dias do experimento com 10 % de óleo e doses crescentes de NPK. ....	77
Gráfico 12. Superfícies de resposta das produções acumuladas de CO <sub>2</sub> em razão das doses de NPK e níveis de contaminação por óleo aos (a) 7 dias, (b) 14 dias, (c) 21 dias, (d) 28 dias, (e) 36 dias, (f) 42 dias, (g) 49 dias, (h) 56 dias, (i) 70 dias, (j) 77 dia e (l) 84 dias. ....	78
Gráfico 13. Superfície de resposta da produção acumulada de CO <sub>2</sub> em razão das doses de NPK e níveis de contaminação por óleo aos 91 dias. ....	81
Gráfico 14. Máxima produção de CO <sub>2</sub> com relação as doses de NPK para 0, 1, 3, 5 e 10 % de óleo. ....	83
Gráfico 15. Isoquantas da produção acumulada de CO <sub>2</sub> em razão das doses crescentes de óleo e NPK e definição da zona racional. ....	85

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Vantagens e desvantagens da biorremediação em solos. ....	31
Quadro 2 - Vantagens e desvantagens das técnicas de Biorremediação In situ e Ex situ. ....	35

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frações típicas do petróleo.....	22
Tabela 2 - Classificação do petróleo segundo o Grau API e o Teor de Enxofre.....	23
Tabela 3 - Tecnologias de tratamento de compostos orgânicos.....	34
Tabela 4 - Distribuição de microrganismos em várias profundidades do solo.....	47
Tabela 5 - Características físicas do solo utilizado no experimento.....	61
Tabela 6 - Características químicas do solo utilizado no experimento. ....	61
Tabela 7 – Esquema fatorial do experimento, 25 tratamentos em diferentes combinações de doses de petróleo e NPK.....	65
Tabela 8. Coeficientes dos modelos matemáticos obtidos a partir das superfícies de resposta gerados a partir dos dados de produção acumulada de CO <sub>2</sub> entre os dias 7 e 91 e seus respectivos coeficientes de determinação R <sup>2</sup> .....	82
Tabela 9. Simulação da produção de CO <sub>2</sub> em relação aos diferentes níveis de óleo e NPK conforme modelo matemático gerado pela superfície de resposta aos 91 dias. ....	82
Tabela 10. Máxima produção de CO <sub>2</sub> em relação a dose ótima de NPK para os níveis de contaminação do solo de 0 a 10 %. ....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AC	Área Contaminada
API	American Petroleum Institute
BR	Rodovia Federal Brasileira
C:N	Relação Carbono Nitrogênio
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono ou Gás Carbônico
CRA	Capacidade de Retenção de Água
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPA	Environmental Protection Agency
EUA	Estados Unidos da América
TFSA	Terra Fina Seca ao Ar
GLP	Gás Liquefeito de Petróleo
HPA	Hidrocarbonetos Poliaromáticos
MAP	Monofosfato de Amônio
MSR	Metodologia da Superfície de Resposta
NBR	Normas Brasileiras
NPK	Nitrogênio, Potássio e Fosforo
pH	Potencial Hidrogeniônico
ppm	Partes por Milhão
PRAD	Plano de Recuperação de Área Degradada
PVC	Policloreto de Vinila
TPH	Hidrocarbonetos Totais de Petróleo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>Petróleo .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2</b>	<b>Efeitos do petróleo no meio ambiente .....</b>	<b>25</b>
<b>3.3</b>	<b>Biorremediação .....</b>	<b>28</b>
3.3.1	Técnicas de biorremediação .....	33
3.3.2	Atenuação Natural .....	36
3.3.2.1	Bioestimulação .....	37
<b>3.4</b>	<b>Biodegradação.....</b>	<b>45</b>
3.4.1	Fatores limitantes a biodegradação.....	48
3.4.1.1	Umidade.....	49
3.4.1.2	Temperatura.....	49
3.4.1.3	pH .....	51
3.4.1.4	Oxigênio .....	52
3.4.1.5	Nutrientes.....	53
<b>3.5</b>	<b>Respirometria.....</b>	<b>55</b>
<b>3.6</b>	<b>Metodologia da Superfície de Resposta .....</b>	<b>57</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>58</b>
<b>4.1</b>	<b>Coleta da amostra de solo .....</b>	<b>58</b>
<b>4.2</b>	<b>Caracterização física e química do solo .....</b>	<b>60</b>
<b>4.3</b>	<b>Experimento de bioestimulação do solo contaminado .....</b>	<b>62</b>
4.3.1	Produção de C-CO <sub>2</sub> .....	65
<b>4.4</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>66</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>89</b>
<b>8</b>	<b>APÊNDICE A – ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>102</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Registros apontam a utilização do petróleo há mais de 2.000 anos, para as mais diversas finalidades, dentre elas construção civil e fins bélicos (THOMAS, 2001), atualmente é largamente utilizado na produção de combustíveis e como matéria prima na fabricação de produtos industrializados. O Brasil é destaque mundial na cadeia produtiva do petróleo, em 2013 foi listado entre os 15 maiores produtores e detentores de reservas comprovadas. O estado do Rio Grande do Norte é diretamente responsável por esse mérito detendo a maior quantidade de poços produtores de petróleo e gás natural em terra seguido de Sergipe e Bahia.

A cadeia produtiva do petróleo abrange as etapas da exploração, transporte, refino, estocagem e comercialização, estando presente nestas grandes probabilidades de acidentes e por consequência o contato do petróleo ou de seus derivados com os ambientes aquáticos ou terrestres. Muteca (2012) afirma que o aumento da demanda de petróleo e seus derivados geraram ao longo de décadas não apenas benefícios à qualidade de vida da população mundial, mas também prejuízos ao meio ambiente, por ser essa indústria reconhecida como grande causadora de impactos ambientais.

Este fato elevou a fiscalização ambiental nas empresas petrolíferas, que por sua vez investem para tornar a atividade mais segura, entretanto inúmeros acidentes continuam a ocorrer, e vão de pequenos a grandes vazamentos, representando graves danos ao meio ambiente e seus ecossistemas. Dentre as exigências dos órgãos ambientais tem-se a execução de medidas para recuperação das áreas degradadas, para isso foram desenvolvidas e/ou adaptadas diversas técnicas baseadas em processos biológicos, físicos ou químicos, que podem ser implementadas no local da ocorrência (*in situ*) ou em outro local previamente preparado com equipamentos e instalações adequadas (*ex situ*).

Andrade, Augusto e Jardim (2010) citam que os frequentes vazamentos de petróleo e seus derivados em solos brasileiros tem motivado o desenvolvimento de novas técnicas de descontaminação com objetivo primordial de remover ou degradar o petróleo derramado, visando reduzir seus efeitos sobre o ecossistema, especialmente os tóxicos. Destaca-se dentre as técnicas, a biorremediação, que utiliza processos biológicos para degradar contaminantes presentes no solo, com baixo custo e menos agressividade ao meio ambiente, em relação as técnicas físicas e químicas.

Os processos biológicos baseiam-se na capacidade dos microrganismos de metabolizar os contaminantes em substancias inofensivas para os seres humanos e natureza (BERGER, 2005) e de acordo com Mesquita (2004) a técnica de biorremediação consiste no emprego dos

microrganismos, com ajuda de fatores ambientais, para degradação de compostos tóxicos. Quando o contaminante é petróleo, Millioli (2009) explica que os microrganismos metabolizam os hidrocarbonetos e outros compostos encontrados no óleo cru, convertendo em produtos mais solúveis, sendo que em alguns casos pode ocorrer total mineralização com formação de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O.

Segundo Bento, Camargo e Okeke (2003), as estratégias de biorremediação incluem a utilização de microrganismos autóctones (do próprio local), sem qualquer interferência de tecnologias ativas de remediação (biorremediação intrínseca ou natural), a adição de agentes estimulantes, como nutrientes, oxigênio e biossurfactantes (bioestimulação) e a inoculação de consórcios microbianos enriquecidos (bioaumento).

Para fazer o controle da biorremediação uma das opções é a respirometria, técnica de medição indireta da metabolização do petróleo pela microbiota do solo, de acordo com Costa (2009) é uma técnica de acompanhamento da biodegradação baseada no conceito de que, em um sistema aeróbio, quanto maior a quantidade de CO<sub>2</sub> produzido e de oxigênio consumido, maior a facilidade, dos microrganismos, em degradar a matéria orgânica presente no resíduo e assim, maior o potencial de utilização do processo de biorremediação para recuperação de áreas contaminadas pelo resíduo analisado.

Em virtude do exposto faz-se necessário avançar no conhecimento da descontaminação de solos poluídos por petróleo usando alternativas biotecnológicas, como a biorremediação, levando em consideração os fatores ambientais da região semiárida, como tipo de solo e clima, disponibilizando a comunidade alternativas para redução de passivos ambientais decorrentes das atividades da cadeia produtiva do petróleo. Assim será trabalhado a técnica de biorremediação denominada de bioestimulação, alternativa de tratamento *in situ* que “consiste na adição de nutrientes para aumentar a atividade microbiana e a eficácia do processo” (MILLIOLI, 2009, p. 43), utilizando fertilizante NPK na proporção 10:30:20.

## **2 OBJETIVO**

Avaliar o efeito da bioestimulação com aplicação de fertilizantes NPK na proporção 10:30:20 na degradação de petróleo em Vertissolo.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 PETRÓLEO

“Do latim *petrae* (pedra) e *oleum* (óleo)” (THOMAS, 2001, p. 4), o nome petróleo de acordo com Yergin (2010) foi adotado na Roma Antiga e na Grécia com o significado de óleo de pedra ou óleo de rocha. É um líquido escuro acastanhado, de consistência oleosa, de cheiro desagradável e coloração que pode variar do preto ao castanho, podendo alguns ser escuros, densos e viscosos, com pouco gás, enquanto outros podem apresentar tonalidades mais claras, baixa densidade e viscosidade, com quantidade expressiva de gás, em função dos diferentes reservatórios em que os óleos são obtidos (PEDROTI, 2007). Ferreira (2010) acrescenta a sua definição a característica de inflamabilidade e de ser menos denso que a água quando em estado líquido.

Quanto a origem do petróleo, Pedroti (2007) diz originar-se da decomposição de animais e vegetais marinhos soterrados em desabamentos da crosta terrestre em épocas remotas, enquanto Muteca (2012) cita que grande quantidade de organismos animais e vegetais foram lentamente se depositando no fundo dos lagos e mares e ainda acrescenta a ação do calor e da pressão, provocada pelo empilhamento das camadas geológicas sobre estes depósitos orgânicos. Romero (2008) também atribui a origem do petróleo ao acúmulo desses seres decompostos nos fundos dos mares e lagos e os movimentos geológicos, mas o mesmo acrescenta, a ação de bactérias em celenterados, protozoários e outros organismos de águas doces ou salgadas ligado a decomposição de seres que compõem o plâncton, gerando uma combinação de moléculas de carbono e hidrogênio.

Tortora, Funke e Case (2012) explicam que quando as diatomáceas e organismos planctônicos foram enterrados por sedimentos, as suas moléculas orgânicas não foram decompostas para retornar ao ciclo do carbono, a situação de calor e pressão alterou o óleo armazenado nas células e membranas celular, com a eliminação do oxigênio e outros elementos, restou um resíduo de hidrocarbonetos na forma de petróleo e gás natural.

Segundo Millioli (2009), as teorias anteriormente citadas são as mais aceitas, entretanto o mesmo levanta a importância das rochas sedimentares em todo esse processo, o mesmo diz serem estas rochas também denominadas de geradoras, que submetidas a certas temperaturas e pressões, juntamente com a existência de grandes volumes de matéria orgânica, geram o petróleo na subsuperfície quando da sua deposição. O referido autor ainda cita que este é o elemento mais importante e fundamental para ocorrência do petróleo.

“Durante milhares de anos, esse óleo inflamável que brota naturalmente das rochas em algumas regiões do planeta foi utilizado por diferentes povos, como romanos, chineses e incas, para atividades específicas” (BRASIL, 2008, p. 108). Segundo Morais (2013) o petróleo é conhecido desde a Antiguidade, encontrado em poços com pouca profundidade ou em exsudações na superfície terrestre. O betume era largamente utilizado pelos fenícios na calefação de embarcações, na antiga Babilônia os tijolos eram assentados com asfalto, egípcios usaram na pavimentação de estradas, para embalsamar mortos e na construção de pirâmides, gregos e romanos lançaram mão para fins bélicos como material inflamável no cerco de cidades e fortificações, foi utilizado ainda com fins medicinais, como lubrificantes e equipamentos e armas.

Apesar da importância do petróleo e das mais variadas formas de sua utilização, desde as épocas mais remotas, “a pesquisa sistemática deste organomineral para utilização em bases industriais e comerciais foi iniciada na metade do século passado” (SARY, 2012, p. 17). De acordo com Muteca (2012), em 1852 um químico canadense descobriu que a destilação do petróleo produzia um líquido que podia ser utilizado em lâmpadas, o querosene, onde até então, eram utilizados outros produtos, como o óleo obtido do carvão e o óleo de baleia.

Entretanto o petróleo apresentava grandes vantagens sobre estes últimos, principalmente na facilidade de obtenção, o que resultava em menor custo e maior lucro. Morais (2013) destaca que na década de 1850, a procura por fontes mais volumosas de petróleo se acentuou diante da necessidade de se aumentar a produção de querosene, combustível cujas condições de uso e preço eram mais favoráveis que os demais combustíveis então utilizados na iluminação: o óleo destilado do carvão era muito poluente, o óleo de baleia encontrava-se com os preços em forte alta em decorrência da diminuição da população de cetáceos nos mares, e o gás destilado do carvão era caro.

Muteca (2012) relata que em agosto de 1859 foi perfurado o primeiro poço de petróleo em Titusville, Pensilvânia nos Estados Unidos da América (EUA), fato que marcou a utilização do petróleo em larga escala, substituindo os combustíveis disponíveis, principalmente o carvão, na indústria, e os óleos de rícino e de baleia, na iluminação, Thomas (2001) detalha que esse poço tinha 21 metros de profundidade perfurado com um sistema de percussão movido a vapor e produzia 2 m<sup>3</sup>/dia de óleo. Concomitante aos Estados Unidos, estava acontecendo movimento similar na Europa, Morais (2013) cita que na primeira metade do século XIX, na Europa Ocidental, o petróleo renasceu como uma pequena indústria para a fabricação de querosene para iluminação, usado em lâmpadas rudimentar, além disso, a revolução industrial em andamento necessitava de melhores lubrificantes para uso nos maquinário nas fabricas, em substituição as

gorduras animais e aos lubrificantes derivados do carvão então utilizados. “Posteriormente, com a invenção dos motores a gasolina e a diesel, estes derivados até então desprezados, adicionaram lucros expressivos à atividade” (THOMAS, 2001, p. 1).

O crescimento exponencial de sua aplicação veio em 1930, com a invenção do motor a explosão, que deu origem à chamada II Revolução Industrial. Derivados como gasolina e óleo diesel passaram a ser usados como combustível para os meios de transporte, o que fez com que a substância rapidamente se transformasse na principal fonte da matriz energética mundial. Outros derivados, como a nafta, passaram a ser aplicados como insumo industrial na fabricação de produtos bastante diversificados como materiais de construção, embalagens, tintas, fertilizantes, farmacêuticos, plásticos, tecidos sintéticos, gomas de mascar e batons (BRASIL, 2008, p. 108).

“No Brasil, em meados do século passado, consumiam-se produtos combustíveis de animais como o óleo de baleia, mas a demanda não era grande devido à baixa e irregular distribuição para a população” (LUCCHESI, 1998, p. 17). O sucesso nas buscas pelo óleo preto nos Estados Unidos motivaram a pesquisa em terras brasileiras. “A procura por fontes de petróleo no Brasil iniciou-se na década de 1860, mesma época em que a indústria do petróleo dava os primeiros passos nos Estados Unidos” (MORAIS, 2013, p. 20). Mas apenas em 1930, conforme Sousa (2016) o engenheiro agrônomo Manoel Inácio de Bastos, com base em relatos populares da utilização de uma “lama preta”, e em seus próprios experimentos, descobriu a existência de petróleo, em Lobato, bairro suburbano de Salvador.

Atualmente o Brasil é um dos países mais importantes do mundo no que diz respeito a cadeia produtiva de petróleo, em 2013 ficou na 15ª posição no ranking mundial de reservas provadas de petróleo, com um volume de 15,6 bilhões de barris, e em termos de produção chega a 13ª posição com cerca de 2,1 milhões de barris/dia, cerca de 2,5% do total mundial (BRASIL, 2014). E no estado do Rio Grande do Norte a importância do petróleo não é diferente, com 247,5 milhões de barris de reservas provadas em terra, é o estado da federação com a maior quantidade de poços produtores de petróleo e gás natural em terra com 3.902 unidades, seguido de Sergipe e Bahia com 1.822 e 1.640 respectivamente e conta uma unidade de refino para produção de seus derivados localizada no município de Guamaré, denominada Refinaria Clara Camarão, com capacidade de refino de 37.739 barris/dia (BRASIL, 2014).

Houveram épocas de recessão no uso em virtude da descoberta de novas tecnologias, como a descoberta da energia elétrica em substituição do querosene para iluminação, entretanto o petróleo e seus derivados não perderam a sua importância em nossa sociedade, tido como milagre econômico para vários países, é primordial para produção de energia na forma de combustíveis (óleo diesel, gasolina, querosene e etc.) e na fabricação de produtos industrializados, como cosméticos, borracha e tecidos sintéticos, lubrificantes, remédios,

produtos de limpeza, plástico, tintas e fertilizantes, assim, cada vez mais presente no cotidiano das pessoas.

Nos últimos cem anos, o petróleo consolidou-se como a principal fonte de energia e o mais importante recurso estratégico do mundo moderno. Sua conturbada trajetória, que acompanha de perto episódios críticos de nossa história recente, é marcada por renhidas disputas por controle e pela alternância entre períodos de escassez e bonança. Apesar da natureza cíclica dos movimentos do petróleo no mercado internacional, identifica-se tendência de consumo claramente ascendente. Por mais espetaculares que houvessem sido as descobertas de novas reservas, ou por mais revolucionários que tenham sido os avanços em tecnologias para extração, refino ou utilização do petróleo, a avidez da demanda global ainda não parece ter encontrado o seu limite (PIMENTEL, 2011, p. 31).

Por toda peculiaridade em que o petróleo foi formado, resultado de uma grande quantidade de variáveis, que é característica dos recursos naturais, produzido ao longo de milhões de anos, o mesmo apresenta uma mistura complexa de compostos, com destaque para os hidrocarbonetos, que de acordo com Oliveira (2008), Spiro e Stigliani (2009) e Andrade, Augusto e Jardim (2010) representa a fração majoritária.

A literatura apresenta uma série de composições químicas para o petróleo, alguns autores citam uma breve composição, segundo Spiro e Stigliani (2009) cerca de 10 % é formada por enxofre, 5 % por oxigênio e 1 % por nitrogênio, apresentando ainda elementos metálicos porém em níveis traço, e Oliveira (2008) que é constituído, essencialmente, de carbono e hidrogênio (90% dos óleos crus), com quantidades relativamente pequenas de compostos orgânicos sulfurados, nitrogenados, oxigenados e organometálicos.

Outros fazem uma estratificação mais detalhada desse rico composto, segundo API (1999) o petróleo é constituído por uma complexa mistura incluindo, nitrogênio (0% a 0,5%), enxofre (0% a 6%), oxigênio (0% a 3,5%), alguns metais em concentrações traço (principalmente níquel e vanádio) e os hidrocarbonetos (50% a 98%). A heterogeneidade característica da composição química do petróleo se dá em virtude dos diferentes materiais de origem, tempo de formação, caracterização geológica do local do reservatório, dentre outros, entretanto, conforme Ferreira (2010) apesar de sua composição química variar em função do reservatório, os diferentes tipos de petróleo apresentam semelhanças na análise elementar, sendo constituídos (%m/m) de: carbono (83-87); hidrogênio (11-14); enxofre (0,06-8); nitrogênio (0,11-1,7); oxigênio (0,1-2); e metais (até 0,3).

De certa forma Pedroti (2007) afirma que o petróleo consiste basicamente em compostos de apenas dois elementos que, no entanto, formam grande variedade de complexas estruturas moleculares e independentemente das variações físicas ou químicas, quase todos os petróleo variam de 82 a 87 % de carbono em peso e 12 a 15% de hidrogênio.

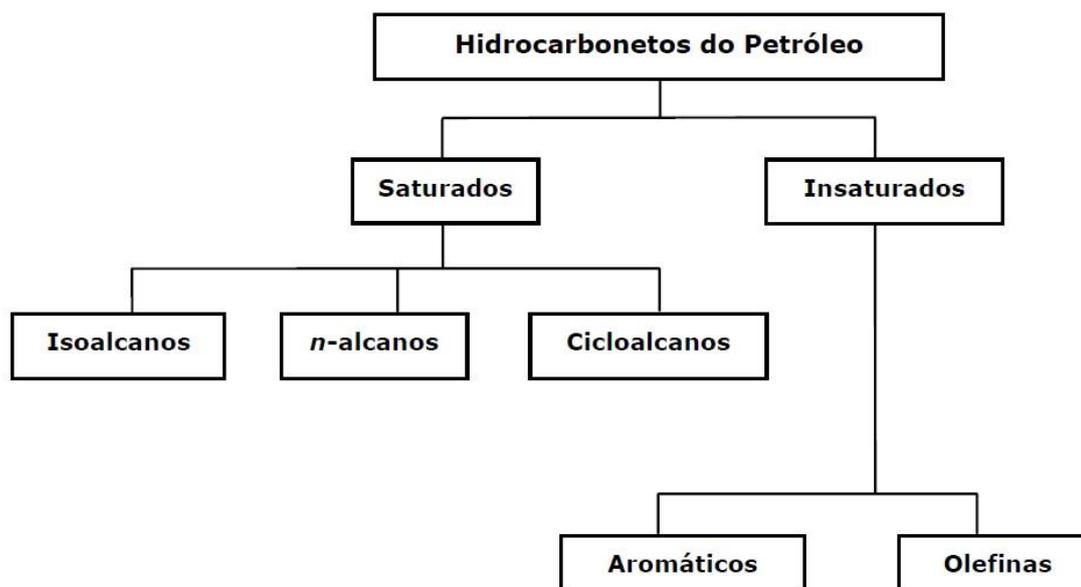
Com relação aos hidrocarbonetos de petróleo, Berger (2005) explica que são derivados de petróleo, como, por exemplo, gasolina, óleo diesel, óleo combustível, óleo lubrificante, entre outros. Eles abrangem uma espectro muito grande de substâncias, que podem ser agrupadas segundo a sua estrutura (linear, ramificada, cíclica) e o seu grau de saturação, isto é, a diferenciação segundo a existência de ligações simples, duplas ou triplas entre os átomos carbono (alcanos, alcenos e alcinos).

Thomas (2001) complementa que os hidrocarbonetos são compostos orgânicos formados por carbono e hidrogênio, classificados conforme sua estrutura em saturados, insaturados e aromáticos. Os saturados (alcanos ou parafinas), são aqueles cujos átomos de carbono são unidos somente por ligações simples e ao maior número possível de átomos de hidrogênio, constituindo cadeias lineares, ramificadas ou cíclicas, interligadas ou não. Os insaturados (olefinas), apresentam pelo menos uma dupla ou tripla ligação carbono-carbono, enquanto que os aromáticos (arenos), apresentam pelo menos um anel de benzeno na sua estrutura.

No petróleo predominam os hidrocarbonetos acíclicos saturados, de cadeia normal e ramificada, bem como os cíclicos de cadeia normal ou ramificada (cicloalcanos) e os aromáticos conforme Oliveira (2008) e Ferreira (2010).

A Figura 1 apresenta classificação química dos hidrocarbonetos de petróleo.

**Figura 1** - Classificação química dos hidrocarbonetos de petróleo.



Fonte: API, 2001.

Uma das características dos hidrocarbonetos, de acordo com Millioli (2009) é ter diferentes pontos de ebulição, sendo matéria-prima de grande importância para a economia, a Tabela 1 extraído de Thomas (2001) mostra as frações típicas que são obtidas do petróleo conforme a faixa de ebulição dos compostos e seus usos.

**Tabela 1** - Frações típicas do petróleo.

<b>Fração</b>	<b>Temperatura de ebulição (°C)</b>	<b>Composição aproximada</b>	<b>Usos</b>
Gás residual	-	C <sub>1</sub> – C <sub>2</sub>	Gás combustível.
Gás liquefeito de petróleo (GLP)	Até 40	C <sub>3</sub> – C <sub>4</sub>	Gás combustível engarrafado, uso doméstico e industrial.
Gasolina	40 - 175	C <sub>5</sub> – C <sub>10</sub>	Combustível de automóveis, solvente.
Querosene	175 - 235	C <sub>11</sub> – C <sub>12</sub>	Iluminação, combustível de aviões a jato.
Gasóleo leve	235 - 305	C <sub>13</sub> – C <sub>17</sub>	Diesel, fornos.
Gasóleo pesado	305 - 400	C <sub>18</sub> – C <sub>25</sub>	Combustível, matéria-prima para lubrificantes.
Lubrificantes	400 - 510	C <sub>26</sub> – C <sub>38</sub>	Óleos lubrificantes.
Resíduo	Acima de 510	C <sub>38+</sub>	Asfalto, piche, impermeabilizantes.

Fonte: THOMAS, 2001.

Com relação ao fator econômico e comercial, o petróleo pode ser caracterizado pela sua densidade e teor de enxofre, a relação entre ambos definem o valor comercial do óleo. A classificação “grau API” criado pela American Petroleum Institute é largamente conhecida, segundo Novaes (2010) a densidade do petróleo é determinada pelo grau API, quanto maior o valor, de modo geral, maior seu valor de mercado, salvo presença de algum elemento ou substância química que prejudique seu valor. “Em geral, quanto maior o °API, maior a quantidade de derivados de alto valor agregado, como os combustíveis (gasolina, diesel e gás liquefeito de petróleo, GLP), em relação a um petróleo de menor grau API” (MACHADO, 2014, p. 24).

A Tabela 2 relaciona a classificação do petróleo em relação ao grau API e o teor de enxofre.

**Tabela 2** - Classificação do petróleo segundo o Grau API e o Teor de Enxofre.

<b>Categoria</b>	<b>% Enxofre</b>	<b>Grau API</b>
Leve com baixo teor de enxofre	0 – 0,5	> 32
Pesado com médio teor de enxofre	0,35 – 1,1	> 24
Leve com elevado teor de enxofre	> 1,1	> 32
Pesado com elevado teor de enxofre	> 1,1	24 -33
Muito pesado com elevado teor de enxofre	> 0,7	0 - 23

Fonte: TAVARES, 2005.

Tais parâmetros que o caracterizam, não interessam apenas aos especialistas em petróleo e seus derivados no seu contexto comercial e econômico, são informações de extrema valia para técnicos que lidam com a área ambiental, mais especificamente com remediação de áreas contaminadas, pois de acordo com Peters e Moldowan (1993) o óleo leve (alto °API) é constituído predominantemente de hidrocarbonetos alifáticos mais facilmente degradados pela população microbiana do que o óleo mais pesado, que pode conter maior abundância de hidrocarbonetos aromáticos.

A propósito, desenvolver novas técnicas de remediação de solos contaminados por petróleo, assim como aprimorar as já existentes, é um desafio para os técnicos e cientistas da área, pois tal qual a importância do petróleo para a sociedade moderna, são os danos que o mesmo causa em ambientes aquáticos ou terrestres quando nestes são lançados. “O que se tem notado, nas duas últimas décadas, é que a poluição causada por petróleo e seus derivados tem sido um dos principais problemas ao meio ambiente” (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010, p. 17).

Ainda com relação ao potencial de danos ao meio ambiente, Weber e Santos (2013) considera o petróleo como um dos principais poluidores do meio ambiente, no entanto ressalta a importância e a nossa dependência pelo petróleo, citado que ele é utilizado como a principal fonte de energia do país, servindo como base para a fabricação dos mais variados produtos, dos quais se destacam benzinhas, óleo diesel, gasolina, lubrificantes, parafinas, querosene, asfaltos e até mesmo cosméticos e medicamentos.

Um dos principais fatores que influenciam ou que elevam esse potencial de impactos ambientais na indústria do petróleo, além da diversidade de usos e a quantidade de

consumidores, é a magnitude de sua cadeia produtiva, que se inicia na sua exploração em terra ou mar, passa toda uma etapa de transporte marítimo ou terrestre até as refinarias, onde se inicia uma nova etapa para obtenção de seus derivados, que são os produtos de interesse comercial, destas seguem para armazenamento e distribuição, mais uma vez passando por transporte terrestres ou marítimo.

“Durante a exploração, o refino, o transporte e as operações de armazenamento do petróleo e/ou de seus derivados podem vir a ocorrer derramamentos acidentais ocasionando a contaminação de solos, rios, etc.” (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010, p. 17). “Cada estágio do processo – exploração, perfuração *onshore* (em solo) e *offshore* (em mar), refino, transporte por oleodutos ou outras formas – apresentam sérios riscos ao meio ambiente” (MILLIOLI, 2009, p. 31). Ainda segundo Millioli (2009) em solos os derrames de petróleo podem ocorrer de muitas formas, mas os maiores eventos ocorrem pelo rompimento de oleodutos, explosões de poços ou perfuração ou erosão de tanques combustíveis, causando efeitos diretos sobre o solo e a vegetação do local contaminado.

Desastres ambientais, por vazamentos de petróleo no solo, decorrentes das diferentes vias citadas anteriormente, alteram a qualidade do mesmo, podendo causar graves efeitos em plantas e animais. A depender da magnitude deste, o petróleo pode infiltrar no solo, diminuindo a quantidade de oxigênio disponível, afetando diretamente as plantas e a microbiota indígena, que por sua vez diminuem de quantidade e/ou passam a competir com as plantas também por nutrientes minerais. As características de permeabilidade do solo e viscosidade do óleo, podem favorecer a contaminação do subsolo e até mesmo o lençol freático.

A legislação ambiental através de seus dispositivos legais, determinam que os responsáveis pela contaminação, promovam ações de recuperação das áreas degradadas, com objetivo de restabelecer as condições de equilíbrio do meio que foi alterado. Todas as ações a serem realizadas para a recuperação da área, deve estar detalhadamente descrita no respectivo Plano de Recuperação de Área Degradada (PRAD), que envolve dentre outras, as etapas de diagnóstico da área e do dano ambiental, metodologia a ser utilizada e medidas de monitoramento e controle ambiental, devidamente planejadas dentro de um cronograma físico e financeiro a ser executado.

Em termos práticos, na ocorrência de um incidente como derramamento ou vazamento de óleo, as primeiras providências a serem tomadas são de natureza física (geralmente, remoção mecânica). Em seguida, podem ser utilizados produtos químicos (surfactantes químicos) para dispersão do óleo. Em tese, as técnicas biotecnológicas são utilizadas em um terceiro momento, para a biotransformação do material restante, podendo chegar à mineralização,

fenômeno caracterizado pela conversão dos hidrocarbonetos em gás carbônico (CO<sub>2</sub>) e água (PEREIRA JUNIOR; GOMES; SORIANO, 2009, p. 8).

Dessa forma, a biorremediação é uma opção proeminente a ser utilizada em solos contaminados por petróleo e seus derivados, conhecido desde o início do século XX, passou a ser mais utilizado em meados de 1980, apresentando resultados satisfatórios, no entanto “inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas em biorremediação de solos impactados com petróleo que, dentre as tecnologias desenvolvidas, destaca-se por ser um processo atrativo e economicamente viável” (MILLIOLI, 2009, p. 26).

### 3.2 EFEITOS DO PETRÓLEO NO MEIO AMBIENTE

O solo, corpos d'água e a atmosfera inevitavelmente receberão contribuições negativas das atividades antrópicas prejudicando a sua qualidade ambiental. Rodrigues (2005) considera o solo como recipiente primordial, da maioria dos rejeitos, produtos químicos e despejos, provenientes das sociedades industrializadas, e após a penetração de substâncias indesejáveis no solo, sucede a preocupação em como controlar, desativar ou destruí-las, pois passaram a fazer parte de um ciclo de reações com implicações diretas na vida dos seres vivos (fauna e flora) ali presentes, inclusive o homem.

Após um evento de vazamento de petróleo bruto no solo são desencadeadas uma série de efeitos negativos sobre a fauna, flora e microbiota terrestre, até mesmo aos seres humanos. Dependendo da magnitude do vazamento o petróleo pode chegar aos corpos d'água superficiais ou infiltrar até as águas subterrâneas, elevando a proporção do dano ambiental. Pedrozo (2002) cita que conhecer o comportamento dos diferentes componentes do petróleo no solo, água e ar é muito importante na avaliação dos efeitos à saúde e à biota decorrentes dessa exposição.

Segundo Maranhão et al. (2006) os hidrocarbonetos do petróleo apesar de serem poluentes ambientais difundidos e a sua biodegradação seja assunto central de numerosas investigações, as informações sobre a sua toxicidade às plantas no solo são limitadas. A complexa composição química do petróleo e sua variabilidade em virtude da jazida de origem aliada aos diversos processos biológicos de degradação no solo dificultam os estudos sobre o tema, pois cada elemento que o compõe pode desencadear efeitos diferentes no solo e por conseguinte na fauna e na flora.

Pedrozo (2002) cita que o transporte dos componentes do petróleo através do meio ambiente envolve vários processos como a volatilização, hidrólise, fotólise, biodegradação, biotransformação, degradação física e dissolução e que a relevância e a velocidade de cada um

desses processos variam de acordo com a situação, tornando-se muito difícil prever acuradamente a composição dos subprodutos de degradação a partir do conhecimento da composição inicial do petróleo, bem como equacionar a potencial toxicidade dos mesmos.

De forma generalizada Guimarães (2007) aponta os efeitos dos impactos ambientais advindos dos resíduos derivados de petróleo na flora e na fauna por ação física (abafamento e redução da luminosidade), ambiental (alteração do pH, diminuição da oferta de oxigênio dissolvido e quantidade de alimento disponível) e tóxica.

Pezeshki et al. (2000) explica a ação física do óleo sobre as plantas, agindo diretamente na redução da transpiração e fotossíntese, pois quando o óleo derramado cobre as folhas, bloqueia os poros dos estômatos reduzindo a taxa de entrada de CO<sub>2</sub>, com isso, diminui a oferta de oxigênio para a raiz, limitando o seu crescimento. Sobre o solo o efeito é similar, após cobrir a superfície do solo, o petróleo forma uma camada hidrofóbica, dificultando a entrada de oxigênio para a zona radicular das plantas, transformando-a em ambiente anaeróbio, ocasionando destruição da membrana da raiz e seletividade iônica. Segundo Morley et al. (2005) a hidrofobicidade dos solos contaminados com petróleo provavelmente estão relacionados aos compostos orgânicos polares, limitando a absorção de água e de nutrientes pela planta.

Outros sintomas observados nas plantas em solo contaminado por petróleo e seus derivados foram citados por Maranhão et al. (2006), como maior ramificação da raiz, aumento da espessura da parede celular, maior área de espaços intercelulares, redução da área foliar, maior espessura dos tecidos foliares e maior densidade estomática

Neubauer Filho (2009) observa que o petróleo ao chegar no manguezal impermeabiliza o sistema radicular, tornando as árvores afetadas incapazes de absorver oxigênio e nutrientes, assim os vegetais vão perdendo as folhas e não conseguem realizar a fotossíntese. No mesmo trabalho o autor destaca o efeito da temperatura, o óleo pode atingir 60 °C ao ser aquecido pelos raios solares, causando mortandade de animais e vegetais microscópicos que alimentam milhares de espécies direta ou indiretamente.

A toxicidade de poluentes nas plantas vem sendo investigado de longa data, em 1898 Wislicenus (1898) apud Wentzel (1983) citou a diminuição do processo metabólico e as atividades enzimáticas aumentando a transpiração e paralisação do mecanismo estomático das plantas, associado ao SO<sub>2</sub> e HF. No trabalho de Baker (1970) já se tratava dos efeitos agudos e crônicos relacionados a toxicidade do petróleo, o autor defende que as moléculas pequenas e com baixa viscosidade de hidrocarbonetos penetram mais facilmente nos tecidos vegetais, entretanto as moléculas grandes e de maior viscosidade tem mais dificuldade, assim as

primeiras tem maior potencial tóxico que as últimas, o autor ainda cita que o grau de toxicidade do petróleo aumenta na seguinte ordem, compostos saturados, insaturados e aromáticos.

A ideia é reiterada por Spies et al. (1996) quando cita a tendência dos efeitos tóxicos imediatos (agudos) serem causados por moléculas de baixa massa molar e os efeitos tóxicos tardios (crônicos) estão relacionados as moléculas de alta massa molar, geralmente as aromáticas. Os hidrocarbonetos de baixa massa molar apesar de serem mais tóxicos se degradam mais rapidamente e os de alta massa molar são mais persistentes no ambiente.

De acordo com Clark (1997) a toxicidade dos hidrocarbonetos está associada a sua hidrofobicidade, sendo menos tóxicos os mais solúveis em água, pois influencia na taxa de transporte dos hidrocarbonetos na camada lipídica da membrana celular, contrariamente Freedman (1993) cita que os danos ambientais mais severos em um vazamento de petróleo são consequência das frações mais leves e mais solúveis, pois estas tem mais facilidade de entrar em contato com os organismos.

Rodrigues (2005) discorre que o caráter potencial da toxicidade está presente, com maior ou menor grau de intensidade, portanto a nocividade para os seres vivos circundantes é dependente da sensibilidade de cada um, das características genéticas, fisiológicas e das circunstâncias em que foram afetados. Completa ainda que quando um ser vivo é submetido a uma força, tensão que o afaste das condições consideradas ótimas para sua sobrevivência, esta acaba induzindo respostas e/ou transformações em sua fisiologia interna, muitas vezes reversíveis a princípio, mesmo que durante a permanência do fator estressante desencadeador, ocorra à diminuição de sua resistência. Quando o limite de capacidade de ajuste é alcançado, os distúrbios que antes estavam em estado latente, agora se manifestam na forma de doenças crônicas ou injúrias irreversíveis.

De acordo com Rodrigues (2005) as plantas são mais sensíveis que o homem aos poluentes em geral e por isso são utilizadas como bioindicadoras denunciando a presença de compostos acumulados através de reações biológicas em escala visível. Além da sensibilidade ao contaminante, Baker (1970) cita outros fatores que estão relacionados a contaminação do ambiente por petróleo que interferem na toxicidade as plantas, são estes o tipo de solo, a estação do ano e o tempo que as plantas ficam expostas ao óleo.

Segundo Inckot et al. (2008) a toxicidade do petróleo em relação as plantas pode ocorrer pelo contato direto ou absorção de algum composto e cita como exemplo o trabalho de Alkio et al. (2005) que detectou um composto do petróleo (fenantreno) no interior da *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., e registrou redução no crescimento das raízes, diminuição no tamanho e número de folhas, deformação de tricomas e áreas necrosadas com morte celular. Maranhão et

al. (2006) cita a inibição da germinação de sementes, diminuição do crescimento vegetal e morte das plantas como indicadores da toxicidade dos hidrocarbonetos. Chupakhina e Maslennikov (2004) citam que a poluição por petróleo causam destruição da clorofila e carotenoides das espécies vegetais.

Com relação aos animais presentes em ambientes contaminados, Neubauer Filho (2009) cita que estes podem morrer em poucos dias sem poder respirar, ou se intoxicar ao poucos ao comerem folhas e bichos contaminados. O óleo que cobre o corpo dos animais pode prejudicar o sistema de isolamento térmico, como é o caso das aves cujas penas formam colchões de ar que os aquecem.

De acordo com USEPA (1999) e Pedrozo (2002) vazamentos de petróleo e seu derivados podem afetar também a biota aquática, ao se espalhar sobre a superfície da água formam um filme com espessura de cerca de 0,1 mm. O espalhamento do óleo depende da sua tensão superficial, viscosidade, temperatura, densidade e quantidade de óleo derramado. O óleo na superfície da água pode evaporar, ser degradado, emulsificar ou afundar, expondo tanto as espécies vegetais das margens dos corpos d'água quanto os peixes presentes no ambiente, que por sua vez podem apresentar problemas cardíacos e respiratórios, alterações bioquímicas, celular e no aparelho reprodutor, podendo se estender a anomalias genéticas e carcinoma. Os peixes e mamíferos podem ser afetados pelo óleo pelo contato direto, ao atingir pelos e penas influencia a perda do isolamento térmico e risco de congelamento e afogamento dos animais, exposição aos vapores e ingestão do óleo, que afetam o sistema nervoso, coração e pulmões, destruição do habitat e fonte de alimentos.

### 3.3 BIORREMEDIAÇÃO

O processo de biorremediação largamente difundido na literatura tem sido definido de várias formas, algumas conceituações mais simples e genéricas, Tortora, Funke e Case (2012) definem a como “o uso de microrganismos para detoxificar ou degradar poluentes” corroborando com Mariano (2006) que considera “uma nova tecnologia para tratar locais contaminados mediante o uso de agentes biológicos capazes de modificar ou decompor poluentes alvos”.

Outros conceitos de biorremediação são mais específicos, Lemos et al. (2009) define como um conjunto de tecnologias nas quais se utilizam microrganismos, ou seus produtos e processos, aplicadas a recuperação, ou remediação, de áreas contaminadas, tratamento de compostos orgânicos voláteis tóxicos ou efluentes. Entretanto pode-se observar que todos

convergem para a utilização de organismos vivos, desde microrganismos a plantas, com o objetivo de remediar ambientes terrestres ou aquáticos contaminados, através da degradação dos poluentes.

“A biorremediação baseia-se na degradação bioquímica dos contaminantes por meio da atividade de microrganismos presentes ou adicionados no local de contaminação” (BERNOTH et al., 2000) e “os produtos finais de uma biorremediação efetiva, são água e gás carbônico (processo denominado mineralização), compostos estes, que não apresentam toxicidade e que podem ser incorporados ao ambiente sem prejuízo aos organismos vivos (MARIANO, 2006).

“As chamadas técnicas de biorremediação vêm sendo amplamente estudadas e utilizadas para remediação de ambientes contaminados com substâncias orgânicas. Essas técnicas têm como pré-requisito básico o aumento da eficiência da remoção natural feita pelos microrganismos” (CHAGAS-SPINELLI, 2007, p. 37), sendo eficiente também no tratamento de compostos inorgânicos. De acordo com Dias (2000), o objetivo da biorremediação no tratamento em áreas contaminadas é induzir ou acelerar os processos biológicos naturais de reciclagem de compostos de interesse, incluindo compostos orgânicos ou inorgânicos utilizando a capacidade intrínseca dos microrganismos de degradar matéria orgânica tóxica, tanto de origem natural como compostos sintéticos.

Associado ao termo “biorremediação” comumente tem-se o de área ou ambiente contaminado ou mesmo poluído, a utilização de ambos remete a alterações negativas ao meio ambiente, que por vezes é entendido como sinônimo. De fato, na literatura pode-se encontrar vários conceitos que não os diferenciam, para CETESB (1999) Área Contaminada (AC) é onde há comprovadamente poluição causada por quaisquer substâncias ou resíduos que nela tenham sido depositados, acumulados, armazenados, enterrados ou infiltrados, e que determina impactos negativos sobre os bens a proteger.

A poluição é uma alteração indesejável nas características físicas, químicas ou biológicas da atmosfera, litosfera ou hidrosfera, provocada pelas atividades e intervenções humanas no meio ambiente, que possa causar dano a sobrevivência ou as atividades dos seres humanos e outras espécies, ou ainda deteriorar materiais (SANTOS, 2005, p. 11).

Mas é importante observar que existe uma diferença conceitual entre poluição e contaminação, explicado por Nass (2002), poluição é uma alteração ecológica provocada pelo ser humano que prejudica, direta ou indiretamente, sua vida ou seu bem estar, como danos aos recursos naturais como a água e o solo e impedimentos a atividades econômicas como a pesca e a agricultura. Já a contaminação é a presença, em um ambiente, de seres patogênicos que provoquem doenças, ou substâncias em concentrações nocivas ao ser humano. Baseado nestes conceitos é possível que uma contaminação não ocasione uma alteração das relações ecológicas

e assim não seja considerada poluição, geralmente pode ser observado quando a carga do contaminante é muita pequena em relação ao meio em que está sendo lançada.

Apesar de ser considerada uma tecnologia nova, com vasto campo de estudos, a biorremediação já vem sendo utilizado há quase trinta anos para descontaminação de solos. “Em 1988, os cientistas começaram a utilizar micróbios para limpar poluentes e resíduos tóxicos produzidos por vários processos industriais” (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012, p. 17). Observa-se que existem relatos da utilização das técnicas de biorremediação bem mais antigas, Mariano (2006) cita que a habilidade de microrganismos degradarem poluentes é conhecida desde 1908, quando um cientista isolou uma bactéria que apresentou capacidade de crescer em meio contendo tolueno e xileno.

As técnicas de biorremediação são baseadas no potencial inerente aos microrganismos de metabolizar os poluentes, reduzindo a concentração destes no ambiente ou transformando em substancias inertes, para isso são executadas estratégias para favorecer essa dinâmica natural. Observa-se assim que o homem não criou os mecanismos da biorremediação, estes foram desenvolvidos pela natureza através do tempo e da evolução dos microrganismos em contato com os poluentes, a intervenção humana consiste apenas em acelerar o processo, através de medidas que visam condicionar o ambiente, favorecendo condições ótimas para a microbiota.

As diferentes estratégias de biorremediação, em geral, visam aumentar a população microbiana criando condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento (Silva et al., 2004). “O princípio da biorremediação se baseia na utilização de populações microbianas que possuem a habilidade de modificar ou decompor determinados poluentes” (CUNHA et al., 2008, p. 20).

A possibilidade de decomposição de poluentes presentes no ambiente se utilizando de processos naturais desempenhados pelos microrganismos conferem a biorremediação uma alternativa ecológica, eficaz e menos onerosa que outras tecnologias existentes que se utilizam de processos físicos e/ou químicos.

As pesquisas evidenciam uma série de vantagens dos processos de tratamento biológico em relação aos físicos e químicos, D’annibale et al. (2006) ressaltam que tecnologias de tratamento biológico para remediação de solos e águas subterrâneas contaminados com poluente orgânicos são mais baratos e menos agressivos ao meio ambiente com relação a outras tecnologias. Andrade, Augusto e Jardim (2010) acrescentam que o uso dos equipamentos são de fácil obtenção, instalação e operação, pode ser combinada com outras técnicas, na maioria

dos casos não produz compostos tóxicos que precisam de tratamento e disposição final e por fim são eficientes na biodegradação de petróleo e seus derivados.

A tendência de se ter menores custos é justificado por Millioli (2009) por se ter à possibilidade do tratamento no próprio local de contaminação. Outras variáveis também são decisivas, “uma justificativa para os menores custos é que, em muitos casos, as alternativas de biotratamento concentram seus esforços em otimizar simplesmente o processo que ocorre de forma natural no solo” (MUTECA, 2012, p. 8).

As tecnologias físicas e químicas de tratamento possuem a vantagem de obter resultados mais rápidos na redução dos contaminantes a níveis seguros e aceitáveis pela legislação ambiental, por isso são tidos como mais eficazes, embora dependendo da magnitude da poluição do solo e do porte da empresa responsável pela recuperação da área degradada, estas sejam inviáveis.

Dentre as desvantagens, ressalta Muteca (2012) o fato de serem muito caras, requerer alta demanda de energia e são agressivas ao meio ambiente, exigirem um alto consumo de reagentes químicos assim como, em alguns casos, a necessidade de se fazer a remoção do solo e transporte para tratamento em outro local podendo ocasionar a propagação da contaminação para outros meios. Uma das grandes desvantagens dos tratamentos físicos é o caráter não destrutivo do contaminante, o mesmo é apenas transferido para outro local.

A biorremediação de solos também apresenta limitações que precisam ser avaliadas, dentre estas Andrade, Augusto e Jardim (2010) citam a possibilidade de monitoramento contínuo por tempos longos, ser ineficiente para compostos orgânicos que ficam adsorvidos no solo, efeito toxicológico a microbiota pelas altas concentrações de contaminantes, as propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo e as condições climáticas, podem alterar a taxa de biodegradação como também a dificuldade de utilização em solos argilosos com baixa permeabilidade. O quadro 1 apresenta principais vantagens e limitações da biorremediação de solo.

**Quadro 1** - Vantagens e desvantagens da biorremediação em solos.

<b>Vantagens</b>	<b>Limitações</b>
A aplicação envolve o uso de equipamentos de fácil obtenção, instalação e operação.	Podem ser requeridos monitoramento contínuo por tempos longos e/ou manutenção do sítio submetido a biorremediação.

Em atividades in-situ, a biorremediação gera distúrbios mínimos ao meio ambiente.	A técnica é ineficiente para compostos orgânicos que ficam adsorvidos no solo, tornando-os indisponíveis a biodegradação.
Em condições ótimas de operação, apresenta custos menores em comparação as técnicas alternativas de remediação.	É menos eficiente em períodos menores de tempo em comparação as outras técnicas de remediação, como os POA.
Pode ser combinada com outras técnicas, como a SVE, para acelerar o processo de descontaminação.	Contaminantes de baixa solubilidade em concentrações elevadas, como os HTP, podem ser tóxicos aos microrganismos e/ou não biodegradáveis, inviabilizando a utilização da técnica.
Na maioria dos casos, essa técnica não produz compostos tóxicos, que devem ser dispostos e tratados em outro local.	As propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo e as condições climáticas, podem alterar a taxa de biodegradação.
É muito eficiente na biodegradação de petróleo e seus derivados em solos permeáveis.	Dificuldade de utilização em solos argilosos ou com baixa permeabilidade.

Fonte: ANDRADE, AUGUSTO E JARDIM, 2010.

Solos argilosos tem peculiaridades que precisam serem levadas em consideração para se aumentar a eficiência do processo de biorremediação, Seabra (2005) sugere adição de agentes estruturantes para melhorar a porosidade de solos com teores elevados de finos (silte e argila) e Bisognin (2012) explica que solos com baixa permeabilidade são difíceis de arejar formando aglomerados prejudiciais a distribuição de umidade, ar, nutrientes e de microrganismos. Rocha (2015) cita que solos com altos teores de finos contribuem para a ocorrência do fenômeno de sorção dos contaminantes diminuindo a mobilidade dos hidrocarbonetos e dificuldade de promover a sua degradação.

Dentre os solos que possui como característica o alto teor de argila na sua composição, pode-se citar os Vertissolos. Capurro (2005) cita que os Vertissolos caracterizam-se por apresentarem altas porcentagens de argila expansiva em todo perfil e altos níveis de matéria orgânica, conferindo uma fertilidade natural elevada e uma estrutura granular forte, com características de autogranulado.

### 3.3.1 Técnicas de biorremediação

A técnica de biorremediação a ser adotada na área degradada depende de uma análise criteriosa a ser realizada com base no diagnóstico atual da área, que leva em consideração o tipo de solo, as características físicas e químicas do mesmo, o tipo do poluente, seu potencial de migração para outros meios, efeitos toxicológicos assim como a concentração final do contaminante após o processo de tratamento e o custo.

As técnicas são denominadas *in situ* e *ex situ*, sendo a primeira realizada no próprio local contaminado e a segunda, o material contaminado é removido e transferido para um outro local previamente preparado para as etapas de tratamento conforme o método escolhido.

De acordo com Oliveira (2008) a escolha entre as técnicas denominadas *in situ* e *ex situ*, deverão considerar não só os poluentes, mas o custo dos processos e, principalmente, a concentração final do contaminante, no término do tratamento, como aceitável para o tipo de resíduo e para o uso futuro da área.

Ilustrativamente, pode-se entender a transferência do material contaminado, feito geralmente através de escavação quando o meio é solo e bombeamento quando o meio for água, e a logística de transporte depende local contaminado e o local do tratamento, que dependendo da quantidade peso/volume do material é instalado nas proximidades para reduzir custos com logística.

Dentre as técnicas de biorremediação *in situ* Jacques et al (2007), Millioli (2009), Lima (2010) e Muteca (2012) citam Atenuação Natural, Bioestimulação, Bioaugmentação e Fitorremediação, Millioli (2009), Lima (2010) e Muteca (2012) acrescentam a lista a Bioventilação. A técnica das Barreiras Reativas Permeáveis (BRPs), pouco conhecida e utilizada foi também citada e explicada apenas por Millioli (2009) como sendo também realizada no próprio local da contaminação.

Com relação a técnica da Atenuação Natural, Millioli (2009) e Muteca (2012) acrescentam o termo Monitorada, evidenciando que o tratamento não deve ser deixado a cargo apenas da natureza e seus processos, o mesmo deve ser devidamente acompanhado e controlado até que seja diagnosticado a redução dos níveis de contaminação e comprovação da recuperação da área degradada. Ainda tratando da mesma Lima (2010) traz o termo Biorremediação Intrínseca como sendo sinônimo.

Nas técnicas citadas como sendo *ex situ*, tem-se as Biopilhas e os Biorreatores segundo Seabra (2005), Millioli (2009), Muteca (2012) e ainda Compostagem conforme Seabra (2005) e Muteca (2012). A técnica denominada de *Landfarming* que tem como característica a

utilização de práticas e máquinas agrícolas como o arado e a grade durante as fases do tratamento é considerada *ex situ* por Seabra (2005), Mariano (2006), Millioli (2009) e Muteca (2012) com exceção de Jacques et al (2007) que lista como sendo *in situ*.

Ambas apresentam vantagens e desvantagens, Mariano (2006) defende que a biorremediação *in situ* evita custos e distúrbios ambientais, provenientes das movimentações de solos e águas de um local contaminado para outros locais destinados ao tratamento, de acordo com Lima (2010) a mesma visa tratar o solo utilizando-se de tecnologias que vão desde a introdução de oxigênio e nutrientes até a adição de organismos selecionados para cada tipo de contaminante. Rattedge e Kristiansen (2001) acrescenta que as técnicas *in situ* pode ser aplicada em situações onde a contaminação é profunda, subterrânea ou sob construções, evitando custos de escavação e ainda argumentam que não há produção de compostos tóxicos como nos tratamentos físico-químicos.

Entretanto, em determinadas ocasiões a remoção do material contaminado é necessária e em alguns casos imprescindível, de acordo com Jacques et al (2007) quando há possibilidade contaminação de pessoas e do ambiente próximo do solo a ser biorremediado, ou quando a presença de altas concentrações de contaminantes. Abbas (2003) defende que as técnicas “*ex situ*” produzem resultados mais rápidos, são mais fáceis de controlar e apresentam uma maior versatilidade para o tratamento de grande número de contaminantes e tipos de solo, todavia, requerem a remoção do solo contaminado antes da biorremediação acontecer, o que eleva o custo do tratamento. Com relação a custo, importante variável a ser analisada antes da utilização das citadas técnicas, segue a Tabela 3 com custo aproximado das técnicas biológicas de remediação.

**Tabela 3** - Tecnologias de tratamento de compostos orgânicos.

<b>Tecnologia</b>	<b>Tipo</b>	<b>Custo (US\$)</b>
Biorremediação de solo	<i>In situ</i>	30 a 100/m <sup>3</sup>
Bioventilação	<i>In situ</i>	10 a 70/m <sup>3</sup>
Atenuação Natural	<i>In situ</i>	“zero”
Landfarming	<i>Ex situ</i>	135 a 270/m <sup>3</sup>
Biopilha	<i>Ex situ</i>	40 a 200/ton
Bio-reactor	<i>Ex situ</i>	130 a 200/m <sup>3</sup>
Fitorremediação de comp. orgânicos	<i>In situ</i>	30 a 50/m <sup>3</sup>

Fonte: Adaptada de MESQUITA, 2004.

Portanto, conforme Mariano (2006) as técnicas de biorremediação *in situ* são mais viáveis pela facilidade de sua aplicação em relação às técnicas *ex situ*, além de gerar menos custos com o transporte e armazenamento do material contaminado e menos distúrbios ambientais, provavelmente seja por esse motivo que “a biorremediação *in-situ* é a mais empregada no mundo” (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010, p. 24). O quadro 2 sintetiza as vantagens e desvantagens com relação as técnicas de biorremediação *in situ* e *ex situ*.

**Quadro 2** - Vantagens e desvantagens das técnicas de Biorremediação In situ e Ex situ.

<b>Técnica</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Biorremediação In Situ	Não requer a escavação do solo contaminado, reduzindo os custos.	Processo de tratamento mais lento.
	Pode tratar um grande volume de solo de uma só vez.	Pode ser difícil o controle do processo.
	Há liberação de menos poeira e compostos orgânicos voláteis.	Mais eficiente e solos mais permeáveis.
Biorremediação Ex Situ	Processo de tratamento mais rápido.	Requer a escavação do solo contaminado o que onera os custos.
	De fácil controle.	Pode necessitar de um tratamento prévio do solo contaminado.
	Pode ser empregado para o tratamento de uma variedade de contaminantes e tipos distintos de solo.	Liberação de poeira e compostos orgânicos voláteis.

Fonte: EPA, 1996.

Dentre as principais técnicas de biorremediação *in situ*, destacamos a Atenuação Natural e a Bioestimulação, ambas serão tratadas a seguir por desfrutar dos mesmos mecanismos naturais, diferindo apenas com relação ao condicionamento do ambiente na Bioestimulação, com o objetivo de acelerar o processo natural, destarte alguns autores denominarem a técnica de Atenuação Natural Acelerada.

### 3.3.2 Atenuação Natural

Segundo Mulligan e Yong (2004) biorremediação passiva ou atenuação natural, é técnica na qual o poluente/contaminante permanece no local impactado e, por meio de processos naturais, como biodegradação, volatilização, diluição e sorção, ocorre a descontaminação do ambiente e assim “vem ganhando maior aceitação em locais contaminados por derramamentos de derivados de petróleo” (MARIANO, 2006, p. 18).

Para o emprego da técnica deve haver um controle rigoroso, avaliando as condições ambientais e os níveis de contaminação, para que se tenha um diagnóstico a respeito da viabilidade da utilização da mesma, dessa forma, Alvarez (2011) complementa que a atenuação natural pode ser definida como o gerenciamento da biodegradação do contaminante sem a necessidade da utilização de recursos da engenharia para acelerar o processo pois a mesma utiliza-se da capacidade inata de metabolização de poluentes do ambiente por comunidades microbianas indígenas.

Esse argumento vai de encontro ao custo “zero” citado na Tabela 3, que por sua vez passa a ideia de um total conforto e comodidade na utilização da técnica, dentre as etapas do acompanhamento, pode-se citar “análises químicas dos contaminantes, de aceptores finais de elétrons e/ou reagente ou produtos indicativos dos processos de biodegradação” (ALVAREZ, 2011, p. 7), sendo essa etapa geradora de custo durante todo o processo de remediação, que pode ser longa. Segundo Andrade, Augusto e Jardim (2010) normalmente, processos de atenuação natural costumam durar de meses a anos, por isso, o tempo e a porcentagem de degradação dos contaminantes podem ser muito lentos e até imprevisíveis, dessa forma na maioria dos casos, é necessário que esse processo de tratamento seja monitorado rigorosa e periodicamente.

Muteca (2012) cita não só o tempo prolongado que eleva o custo com monitoramento como desvantagem desse tratamento, mas a caracterização (avaliação das condições geológicas e geoquímicas), a probabilidade dos produtos finais serem mais tóxicos que os contaminantes originais bem como a migração do contaminante no solo antes da degradação causando, por exemplo, erosão, volatilização e lixiviação.

A principal vantagem do processo de atenuação natural, segundo Andrade, Augusto e Jardim (2010) é que, mesmo sem o acréscimo de nutrientes no solo ou a adequação de qualquer condição ambiental, a redução do contaminante pode acontecer de maneira eficiente e contínua. Isso ocorre devido, principalmente, ao processo de adaptação natural da microbiota nativa existente no solo impactado.

Millioli (2009) cita cinco mecanismos diretamente relacionados ao processo de atenuação natural, são eles: biodegradação; transformação química (hidrólise e desalogenação); estabilização dos contaminantes, como por exemplo, argila e materiais húmicos que dificultam e impedem a migração do contaminante; volatilização e a dispersão. A biodegradação pode ser considerada o mecanismo mais importante, pois transforma o contaminante em produtos inertes, sem risco ao meio ambiente. Conforme Andrade, Augusto e Jardim (2010), somente a biodegradação, facilitada por microrganismos, destrói fisicamente os contaminantes de interesse, os demais processos citados envolvem, basicamente, a transferência dos contaminantes de um local para outro ou a retenção do contaminante, no caso do processo de sorção.

Sendo assim, considerando a magnitude do derrame de petróleo e avaliando as possibilidades de se haver migração dos contaminantes para outros meios, a atenuação natural pode ser utilizada com sucesso. Geralmente, na ocorrência de grandes derrames, essa técnica não será a mais adequada, “já que o tempo necessário para que ocorresse a biodegradação do óleo seria bem maior, trazendo grandes prejuízos ao ecossistema atingido” (LIMA, 2010, p. 173).

No entanto, as condições ambientais devem ser adequadas para que essa seja empregada. Além disso, é necessária a presença de microrganismos nativos capazes de biodegradar o contaminante presente no solo. Se as condições não forem satisfatórias há necessidade de se promover correções dos fatores limitantes à biodegradação do contaminante. Essa técnica é denominada de bioestimulação e visa estimular o crescimento da população microbiana nativa pelo fornecimento de aceptores finais de elétrons, pela adição de nutrientes essenciais, pela correção do pH e do teor de umidade. Se essas medidas forem realizadas de forma apropriada, a biodegradação de hidrocarbonetos será estimulada sem qualquer impacto adverso ao meio ambiente (BAPTISTA, 2007, p. 22).

### 3.3.2.1 Bioestimulação

A bioestimulação usufrui dos mesmos processos naturais da atenuação natural, entretanto seu emprego se dá quando é necessário acelerar o processo de Atenuação Natural ou quando as condições ambientais não são satisfatórias, impondo assim fatores limitantes a biodegradação do contaminante pela microbiota nativa. A ideia fundamental da técnica parte do conhecimento das necessidades da microbiota e das condições ambientais ótimas para o seu crescimento e aumento das taxas de biodegradação do contaminante, seja petróleo, seus derivados, outros resíduos ou efluentes.

De acordo com Oliveira (2008) o processo de bioestímulo é uma das estratégias mais adotadas em tratamentos de recuperação de áreas impactadas, a técnica consiste na correção das condições ambientais, tais como adição nutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio) que segundo Oliveira (2011) apresenta dentre outras vantagens baixo custo, não gera toxicidade no meio e estimula o crescimento de populações microbianas degradadoras do óleo, oxigênio e umidade para aumentar a atividade da população microbiana existente nas áreas contaminadas.

Não deve ser visado apenas o aumento da atividade microbiana, mas também o crescimento quantitativo da microbiota, através da reprodução microbiana, aumentando a demanda da biodegradação. “A bioestimulação é a aceleração da reprodução microbiana e de suas atividades metabólicas, pela adição de oxigênio, água e nutrientes ao meio ambiente contaminado” (PEDROTI, 2007, p. 50; SANTOS, 2014, p. 28).

Como forma de estimular o crescimento e atividade da microbiota foi citado a adição de nutrientes como o nitrogênio, fosforo, potássio, assim como oxigênio e água, entretanto Baptista (2007) acrescenta a importância da correção do pH do meio, estimulando a biodegradação de hidrocarbonetos sem qualquer impacto adverso ao meio ambiente.

Um dos objetivos da bioestimulação é também disponibilizar os contaminantes para serem biodegradados, em alguns casos o contaminante está fortemente adsorvido nas partículas do solo e a microbiota não consegue acessar o mesmo, segundo (MUTECA, 2012, p. 28) “a bioestimulação visa aumentar os microorganismos autóctones e acelerar a taxa de biodegradação natural pela adequação das quantidades de nutrientes e/ou melhorar a biodisponibilidade de contaminantes em ambientes tanto quentes quanto frios”.

Santos (2014) explica que pelo fato de serem hidrofóbicos, os hidrocarbonetos de petróleo tendem a permanecer sorvidos na matriz do solo, o que diminui assim a sua disponibilidade ao ataque dos microorganismos e certamente limita sua biodegradação. Para contornar esse problema a adição de surfactante é uma alternativa que apresenta bons resultados. Sua adição na técnica de biorremediação apresenta efeitos positivos em relação à dessorção de compostos orgânicos hidrofóbicos sorvidos no solo, pois diminuem a tensão superficial e possui alta capacidade emulsificante, aumentando assim a solubilidade dos compostos orgânicos. Os surfactantes podem ser inorgânicos ou orgânicos (biosurfactantes).

Os surfactantes são uma ampla classe de moléculas anfipáticas (com domínio polar e apolar) que são capazes de diminuir as tensões superficial e/ou interfacial entre gases, líquidos e sólidos com uma grande variedade de aplicações, tanto industriais como na limpeza de locais contaminados com hidrocarbonetos. Contudo, surfactantes sintéticos mostram alta toxicidade, baixa biodegradabilidade e eficiência somente em faixas pequenas de pH e temperatura. Devido a essas limitações, o interesse pelos biosurfactantes

(surfactantes de origem microbiana), produzido por certas bactérias, leveduras e fungos, tem aumentado devido à baixa toxicidade, natureza biodegradável e eficiência em valores de temperatura, pH e salinidade extremos e seu papel na recuperação de ecossistemas pela aceleração da biodegradação dos hidrocarbonetos provenientes de vazamentos (MARIANO, 2006, p. 42).

A importância da temperatura nesse processo está implícito quando Muteca (2012) cita “em ambientes tanto quentes quanto frios”. Em locais frios a atividade dos microrganismos é reduzida, diminuindo a taxa de biodegradação. Este fator é difícil de controlar quando da utilização da técnica *in situ*, sendo assim privilégio das regiões de temperaturas mais elevadas, como a região semiárida localizada no nordeste brasileiro, caracterizado pelo ocorrência do bioma caatinga e fator limitante em regiões de clima temperado, se agravando quando mais próximo estiver dos polos norte e sul.

A EPA (2004) ainda cita a possibilidade de adição de hidrogênio como forma de acelerar a biorremediação entretanto informa que o primeiro requisito a ser atendido para que a bioestimulação seja utilizada de forma eficiente e com baixo custo em relação as outras técnicas, é a capacidade dos microrganismos autóctones (indígenas) descontaminar o poluente alvo. (MARIANO, 2006, p. 22) corrobora a ideia quando cita “para se utilizar o processo de bioestimulação, deve-se demonstrar que existe no local contaminado uma população natural de microrganismos capazes de biodegradar os contaminantes presentes”. Os termos autóctones, indígenas ou nativos relacionados a microbiota, são sinônimos e para serem definidos como tal, devem ser nativos da região biogeográfica.

Dentre as vantagens da bioestimulação já apresentadas, com relação a facilidade de aplicação e baixo custo, destacam-se conforme Oliveira (2001) a certeza de que os microrganismos nativos já estão adaptados às condições climáticas do local, que pode ser determinante no sucesso do tratamento. De acordo com Millioli (2009) e Muteca (2012) dependendo das características do contaminante e do solo, pode ser utilizada isoladamente ou em conjunto com a bioaugmentação, que é uma técnica de biorremediação que consiste na inoculação de microrganismos alóctones em ambientes contaminados com comprovada capacidade de degradação dos contaminantes alvo, podendo serem geneticamente modificados ou não. Assim como “também a possibilidade de utilização em compostos xenobióticos” (SARY, 2012, p. 39).

As moléculas orgânicas de difícil degradação, denominadas “recalcitrantes”, podem ser de origem natural, sintetizadas pelo metabolismo biológico, ou sintéticas, produzidas por tecnologias industriais modernas e estranhas ao ambiente natural, por esta razão denominadas “xenobióticas” (*xenos*, do grego = estrangeiro). Estas moléculas xenobióticas, introduzidas no ambiente desde o início do século XX, compreendem vários tipos de compostos, aplicados na indústria química e de materiais, tal como agrotóxicos, corantes, fármacos,

polímeros e plásticos, podendo ser tóxicas a sistemas biológicas e/ou recalcitrantes, uma vez que não fazem parte do conjunto de moléculas produzidas pelo metabolismo evolutivo que propicia a vida na terra. Muitos dos xenobióticos e/ou seus produtos de degradação resultam em efeitos nocivos e/ou mutagênicos aos organismo vivos, podendo levar a eliminação seletiva de indivíduos e acarretar modificações na estrutura ecológica e funcional da comunidade biológica (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005, p. 36).

Assim ressalta-se a importância de uma análise detalhada pois a bioestimulação “deve ter sua aplicação muito bem estudada e controlada, para evitar a extinção da microfauna autóctone e conseqüentemente um desequilíbrio ambiental” (SARY, 2012, p. 39) e “outra preocupação importante com o uso de fertilizantes em áreas contaminadas é com produção de metabólicos tóxicos como subprodutos” (LIMA, 2010, p. 57). Dessa forma (FERREIRA, 2010, p. 66) alerta que “há que se monitorar as concentrações de nutrientes durante o tratamento para que essas não fiquem abaixo dos níveis necessários para a atividade celular ou, ao contrário, atinjam níveis tóxicos que ultrapassem as concentrações permitidas pela legislação”.

As linhas de pesquisa na área da biorremediação utilizando a estratégia de bioestimulação, atualmente está voltada para o teste dos produtos que já vem sendo utilizados, como por exemplo o NPK e seu comportamento nos variados tipos de solo, tipos de contaminantes e doses ótimas, testes de novos produtos tanto orgânicos como inorgânicos, exemplo, os surfactantes sintéticos e biosurfactantes, e o conhecimento qualitativo e quantitativo das espécies dos microrganismos envolvidos na degradação dos contaminantes.

Morais (2005) avaliou o potencial de sistemas de biopilhas na degradação de borra de óleo, com adição de fertilizantes e bioaugmentação. Preliminarmente testou a biodegradabilidade da borra de óleo através do método respirométrico de Bartha, com solo argiloso misturado com borra oleosa na proporção de 5 % com base em massa, incubados por 133 dias a 28 °C. Neste foi observado que a adição do resíduo no solo proporcionou aumento na produção de CO<sub>2</sub>, sendo que a produção no sistema contendo apenas solo correspondeu durante 133 dias, a aproximadamente 10% dos valores encontrados nos demais sistemas que receberam o resíduo.

Seabra (2005) testou bioestimulação com biopilhas em sua pesquisa que consistiu em estudar o efeito dos parâmetros que influenciam a biodegradação de petróleo em solos com altos teores de argila e silte. Utilizou a respirometria no primeiro estágio da pesquisa para estimar consumo de oxigênio em função da concentração inicial de óleo, da temperatura, da correção de pH, do tipo e quantidade de material estruturante (serragem e o composto maduro de lixo urbano), entre outras condições. Avaliou como viável o uso da biopilha para tratamento de solos argilosos e ainda observou que a concentração de óleo cru teve influência na taxa de consumo de oxigênio, as amostras com 3 % de óleo apresentaram consumo maior de oxigênio

em praticamente todos os testes em relação as amostras com 5 e 10 % de óleo. O consumo de oxigênio nas amostras com 3 % de óleo foi praticamente o dobro das amostras com 10 %. Ainda foi observado que o aporte de nutrientes fosforo e potássio incrementaram a taxa de consumo de oxigênio e a elevação da temperatura de 22 para 30 °C dobrou o consumo de oxigênio das amostras com 3 % de óleo.

Mariano (2006) testou a bioestimulação com a adição de nutrientes e de surfactante e bioaumento em solos e águas subterrâneas contaminadas com hidrocarbonetos. Ainda testou a utilização de vinhaça como fonte de nutriente. O método respirométrico foi utilizado nos experimentos para monitoramento da biodegradação em solos. Foi observado que a combinação de bioestimulação com adição de nutrientes, surfactante e bioaumento dobrou a eficiência de biodegradação com remoção de hidrocarbonetos da ordem de 45,5 % e que a deficiência de nutrientes foi o fator limitante principal do processo. A aplicação da técnica de bioaumento isolada não apresentou ganhos e a fertilização com vinhaça não foi adequada para aumentar a eficiência da biodegradação do óleo diesel.

Baptista (2007) em sua pesquisa avaliando a biodegradação de óleo diesel em solo argiloso e arenoso, sob condições aeróbia e anaeróbia, empregando biosurfactante em um planejamento fatorial cujas variáveis independentes avaliadas foram o teor de fertilizante NPK 4:14:8, teor de biosurfactante e tempo, e percentual de remoção de hidrocarbonetos como variável resposta. O solo foi contaminado com 5 % v/m de óleo diesel e adicionado inoculo de bactérias. Foi observado que as maiores eficiências de remoção de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo foram obtidas nos experimentos realizados com solo argiloso tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias. Em condições aeróbias, o uso do fertilizante e/ou biosurfactante em solo argiloso promoveu aumento na eficiência de remoção de TPH acima de 50 %. Nas amostras que não foram corrigidas não foi detectada remoção de TPH nos primeiros 30 dias, no entanto o percentual atingiu 4 % em 50 dias. A maior remoção registrada de TPH (79,6 %) foi nas amostras com solo argiloso com emprego de maior concentração de fertilizante e biosurfactante.

Chagas-Spinelli (2007) realizou pesquisa com objetivo de avaliar a eficiência de remoção de hidrocarbonetos poliaromaticos (HPA) de um solo argiloso contaminado experimentalmente com óleo diesel, comparando o uso de diferentes técnicas de biorremediação, entre elas, Landfarming, bioestimulação com adição de nutrientes e bioestimulação associado a bioaugmentação. As amostras tiveram umidade corrigida a 50 % da capacidade de campo e foi utilizado N e P como fonte de nutrientes. Os tratamentos com bioestimulação e bioestimulação associado a bioaugmentação foram mais eficientes na remoção

de HPAs do que apenas o Landfarming no início do experimento, entretanto o Landfarming foi mais eficiente que a bioestimulação com relação a remoção de óleo e graxas chegando ao percentual de 65 %, sendo a bioestimulação associada a bioaumentação mais eficiente nesse parâmetro com 72 %. Só bioaumentação não se mostrou eficiente.

Dias (2007) em sua pesquisa avaliou a capacidade de consorcio microbiano em degradar hidrocarbonetos presentes no óleo bruto utilizando solo com e sem histórico de contaminação avaliando a necessidade de suplementação com fontes de nutrientes. Os testes para quantificação da produção de gás carbônico foram realizados através da respirometria e tiveram duração de 53 dias e de degradação do óleo bruto através de cromatografia gasosa 91 dias. O autor observou que a melhor condição para maximização da biodegradação obtida através da produção de gás carbônico foi na a fonte de nitrogênio (0,10 g/100 g de solo), ferro (0,0015 g/100 g de solo), fosforo (0,45 g/100g de solo) e inoculo (0,6 ml/100 g de solo). Nas amostras com solo com histórico de contaminação a bioestimulação apresentou o melhor resultado.

Meneghetti (2007) realizou pesquisa com objetivo de avaliar a descontaminação de um solo residual contaminado com óleo diesel e biodiesel, através das técnicas de atenuação natural, bioaumentação e bioventing. Os ensaios foram realizado com solo do tipo Latossolo com 70 % de argila. Foi feito acompanhado da evolução de CO<sub>2</sub> por um período de 45 dias pelo método da respirometria. Durante este período foi observado que a atividade microbiana, avaliadas pela liberação de CO<sub>2</sub>, apresentou diferenças significativas no período de 45 dias, apresentando melhores resultados para a Bioaumentação em relação a Atenuação Natural, porem esta última apresentou resultados satisfatórios, requerendo mais tempo para descontaminação do solo. O tratamento controle atingiu o pico de liberação do CO<sub>2</sub> no 15° dia, mantendo-se praticamente constante até o 31° dia, decrescendo atingindo a estabilidade aos 45 dias de incubação. Os tratamentos representados pela atenuação natural com diesel e biodiesel atingiram o pico de produção de CO<sub>2</sub> no 25 ° dia, começando a decrescer no 31° tal qual o tratamento controle.

Pedroti (2007) utilizou a respirometria em sua pesquisa com objetivo de isolar e caracterizar microrganismo com capacidade de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em ambiente terrestre. O autor utilizou variedades de cepas e hidrocarbonetos, e testou em solo arenoso e argiloso para avaliar o processo em solos diferentes. As cepas apresentaram potencial de biodegradação dos hidrocarbonetos derivados de petróleo, foi observado que os solos arenosos apresentam maior capacidade de biodegradação dos hidrocarbonetos em relação aos tratamentos em solos argilosos, provavelmente devido a maior quantidade de oxigênio.

Oliveira (2008) trabalhou com bioestimulação utilizando solo franco-arenoso do município de Carmópolis em Sergipe, com objetivo de determinar estratégias de biorremediação para solo contaminado com petróleo. O experimento foi dividido em quatro fases sendo a primeira o monitoramento do processo de atenuação natural de um solo contaminado com 5 % m/m de petróleo e a segunda etapa foram avaliadas a contribuição das fontes de nitrogênio e suas respectivas concentrações nos testes de biodegradação de óleo, além de avaliar níveis mais favoráveis da Capacidade de Retenção de Água (CRA) para o crescimento microbiano, através da produção de gás carbônico medido por cromatografia gasosa. O autor utilizou ureia e torta de mamona na relações C:N 100/10 e 100/20 respectivamente como fonte de nutriente, que apresentaram produção superior de gás carbônico em comparação com a atenuação natural, e as amostras corrigidas com mamona por sua vez apresentaram produção quatro vezes maior em relação a ureia, sendo assim, nesse caso a fonte mais eficiente. Entretanto quando se comparou as porcentagens de remoção de petróleo através da análise de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP), a condição empregando ureia (62,34 %) mostrou-se mais eficiente em comparação com a mamona (54,40 %). Por fim o autor ainda testou toxicidade do solo contaminado utilizando minhocas e concluiu que os solos com 1 e 5 % m/m de petróleo não foram considerados tóxicos para os testes de letalidade e perda de biomassa, sendo as fontes de nitrogênio mais agressivas a qualidade do solo que o próprio contaminante.

Ferreira (2010) trabalhou com biorremediação de solo argiloso contaminado com gasolina, o experimento dividiu-se em duas partes, sendo a primeira com finalidade de avaliar as condições nutricionais e de umidade na biorremediação e a segunda parte avaliar o processo em diferentes profundidades no solo. A fonte de nutrientes utilizada foi o fertilizante comercial da marca Ultraverde com relação NPK de 4:14:8 e o ajuste nutricional do solo foi baseada no teor de fosforo presente no solo, podendo ser de 25 ou 50 ppm. Foi realizado também calagem para elevar o pH a valores próximos da neutralidade. A degradação do contaminante foi irrisória nas amostras de solo sem ajuste de nutrientes e chegou a cerca de 50 % nas amostras com ajuste do solo para 50 ppm de fósforo. Foi observado também que teores de umidade em torno de 40 % colaboram para maior eficiência do processo.

Lima (2010) realizou estudo com objetivo de avaliar a degradação de hidrocarbonetos saturados através da técnica de bioestimulo em sedimento de manguezal impactado por atividades petrolíferas, testando duas fontes de nutrientes, o NPK e OSMOCOTE na proporção 100:10:1, com diferença que o NPK libera seus nutrientes mais rapidamente. O experimento foi conduzido em aquários com sedimentos contaminados por petróleo ao longo de 90 dias. Foi

observado que as unidades de simulação com NPK apresentaram uma redução mais expressiva dos hidrocarbonetos saturados, ao final do experimento, se mostrando mais eficiente quando comparada as unidades referência e ao OSMOCOTE.

Alvarez (2011) em sua pesquisa testou o efeito da introdução de microrganismos em dois diferentes tipos de solo em comparação com a bioestimulação e atenuação natural monitorada e avaliou também o efeito desses tratamentos sobre a diversidade microbiana dos solos. Nesse trabalho também foi avaliado o efeito da salinidade no processo de biorremediação simulando as descargas de água de produção de petróleo no solo. O experimento foi conduzido com amostras contaminadas ao nível de 5 % de óleo bruto, durante o período de 120 dias, onde foi observado que a atenuação natural monitorada foi mais eficiente nas amostras contendo NaCl que os tratamentos com bioaugmentação e bioestimulação e com relação a remoção de petróleo a atenuação natural obteve resultados pouco inferior aos demais tratamentos tanto na presença quanto na ausência de NaCl, dessa forma, o autor concluiu que esse seria o tratamento mais indicado, levando em consideração também o baixo custo e interferência na comunidade microbiana nativa.

Oliveira (2011) trabalhou com bioestimulação e bioaugmentação comparando o efeito da adição de fontes de nitrogênio e fosforo solúveis em água e fontes oleolíficas (resina ureia-formaldeído e lecitina de soja) sobre a degradação de petróleo, em areia de praia, utilizando amostras com microrganismos nativos como também adicionados em consorcio. Foi testado também o efeitos das trocas diárias de água, para isso realizou-se contagem de bactérias e análises de concentração de nitrogênio e fosforo na água, e o óleo remanescente foi quantificado por espectrofotometria. Não foi observado diferenças consideráveis nas contagens microbianas entre os tratamentos com nutrientes e fontes oleofílicas e que a degradação do óleo foi maior nos tratamento com nutrientes solúveis em água (nitrogênio e fosforo).

Muteca (2012) trabalhou com bioestimulação em escala de bancada com solo contaminado com óleo proveniente de Angola, dentre outras metodologias o autor utilizou a umidificação, fertilização, aeração e bioaugmentação. Para avaliar o desempenho da biorremediação foi realizado monitoramento de pH, umidade, nitrogênio, fosforo, hidrocarbonetos totais e policíclicos aromáticos. Os solos foram fertilizados com produto comercial denominado de Vitaplan na relação NPK de 10:10:10 e enriquecidos com microrganismos. O experimento foi conduzido durante 90 dias em reator, na temperatura entre 19 e 21 °C com solo in natura misturado com solo contaminado nas proporções respectivas 9, 17 e 27 % m/m, obtendo remoção de 62 % de HTP e crescimento bacteriano até os 45 dias.

Também foi observado que para essas proporções de mistura de solo contaminado com solo não contaminado não se alcançou concentrações de hidrocarbonetos tóxicos às células.

Costa (2015) em trabalho similar a esta pesquisa avaliou a capacidade de biorremediação de solo arenoso contaminado com compostos oleosos utilizando a técnica da bioestimulação. O experimento foi montado em escala de bancada em esquema fatorial 5 x 5 com duas variáveis independentes (fertilizante e nível de contaminação por petróleo) e a variável dependente foi a quantidade de C-CO<sub>2</sub> produzido, medido a partir da metodologia da respirometria utilizando respirômetros de Bartha adaptados, onde a maior produção está associada ao arranjo com maior capacidade de estimulação da microbiota nativa para degradação do contaminante. A fonte de fertilizante utilizada foi ureia, monofosfato de amônio e cloreto de potássio na proporção NPK 10:30:20. O experimento durou 105 dias e a temperatura variou durante esse período de 31,9 a 34,3 °C. A análise estatística foi realizada através da metodologia da superfície de resposta e os melhores resultados obtidos para produção de C-CO<sub>2</sub> foi de 3.539,40 mg kg<sup>-1</sup> para o nível de contaminação a 9,20 % de petróleo com base em massa e a dose de fertilizante equivalente a 2.435 kg ha<sup>-1</sup> de NPK. Foi observado que a região racional está limitada a aplicação de dose equivalente de 1.067,5 kg ha<sup>-1</sup> de NPK a um nível de contaminação de 6,68 % de petróleo.

### 3.4 BIODEGRADAÇÃO

A biodegradação dos contaminantes é um processo natural de reciclagem dos compostos orgânicos, compondo assim seus ciclos biogeoquímicos, e ocorrerá espontaneamente quando as condições forem favoráveis. O contaminante será atacado pelos microrganismos, geralmente bactérias e/ou fungos, que por sua vez irão desencadear o processo de decomposição. A biodegradação final é também denominada de mineralização, quando a biodegradação passa por suas diversas etapas até a conversão dos compostos orgânicos em biomassa, dióxido de carbono, água e sais minerais.

A biodegradação se dá através do aproveitamento dos contaminantes pelos microrganismos como fonte de carbono que os permitem produzir novas células e, também, suprir-se de elétrons que possibilitem a obtenção de energia. A energia é obtida mediante a catalise de reações químicas que, dentre outras formas, podem ser por oxidação ou redução. O que ocorre é a quebra das ligações químicas e a transferência de elétrons do contaminante. Para microrganismos degradarem completamente o petróleo, centenas de diferentes compostos tem que ser metabolizados.

A biodegradação pode ser dividida em três categorias: (a) mineralização, onde os compostos químicos orgânicos são transformados a compostos químicos inorgânicos como dióxido de carbono, água e amônia; (b) biotransformação,

onde os compostos orgânicos químicos são transformados em estruturas menores e (c) cometabolismo, onde outro composto é metabolizado primeiramente ou simultaneamente a um composto específico (PEDROTI, 2007, p. 33).

Moraes e Tornisielo (2009), explicam que a biodegradação de resíduos oleosos exige uma via metabólica complexa que nem sempre é encontrado em uma única espécie de microrganismos, e que geralmente os produtos metabólicos de uma espécie pode ser degradado por um outra, e assim sucessivamente, levando à completa degradação do substrato, apesar da falta de um tipo específico de microrganismo na comunidade capaz de degradar sozinho. Santos (2014) utiliza o mesmo argumento e acrescenta que é difícil o processo de biodegradação ser realizado apenas por uma espécie de microrganismo.

Segundo Santos (2014) a capacidade adquirida por muitas espécies de microrganismos em usar compostos de petróleo como substrato de crescimento, degradando-os ou tornando-os menos tóxicos ao meio ambiente, pode ser explicada pela presença maciça de hidrocarbonetos em toda a biosfera. A exposição prolongada aliado a ausência de outras fontes de carbono mais acessíveis proporcionou a adaptação desses seres a fim de utilizarem os hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia. Esse mecanismo de adaptação também explica o fato de se ter microrganismos com taxas de biodegradação mais elevadas que outros.

De acordo com Mariano (2006) hidrocarbonetos com baixo a médio peso molecular e álcoois são exemplos de compostos facilmente biodegradáveis, enquanto outros são recalcitrantes (não biodegradáveis), como exemplo os hidrocarbonetos halogenados. “Diversas substâncias não são susceptíveis à biodegradação, como os metais pesados, radionuclídeos e alguns compostos organoclorados” (SEABRA, 2005, p. 27). Os compostos químicos fabricados pelo homem em especial, são difíceis de serem biodegradados, retornando a questão da evolução e adaptação, a natureza ainda não descobriu meios para fazê-la.

De acordo com Rosato (1997) a microbiota presente no solo, águas subterrâneas e superficiais são capazes de degradar compostos orgânicos utilizando-os como fonte de energia, sendo lista em ambiente marinho 25 gêneros de bactérias, um de algas e 27 de fungos, os mais comuns são: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Cândida*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Rhodosporidium* e *Sporobolomyces*. No solo, foram registrados 22 gêneros de bactérias e 31 de fungos, os fungos como *Penicillium* e *Cunninghamella* sp apresentam maior capacidade de degradação do que a *Flavobacterium*, *Brevibacterium* e *Arthrobacter* sp (ROSATO, 1997). Tortora, Funke e Case (2012) citam que dentre as bactérias mais utilizadas atualmente como biorremediadores, estão às espécies do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus*.

Conforme Weber e Santos (2013), no ambiente, os hidrocarbonetos são biodegradados principalmente, por bactérias e fungos, sendo que as bactérias são mais amplamente utilizadas nos processos de biorremediação, Cunha (1996) acrescenta as leveduras e os actinomicetes, visto sua habilidade em metabolizar uma ampla diversidade de substâncias orgânicas. Ainda de acordo com o mesmo, a contribuição dos diferentes microrganismos na degradação de compostos varia de acordo com o poluente, com os fatores ambientais e as propriedades físico-químicas do local contaminado.

Esses microrganismos estão presente nos solos, todos desenvolvendo suas atividades (decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes e etc.) de forma a manter o equilíbrio desse ecossistema. Geralmente estão em grande número, tanto em termos qualitativos como quantitativos, esta pode ser observada na Tabela 4.

**Tabela 4** - Distribuição de microrganismos em várias profundidades do solo.

Profundidade (cm)	Microrganismos por grama de solo				
	Bactérias aeróbicas	Bactérias anaeróbicas	Actinomicetos	Fungos	Algas*
3-8	$7,8 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$
20-25	$1,8 \times 10^6$	$3,8 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$5,0 \times 10^4$	$5 \times 10^3$
35-40	$4,72 \times 10^5$	$9,8 \times 10^4$	$4,9 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	$5 \times 10^2$
65-75	$1,0 \times 10^2$	$1, \times 10^3$	$5 \times 10^3$	$6 \times 10^3$	$1 \times 10^2$
135-145	$1,0 \times 10^1$	$4 \times 10^2$	-	$3 \times 10^2$	-

\* Inclui as cianobactérias

Fonte: MOREIRA e SIQUEIRA, 2006.

MENEGHETTI (2007) explica que o número de bactérias presentes no solo é variável, uma vez que diversos fatores exercem profunda influência no seu crescimento. Em geral as maiores concentrações encontram-se nos horizontes de superfície, por serem aí mais favoráveis as condições de temperatura, aeração, umidade e nutrição.

“Bactérias [...] são organismos relativamente simples e de uma única célula [...] geralmente se reproduzem por divisão em duas células iguais; [...] usam compostos orgânicos encontrados na natureza derivados de organismos vivos ou mortos” (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012, p. 4). Martins (2004) cita que as bactérias apresentam crescimento acelerado,

grande versatilidade metabólica, plasticidade genética e capacidade de se adaptarem rapidamente a variações do meio.

Essas características as tornam adaptáveis a diferentes tipos de condições ambientais. Essencialmente elas necessitam apenas de energia, fonte de carbono e nutrientes como nitrogênio, potássio, enxofre, fósforo, cálcio e magnésio, e assim conseguem crescer e sobreviver às mais distintas adversidades. Segundo Brady (1994) as bactérias estão presente em elevado número no solo, variando de bilhões a trilhões por quilograma e são encontradas sob a forma de mantas, moitas e filamentos, denominadas de colônias. Tem a capacidade de produzir esporos e vegetar o que lhes permitem sobreviver a condições desfavoráveis.

Os fungos são extremamente importantes no processo de biodegradação, podendo agir em consorcio com as bactérias, pois segundo Santos e Weber (2013) o metabolismo dos fungos geralmente resulta numa degradação incompleta que necessita da associação de bactérias para alcançar a completa oxidação do petróleo. Pedroti (2007) cita que os fungos geralmente crescem mais devagar e as suas dimensões superiores levam a uma relação baixa entre a superfície e o volume de retenção de substrato. No entanto, os fungos são capazes de degradar uma grande variedade de contaminantes e alguns de elevada complexidade, excretando enzimas que quebram as ligações entre os polímeros e resistem a condições bastante adversas.

Mollea, Bosco e Ruggeri (2005), ressalta as características dos fungos filamentosos, como a bioatividade e o crescimento morfológico, fazendo destes melhores degradadores potenciais que as bactérias, aliado a capacidade de crescer sob condições ambientais de estresse, em meio com pH baixo, pobres em nutrientes e pouca água. Mariano (2006) também chama atenção para a habilidade dos fungos filamentosos em degradar ou transformar hidrocarbonetos de estrutura complexa e de cadeia longa.

Entretanto apenas a existência destes seres vivos, adaptados a hidrocarbonetos de petróleo e em quantidade suficientes não garantem eficiência no processo de biodegradação, pois conforme Mariano (2006), Baptista (2007), Ferreira (2010) e Rocha (2015) existem algumas limitações naturais como a falta de oxigênio, pH e temperatura desfavoráveis, falta de nutrientes minerais e baixa umidade. “A manipulação e a otimização destes fatores é fundamental para a obtenção de bons resultados na biorremediação” (BAPTISTA, 2007, p. 23).

### **3.4.1 Fatores limitantes a biodegradação**

Os fatores citados como limitantes para a biodegradação são também citados por Tortora, Funke e Case (2012) como sendo necessários para o crescimento microbiano e podem

ser divididos em duas categorias principais, físicos (temperatura, pH e água) e os químicos (oxigênio e nutrientes).

#### 3.4.1.1 Umidade

“Os microrganismos obtêm a maioria dos seus nutrientes da água presente no seu meio ambiente. Portanto, eles requerem água para seu crescimento, sendo que sua composição é de 80 a 90 % de água” (TORTORA; FUNKE; CASE, 2010, p. 159). Assim a disponibilidade de água no solo é imprescindível para a atividade e crescimento microbiano, e biodegradação dos contaminantes. De acordo com Silva (2004) e Millioli (2009) a umidade é um dos fatores ambientais que mais afeta a vida microbiana no solo, já que os microrganismos requerem uma quantidade razoável de água para o seu crescimento.

De acordo com Chagas-Spinelli (2007) a água, ou umidade do solo, é o veículo de transporte dos nutrientes e do oxigênio para fora e dentro das células dos microrganismos e pode estar presente em três formas: livre (se movendo no solo e transportando o oxigênio), capilar (presente nos poros da matriz do solo quando não está saturado e hidroscópica (interagindo com a superfície da matriz do solo, geralmente indisponível a microbiota).

Solos argilosos tem uma maior capacidade de reter umidade com relação a solos arenosos, assim como solos com maior teor de matéria orgânica, garantindo maior atividade dos microrganismos presentes. Millioli (2009) cita que geralmente em solos contaminados com óleo cru a taxa de biodegradação aumenta com o ajuste da umidade entre 30 e 90 % do valor da capacidade de retenção do líquido, enquanto que o valor ótimo dependendo das propriedades do solo e do contaminante. Conforme Silva (2004) os solos devem ser úmidos, mas não molhados e a faixa ideal para a umidade do solo deve estar entre 40 e 85 % da capacidade de retenção de água (capacidade de campo) do solo ou de aproximadamente 12 a 30 % em peso.

Com relação ao descontrole da umidade, o solo encharcado tem efeitos negativos, pois segundo Silva (2004) e Aspray (2008) a umidade excessiva pode reduzir a disponibilidade de oxigênio afetando os processos metabólicos dos microrganismos aeróbios, que são os principais responsáveis pela degradação dos poluentes orgânicos nos horizontes superficiais do solo.

#### 3.4.1.2 Temperatura

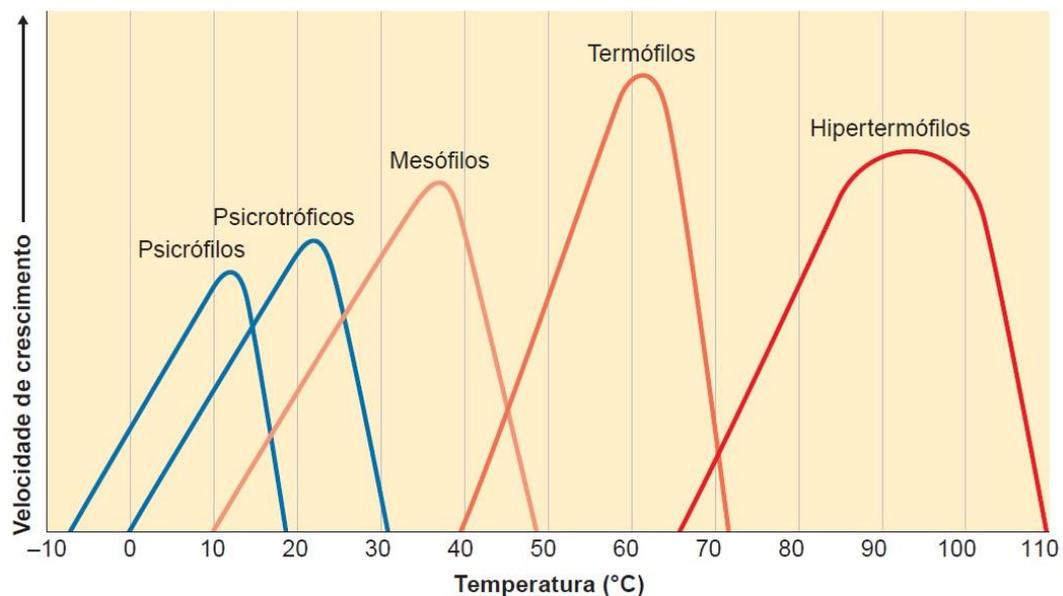
A temperatura é um fator diretamente relacionado ao processo de biodegradação, pois, conforme Pedroti (2007) cada tipo de bactéria apresenta uma temperatura ótima de crescimento,

em torno desta temperatura observa-se um intervalo dentro do qual o desenvolvimento também ocorre, sem, no entanto, atingir o seu máximo. Ultrapassado o limite superior, rapidamente ocorre desnaturação do material celular e, conseqüentemente, a morte da célula. As temperaturas inferiores a ótima levam a uma desaceleração das reações metabólicas, com diminuição da velocidade de multiplicação celular, que em caso extremo, fica impedida.

Os microrganismos são classificados em três grupos principais com base em sua faixa preferida de temperatura: em **psicrófilos** (crescem em baixas temperaturas), **mesófilos** (crescem em temperaturas moderadas) e **termófilos** (crescem em altas temperaturas). A maioria das bactérias cresce em uma faixa limitada de temperatura, sendo que há somente 30 °C de diferença entre a temperatura máxima e a mínima de crescimento. Elas crescem pouco nas temperaturas extremas considerando sua faixa ideal (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012, p. 157).

A Figura 2 mostra a velocidade de crescimento dos diferentes tipos de microrganismos em resposta à temperatura, Tortora, Funke e Case (2012) ressaltam que a temperatura ótima de crescimento normalmente está deslocada para perto da variação máxima de temperatura, acima desta, a velocidade de crescimento decresce rapidamente, provavelmente pela ocorrência da inativação dos sistemas enzimáticos das células.

**Figura 2** - Velocidades de crescimento características de diferentes tipos de microrganismos em resposta à temperatura.



Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE, 2012.

A faixa de temperatura ideal citados pelos autores como ideais para a biodegradação, estão praticamente todos em um mesmo patamar, de 20 a 35 °C para Leahy e Colwell (1990), 30 a 40 °C para Millioli (2009) e 25 a 30 °C para Andrade, Augusto e Jardim (2010). Margesin

e Schinner (2001) e Silva (2004) citam que a atividade microbiana no solo diminui significativamente a temperaturas abaixo de 10 °C e, essencialmente cessam, abaixo de 5 °C.

Silva (2004) relata que a atividade microbiana da maioria das bactérias importantes para a biodegradação dos hidrocarbonetos do petróleo também diminui a temperaturas maiores do que 45 °C. Como a temperatura do solo varia com a temperatura do ambiente, haverá certos períodos do ano em que o crescimento microbiano e, portanto, a degradação dos constituintes diminuirá. Bisognin (2012) *apud* USEPA (1994) cita que os microrganismos dobram sua atividade metabólica e enzimática a cada aumento de 10 °C na temperatura, até atingir valores inibitórios, comumente em torno de 40 a 50 °C.

Dessa forma pode-se observar que os mesófilos são os principais microrganismos atuantes no processo de biodegradação de contaminantes no solo, entretanto a temperatura não afeta somente o metabolismo destes, interfere também no contaminante, agindo sobre a sua solubilidade. A baixas temperaturas o petróleo tende a se solidificar e a altas aumenta a viscosidade, afetando a taxa de biodegradação.

A temperatura varia de região para região e tem sua sazonalidade definida pelas estações do ano, mas Andrade, Augusto e Jardim (2010) ressaltam que as temperaturas citadas como ideais, são encontradas na maior parte dos solos brasileiros, sendo uma excelente característica para utilização das técnicas de biorremediação. O mesmo ainda relata que a temperatura do solo varia diariamente nas proximidades da superfície em solos com baixa densidade de cobertura vegetal e abaixo dos 50 cm, essa variação é pouco significativa.

Essa característica dos solos brasileiros conferem maior potencial de uso da biorremediação, pois controlar temperatura em tratamentos *in situ* é extremamente complicado, principalmente se a contaminação se estender por longas áreas, contudo Costa (2009) cita algumas técnicas que podem ser utilizadas para modificar a temperatura do solo, em climas quentes, pode cobrir a área com terra, esterco, serapilheira, plástico, ou ainda por meio do crescimento de plantas, e em climas frios irrigar ou injetar água aquecida na zona vadosa.

#### 3.4.1.3 pH

Segundo Jacques et al. (2007) o pH é um fator químico que afeta diretamente a atividade microbiana, devido aos efeitos dos íons H<sup>+</sup> na permeabilidade celular e na atividade enzimática, e, indiretamente, pela influência na disponibilidade de macro e micronutrientes e na solubilidade do alumínio e demais metais pesados, que podem ser tóxicos aos microrganismos. Além de estar relacionado ao metabolismo dos microrganismos, Trindade (2002) acrescenta

que a alteração do pH pode influenciar a solubilidade dos contaminantes em água como também a intensidade da sorção destes no solo.

Esta condição pode ser inerente ao tipo de solo, em uma escala que pode variar “desde de 2,5 a 11,0 em solos ácidos e em desertos alcalinos” (PEREIRA JUNIOR; GOMES; SORIANO, 2009, p. 59), respectivamente, mas este desequilíbrio pode também ser ocasionado após o derrame do contaminante. A grande maioria dos autores, como exemplo, Pereira Junior, Gomes e Soriano (2009), Millioli (2009) e Nascimento (2013) citam que a faixa de pH mais favorável para a maioria dos microrganismos envolvidos no processo de biorremediação, está situada 6,0 e 8,0, com o valor ótimo em torno de 7,0, onde a taxa de biodegradação tende a ser maior e em ambientes de extrema acidez ou alcalinidade, a atividade microbiana decai, podendo inibir o processo.

Muteca (2012) detalha a ocorrência do fenômeno, ser devido ao pH citoplasmático dos microrganismos ser 7,0 e assim faz-se necessário manutenção do pH do meio igual a esse ou em uma faixa próxima, sob pena de ocorrer alterações no metabolismo e reduzir drasticamente sua atividade. Nessa faixa, é comum tanto a ação de bactérias quanto fungos, porém os fungos são mais resistentes em faixas de pH mais ácidas.

Salienta-se, porém, que nos solos ácidos o desenvolvimento dos microrganismos é bastante reduzido, principalmente das bactérias fixadoras do nitrogênio atmosférico, além de tornar o fósforo de difícil aproveitamento pelos vegetais. Nesta situação, embora a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo seja, na maioria das vezes, realizada por bactérias, pesquisas mostram que a utilização de fungos é uma opção considerada bastante viável. Esses microrganismos têm sido mais eficientes que as bactérias para agirem em condições ambientais adversas, como em valores extremos de pH (menor que 5 e maior que 10) (ANDRADE; AUGUSTO E JARDIM, 2010, p. 27).

A correção de pH em solos pode ser realizado por calagem quando o objetivo é elevar o pH ou aplicação de ácidos quando é necessário reduzir, práticas comumente utilizadas na agricultura. Segundo Ferreira e Morita (2012), realizar bioestimulação sem a correção dessa característica pode tornar a biorremediação economicamente inviável.

#### 3.4.1.4 Oxigênio

Os compostos orgânicos são metabolizados por fermentação, respiração ou co-metabolismo conforme CETESB (2004). Portanto, o processo de biorremediação pode ser aeróbico ou anaeróbico, requerendo oxigênio ou hidrogênio, respectivamente. Na maioria dos locais, a subsuperfície é carente dessas espécies (oxigênio ou hidrogênio), o que impede os microrganismos de se reproduzirem e degradarem completamente o contaminante alvo.

De acordo com Mesquita (2004) quando o meio é solo, o oxigênio está presente nos vazios dos poros. O solo pode vir a ficar deficiente de oxigênio, ou anóxico, devido às dificuldades de difusão do O<sub>2</sub>, quando os poros são preenchidos por água, ou se o mesmo sofrer algum tipo de compactação, sendo necessário em geral um mínimo de 10% de ar na matriz do solo, para manter a atividade aeróbia.

“Geralmente, sob condições aeróbicas, a biorremediação ocorre mais facilmente. Regiões próximas à superfície do solo têm demonstrado maior taxa de biodegradação, enquanto que em regiões mais profundas verifica-se que estas taxas diminuem” (PEREIRA JUNIOR; GOMES; SORIANO, 2009, p. 58). Essa vantagem dos microrganismos aeróbicos em relação aos anaeróbicos na biodegradação dos contaminantes, pode ser explicado por Tortora, Funke e Case (2012) ao citar que os microrganismos que utilizam o oxigênio molecular (aeróbicos) produzem mais energia a partir dos nutrientes que os microrganismos que não utilizam o oxigênio (anaeróbicos). Mesquita (2004) cita que o oxigênio é o aceptor de elétrons preferido, quando presente, mas quando o oxigênio livre se torna limitante, os microrganismos passam a usar o oxigênio proveniente do nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e depois continuam a usar outras formas de oxigênio que estejam presentes na região (SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>).

Segundo Andrade, Augusto e Jardim (2010) explicam que a “biorremediação aeróbica”, requer um meio oxidante. O oxigênio atua como receptor de elétrons e os contaminantes são utilizados pelos microrganismos como fontes de carbono (doador de elétrons), necessárias para manter as suas funções metabólicas, incluindo o crescimento e a reprodução.

O controle dos níveis de oxigênio pode ser conseguida, conforme Mesquita (2004) evitando a saturação com água ou podem ser usadas técnicas de injeção de ar ou peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). O uso de peróxido é limitado, porque em concentrações acima de 100 ppm ele se torna tóxico aos microrganismos. Outro problema é que o peróxido tende a se decompor rapidamente na presença de alguns componentes do solo. O crescimento das raízes das plantas também favorece a aeração do solo.

#### 3.4.1.5 Nutrientes

Além da água, um dos fatores mais importantes para o crescimento microbiano são os nutrientes, em especial o carbono, “necessário para todos os compostos orgânicos que constituem uma célula viva. Metade do peso seco de uma célula bacteriana típica é composta de carbono” (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012, p. 160).

De acordo com (THOMAS, 2001, p. 5) “a alta porcentagem de carbono e hidrogênio existente no petróleo mostra que os seus principais constituintes são os hidrocarbonetos. Os outros constituintes aparecem sob forma de composto orgânicos que contem outros elementos, sendo os mais comuns nitrogênio, o enxofre e o oxigênio”. Assim “o petróleo pode ser utilizado por diversos microrganismos como fonte de carbono e energia. Uma grande quantidade de substratos e metabólitos presentes em solos impactados por hidrocarbonetos fornece condições para o desenvolvimento de uma complexa comunidade microbiana” (TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2011, p. 79), facilitando a degradação desses compostos no meio ambiente, conforme Lima (2010).

Conforme Pedrozo (2002) há pelo menos onze macro e micronutrientes essenciais que devem estar presentes no solo em quantidades, formas e relações adequadas para manter o crescimento microbiano. São eles: nitrogênio, fósforo, potássio, sódio, enxofre, cálcio, magnésio, ferro, manganês, zinco e cobre. Assim quando há o aumento do suprimento do carbono há também a necessidade de incremento destas fontes de nutrientes. Dependendo da fertilidade do solo, estes já estão em quantidades adequadas para suprir essa demanda, entretanto “quando o meio não fornece macro e micronutrientes necessários para o metabolismo celular dos microrganismos degradadores, é necessária a adição controlada destes ao sistema” (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005, p. 39).

Pedrozo (2002) e Millioli (2009) afirmam que depois da fonte de carbono, o nitrogênio (N) e o fósforo (P) são os elementos essenciais ao crescimento celular, por isso, na maioria das vezes, a velocidade de degradação de alguns hidrocarbonetos é influenciada positivamente pela incorporação de N e P em solos que não os contêm em quantidades adequadas para a atividade microbiana. “O nitrogênio constitui cerca de 14% do peso seco da célula bacteriana, e o enxofre e o fosforo juntos constituem cerca de 4%” (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012, p. 160). De acordo com Mariano (2006) e Lima (2010), os macronutrientes servem para sintetizar componentes celulares, como o nitrogênio para aminoácidos e enzimas, o fósforo para o ATP e o DNA e os micronutrientes para atividades enzimáticas, o enxofre para algumas proteínas e coenzimas, o cálcio para estabilizar a parede celular e magnésio para estabilizar os ribossomos. Lima (2010) ainda cita que o ferro é outro fator limitante a taxa de biodegradação, essencial aos microrganismo por ser requerido em diversas funções celulares.

Pedrozo (2002) relata que o ajuste na quantidade de nutrientes ou no balanço C/N/P pode ser facilmente efetuado pela adição de fertilizantes, porem Jacques et al. (2007) relata que a grande maioria dos pesquisadores recomenda que a adição de nutrientes deve ser realizada somente após criteriosa avaliação, de forma a evitarem-se adições desnecessárias, que resultam

em aumentos dos custos e em prejuízos ao processo de biorremediação. Além de custos e prejuízos Bisognin (2012) *apud* USEPA (1994) cita que o excesso de nutrientes pode reprimir o metabolismo microbiano, devendo se estabelecer uma faixa ótima afim de evitar esse problema.

### 3.5 RESPIROMETRIA

A aplicação da biorremediação em campo precisa de acompanhamento e monitoramento, pois é necessário avaliar se o emprego da técnica está sendo efetiva e qual o grau de eficiência, assim os técnicos terão informações uteis ao planejamento das áreas em processo de recuperação. Para o acompanhamento da biodegradação de poluentes orgânicos, como por exemplo o petróleo, tem-se a respirometria, técnica que se baseia no quantitativo consumido de oxigênio e produzido de CO<sub>2</sub>, que fornece uma resposta indireta a respeito da atividade microbiológica no meio avaliado. De acordo com Costa (2009) a respirometria é uma técnica de acompanhamento do processo de biodegradação que se baseia no conceito de que, em um sistema aeróbio, quanto maior a quantidade de CO<sub>2</sub> produzido e de oxigênio consumido, maior a facilidade, dos microrganismo, em degradar a matéria orgânica presente no resíduo e assim, maior o potencial de utilização do processo de biorremediação para recuperação de áreas contaminadas pelo resíduo analisado.

O ensaio de respirometria é utilizado para avaliar a atividade microbiológica de um solo, através da medida do CO<sub>2</sub> gerado no processo de degradação da matéria orgânica. Baseia-se no princípio de que há uma correlação direta entre a geração de CO<sub>2</sub> e a degradação da matéria orgânica num solo, pela adição dos microrganismos presentes. Quando, num determinado solo, é adicionada uma certa quantidade de matéria orgânica, há um crescimento da massa biológica e, conseqüentemente, aumenta a geração de CO<sub>2</sub>, como resultado da atividade desses microrganismos. A medida que a quantidade de matéria orgânica vai diminuindo, o número de microrganismos também diminui, e a geração de CO<sub>2</sub> sofre um decréscimo (NUVOLARI, 1996, p. 24).

A respirometria busca assim quantificar a respiração dos microrganismos no meio analisado, assim quanto maior for a atividade microbiológica maior será a os níveis de respiração dos microrganismos. Mariani (2005) define a respiração como sendo um processo de obtenção de energia, através do qual os compostos orgânicos naturais e sintéticos servem como doadores de elétrons. Dessa forma, define-se a respiração microbiana como consumo de oxigênio e/ou liberação de dióxido de carbono por bactérias, fungos, algas e protozoários, incluindo as trocas gasosas, resultantes do metabolismo aeróbio e anaeróbio. E ainda acrescenta que os testes respirométricos podem ser realizados em meio líquido ou em meio sólido (solo, composto).

Segundo Ferreira (2002) os ensaios para obtenção dos dados na respirometria são realizados sob condições controladas em aparatos denominados respirômetros. O respirômetro consiste, basicamente, de um reator (câmara de respiração) e de um equipamento capaz de medir a variação de oxigênio no sistema. No reator, são colocados em contato substrato, biomassa e oxigênio dissolvido, entre outros componentes para controle das reações no sistema.

Existem várias metodologias de quantificação da variação do oxigênio e dióxido de carbono produzido dentro do respirômetro, como a respirometria manométrica que se baseia na medida da mudança da pressão parcial dos gases em frascos fechados com material sofrendo biodegradação. Enquanto o oxigênio é consumido, o dióxido de carbono produzido é precipitado em uma solução alcalina, o que faz com que a pressão parcial no frasco diminua. É a respirometria eletrolítica que monitora o decréscimo da pressão parcial em frascos fechados e hidrolisa eletricamente a água a hidrogênio e oxigênio para suprir os frascos com oxigênio, possibilitando a medida da quantidade de oxigênio produzida, ambas citadas por Costa (2009).

Mariani (2005) destaca os respirômetros de Bartha e Pramer, que tem sido largamente utilizados para avaliação de degradação de poluentes por microrganismo no solo. A medição da liberação de  $\text{CO}_2$  é realizada por meio da captura do  $\text{CO}_2$  por substâncias alcalinas (normalmente hidróxido de potássio –  $\text{KOH}$  ou hidróxido de sódio –  $\text{NaOH}$ ) e posterior precipitação na forma de carbonato de Bário –  $\text{BaCO}_3$  pela adição de solução saturada de Cloreto de Bário –  $\text{BaCl}_2$ . A soda excedente é, então, titulada com Ácido Clorídrico –  $\text{HCl}$ , permitindo o cálculo da produção de gás carbônico.

Pedroti (2007) ressalta que o método respirométrico de Bartha é um método adaptado de uma norma holandesa, simples e economicamente viável para determinar a atividade microbiológica pela geração de gás carbônico e, indiretamente, a biodegradação de contaminantes orgânicos no solo. Muito utilizado para avaliação de condições de manejo de sistemas de tratamento de resíduos no solo, foi normatizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), através da NBR 14.283. Nuvolari (1996) cita que o mesmo ainda é capaz de estimar o tempo para a estabilização de um resíduo orgânico, quando este é lançado no solo, as taxas de aplicação mais convenientes, e ainda detectar uma possível toxicidade dos elementos presentes no resíduo, quando estes afetam os microrganismos do solo.

Uma desvantagem do método apontada por Costa (2009) é a impossibilidade de prever qual o contaminante está sendo metabolizado em um determinado momento quando da avaliação de uma mistura de contaminantes ou mesmo de contaminantes com composição complexa como o petróleo, pois nesse tipo de determinação é dosado apenas o gás carbônico como produto final do processo de mineralização, mas existem condições biológicas em que o

contaminante é biodegradado porém não se chega ao estágio final de mineralização, assim outros métodos são apontados como mais eficientes no acompanhamento dos processos de biorremediação, como por exemplo a determinação de hidrocarbonetos totais presentes nas amostras.

Vários autores utilizaram a respirometria como metodologia para acompanhamento do processo de biorremediação, dentre eles Seabra (2005), Morais (2005), Mariano (2006), Dias (2007), Meneghetti (2007), Pedroti (2007), Oliveira (2008), Costa (2009), Millioli (2009) e Costa (2015).

### 3.6 METODOLOGIA DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Segundo Myers e Montgomery (2009) a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) é uma coleção de técnicas estatística e matemática úteis para o desenvolvimento, melhoria e otimização de processos, com importante aplicação na concepção, desenvolvimento e formulação de novos produtos, como também na melhoria de modelos de produtos existentes. Largamente utilizado no mundo industrial, em especial nas situações em que várias variáveis de entrada influenciam potencialmente alguma medida de desempenho ou característica de qualidade do produto ou do processo, chamada de resposta.

A metodologia da superfície de resposta e o método fatorial vem sendo utilizado em vários trabalhos relacionados a biorremediação, segundo Sharma et al. (2009) a Metodologia da Superfície de Resposta (MSR) é amplamente utilizada com eficiência em análises estatística, para comparar e otimizar interação entre diferentes fatores ou tecnologias de tratamento em processos de biorremediação.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETA DA AMOSTRA DE SOLO

O solo utilizado no experimento foi um Vertissolo, coletado na margem esquerda da Rodovia Federal Brasileira (BR-304) sentido Mossoró-Natal, nas proximidades do Rio Angicos (Figura 3), localizado no município de Mossoró/RN, interior do estado do Rio Grande do Norte, região Nordeste do Brasil, na coordenada geográfica 5°16'21,59" Sul e 37°17'50,15" Oeste (Figura 4).

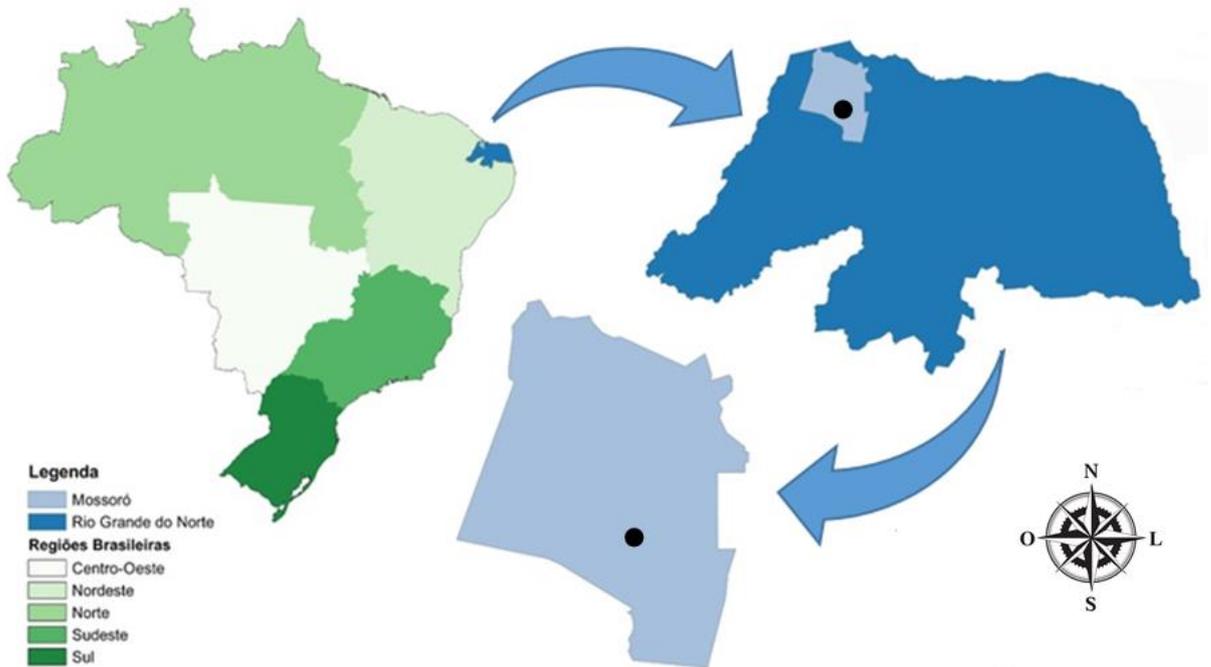
Segundo Rio Grande do Norte (2012) o referido município pertence a mesorregião do Oeste Potiguar e a microrregião de Mossoró, possui área de 2.099,3 km<sup>2</sup>, e conforme Mossoró (2015) se limita ao norte com o estado do Ceara e o município de Grossos, ao sul com os municípios de Governador Dix Sept Rosado e Upanema, ao leste com Areia Branca e Serra do Mel e a oeste com o município de Baraúna.

**Figura 3** - Local de coleta do solo.



Fonte: Autor, 2016.

**Figura 4** - Localização do ponto de coleta do solo em relação ao município de Mossoró, estado do Rio Grande do Norte.



Fonte: Autor, 2016.

O solo foi coletado (Figura 5) no mês de janeiro de 2016. Realizou-se limpeza da superfície para retirada de folhas, vegetação rasteira ou pedras e retirou-se uma amostra simples e deformada com aproximadamente 15 kg, na camada entre 0 e 15 cm com auxílio de uma pá. A amostra foi acondicionada em sacos plásticos, devidamente lacrado e identificados, transportado a temperatura ambiente para o Laboratório de Hidrogeoquímica Ambiental da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

**Figura 5** - Coleta do solo.



Fonte: Autor, 2016.

#### 4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DO SOLO

O solo coletado foi disposto sobre uma bancada previamente limpa, forrada com papel, em uma sala isolada e a temperatura ambiente para secar ao ar, como mostra a Figura 6, posteriormente o solo foi destorroado e peneirado em peneira com malha de 2 mm de abertura, para remoção de restos vegetais e partes indesejáveis de maior granulometria, obtendo-se Terra Fina Seca ao Ar (TFSA).

**Figura 6** - Solo secando ao ar.



Fonte: Autor, 2016.

Em seguida foi retirada uma amostra de aproximadamente 1,0 kg para caracterização física e química do solo obedecendo a metodologia recomendado pelo Manual de Métodos de Análise de Solo da EMBRAPA (2011). A caracterização física (Tabela 5) limitou-se a uma análise granulométrica para determinação das frações de argila, silte, areia e densidade. Para a caracterização química (Tabela 6) analisou-se o pH, CE (condutividade elétrica), matéria orgânica, Fósforo (P), Carbono (C), Cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), Magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), Sódio ( $\text{Na}^+$ ), Potássio ( $\text{K}^+$ ), Alumínio + Hidrogênio (Al + H), Alumínio ( $\text{Al}^{3+}$ ) e micronutrientes Cobre (Cu), Ferro (Fe), Manganês (Mn) e Zinco (Zn).

**Tabela 5** - Características físicas do solo utilizado no experimento.

Frações granulométricas					Densidade
(kg kg <sup>-1</sup> )					(kg dm <sup>-3</sup> )
Areia grossa	Areia fina	Areia total	Silte	Argila	Real
0,17	0,12	0,29	0,35	0,35	2,50

Fonte: Autor, 2016.

A partir das frações granulométricas (Tabela 5), o solo se enquadra na classificação textural como sendo solo Franco Argiloso utilizando o triangulo de FERET.

**Tabela 6** - Características químicas do solo utilizado no experimento.

Característica	Resultado	Unidade
pH	7,00	Adimensional
CE	0,46	ds m <sup>-1</sup>
Matéria orgânica	12,31	g kg <sup>-1</sup>
P	4,6	mg dm <sup>-3</sup>
K <sup>+</sup>	252,0	mg dm <sup>-3</sup>
Na <sup>+</sup>	67,9	mg dm <sup>-3</sup>
Ca <sup>2+</sup>	38,30	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>
Mg <sup>2+</sup>	7,30	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>
Al <sup>3+</sup>	0,00	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>
(H+Al)	0,00	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>
SB	46,54	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>
t	46,54	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>

CTC	46,54	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>
V	100	%
m	0	%
PST	1	%
Cu	0,18	mg dm <sup>-3</sup>
Fe	3,7	mg dm <sup>-3</sup>
Mn	27,7	mg dm <sup>-3</sup>
Zn	1,65	mg dm <sup>-3</sup>

Fonte: Autor, 2016

#### 4.3 EXPERIMENTO DE BIOESTIMULAÇÃO DO SOLO CONTAMINADO

Para montagem do experimento, foram pesadas 5 amostras de 2,0 kg de solo, separados em sacos plásticos (Figura 7) em seguida contaminados com petróleo e revolvido manualmente dentro de um saco plástico até completa homogeneização, nas proporções com base em massa de 0, 1, 3, 5 e 10 % (Figura 8). Após homogeneização retirou-se 5 alíquotas de 100 g de cada amostra, as quais receberam dosagem respectiva de fertilizante NPK nas proporções equivalentes a 0, 250, 500, 1.250 e 2.500 kg ha<sup>-1</sup> diluídas em soluções de 10 ml. As doses escolhidas para o fertilizante foram baseadas na dose recomenda por Quideau et al. (2012), que seria de 250 kg ha<sup>-1</sup> de NPK na proporção de 10:30:20 (NPK).

O petróleo utilizado para contaminação das amostras é proveniente do Campo de Canto do Amaro, conforme Brasil (2009) situado nos municípios de Mossoró e Areia Branca, localizado a 260 km de Natal e 20 km da cidade de Mossoró, no Estado do Rio Grande do Norte. O óleo encontrado no principal reservatório, que é da Formação Açu, apresenta °API variando entre 28 e 44°.

**Figura 7.** Amostras de solo pesadas com 2,0 kg cada em sacos plásticos para contaminação com petróleo nas respectivas porcentagens de 0, 1, 3, 5 e 10 %.



Fonte: Autor, 2016.

**Figura 8.** Contaminação das amostras de solo com petróleo em saco plástico para homogeneização.



Fonte: Autor, 2016.

Após contaminadas com petróleo e adicionada as respectivas doses de fertilizante, as porções de 100 g foram uma a uma acondicionadas em recipientes de vidro e sobre eles colocou-se um copo de polietileno contendo 20 ml de NaOH 0,5 M para capturar o CO<sub>2</sub> produzido pelo processo de biorremediação. Imediatamente após colocar o NaOH os recipientes foram lacrados com filme de Policloreto de Vinila (PVC) e hermeticamente fechados com tampa (Figura 9).

**Figura 9.** Frascos de vidro lacrados com filme PVC, hermeticamente fechados com tampa (respirômetros de Bartha adaptados).

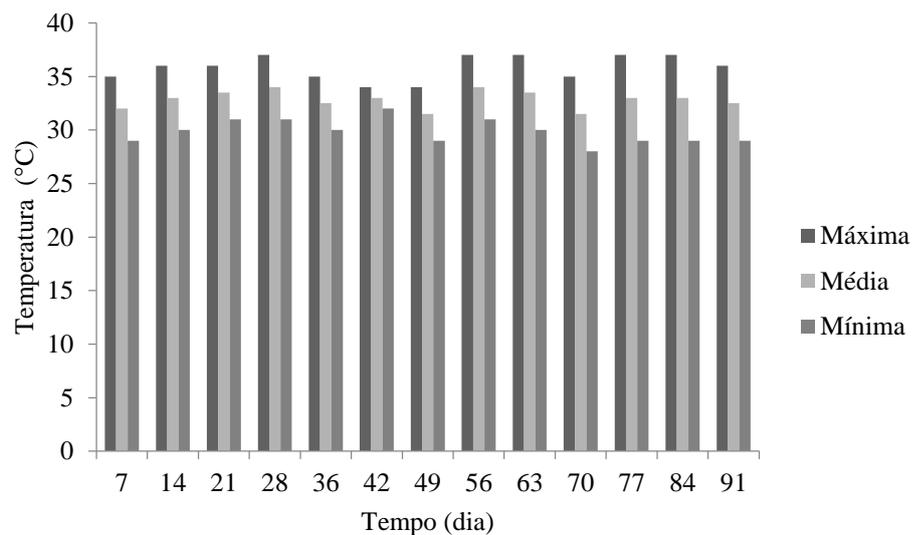


Fonte: Autor, 2016.

O fertilizante utilizado nas amostras foi preparado em laboratório a partir de solução concentrada, tendo a Ureia, Monofosfato de Amônio (MAP) e Cloreto de Potássio como fonte de Nitrogênio, Fosforo e Potássio nas porcentagens 10:30:20 de N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O, respectivamente.

O experimento foi conduzido em bancada, sob temperatura ambiente, registrado com termohigrometro, a qual variou entre 26 e 37 °C, entre os meses de março a maio de 2016, conforme mostra o Gráfico 1.

**Gráfico 1.** Temperaturas registradas durante a execução do experimento.



O delineamento adotado foi blocos casualizados, em esquema fatorial 5 x 5, sendo 5 doses de petróleo e 5 doses de NPK com 3 repetições, totalizando 75 parcelas experimentais (Tabela 7).

**Tabela 7** – Esquema fatorial do experimento, 25 tratamentos em diferentes combinações de doses de petróleo e NPK.

Doses de NPK	Doses de Petróleo				
	0 %	1 %	3 %	5 %	10 %
0 (0 kg.ha <sup>-1</sup> )	0 / 0	0 / 1	0 / 3	0 / 5	0 / 10
1 (250 kg.ha <sup>-1</sup> )	1 / 0	1 / 1	1 / 3	1 / 5	1 / 10
2 (500 kg.ha <sup>-1</sup> )	2 / 0	2 / 1	2 / 3	2 / 5	2 / 10
5 (1.250 kg.ha <sup>-1</sup> )	5 / 0	5 / 1	5 / 3	5 / 5	5 / 10
10 (2.500 kg.ha <sup>-1</sup> )	10 / 0	10 / 1	10 / 3	10 / 5	10 / 10

Fonte: Autor.

#### 4.3.1 Produção de C-CO<sub>2</sub>

As avaliações foram realizadas semanalmente, abrindo-se os recipientes isoladamente, para retirada da solução de NaOH 0,5 M, em seguida era adicionado 1 ml de BaCl<sub>2</sub> 1 M para ser titulado com HCl 0,5 M padronizado, utilizando fenolftaleína como indicador (Figura 10). Após retirada da solução de NaOH, adicionava-se volume de água destilada para correção da umidade e o solo era revolvido mecanicamente com bastão de vidro limpo para aerar as amostras, e uma nova solução de 20 ml de NaOH era disposta dentro do recipiente para em seguida ser novamente lacrado com filme de PVC e fechado com tampa até a próxima análise.

**Figura 10.** Titulação da solução de NaOH contendo o CO<sub>2</sub> produzido nos respirômetros, titulados com HCl, utilizando fenolftaleína como indicador.



Fonte: Autor, 2016.

A produção de CO<sub>2</sub> é uma medição indireta da degradação do hidrocarboneto pela microbiota existente no solo em estudo, técnica conhecida como respirometria, expressa em mg kg<sup>-1</sup> de solo seco e quantificada através da fórmula de Stotzky (1965):

$$CCO_2(mgkg^{-1}solo) = (B - T).eq. M. 10 \quad \dots(1)$$

onde, B é o volume (em ml) da solução de HCl gasto para titular a prova em branco (frasco respirométrico sem solo); T é o volume (em ml) da solução de HCl 1 M gasto para titular os tratamentos; eq é o equivalente-grama do C, que é 6; M é a molaridade da solução padronizada de HCl 1 M e 10 é o fator de conversão para quilograma de solo.

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir dos dados do experimento confeccionou-se uma superfície de resposta para obtenção de modelo matemático que descreva a máxima produção de C-CO<sub>2</sub> (variável resposta ou variável dependente) em função da dose de petróleo e de NPK (variáveis independentes).

Conhecendo-se o comportamento quadrático das variáveis independentes em relação a variável resposta utilizou-se um modelo de segunda ordem, descrito abaixo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1.X + \beta_2.X^2 + \beta_3.Z + \beta_4.Z^2 + \beta_5.X.Z \quad \dots(2)$$

onde, o Y corresponde a quantidade de CO<sub>2</sub> produzido, o X é a dose de petróleo e o Z a dose de fertilizante NPK, resultando em:

$$CO_2 = \beta_0 + \beta_1.P + \beta_2.P^2 + \beta_3.NPK + \beta_4.NPK^2 + \beta_5.P.NPK \quad \dots(3)$$

A tabulação dos dados e geração da superfície de resposta foi realizado com auxílio de planilha eletrônica e do *software Statistica 9.1*.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Observou-se que a faixa de temperatura registrada é compatível com a faixa considerada ideal na literatura conforme Leahy e Colwell (1990) e Millioli (2009) não chegando aos 40 °C, valor tido como início da faixa inibitória. Relacionando o Gráfico 1 de temperaturas com os gráficos de produção de CO<sub>2</sub> nas amostras não é possível verificar interferência direta com os resultados obtidos, apesar da temperatura influenciar na atividade microbiana, este pode ser explicado pelo fato das temperaturas registradas estarem dentro de uma faixa favorável e estável durante a fase de experimento, sem grandes variações entre as leituras.

O solo dentro do frasco pode ter alcançado temperaturas superiores às registradas, em virtude do efeito estufa no seu interior e uma maior absorção da radiação em virtude da coloração escura do solo em comparação a solos com coloração clara. Como foi observado a temperatura não foi um fator limitante e essa condição pode ter tido também efeito benéfico a atividade microbiana garantindo uma temperatura favorável ao longo das noites, horários onde foram registradas temperaturas mais amenas.

Não foi necessário fazer correção de pH do solo, pois a análise apontou valor 7,0, estando dentro da faixa ótima conforme Pereira Junior, Gomes e Soriano (2009), Millioli (2009) e Nascimento (2013) que citam que o valor ótimo é 7,0, entretanto estando entre 6,0 e 8,0 encontra-se em faixa favorável para a maioria dos microrganismos envolvidos no processo de biorremediação.

Observou-se dificuldade de promover o revolvimento do solo durante o experimento, pois o mesmo aderiu com facilidade ao bastão de vidro utilizado, formando grandes torrões, dificultando a aeração, característica associada ao tipo de solo, com alto teor de argila, como pode ser visto nas Tabelas 5 e 6.

Analisando os resultados foi observado no Gráfico 2 que a produção de CO<sub>2</sub> nos tratamentos com 0 % de óleo e níveis crescente de NPK 10:30:20, comportamento similar entre os tratamentos no 7º dia, variando 167,44 mg kg<sup>-1</sup> no tratamento T01 a 178,88 mg kg<sup>-1</sup> no T010. Entre os 14º e 36º dia a produção de CO<sub>2</sub> diminuiu em relação ao 7º dia, variando na faixa de 80,08 a 119,60 mg kg<sup>-1</sup>. No 42º e 49º dias a produção de CO<sub>2</sub> diminuiu novamente ficando entre 67,60 a 89,44 mg kg<sup>-1</sup>. Nos dias posteriores houve uma tendência de aumento e estabilização da produção de CO<sub>2</sub>.

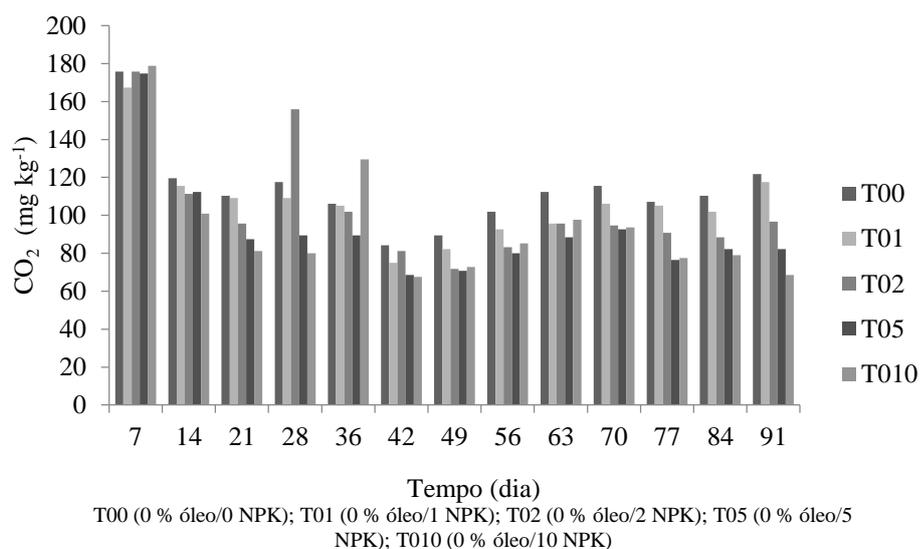
Apesar dos tratamentos T05 e T010 receberem maior carga de fertilizante apresentaram uma menor produção de CO<sub>2</sub> em relação aos demais tratamentos, com exceção do 7º e 36º dia, o que indica um possível efeito inibidor do excesso de fertilizante em virtude do aumento da

quantidade de sais no solo, que ocasiona aumento do potencial osmótico dificultando o acesso a microbiota a água disponível demandando maior energia das bactérias para metabolizar a matéria orgânica. Mariano (2006) cita que o nitrogênio quando adicionado na forma de sais de amônia pode ser tóxico aos microrganismos devido a possibilidade de geração de amônia, podendo ser letal em altas concentrações.

Millioli (2009) avaliou 7 diferentes relações nutricionais monitorando por remoção de óleos e graxas, e os resultados demonstraram que a adição do nitrogênio ao solo foi fundamental para que houvesse maior biodegradação, entretanto adições de maiores concentrações tiveram efeito contrário, reiterando a toxicidade devido a amônia, assim como aumento do pH. Silva (2004) observou fenômeno semelhante quando observou que a biodegradação do óleo diesel aumenta com a diminuição da concentração de Nitrogênio.

Jacques et al. (2010) verificaram que com aumento da dose de nitrogênio, houve tendência de redução da mineralização do antraceno no solo, pois as maiores produções de C-CO<sub>2</sub> foram quantificadas nos tratamentos contendo entre 0 e 50 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio e quando houve adição de 100 ou 200 kg ha<sup>-1</sup> a produção reduziu em 11 e 26 % respectivamente. Seklemova et al. (2001) e Yerushalmi et al. (2003) respectivamente não obtiveram efeito na descontaminação de solos poluídos com óleo diesel e não aumentaram a remoção de hidrocarbonetos de petróleo do solo com a adição de fertilizantes inorgânicos.

**Gráfico 2.** Produção absoluta de CO<sub>2</sub> em relação aos dias do experimento com 0 % de óleo e doses crescentes de NPK.

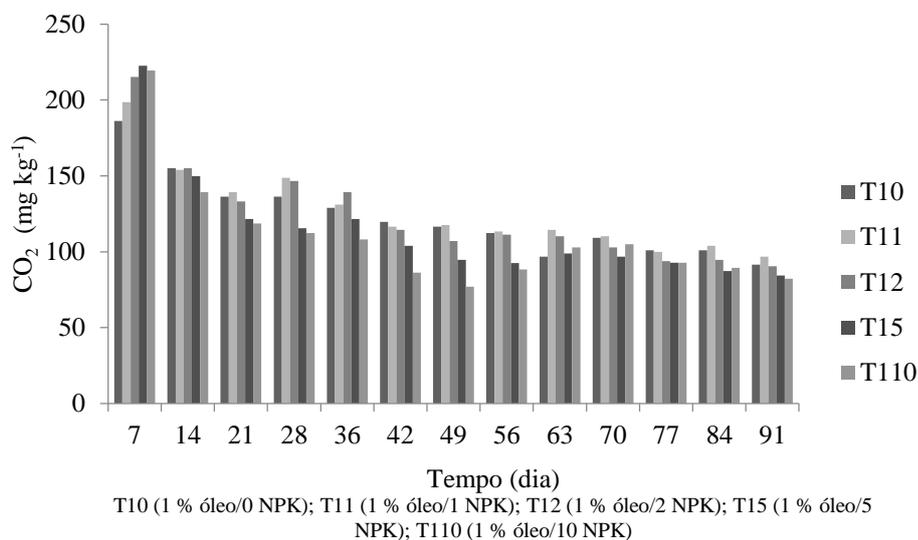


O Gráfico 3 é similar ao anterior mostrando as medições ao longo do experimento com 1 % de óleo nos tratamentos e níveis crescentes de NPK. Observou-se uma maior produção de

CO<sub>2</sub> em relação aos tratamentos com 0 % de petróleo, essa diferença se dá em virtude do acréscimo de matéria orgânica proveniente do contaminante, comportamento que se repete nos tratamentos com 3, 5 e 10 % de óleo em valores médios, pois em valores absolutos alguns tratamentos apresentam redução. Observou-se maior produção de CO<sub>2</sub> nos tratamentos no 7º dia variando de 186,16 a 222,56 mg kg<sup>-1</sup> e uma tendência decrescente nos dias subsequentes, finalizando no 91º dia na faixa de 82,16 a 96,72 mg kg<sup>-1</sup>. Com exceção do 7º dia a produção dos tratamentos T15 e T110 apresentaram menor produção de CO<sub>2</sub> em relação aos demais, comportamento similar aos tratamentos T05 e T010.

Morais (2005) observou comportamento semelhante, com maior produção nos primeiros 14 dias de incubação nos respirômetros adicionados de inoculo mais fertilizante, atribuindo o fenômeno a contribuição da adição do fertilizante ao aumento da atividade microbiana nesse período, entretanto após duas semanas de experimento a emissão de CO<sub>2</sub> no sistema que recebeu o fertilizante não era maior do que as emissões de outros sistemas. Seabra (2005) medindo consumo de oxigênio ao invés de produção de gás carbônico, verificou comportamento semelhante quando da adição de fosforo e potássio em solo contaminado com 3 e 10 % de óleo, havendo incremento no consumo de oxigênio.

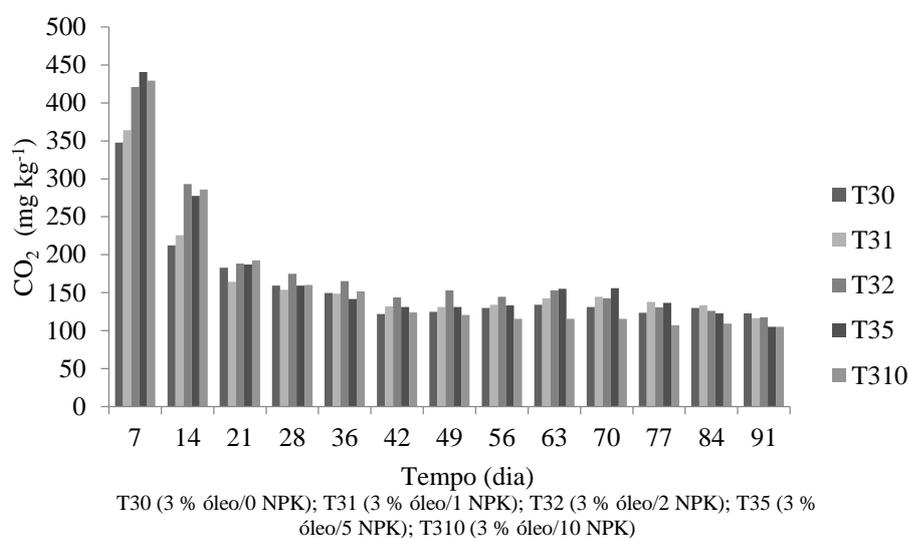
**Gráfico 3.** Produção absoluta de CO<sub>2</sub> em relação aos dias do experimento com 1 % de óleo e doses crescentes de NPK.



Observou-se no Gráfico 4 referente aos tratamentos que usaram 3 % de óleo, maior produção na primeira medição, no 7º dia, entre 347,88 e 440,96 mg kg<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub>, tendência decrescente até 63º e 70º dia, onde houve um pequeno aumento na produção e em seguida estabilização na faixa de 105,04 a 137,70 mg kg<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> entre os 77º e 91º dia. O aumento de

CO<sub>2</sub> ocorrido entre o 63° e 70° pode estar relacionado com a adaptação da microbiota. Diferente dos tratamentos com 0 e 1 % de óleo, não observou-se tendência de menor produção para os tratamentos com maiores níveis de NPK (T35 e T310). Estes apresentaram produção similar com exceção entre o 7° e 21° dia onde foram pouco superior aos demais e entre os 42° e 91° dia onde apenas o tratamento T310 foi inferior estabilizando sua produção entre 105,04 e 123,76 mg kg<sup>-1</sup>.

**Gráfico 4.** Produção absoluta de CO<sub>2</sub> em relação aos dias do experimento com 3 % de óleo e doses crescentes de NPK.

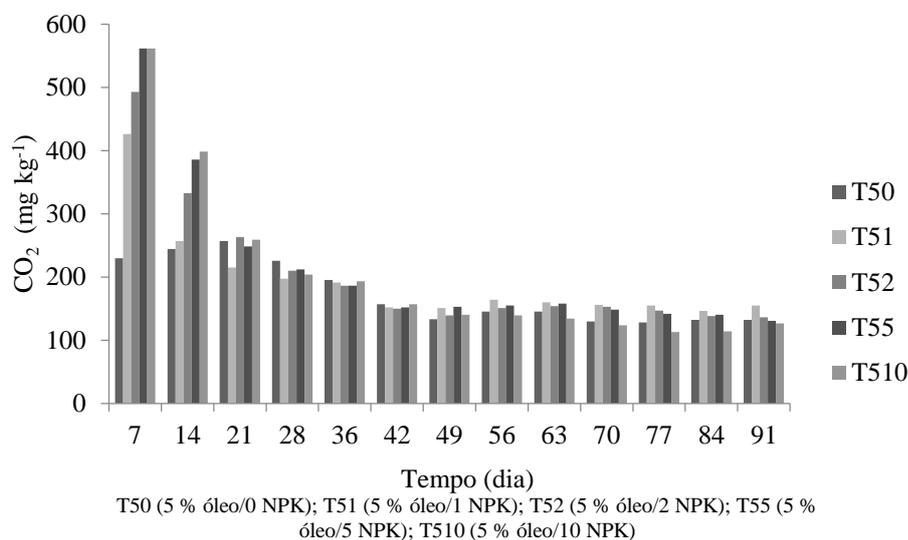


Observou-se que a tendência de redução da produção de CO<sub>2</sub> nos tratamentos com maiores níveis de NPK reverteu-se nos tratamentos com maior quantidade de óleo, mostrados no Gráfico 5 e 6, com 5 e 10 % de óleo respectivamente. Os gráficos mostraram que os tratamentos T55 e T510 foram superiores nos 7° e 14° dia e os tratamentos T105 e T1010 superiores aos demais até o 56° dia, estabilizando nos dias subsequentes. Essa alteração no padrão de produção de CO<sub>2</sub> mostrou que nos tratamentos com níveis mais acentuados de contaminação com óleo obteve-se também uma maior tolerância ao aumento na aplicação de fertilizante NPK para bioestimulação dos microrganismos.

A produção de CO<sub>2</sub> no tratamento com 5 % de óleo se iniciou na faixa de 426,40 a 561,60 mg kg<sup>-1</sup> exceto para o tratamento T50 que produziu apenas 229,84 mg kg<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub>, com tendência decrescente nos dias subsequentes e leve aumento entre o 56° e 63° dia, em seguida reduzindo e estabilizando entre 113,22 e 155,04 mg kg<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> entre o 77° e 91° dia, como mostrado no Gráfico 5. Essa tendência de aumento na produção entre os 56° e 70° dia ocorrida nos tratamentos com 0, 3 e 5 % de óleo e posterior decréscimo pode ser explicada pela adaptação dos microrganismos a adição de água, nutrientes e temperatura em condições

favoráveis ao aumento da atividade e crescimento quantitativo dos microrganismos do solo, por consequência maior respiração e produção de CO<sub>2</sub>.

**Gráfico 5.** Produção absoluta de CO<sub>2</sub> em relação aos dias do experimento com 5 % de óleo e doses crescentes de NPK.



Observou-se nos Gráficos 5 e 6 uma discrepância entre as produções de CO<sub>2</sub> nas primeiras medições, principalmente nos tratamentos com doses equivalente a 0 e 2.500 kg.ha<sup>-1</sup> de NPK. No 7º dia o tratamento T510 produziu 561,60 mg kg<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> enquanto que o tratamento T50 apenas 229,84 mg kg<sup>-1</sup>, diferença 2,44 vezes maior. O tratamento T1010 apresentou produção de 2,46 e 1,99 vezes maior que o tratamento T100, nos 7º e 14º dia respectivamente. Em ambos os casos a produção de CO<sub>2</sub> entre os tratamentos são similares após o 21º dia para solo contaminado com 5 % de óleo e 28º dia para solo contaminado com 10 % de óleo, evidenciando a importância da aplicação do fertilizante NPK para acelerar o processo de biorremediação de solos contaminados com óleo, principalmente em se tratando de contaminações com níveis superiores a 5 % de óleo com base em massa.

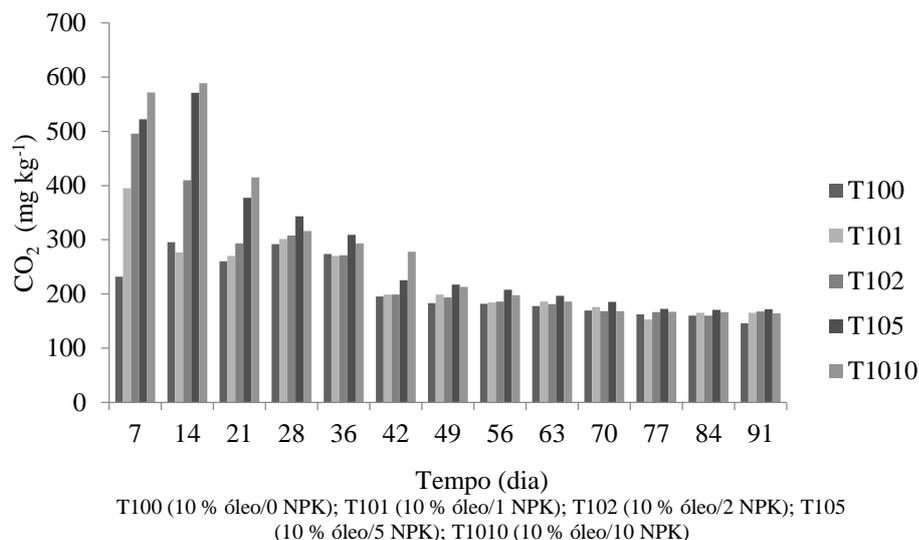
Atlas (1995) em experimento com biorremediação de contaminação de águas marinhas com óleo, verificou que a taxa de biodegradação aumentou de 3 a 5 vezes após a aplicação de fertilizantes. Margesin e Schinner (2001) comparando atenuação natural com a técnica da bioestimulação por fertilizante em solo contaminado por óleo, observaram redução de cerca de 70% no solo bioestimulado em relação ao tratamento com atenuação natural com redução de 50% e relacionaram o fato ao aumento significativo do número de microrganismos, respiração do solo e as atividades das enzimas catalase e lipase. Morais (2005) em estudos preliminares utilizando a produção do CO<sub>2</sub> como indicador do processo de biodegradabilidade no sistema

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

Outros autores também observaram a aceleração da biorremediação de solos poluídos por petróleo com adição de fertilizantes, como Gallego et al. (2001) e Gogoi et al. (2003). Dias (2007) explica que o petróleo, constituído principalmente de hidrocarbonetos, pode servir como a principal fonte de energia para o desenvolvimento de microrganismos facilitando a degradação, mas quando há o aumento do suprimento do carbono surge também a necessidade da suplementação de outras fontes de nutrientes, como o nitrogênio e o fósforo, dessa forma Mariano (2006) também chama atenção para a importância do balanceamento nutricional no processo de biorremediação.

A produção de CO<sub>2</sub> no tratamento com 10 % de óleo apresentado no Gráfico 6 mostra que as maiores produções ocorreram nos tratamentos com maiores níveis de NPK (T102, T105 e T1010) entre os 7º e 14º dia, variando de 409,76 a 588,64 mg kg<sup>-1</sup>, enquanto que os tratamentos com equivalente a 0 e 250 kg ha<sup>-1</sup> de NPK produziram apenas 231,92 a 395,20 mg kg<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> no mesmo período, evidenciando a importância do fertilizante na bioestimulação como fonte de nutrientes para os microrganismos. A produção estabilizou entre os 77º e 91º dia na faixa de produção de CO<sub>2</sub> de 153,00 a 172,38 mg kg<sup>-1</sup>. Observou-se que a produção absoluta acumulada no 91º dia nos tratamentos com 10 % de óleo foram superiores a produção dos demais tratamentos em virtude da maior quantidade de matéria orgânica no solo, sendo o óleo fonte de carbono para os microrganismos.

**Gráfico 6.** Produção absoluta de CO<sub>2</sub> em relação aos dias do experimento com 10 % de óleo e doses crescentes de NPK.



A tendência de redução na produção de CO<sub>2</sub> em todos os tratamentos após o 70º dia evidenciado nos Gráficos 2, 3, 4, 5 e 6 é similar ao descrito por Bisognin (2012), que observou queda na biodegradação depois do 80º dia de experimento, explicando que o fenômeno pode estar associado à baixa capacidade que os microrganismos possuem de atuarem diretamente sobre poluentes adsorvidos no solo, caso dos hidrocarbonetos de elevado peso molecular ou mesmo a formação de subprodutos complexos originados pela ação de grupos específicos de microrganismos sobre os hidrocarbonetos. O referido autor ainda reitera que inicialmente os microrganismos podem ou não buscar os hidrocarbonetos como fonte de alimento, contudo, os hidrocarbonetos são, supostamente, degradados de forma mais rápida do que no processo de degradação natural, devido à elevação da população de microrganismos causada pelo aumento nas concentrações de nutrientes e estabelecimento de condições favoráveis a sua proliferação.

A maior produção de gás carbônico nos primeiros dias do experimento é também observada nos Gráficos 7, 8, 9, 10 e 11. Esse fenômeno também ocorreu na pesquisa de Tauk (1990) e Mariano (2006) e foi justificada pela rápida decomposição inicial da matéria lábil, ou seja, da matéria orgânica mais facilmente assimilável pela microbiota nativa e, posteriormente, num processo mais lento, a decomposição de materiais resistentes.

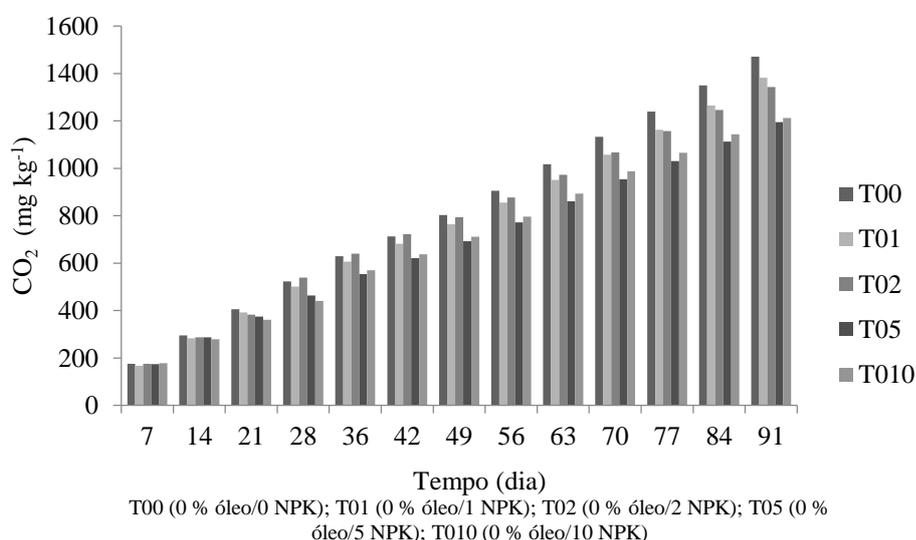
Mariano (2006) avaliou a taxa de produção média de CO<sub>2</sub> durante os primeiros 20 dias e o período subsequente, registrando diminuição de até 45 %, provavelmente ocasionada pela transição de fontes de carbono mais facilmente biodegradáveis (hidrocarbonetos lineares e de cadeias abertas) resultando na diminuição da biodisponibilidade desses compostos e exigindo

uma adaptação metabólica dos microrganismos para consumirem hidrocarbonetos mais recalcitrantes, como os poliaromáticos, resultando no decréscimo da produção de CO<sub>2</sub>.

Colla (2012) testando solo contaminado com mistura de diesel e biodiesel, observou um aumento inicial na liberação de C-CO<sub>2</sub>, estabilizando em torno de sete dias de incubação, também associa o fenômeno a degradação das frações lábeis da mistura. Ghaemghami *et al.* (1998) observou que a taxa de mineralização de solos contaminados com solventes são mais elevadas nas primeiras semanas, o que sugere a existência de microbiota nativa adaptada a biodegradação e também a existência de compostos mais facilmente degradados.

São mostrados nos Gráficos 7, 8, 9, 10 e 11 as produções acumuladas de CO<sub>2</sub> ao longo do experimento para solo com 0, 1, 3, 5 e 10 % de óleo respectivamente e níveis crescentes de NPK. A produção de CO<sub>2</sub> dos tratamentos com 0 % de óleo mostrado no Gráfico 7 finaliza no 91º dia em uma faixa de 1.194,50 a 1.471,58 mg kg<sup>-1</sup> sendo o tratamento T00 (sem óleo e sem NPK) o que mais produziu. O tratamento T00 é um tratamento controle e representa também o comportamento da atenuação natural, sendo o CO<sub>2</sub> produzido proveniente da mineralização da matéria orgânica presente no solo, já que o mesmo não recebeu contaminação por óleo.

**Gráfico 7.** Produção acumulada de CO<sub>2</sub> em relação aos dias do experimento com 0 % de óleo e doses crescentes de NPK.



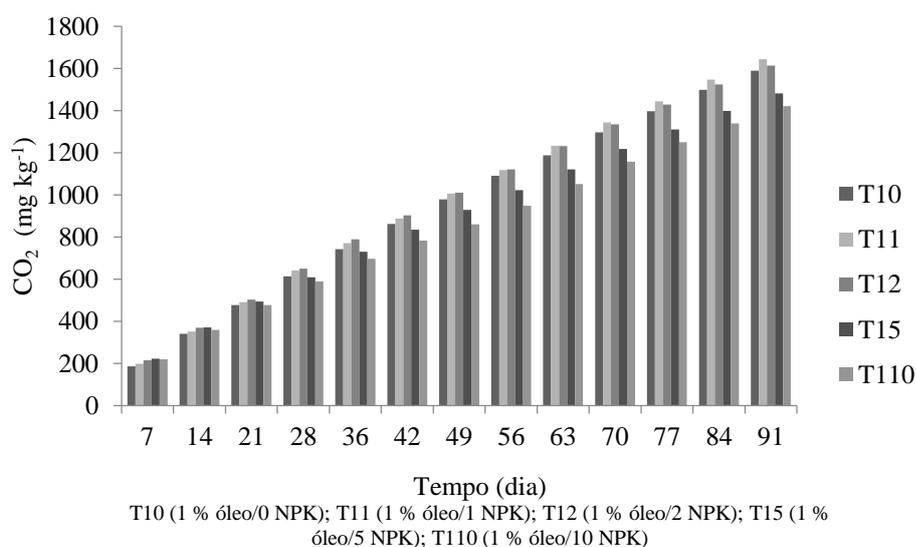
A análise do Gráfico 7 evidencia que o CO<sub>2</sub> produzido não é decorrência apenas da mineralização do contaminante, que o próprio solo possui matéria orgânica em quantidade suficiente e disponível para degradação por parte da microbiota nativa. Oliveira (2008) chama a atenção para esse quesito quando cita que quando se realiza testes com bioestimulação e o monitoramento se dá através de quantificação de gás carbônico produzido deve se atentar para

a origem da produção do gás carbônico, pois geralmente, a população microbiana utiliza como fonte de energia os compostos mais simples e facilmente degradáveis. Isso implica na possibilidade da biodegradação preferencial de outras fontes, que não o contaminante, ou apenas da fonte de nitrogênio adicionada, em detrimento do petróleo. O resultado disso é uma alta taxa de evolução de CO<sub>2</sub> nas amostras sem, contudo, promover a biodegradação do petróleo.

As menores produções absoluta acumulada de CO<sub>2</sub> ocorreram nos tratamentos sem petróleo e com maiores níveis de nutrientes como por exemplo o T05 e T010 como mostra o Gráfico 7. O fenômeno pode ser explicado pela inibição da atividade microbiana em virtude das altas concentrações de nitrogênio como discutido anteriormente e observado nos trabalhos de Silva (2004), Mariano (2006) e Millioli (2009).

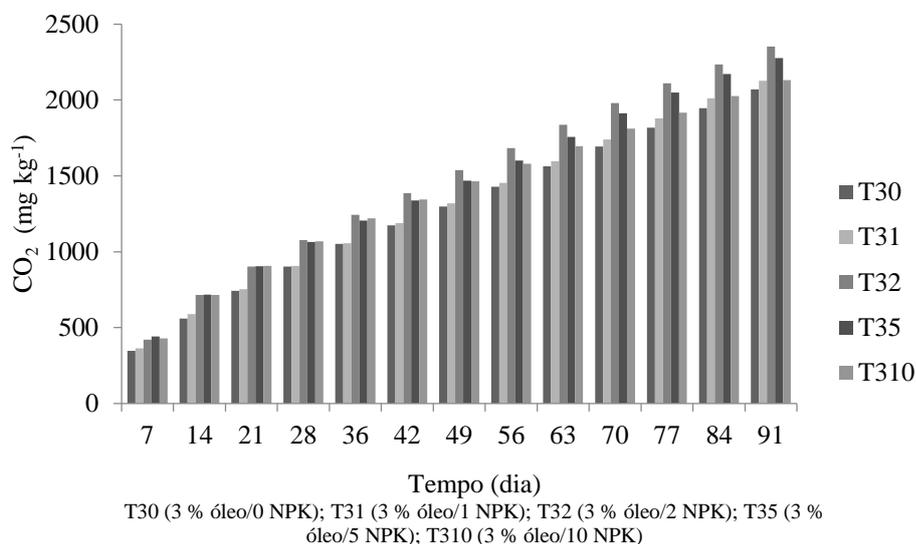
A produção final de CO<sub>2</sub> dos tratamentos com 1 % de óleo mostrada no Gráfico 8 alcançou 1.644,36 mg kg<sup>-1</sup> no tratamento T11, que nesse caso, foi o tratamento com maior produção entre os demais sendo o tratamento T110 o que menos produziu, chegando a 1.421,94 mg kg<sup>-1</sup>, ainda assim obteve resultado superior ao maior dos tratamentos sem óleo, evidenciando que a diferença é proveniente da adição de óleo no solo. Pedroti (2007) utilizando a produção de CO<sub>2</sub> como indicador do processo de biodegradabilidade em solo contaminado com hidrocarboneto também verificou que a adição do hidrocarboneto no solo proporcionou aumento na produção de CO<sub>2</sub>.

**Gráfico 8.** Produção acumulada de CO<sub>2</sub> em relação aos dias do experimento com 1 % de óleo e doses crescentes de NPK.



O Gráfico 9 apresenta a produção acumulada para os tratamentos com 3 % de óleo, chegando 2.353,04 mg kg<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> ao final dos 91 dias no tratamento T35.

**Gráfico 9.** Produção acumulada de CO<sub>2</sub> em relação aos dias do experimento com 3 % de óleo e doses crescentes de NPK.



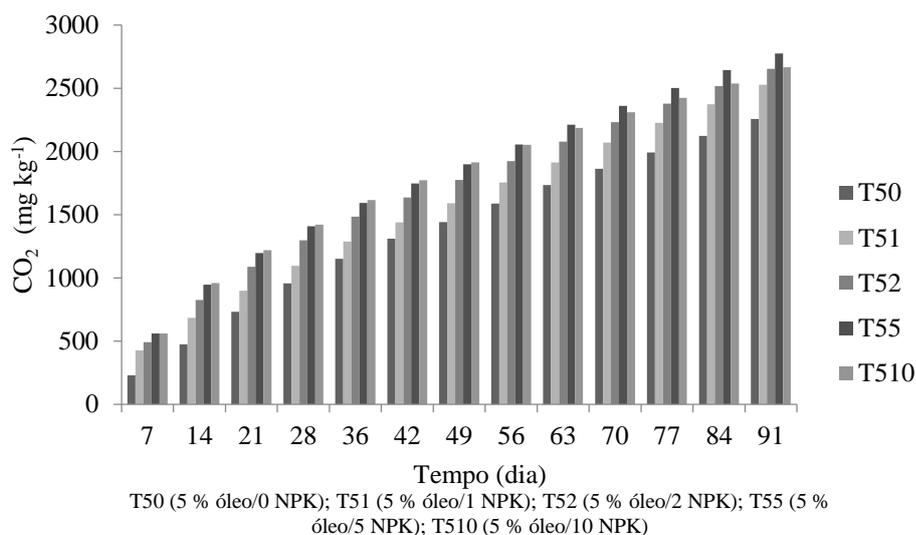
Os Gráficos 10 e 11 mostram uma maior produção de CO<sub>2</sub> nos tratamentos com maiores níveis de óleo e NPK, com produção de 2.774,02 mg kg<sup>-1</sup> para o tratamento T55 e 3.726,16 mg kg<sup>-1</sup> para o tratamento T1010, resultado superior a produção dos tratamentos sem adição de NPK T50 e T100, 2.256,36 e 2.728,90 mg kg<sup>-1</sup> respectivamente.

Observou-se que quanto maior o nível de contaminação do solo maior é a necessidade de aplicação de fertilizantes reduzindo o tempo do processo de biorremediação. O fenômeno também pode ser explicado pela toxicidade causada pelos altos níveis de contaminação de óleo. Ferreira (2010) observou que a contaminação reduz as populações de bactérias, embora, após uma fase de adaptação, algumas espécies sejam capazes de se restabelecer e retomar o seu crescimento. Seabra (2005) explica que o aumento da concentração de óleo há também aumento das demandas de nutrientes e aceptores de elétrons, nem sempre supridas facilmente nas condições dos experimentos e ressalta ainda o efeito tóxico nas bactérias biodegradadoras de óleo.

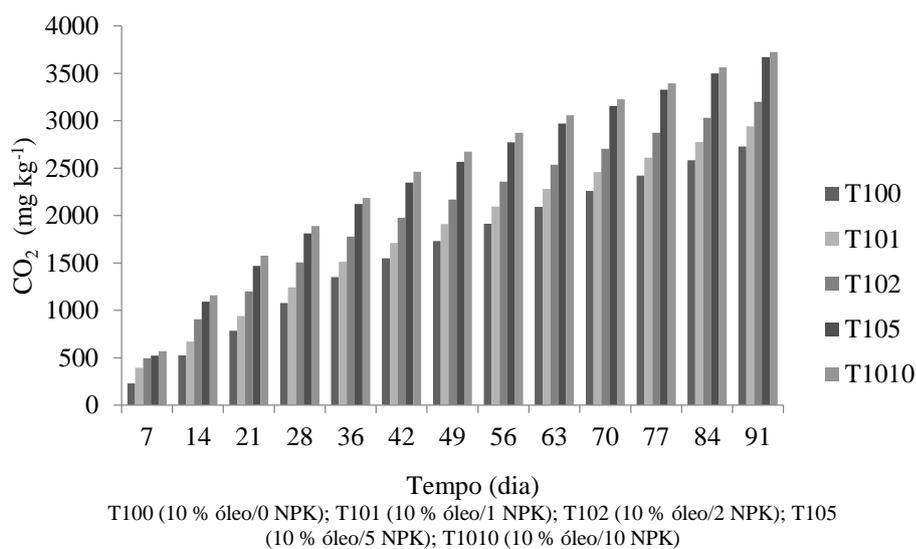
Fusey e Oudot (1984) citam que altas concentrações de hidrocarbonetos podem ocasionar a inibição da biodegradação devido à limitação de nutrientes, oxigênio ou pela toxicidade dos hidrocarbonetos voláteis. Dibble e Bartha (1979) demonstraram que o aumento da massa de hidrocarboneto em um lodo oleoso aplicado em solo, na faixa de 1,25 a 5 % de massa de hidrocarboneto por massa de solo seco, provocou aumento da evolução de CO<sub>2</sub>, mas

no nível de contaminação de 10 % registrou-se decréscimo de 15 % na evolução de CO<sub>2</sub>. Linhares e Seabra (1991) observou através da produção de CO<sub>2</sub>, redução a partir do nível de 5 % de contaminação por hidrocarbonetos, atribuindo a redução da atividade microbiana a toxicidade do contaminante.

**Gráfico 10.** Produção acumulada de CO<sub>2</sub> em relação aos dias do experimento com 5 % de óleo e doses crescentes de NPK.



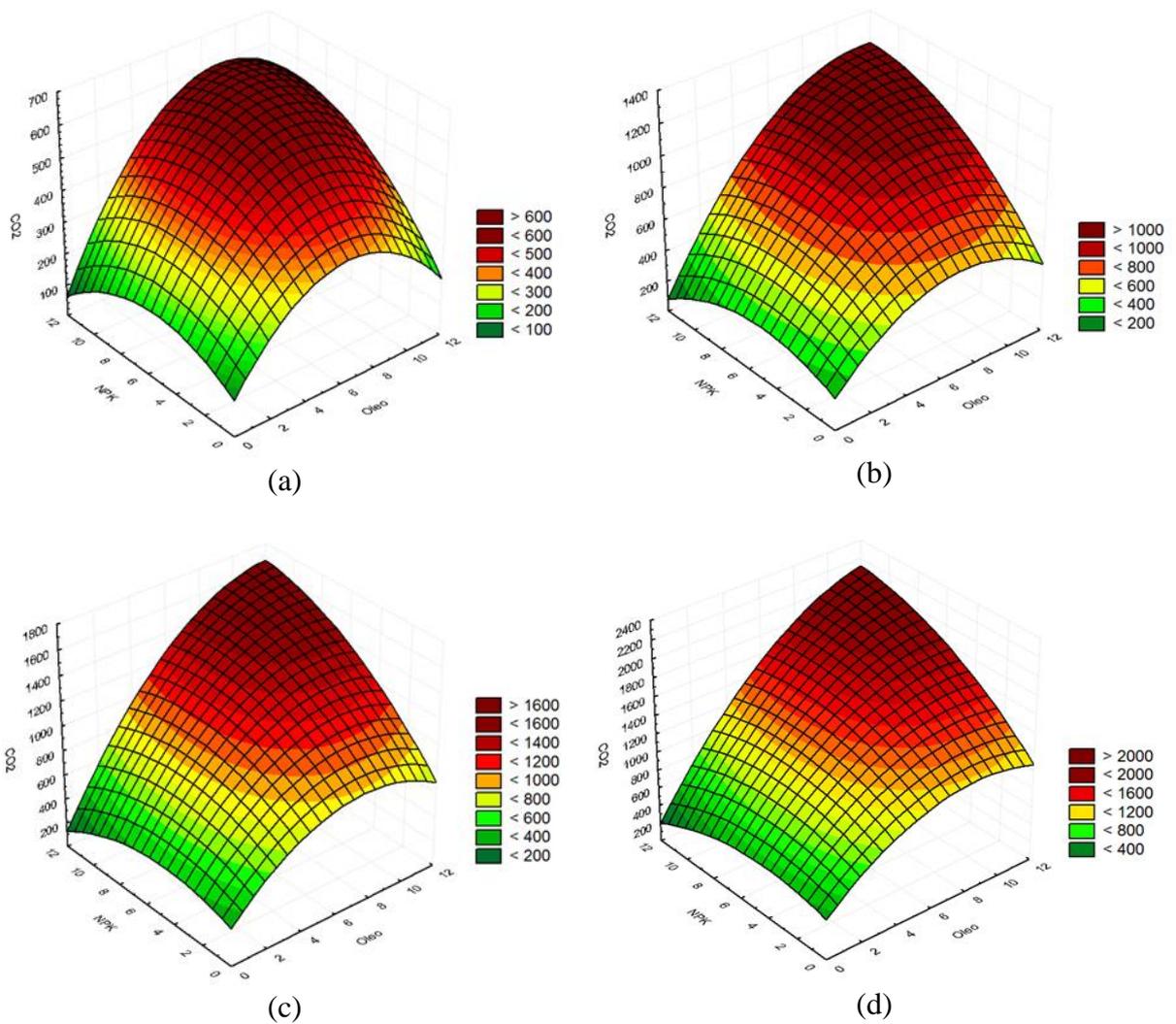
**Gráfico 11.** Produção acumulada de CO<sub>2</sub> em relação aos dias do experimento com 10 % de óleo e doses crescentes de NPK.

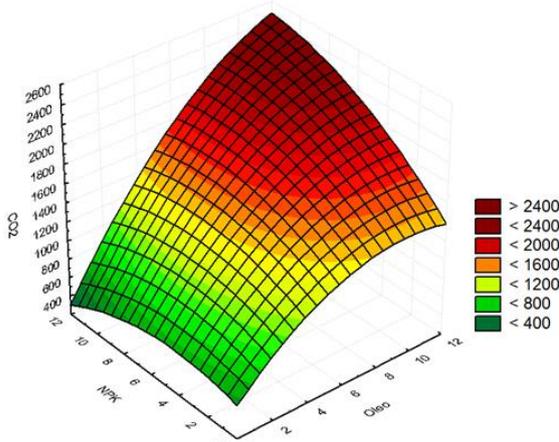


Os resultados das produções acumuladas de CO<sub>2</sub> foram utilizados para construção de um modelo matemático a partir de uma superfície de resposta que estimasse qual dose ótima de

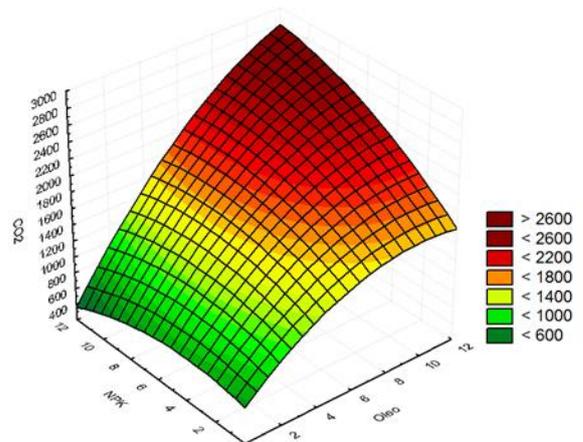
NPK 10:30:20 a ser aplicada em solos contaminados a diferentes níveis de óleo considerando que o melhor resultado seria o que retornasse a maior produção de  $\text{CO}_2$  e por consequência maior respiração microbiana e mineralização da matéria orgânica presente no solo. O Gráfico 12 apresenta as superfícies geradas em cada medição de  $\text{CO}_2$ , sendo possível analisar a dinâmica do processo desde a primeira análise no dia 7 finalizando no dia 91 (Gráfico 13). A produção de  $\text{CO}_2$  apresentou comportamento quadrático em função das variáveis independentes (NPK e óleo), que está bem definido na superfície gerada com os resultados do 7º dia mostrados no Gráfico 12 (a), estando menos acentuado nas superfícies de resposta posteriores.

**Gráfico 12.** Superfícies de resposta das produções acumuladas de  $\text{CO}_2$  em razão das doses de NPK e níveis de contaminação por óleo aos (a) 7 dias, (b) 14 dias, (c) 21 dias, (d) 28 dias, (e) 36 dias, (f) 42 dias, (g) 49 dias, (h) 56 dias, (i) 70 dias, (j) 77 dia e (l) 84 dias.

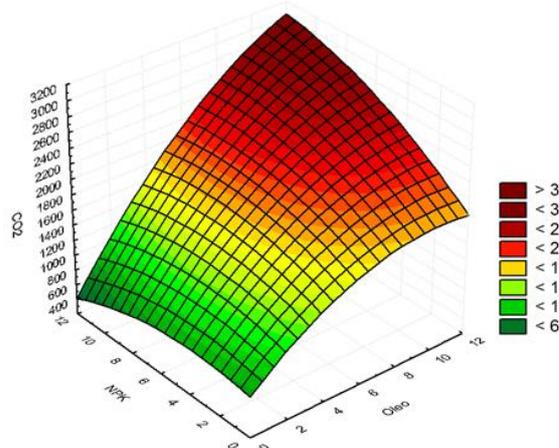




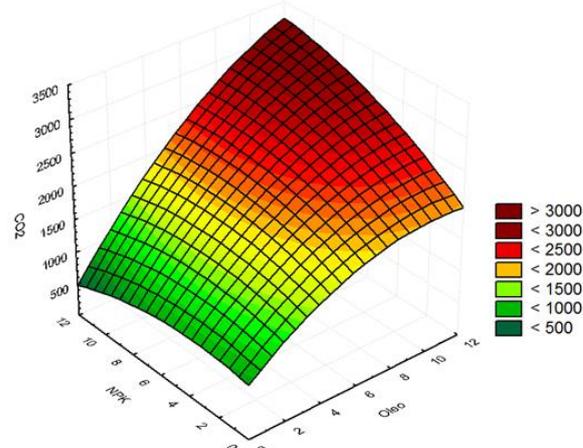
(e)



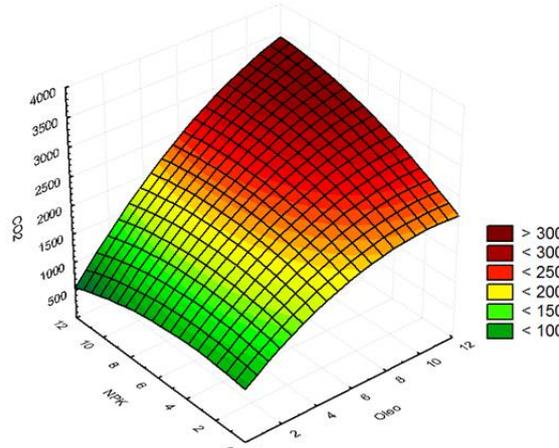
(f)



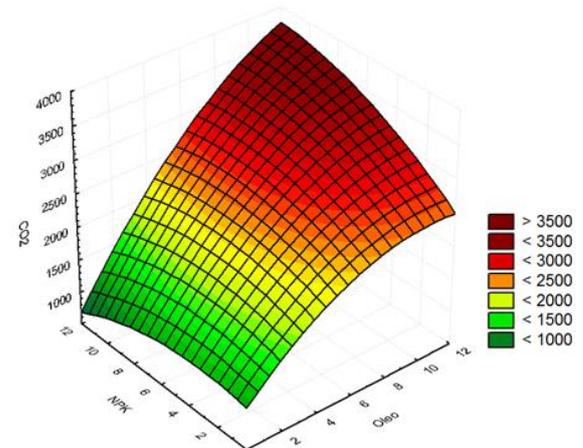
(g)



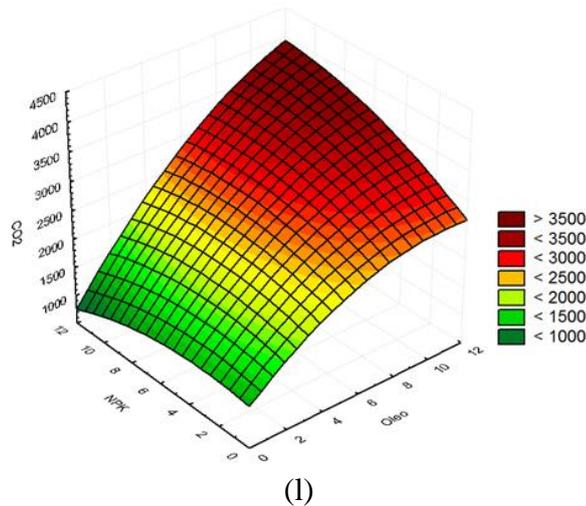
(h)



(i)



(j)



O modelo matemático resultado da superfície de resposta gerada com os dados das produções de  $CO_2$  acumuladas no 91º dia:

$$CO_2 = 1.333,51 + 277,566.P - 12,7466.P^2 + 38,5684.NPK - 6,8613.NPK^2 + 12,7064.P.NPK \quad \dots(4)$$

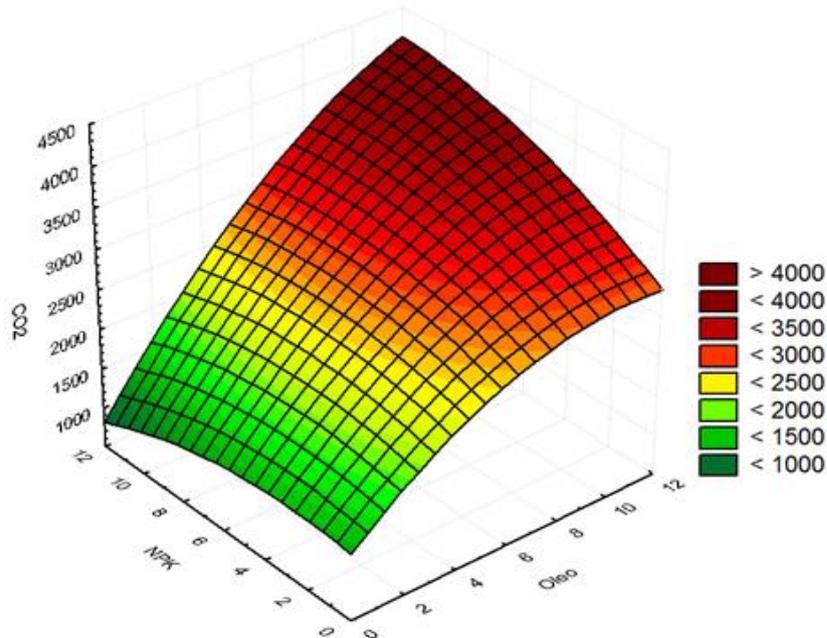
Os coeficientes do modelo foram testados ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste “t” e estima uma produção máxima de  $CO_2$  de  $4.962,34 \text{ mg kg}^{-1}$  com uma dose de NPK equivalente a  $5.985,35 \text{ kg ha}^{-1}$  e o solo contaminado com óleo ao nível de 22,82 %. O resultado obtido possui coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9816 indicando que o modelo tem um bom ajuste para explicar o fenômeno em questão.

O comportamento quadrático da produção de  $CO_2$  em relação a contaminação por óleo e doses de NPK mostra que há uma tendência de se aumentar a eficiência do processo com o aumento dos níveis destes elementos até um certo ponto (ponto máximo) e a partir deste haverá um decréscimo, que pode ser em virtude da toxicidade do óleo ou inibição por altas doses de fertilizantes.

De acordo com o modelo matemático obtido na equação 4, estima-se que a bioestimulação com o fertilizante NPK 10:30:20 nas condições do experimento é eficiente até um nível de contaminação de 22,82 % de óleo, confrontando com os resultados de Dibble e Bartha (1979) que observaram decréscimo em virtude de toxicidade a partir de níveis de contaminação de 10 %, Linhares e Seabra (1991) com valores mais restritivos ao nível de contaminação de 5 % e Seabra (2005) avaliou que a concentração de óleo teve influência na taxa de consumo de oxigênio, as amostras com 3 % de óleo apresentaram consumo maior de oxigênio em praticamente todos os testes em relação as amostras com 5 e 10 % de óleo, sendo

praticamente o dobro. Assim o arranjo em questão solo argiloso/óleo/fertilizante tem tolerância superior a níveis de contaminação que os estudos relatados.

**Gráfico 13.** Superfície de resposta da produção acumulada de CO<sub>2</sub> em razão das doses de NPK e níveis de contaminação por óleo aos 91 dias.



O método da superfície de resposta vem sendo largamente utilizada em trabalhos relacionados a otimização de fornecimento de insumos e obtenção de melhores resultados, utilizado por Zahed et al. (2010) para otimizar a concentração de nitrogênio e fósforo na remoção de alcanos em amostras de água do mar contaminada com petróleo bruto em reatores. Mohajeri et al. (2010) utilizou a superfície de resposta para otimizar concentrações de óleo em relação a concentração de biomassa, nitrogênio e fósforo na biorremediação de sedimentos contaminados com petróleo bruto e Costa (2015) otimizou aplicação de fertilizante NPK na concentração 10:30:20 para biorremediação de solos com diferentes níveis de contaminação com petróleo bruto.

Os coeficientes dos modelos matemáticos obtidos nas superfícies de resposta do Gráfico 12 e os respectivos coeficientes de determinação  $R^2$  estão sumarizados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Coeficientes dos modelos matemáticos obtidos a partir das superfícies de resposta gerados a partir dos dados de produção acumulada de CO<sub>2</sub> entre os dias 7 e 91 e seus respectivos coeficientes de determinação R<sup>2</sup>.

t (dia)	$\beta_0$	$\beta_{1.P}$	$\beta_{2.P^2}$	$\beta_{3.NPK}$	$\beta_{4.NPK^2}$	$\beta_{5.P.NPK}$	R <sup>2</sup>
7	113,8497	83,0519	-6,4581	35,7583	-3,3278	2,8531	0,9182
14	204,5448	122,2214	-8,6092	51,2074	-5,1579	6,1857	0,9462
21	309,0535	150,2001	-9,8625	48,5696	-5,3076	8,022	0,9668
28	442,7853	170,039	-9,8731	48,9483	-5,7811	9,0756	0,9748
36	553,711	183,9257	-9,6005	47,3527	-5,686	9,3503	0,9783
42	649,5459	196,5379	-9,8961	43,0303	-5,6037	10,444	0,9830
49	739,9445	209,9122	-10,2627	42,6089	-5,8425	11,008	0,9834
56	836,4988	223,5907	-10,7478	41,6009	-5,9926	11,3967	0,9834
63	933,7462	237,2272	-11,2725	43,8624	-6,3518	11,5427	0,9831
70	1034,868	248,5823	-11,710	45,6208	-6,6849	11,6634	0,9824
77	1131,033	260,125	-12,2193	45,2684	-6,9086	11,9551	0,9819
84	1230,388	270,2091	-12,5813	42,6443	-6,9128	12,2327	0,9818
91	1333,512	277,5661	-12,7466	38,5681	-6,8613	12,7064	0,9816

Fonte: Autor.

A partir dos coeficientes apresentados é possível simular diferentes situações estimando a produção de CO<sub>2</sub> para diferentes níveis de NPK e óleo, como feito na tabela 9 utilizando os coeficiente do modelo matemático para os 91 dias.

**Tabela 9.** Simulação da produção de CO<sub>2</sub> em relação aos diferentes níveis de óleo e NPK conforme modelo matemático gerado pela superfície de resposta aos 91 dias.

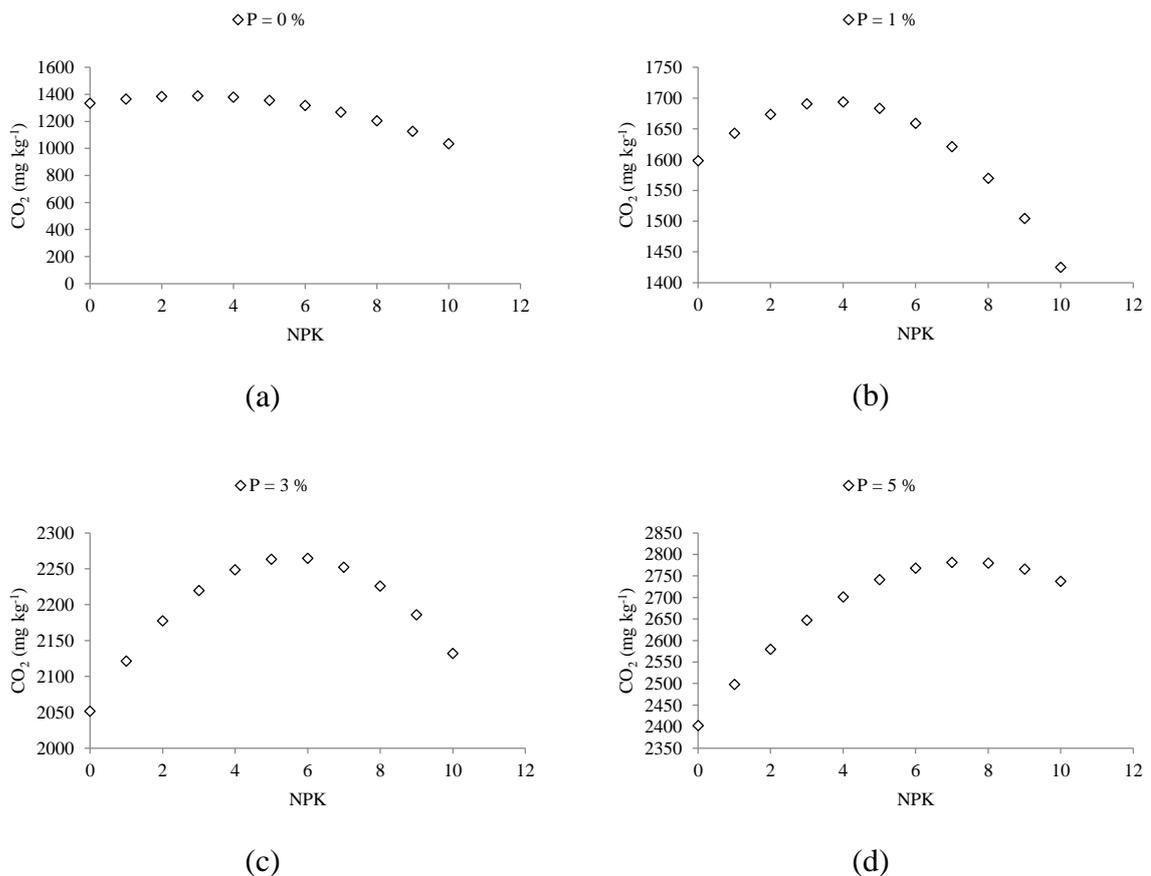
NPK	Óleo (%)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	1333,51	1598,33	1837,66	2051,49	2239,83	2402,68	2540,03	2651,89	2738,26	2799,13	2834,51
1	1365,22	1642,75	1894,78	2121,32	2322,36	2497,92	2647,98	2772,54	2871,62	2945,20	2993,28
2	1383,20	1673,44	1938,17	2177,42	2391,17	2579,43	2742,20	2879,47	2991,25	3077,54	3138,33
3	1387,47	1690,40	1967,85	2219,80	2446,26	2647,23	2822,70	2972,68	3097,17	3196,16	3269,66
4	1378,00	1693,65	1983,80	2248,46	2487,63	2701,30	2889,48	3052,16	3189,36	3301,05	3387,26
5	1354,82	1683,17	1986,03	2263,40	2515,27	2741,65	2942,53	3117,92	3267,82	3392,23	3491,14
6	1317,91	1658,97	1974,54	2264,61	2529,19	2768,27	2981,86	3169,96	3332,57	3469,68	3581,30
7	1267,29	1621,05	1949,32	2252,10	2529,38	2781,17	3007,47	3208,28	3383,59	3533,41	3657,73
8	1202,93	1569,40	1910,38	2225,87	2515,86	2780,36	3019,36	3232,87	3420,89	3583,42	3720,45

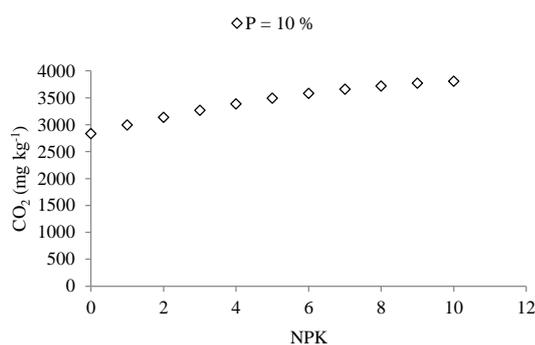
9	1124,86	1504,04	1857,72	2185,91	2488,61	2765,81	3017,52	3243,74	3444,47	3619,70	3769,44
10	1033,06	1424,95	1791,34	2132,23	2447,64	2737,55	3001,97	3240,89	3454,32	3642,26	3804,70

Fonte: Autor

O gráfico 14 foi gerado a partir de simulação com o modelo matemático obtido mostrando a produção máxima obtida de CO<sub>2</sub> para as doses crescentes de NPK e níveis de contaminação por óleo a 0, 1, 3, 5 e 10 %. Nestes é possível verificar, em todos os casos que o fenômeno tem um efeito positivo advindo da adição de nutrientes para bioestimular e acelerar o processo de biorremediação, no entanto tem um ponto ótimo que ao ser ultrapassado passa a ter efeitos negativos, reduzindo a atividade microbiana.

**Gráfico 14.** Máxima produção de CO<sub>2</sub> com relação as doses de NPK para 0, 1, 3, 5 e 10 % de óleo.





(e)

A máxima produção de CO<sub>2</sub> para doses ótimas de NPK em relação aos níveis de contaminação por óleo mostradas no Gráfico 14 estão relacionado na Tabela 10. Observou-se que para as contaminações aos níveis de 0, 1, 3 e 5 % o ponto de máxima produção é visível no Gráfico 14 (a, b, c e d) e são respectivamente 1.387,70, 1.694,09, 2.265,78 e 2.782,53 mg kg<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub>, mas para a contaminação a 10 % de óleo a tendência no gráfico é crescente.

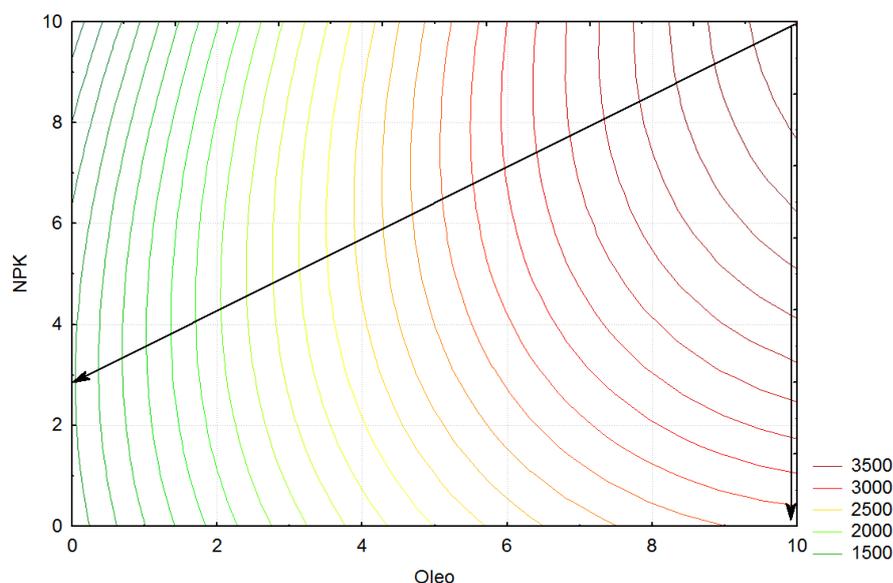
**Tabela 10.** Máxima produção de CO<sub>2</sub> em relação a dose ótima de NPK para os níveis de contaminação do solo de 0 a 10 %.

Var.	Óleo (%)											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
NPK máx. kg ha <sup>-1</sup>	702,64	934,12	1165,61	1397,09	1628,59	1860,07	2091,62	2322,99	2554,55	2786,10	3017,47	
CO <sub>2</sub> max. mg kg <sup>-1</sup>	1387,70	1694,09	1986,85	2265,78	2530,97	2782,53	3020,28	3244,31	3454,70	3651,26	3834,07	

Fonte: Autor

O Gráfico 15 apresenta as isoquantas da produção acumulada de CO<sub>2</sub> em razão das doses crescentes de óleo e NPK e define a região racional de aplicação. As isoquantas apresentam uma infinidade de possibilidades de aplicação de NPK em razão da contaminação do solo em diferentes níveis de óleo obtendo-se assim igual produção de CO<sub>2</sub>, estando a escolha da dose vinculada a critérios técnicos e/ou econômicos. Em se tratando do critério econômico indica-se a definição da dose de fertilizante a ser aplicada dentro da região definida entre as setas (região racional) do Gráfico 15, onde obtém-se melhor produção de CO<sub>2</sub> em virtude dos níveis de NPK e óleo. A dose definida fora dessa zona implica em elevados acréscimos para um pequeno aumento no resultado.

**Gráfico 15.** Isoquantas da produção acumulada de CO<sub>2</sub> em razão das doses crescentes de óleo e NPK e definição da zona racional.



Observou-se neste que o limitante da região racional é a dose de NPK a ser aplicada limitando-se a 2,81 vezes a dose equivalente a 250 kg ha<sup>-1</sup>, ou seja 702,50 kg ha<sup>-1</sup> de NPK para 0 % de contaminação de óleo, entretanto o nível de contaminação por óleo abrange até o nível de 10,89 %. O que significa dizer nesse caso que para níveis maiores de contaminação do solo será necessário pequena dose para bioestimular os microrganismos a degradar o óleo de forma econômica.

Baptista (2007) fez análise semelhante quando observou no modelo matemático uma tendência no aumento de remoção de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPH) quando há aumento na concentração de fertilizante e biossurfactante, e aumentando a concentração de fertilizante tem-se uma condição ótima de remoção do óleo, porem o autor ressaltou que para se alcançar a melhor condição de remoção de TPH, a concentração de fertilizante e de biossurfactante a ser empregada pode onerar o tratamento do solo, tornando-o inviável economicamente.

Costa (2015) avaliando a capacidade de biorremediação de solo contaminado com compostos oleosos utilizando a técnica da bioestimulação com adição de fertilizante NPK na mesma proporção 10:30:20 e doses crescentes 0, 250, 500, 1.250 e 2.500 kg ha<sup>-1</sup> para os mesmos níveis de contaminação por óleo de 0, 1, 3, 5 e 10 % com base em massa, monitorados pelo método respirométrico, com experimento com duração de 105 dias, temperatura variando entre 31,9 a 34,3 °C, mas utilizando solo arenoso, observou os melhores resultados para produção de C-CO<sub>2</sub> de 3.539,40 mg kg<sup>-1</sup> para o nível de contaminação a 9,20 % de petróleo e

dose de fertilizante equivalente a  $2.435 \text{ kg ha}^{-1}$  de NPK. A autora delimitou a região racional atentando para o critério econômico de aplicação de fertilizante limitada a dose equivalente de  $1.067,5 \text{ kg ha}^{-1}$  de NPK a um nível de contaminação de 6,68 % de petróleo.

Fazendo comparação com o trabalho de Costa (2015) observou-se que em 91 dias, ou seja, 14 dias a menos de quantificação, em condições experimentais similares, alterando o tipo de solo e assim as características físico químicas que lhes são inerentes, o experimento com solo argiloso obteve produção máxima estimada de  $\text{CO}_2$  40 % superior, de  $4.962,34 \text{ mg kg}^{-1}$  de solo em relação a  $3.539,40 \text{ mg kg}^{-1}$  de solo, entretanto requerendo para isso uma dose de fertilizante cerca de 2,45 vezes maior, sendo  $5.985,35 \text{ kg ha}^{-1}$  em relação a  $2.435 \text{ kg ha}^{-1}$  de NPK, ressaltando a tese anteriormente levantada que o solo em estudo tem uma maior tolerância ao aumento na aplicação de fertilizante para níveis mais elevados de contaminação por óleo.

O solo em questão pode ser bioestimulado até níveis de contaminação de 22,82 %, condição tida como limitante por outros autores em virtude do efeito tóxico do óleo, enquanto que o experimento com solo arenoso realizado por Costa (2015) mostrou ser viável tecnicamente a partir da estimativa baseada no modelo matemático até 9,20 % de contaminação por óleo base em massa. Finalizando o comparativo, a região racional para aplicação econômica do fertilizante para o experimento de Costa (2015) foi mais abrangente com relação a dose e mais restritiva para contaminação,  $1.067,5 \text{ kg ha}^{-1}$  de NPK e 6,68 % de óleo, respectivamente, enquanto que para o solo argiloso em estudo a dose de fertilizante chega apenas a  $702,50 \text{ kg ha}^{-1}$  de NPK, até o nível de 10,89 % de óleo.

Com relação as dificuldades apresentadas no processo de biorremediação, em virtude das características dos solos argilosos, havia expectativa que os solos arenosos fossem mais viáveis para os processos de biorremediação, mas ficou evidente a importância da análise detalhada das condições peculiares a cada ambiente.

Pedroti (2007) observou que os tratamentos em solos arenosos apresentaram maior capacidade de biodegradação dos hidrocarbonetos em relação aos solos argilosos, conforme o autor, devido a maior quantidade de oxigênio, facilitando a biodegradação, assim tendo uma velocidade de biodegradação superior aos argilosos. Enquanto que Baptista (2007) observou que as maiores eficiências de remoção de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPH) foram obtidas nos experimentos realizados com solo argiloso tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias, sendo a maior remoção registrada de TPH (79,6 %) nas amostras com solo argiloso com emprego de maior concentração de fertilizante e biosurfactante.

O desempenho superior com relação a produção de  $\text{CO}_2$  no presente experimento com relação ao experimento de Costa (2015) com solo arenoso pode ser explicado pelas diferenças

das características de fertilidade de ambos os solos, principalmente com relação aos níveis de P e K, pois a quantidade de matéria orgânica está na mesma faixa, sendo um pouco superior no solo arenoso com  $13,40 \text{ g kg}^{-1}$  em relação a  $12,31 \text{ g kg}^{-1}$  do solo argiloso. A concentração de P e K do solo argiloso antes da bioestimulação era de 4,6 e  $252,0 \text{ mg dm}^{-3}$  respectivamente enquanto apenas 2,7 e  $47,5 \text{ mg dm}^{-3}$  no solo arenoso.

Seabra (2005) avaliando solos argilosos em biopilha observou que as amostras com 3 % de óleo consumiram o dobro de oxigênio com relação as amostras com 5 e 10 % de óleo, comportamento relacionado ao aporte dos nutrientes fosforo e potássio, assim como a temperatura. Ferreira (2010) trabalhou com biorremediação de solo argiloso contaminado com gasolina e o ajuste nutricional do solo foi baseado no teor de fosforo presente no solo, podendo ser de 25 ou 50 ppm. Os resultados indicaram que a degradação do contaminante foi irrisória nas amostras de solo sem ajuste de nutrientes e chegou a cerca de 50 % nas amostras com ajuste do solo para 50 ppm de fósforo.

## **6 CONCLUSÃO**

A técnica da bioestimulação com aplicação de fertilizante NPK na proporção 10:30:20 teve efeito significativo no aumento da produção de CO<sub>2</sub> no Vertissolo com diferentes níveis de contaminação por petróleo evidenciando efeito positivo da bioestimulação na otimização da degradação do contaminante.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Marilda Z. M.. **A biorremediação como ferramenta para a minimização de problemas ambientais**: Relatório do curso de especialização em Gerenciamento Ambiental. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2003. 18p.

ALKIO, Merianne et al. Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in Arabidopsis include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. **Journal Of Experimental Botany**, [s.l.], v. 56, n. 421, p.2983-2994, 10 out. 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/eri295>. Disponível em: <<http://jxb-oxfordjournals-org.ez139.periodicos.capes.gov.br/content/56/421/2983.full.pdf+html>>. Acesso em: 10 maio 2016.

ALVAREZ, Vanessa Marques. **Comparação entre métodos de biorremediação em solos brasileiros contaminados com óleo**. 2011. 203 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <<http://objdig.ufrj.br/57/teses/763757.pdf>>. Acesso em: 5 jan. 2016.

AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE (API). **“Risk-Based Methodologies for Evaluating Petroleum Hydrocarbon Impacts at Oil and Natural Gas E&P Sites”**. In: API Publication Number 4709, Washington, DC, USA, 2001.

\_\_\_\_\_. **Fate of spilled oil in marine waters: Where does it go? What does it do? How do dispersants affect it?**. In: API Publication Number 4691, Washington, DC, USA, 1999.

ANDRADE, Juliano de Almeida; AUGUSTO, Fabio; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética Química**, São Paulo, v. 35, n. 3, p.17-43, set. 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/eq/v35n3/v35n3a02.pdf>>. Acesso em: 30 ago. 2015.

ASPRAY, T. et al. Effect of nitrogen amendment on respiration and respiratory quotient (RQ) in three hydrocarbon contaminated soils of different type. **Chemosphere**, Oxford, v.72, n.6, p.947-995, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653508003809>>. Acesso em: 22 nov. 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14283**: Resíduos sólidos - Determinação da biodegradação pelo método respirométrico. Rio de Janeiro: Abnt, 1999. 8 p.

ATLAS, Ronald M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, [s.l.], v. 31, n. 4-12, p.178-182, abr. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0025-326x\(95\)00113-2](http://dx.doi.org/10.1016/0025-326x(95)00113-2). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0025326X95001132>>. Acesso em: 25 ago. 2016.

BAKER, J. M. The effects of oils on plants. **Environmental Pollution**, South Wales, v. 1, n. 1, p.27-44, jul. 1970. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0013932770900042>>. Acesso em: 24 jul. 2015.

BAPTISTA, Sandro José. **Avaliação do emprego de biossurfactante na biorremediação de solos contaminados com óleo diesel**. 2007. 146 f. Tese (Doutorado) - Curso de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: <<http://tpqb.eq.ufrj.br/download/biossurfactante-na-biorremediacao-de-solos-contaminados-com-oleo-diesel.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2015.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.34, supl.1, p. 65-68, Nov. 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v34s1/irq22.pdf>>. Acesso em: 21 ago. 2015.

BERGER, Thomas Michael. **Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos totais de petróleo**: Enfoque na aplicação do processo Terraferm. 2005. 86 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ecologia, Departamento de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/10900/000590396.pdf?s>>. Acesso em: 25 ago. 2015.

BERNETH, L.; FIRTH, I.; MCALLISTER, P.; RHODES, S. “**Biotechnologies for remediation and pollution control in the mining industry**”. *Minerals & Metallurgical Processing*, 17 (2), 105-111, 2000.

BISOGNIN, Ramiro Pereira. **Análise do potencial microbiano de uma biopilha na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos**. 2012. 139 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2012. Disponível em: <[http://www.unisc.br/portal/upload/com\\_arquivo/dissertacao\\_final\\_ramiro.pdf](http://www.unisc.br/portal/upload/com_arquivo/dissertacao_final_ramiro.pdf)>. Acesso em: 23 ago. 2015.

BRADY, N. C.; BUCKMAN, H. O. **Natureza e propriedade dos solos**. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1994.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA – ANEEL (Org). **Atlas de Energia do Brasil**. 3. ed. Brasília: Aneel, 2008. 236 p. Disponível em: <<http://www.aneel.gov.br/arquivos/PDF/atlas3ed.pdf>>. Acesso em: 5 ago. 2015.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**. Rio de Janeiro: Anp, 2014. 247 p. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?dw=73191>>. Acesso em: 10 maio 2015.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. **Sumário executivo do Campo de Canto do Amaro**: Contrato de Concessão n° 48000.003792/97-24. 2009. Disponível em: <[www.anp.gov.br/?dw=8419](http://www.anp.gov.br/?dw=8419)>. Acesso em: 09 jul. 2016.

CAPURRO, Enrique Perez Gomar. **Qualidade física de um Vertissolo e produção forrageira em campo nativo melhorado, com irrigação e pastoreio**. 2005. 84 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005. Disponível em: <[w3.ufsm.br/ppgs/.../ENRIQUE-PEREZ-GOMAR-CAPURRO-TESE.pdf](http://w3.ufsm.br/ppgs/.../ENRIQUE-PEREZ-GOMAR-CAPURRO-TESE.pdf)>. Acesso em: 26 abr. 2016.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Manual de gerenciamento de áreas contaminadas**. Capítulo X – Investigação para Biorremediação, 2004. 77p. Disponível em: <[http://areascontaminadas.cetesb.sp.gov.br/wpcontent/uploads/sites/45/2013/11/Capitulo\\_X.pdf](http://areascontaminadas.cetesb.sp.gov.br/wpcontent/uploads/sites/45/2013/11/Capitulo_X.pdf)>. Acesso em: 14 jan. 2016.

\_\_\_\_\_. **Manual de Gerenciamento de Áreas Contaminadas**. 1ª. Ed. São Paulo: CETESB, 1999, 385p.

CHAGAS-SPINELLI, Alessandra Carla Oliveira. **Biorremediação de solo argiloso contaminado por hidrocarbonetos poliaromáticos provenientes de derrame de óleo diesel**. 2007. 174 f. Tese (Doutorado) – Curso de Geociências, Centro de Tecnologias e Geociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007. Disponível em: <[http://repositorio.ufpe.br:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/6415/arquivo6804\\_1.pdf?sequence=1&i](http://repositorio.ufpe.br:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/6415/arquivo6804_1.pdf?sequence=1&i)>. Acesso em: 7 jan. 2016.

CHUPAKHINA, G. N.; MASLENNIKOV, P. V.. Plant adaptation to oil stress. **Russian Journal Of Ecology**, Kaliningrad, v. 35, n. 5, p.290-295, set. 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1023/B:RUSE.0000040681.75339.59>>. Acesso em: 15 out. 2015.

CLARK, R. B. **Marine pollution**. 4th ed. Oxford: Oxford University Press, 1997. 161 p.

COLLA, Tatiana S. **Avaliação da biorremediação de solo contaminado pela mistura B10 por consórcio bacteriano**. 2012. 138 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/61774/000866621.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 31 ago. 2016.

COSTA, Maria Valdete da. **Recuperação de solo contaminado por petróleo usando bioestimulação**. 2015. 45 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ecologia e Conservação, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2015. Disponível em: <<https://ppgec.ufersa.edu.br/wp-content/uploads/sites/53/2015/05/Dissertação-Maria-Valdete-da-Costa.pdf>>. Acesso em: 9 out. 2015.

COSTA, Melissa Riani. **Uso da respirometria para avaliação da biodegradação aeróbia de lixo de resíduos sólidos urbanos em Latossolo vermelho-escuro**. 2009. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia Ambiental e recursos Hídricos, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, 2009. Disponível em: <[http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/9878/1/2009\\_MelissaRianiCosta.pdf](http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/9878/1/2009_MelissaRianiCosta.pdf)>. Acesso em: 9 jul. 2015.

CUNHA, C. D. et al. **Biorremediação de água subterrânea contaminada com gasolina e análise molecular da comunidade bacteriana presente**. CETEM/MCT - Série Tecnologia Ambiental. Rio de Janeiro: 45p. 2008. Disponível em: <[www.cetem.gov.br/publicacao/series\\_sta/sta-47.pdf](http://www.cetem.gov.br/publicacao/series_sta/sta-47.pdf)>. Acesso em: 25 junho 2015.

CUNHA, Claudia da. **Avaliação da biodegradação de gasolina em solo**. 1996. 97 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1996.

D'ANNIBALE, A., ROSETTO, F. LEONARDI, V., FEDERICI, F., & PETRUCCIOLI, M. 2006. **Role of Autochthonous Filamentous Fungi in Bioremediation of a Soil. Historically Contaminated with Aromatic Hydrocarbons**. *Applied and Environmental Microbiology* (72), 1: 28–36. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1352206/pdf/1243-05.pdf>>. Acesso em: 30 maio 2015.

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.

DIAS, Fábio Guimaro. **Utilização de consórcio microbiano para biorremediação do meio ambiente contaminado com derivados de petróleo**. 2007. 106 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000414709&fd=y>>. Acesso em: 14 jan. 2015.

DIBBLE, J. T.; BARTHA, R. Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 37, pp. 729-739, 1979. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/23096656\\_Effect\\_of\\_Environmental\\_Parameters\\_on\\_the\\_Biodegradation\\_of\\_Oil\\_Sludge](https://www.researchgate.net/publication/23096656_Effect_of_Environmental_Parameters_on_the_Biodegradation_of_Oil_Sludge)>. Acesso em: 17 ago. 2016.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 2011. 230 p. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/990374/manual-de-metodos-de-analise-de-solo>>. Acesso em: 18 abr. 2016.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, UNITED STATES - EPA. **A citizen's guide to bioremediation**. United States Environmental Protection Agency. April 1996. EPA 542-F-96-007.

\_\_\_\_\_. 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.

FERREIRA, Douglas Guedes. **Biorremediação de solo argiloso contaminado com gasolina aditivada com diferentes teores de etanol**. 2010. 116 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia dos Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://objdig.ufrj.br/61/dissert/746670.pdf>>. Acesso em: 7 jan. 2016.

FERREIRA, Erika Danielly Silva. **Aplicação da respirometria na caracterização do esgoto doméstico afluente a uma ETE por processo de lodos ativados**. 2002. 153 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, 2002. Disponível em: <<http://www.ptarh.unb.br/downloads/dissertacoes/53-2002.pdf>>. Acesso em: 8 jan. 2016.

FERREIRA, Ieda Domingues; MORITA, Dione Mari. Biorremediação de solo contaminado por isobutanol, bis-2-etil-hexilftalato e di-isodecilftalato. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, n. 36, p.643-652, mar. 2012. Bimestral. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-06832012000200033&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-06832012000200033&script=sci_arttext)>. Acesso em: 5 nov. 2015.

FREEDMAN, B. **Environmental ecology: the ecological effects of pollution, disturbance, and other stresses**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, INC, 1993. 606 p.

FUSEY, P.; OUDOT, J. Relative influence of physical removal and biodegradation in the deperation of petroleum-contaminated seashore sediments. **Marine Pollution Bulletin**, [s.l.], v. 15, n. 4, p.136-141, abr. 1984. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0025-326x\(84\)90234-0](http://dx.doi.org/10.1016/0025-326x(84)90234-0). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0025326X84902340>>. Acesso em: 15 ago. 2016.

GALLEGO, José L.r. et al. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. **Biodegradation**, [s.l.], v. 12, n. 5, p.325-335, 2001. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1014397732435>. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1023/A:1014397732435>>. Acesso em: 5 ago. 2016.

GAYLARDE, Christine Claire; BELLINASO, Maria de Lourdes; MANFIO, Gilson Paulo. Biorremediação: Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 34, p.36-43, jan. 2005. Semestral. Disponível em: <[http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio34/biorremediacao\\_34.pdf](http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio34/biorremediacao_34.pdf)>. Acesso em: 14 jan. 2016.

GHAEMGHAMI, J.; BAKER, R.S.; SIMKINS, S. Outgassing losses of Toluene and Mxylene Evaluated by 14C-based Mass Balances for Laboratory Bioventing Simulations. **Journal of Soil Contamination**. Vol. 7, p.697-708, 1998.

GOGOI, B.k. et al. A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. **Advances In Environmental Research**, [s.l.], v. 7, n. 4, p.767-782, jun. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1093-0191\(02\)00029-1](http://dx.doi.org/10.1016/s1093-0191(02)00029-1). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1093019102000291>>. Acesso em: 25 jul. 2016.

GUIMARÃES, Adriana Karla Virgolino. **Extração do óleo e caracterização dos resíduos da borra de petróleo para fins de reuso**. 2007. 154 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007. Disponível em: <<ftp://ftp.ufrn.br/pub/biblioteca/ext/bdtd/AdrianaKVG.pdf>>. Acesso em: 26 abr. 2016.

INCKOT, Renata Charvet et al. Anatomia das plântulas de Mimosa Pilulifera (Leguminosae) crescendo em solo contaminado com petróleo e solo biorremediado. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 59, p.513-524, jul. 2008. Disponível em: <[rodriguesia.jbrj.gov.br/FASCICULOS/rodrig59\\_3/008.pdf](http://rodriguesia.jbrj.gov.br/FASCICULOS/rodrig59_3/008.pdf)>. Acesso em: 26 abr. 2016.

JACQUES, Rodrigo Josemar Seminoti et al. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, p.1192-1201, jul. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v37n4/a49v37n4.pdf>>. Acesso em: 2 jan. 2016.

JACQUES, Rodrigo Josemar Seminoti et al. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 2, p.310-317, fev. 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v40n2/a468cr1426.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2015.

LINHARES, M. M., SEABRA, P. N. Método para Avaliação da Aplicabilidade e Taxa de Aplicação de Resíduos em Solo. **Boletim Técnico da Petrobras**, v. 34, p. 49-52, 1991.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial Degradation of hydrocarbons in the Environment. **Microbiol.** Ver. v.54, p. 305-315. 1990.

LEMOS, J. L. S.; OLIVEIRA, S. D.; SCHLITTER, L. D. F. S. e PEREIRA JR. N. **Técnicas de Biorremediação de Solos Contaminados por Hidrocarbonetos de Petróleo**. Diálogo e Ciência – Revista da Rede de ensino FTC, Ano II, n. 11, dez. 2009.

LIMA, Danúsia Ferreira. **Biorremediação em sedimentos impactados por petróleo na Baía de Todos os Santos, Bahia**: Avaliação da degradação de hidrocarbonetos saturados. 2010. 231 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Geologia, Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010. Disponível em: <[https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/16319/1/Danúsia Ferreira Lima.pdf](https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/16319/1/Danúsia%20Ferreira%20Lima.pdf)>. Acesso em: 19 set. 2015.

LUCCHESI, Celso Fernando. Petróleo. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 12, n. 33, p.17-40, jan. 1998. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/eav/article/view/9403/10971>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

MACHADO, Flora Gomes. **Estudo da evolução de ácidos orgânicos no processo de destilação de petróleos**. 2014. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014. Disponível em: <[http://portais4.ufes.br/posgrad/teses/tese\\_7536\\_Flora Gomes Machado.pdf](http://portais4.ufes.br/posgrad/teses/tese_7536_Flora%20Gomes%20Machado.pdf)>. Acesso em: 22 dez. 2015.

MARANHO, Leila Teresinha et al. Efeitos da poluição por petróleo na estrutura da folha de *Podocarpus lambertii* Klotzsch ex Endl., Podocarpaceae. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 3, p.615-624, jul. 2006. Trimestral. Disponível em: <[www.scielo.br/pdf/abb/v20n3/11.pdf](http://www.scielo.br/pdf/abb/v20n3/11.pdf)>. Acesso em: 26 abr. 2016.

MARIANI, Pilar Drummond Sampaio Corrêa. **Estudo da biodegradação da Blenda de Poli (e-Caprolactona) e amido modificado em meios sólidos e líquido**. 2005. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000354268>>. Acesso em: 4 jan. 2016.

MARIANO, Adriano Pinto. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. 2006. 147 f. Tese (Doutorado) - Curso de Geociências e Meio Ambiente, Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006. Disponível em: <[http://www.anp.gov.br/CapitalHumano/Arquivos/PRH05/Adriano-Pinto-Mariano\\_PRH05\\_UNESP\\_D.pdf](http://www.anp.gov.br/CapitalHumano/Arquivos/PRH05/Adriano-Pinto-Mariano_PRH05_UNESP_D.pdf)>. Acesso em: 21 set. 2015.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Biorremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 3127-3133, 2001.

MARTINS, Bianca Alves Dias. **Avaliação da cinética de biodegradação do etanol em concentrações mínimas necessárias dos nutrientes nitrogênio e fósforo**. 2004. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Ambiental, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/87543/203668.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 15 jan. 2015.

MENEGHETTI, Liliâne Rebechi Ribeiro. **Biorremediação na descontaminação de solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel**. 2007. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2007. Disponível em: <[http://www.upf.br/ppgeng/download/2005lilianemeneghetti.pdf?origin=publication\\_detail](http://www.upf.br/ppgeng/download/2005lilianemeneghetti.pdf?origin=publication_detail)>. Acesso em: 11 out. 2015.

MESQUITA, Ana Carla. **Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes**. 2004. 158 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências em Engenharia Civil, Pós-graduação de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004. Disponível em: <[http://www.coc.ufrj.br/index.php/component/docman/doc\\_download/787-ana-carla-mesquita-doutorao?Itemid=>](http://www.coc.ufrj.br/index.php/component/docman/doc_download/787-ana-carla-mesquita-doutorao?Itemid=>)>. Acesso em: 15 jul. 2015.

MILLIOLI, Valéria Souza. **Avaliação da potencialidade da utilização de surfactantes na biorremediação de solo contaminado com hidrocarboneto de petróleo**. 2009. 200 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <<http://www.eq.ufrj.br/prh13/download/?prh13-surfactantes-na-biorremediacao-de-solo-contaminado.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2015.

MOHAJERI, Leila et al. A statistical experiment design approach for optimizing biodegradation of weathered crude oil in coastal sediments. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 101, n. 3, p.893-900, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.013>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409011882>>. Acesso em: 05 jul. 2016.

MOLLEA, C.; Bosco, F.; Ruggeri, B. **Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies**. Itália, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653505001761>>. Acesso em: 7 jan. 2016.

MORAES, B. E.; TORNISIELO, T. M. S. Biodegradation of Oil Refinery Residues Using Mixed-Culture of Microorganisms Isolated from a Landfarming. *Brazilian archives of Biology and technology.*, v.52, n. 6, p. 1571-1578, 2009.

MORAIS, Eduardo Belardo de. **Biodegradação de resíduos oleosos provenientes de refinaria de petróleo através do sistema de biopilhas.** 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Aplicada, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005. Disponível em: <[http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/95010/morais\\_eb\\_me\\_rcla.pdf?sequence=1](http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/95010/morais_eb_me_rcla.pdf?sequence=1)>. Acesso em: 27 ago. 2016.

MORAIS, José Mauro de. **Petróleo em águas profundas: Uma história tecnológica da PETROBRAS na exploração e produção offshore.** Brasília/DF: Ipea: Petrobras, 2013. 424 p. Disponível em: <[http://www.ipea.gov.br/agencia/images/stories/PDFs/livros/livros/livro\\_petrobras\\_aguas\\_profundas.pdf](http://www.ipea.gov.br/agencia/images/stories/PDFs/livros/livros/livro_petrobras_aguas_profundas.pdf)>. Acesso em: 22 ago. 2015.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. 2006. Microbiologia e Bioquímica do Solo. 2ª ed. Editora UFLA. 729p.

MORLEY, C. P. et al. Organic compounds at different depths in a sandy soil and their role in water repellency. **Australian Journal Of Soil Research**, Australia, v. 43, n. 3, p.239-249, mar. 2005. Disponível em: <<http://geography.swan.ac.uk/hydrophobicity/papers/Morley2005-charact-AJSR.pdf>>. Acesso em: 15 maio 2016.

MOSSORÓ. PREFEITURA MUNICIPAL DE MOSSORÓ. (Org.). **Geografia.** 2015. Disponível em: <<http://www.prefeiturademossoro.com.br/mossoro/geografia/>>. Acesso em: 8 set. 2015.

MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N. Natural attenuation of contaminated soil. **Environmental International**, Oxford, v.30, n.4, p.587-601, 2004.

MUTECA, Felisberto Lucas Luis. **Biorremediação de solo contaminado com óleo cru proveniente de Angola.** 2012. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <<http://tpqb.eq.ufrj.br/download/biorremediacao-de-solo-contaminado-com-oleo-cru.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2015.

MYERS, Raymond H.; MONTGOMERY, Douglas C.; ANDERSON-COOK, Christine M.. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimizations Using Designed Experiments.** 3. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009. 680 p.

NASCIMENTO, Teresa Cristina Ferreira do. **Tratamento biológico de solo impactado por resíduos oleosos provenientes do refino de petróleo.** 2013. 140 f. Tese (Doutorado) - Curso de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://objdig.ufrj.br/61/teses/794135.pdf>>. Acesso em: 7 dez. 2015.

NASS, Daniel Perdigão. **O conceito de poluição**. Revista Eletrônica de Ciências. Número 13, Novembro de 2002. Disponível em: <[http://www.cdcc.sc.usp.br/ciencia/artigos/art\\_13/poluicao.html](http://www.cdcc.sc.usp.br/ciencia/artigos/art_13/poluicao.html)>. Acesso em: 07 jan. 2016.

NEUBAUER FILHO, Airton. **Valoração do impacto do derramamento de produtos químicos na Baía de Paranaguá**. 2009. 126 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Desenvolvimento de Tecnologia, Instituto de Tecnologia Para O Desenvolvimento, Curitiba, 2009.

NOVAES, Ricardo Célio Sesma. **Campos maduros e áreas de acumulações marginais de petróleo e gás natural: Uma análise da atividade econômica no Recôncavo Baiano**. 2010. 179 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Energia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em: <[www.iee.usp.br/producao/2010/Teses/RCnovaes-dissert-rev93\\_Final.pdf](http://www.iee.usp.br/producao/2010/Teses/RCnovaes-dissert-rev93_Final.pdf)>. Acesso em: 8 jan. 2016.

NUVOLARI, Ariovaldo. **Aplicação de lodo de esgotos municipais no solo: ensaios de respirometria para avaliar a estabilidade do lodo**. 1996. 158 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000110074>>. Acesso em: 28 nov. 2015.

OLIVEIRA, Carla Gabriela Braga de. **Utilização de fontes oleofílicas de nitrogênio e fósforo para biorremediação de petróleo em areia de praia**. 2011. 38 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

OLIVEIRA, F. J. S. **Biorremediação de solo arenoso contaminado por óleo cru**. 2001. 101f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro Rio de Janeiro.

OLIVEIRA, J.B. DE. 2008. **Pedologia Aplicada**. 3 ed. FEALQ, SP. 592p.

OLIVEIRA, Sabrina Dias de. **Avaliação das técnicas de bioaumentação fúngica e bioestímulo em processos de biorremediação utilizando solo contaminado por petróleo**. 2008. 140 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: <<http://tpqb.eq.ufrj.br/download/bioaumentacao-fungica-em-processos-de-biorremediacao.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2015.

PEDROTI, Giselle Intra. **Ensaios de biodegradabilidade aeróbia de hidrocarbonetos derivados do petróleo em solos**. 2007. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2007. Disponível em: <<http://www.ct.ufes.br/ppgea/files/Dissertacao.pdf>>. Acesso em: 17 nov. 2015.

PEDROZO, Maria de Fátima Menezes et al (Org.). **Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo**. Salvador: Centro de Recursos Ambientais, 2002. 246 p. (Cadernos de Referência Ambiental).

PEREIRA JUNIOR, Nei; GOMES, Edelvio de B.; SORIANO, Adriana Ururahy. **Biodegradação de hidrocarbonetos**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio

de Janeiro, 2009. 77 p. (Séries em Biotecnologia). Disponível em: <<http://www.ladebio.org.br/download/series-em-biotecnologia-vol-iii-biodegradacao-de-hidrocarbonetos.pdf>>. Acesso em: 7 jan. 2016.

PETERS, K.E.; MOLDOWAN, J.M. **The biomarkers guide: Interpreting molecular fossils in petroleum and ancient sediments**. First Edition, Englewoods Cliffs, New Jersey Prentice Hall, 363p, 1993.

PEZESHKI, S. R. et al. The effects of oil spill and clean-up on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: a review. **Environmental Pollution**, v. 108, n. 2, p.129-139, maio 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749199002444>>. Acesso em: 5 fev. 2016

PIMENTEL, Fernando. **O fim da era do petróleo e a mudança do paradigma energético mundial**: Brasília: Fundação Alexandre de Gusmão, 2011. 236 p. Disponível em: <[http://funag.gov.br/loja/download/838-Fim\\_da\\_Era\\_do\\_Petroleo\\_e\\_a\\_Mudanca\\_do\\_Paradigma\\_Energetico\\_Mun](http://funag.gov.br/loja/download/838-Fim_da_Era_do_Petroleo_e_a_Mudanca_do_Paradigma_Energetico_Mun)>. Acesso em: 8 set. 2015.

QUIDEAU, S. A.; GUPTA, S. D.; MACKENZIE, M. D.; LANDHÄUSSER, S. M. Microbial Response to Fertilization in Contrasting Soil Materials used during Oil Sands Reclamation. **Soil Science Society of America Journal**, v. 77, p. 145–154, 2012.

RATTEDGE, C.; KRISTIANSEN, B. (Edit.). **Basic biotechnology**. 2.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2001.

RIO GRANDE DO NORTE. INSTITUTO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL E MEIO AMBIENTE DO RIO GRANDE DO NORTE - IDEMA. **Anuário Estatístico do Rio Grande do Norte**. 2012. Disponível em: <<http://www.idema.rn.gov.br>>. Acesso em: 10 jul. 2015.

ROCHA, Daniele Leonel da. **Biorremediação de solo contaminado com hidrocarbonetos e metais utilizando surfatantes sintéticos e biossurfatante em ensaios em microcosmos e biorreator**. 2015. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://objdig.ufrj.br/61/dissert/827971.pdf>>. Acesso em: 5 jan. 2016.

RODRIGUES, Tânia Thibes. **Os efeitos do solo contaminado com petróleo na estrutura anatômica e estado nutricional do lenho jovem de *Campomanesia xanthocarpa* Berg (MYRTACEAE) E *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith & Downs (EUPHORBIACEAE)**. 2005. 154 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Florestal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

ROMERO, F. **Petróleo - Revista Brasileira de Tecnologia e Negócios de Petróleo, Gás, Petroquímica, Química Fina e Biocombustíveis**. Ano X, Edição de setembro de 2008, número 61.

ROSATO, Y. B. Biodegradação do petróleo. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPMA, 1997. p. 308-334.

SANTOS, Carmenlucia. **Prevenção à poluição industrial: Identificação de oportunidades, análises dos benefícios e barreiras.** 2005. 287 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências da Engenharia Ambiental, Escola de Engenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005. Disponível em: <[www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/.../TeseCarmenluciaSantos.pdf](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/.../TeseCarmenluciaSantos.pdf)>. Acesso em: 2 jan. 2016.

SANTOS, Jefferson Ferreira dos. **Proteínas de Bacillus pumilus envolvidas na degradação de petróleo e diesel.** 2014. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014. Disponível em: <[http://tede.ufam.edu.br/bitstream/tede/4258/2/Dissertação - Jefferson Ferreira dos Santos.pdf](http://tede.ufam.edu.br/bitstream/tede/4258/2/Dissertação%20-%20Jefferson%20Ferreira%20dos%20Santos.pdf)>. Acesso em: 8 jan. 2015.

SARY, Paulo Henrique Muller. **Biorremediação comparativa de petróleo por consórcio microbiano em biorreatores STR e AIRLIFT.** 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Processos, Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2012. Disponível em: <[http://univille.edu.br/account/mep/VirtualDisk.html?action=readFile&file=Dissertacao\\_Paulo\\_Henrique\\_Muller\\_Sary.pdf&tt;=/Dissertacoes/Turma\\_V](http://univille.edu.br/account/mep/VirtualDisk.html?action=readFile&file=Dissertacao_Paulo_Henrique_Muller_Sary.pdf&tt;=/Dissertacoes/Turma_V)>. Acesso em: 29 set. 2015.

SEABRA, Paulo Negrais Carneiro. **Aplicação de biopilha na biorremediação de solos argilosos contaminados com petróleo.** 2005. 169 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005. Disponível em: <[http://objdig.ufrj.br/60/teses/coppe\\_d/PauloNegraisCarneiroSeabra.pdf](http://objdig.ufrj.br/60/teses/coppe_d/PauloNegraisCarneiroSeabra.pdf)>. Acesso em: 24 out. 2015.

SEKLEMOVA, E.; PAVLOVA, A.; KOVACHEVA, K. Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel: field demonstration. **Biodegradation**, [s.l.], v. 12, n. 5, p.311-316, 2001. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1014356223118>. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1023/A:1014356223118>>. Acesso em: 17 jun. 2016.

SHARMA, Shweta; MALIK, Anushree; SATYA, Santosh. Application of response surface methodology (RSM) for optimization of nutrient supplementation for Cr (VI) removal by *Aspergillus lentulus* AML05. **Journal Of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 164, n. 2-3, p.1198-1204, 30 maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.09.030>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389408013642>>. Acesso em: 7 mar. 2016.

SILVA, E. et al. **Combined bioaugmentation and biostimulation to cleanup soil contaminated with high concentrations of atrazine.** *Environ. Sci. Technol.*, 38:632- 637, 2004.

SILVA, Edmilson Pinto da. **Avaliação Preliminar do potencial de aplicação da tecnologia de biopilhas para a biorremediação do solo de Guamaré-RN.** 2004. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2004. Disponível em: <[http://www.nupeg.ufrn.br/documentos\\_finais/dissertacoes\\_de\\_mestrado/dissertacoes/edmilsonpinto.pdf](http://www.nupeg.ufrn.br/documentos_finais/dissertacoes_de_mestrado/dissertacoes/edmilsonpinto.pdf)>. Acesso em: 23 ago. 2015.

SOUSA, Rainer Gonçalves. "**História do Petróleo no Brasil**"; *Brasil Escola*. Disponível em <<http://brasilecola.uol.com.br/brasil/historia-do-petroleo-no-brasil.htm>>. Acesso em 10 de janeiro de 2016.

SPIES, R.B. et al. The effects of the Exxon Valdez oil spill on the Alaskan coastal environment. Pp. 1-16. 1996. In: **Exxon Valdez Proceedings of the Exxon Valdez oil spill symposium**. Bethesda.

SPIRO, T. G. e STIGLIANI, W. M. **Química Ambiental**. 2ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2009. Cap. 2 p. 26.

STOTZKY, G. **Microbial respiration**. In: BLACK, C.A. *Methods of Soil Analysis*, Madison: Americam Society of Agronomy, 1965, v. 2, p. 1151-1572.

TAVARES, Marina Elisabete Espinho. **Análise do refino no Brasil: Estado e perspectivas**: Uma análise "Cross-Section". 2005. 384 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências em Planejamento Energético, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005. Disponível em: <<http://www.ppe.ufrj.br/ppes/production/tesis/mtavares.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

TAUK, Sâmia Maria. Biodegradação de resíduos orgânicos no solo. **Revista Brasileira de Geociência**, v. 20, n. 4, p. 299-301, 1990.

THOMAS, José Eduardo (Org.). **Fundamentos de engenharia de petróleo**. Rio de Janeiro: Interciência, 2001. 271 p.

TONINI, Rita Maria C. Wetler; REZENDE, Carlos E. de; GRATIVOL, Adriana D.. Bacterial Biodegradation of Petroleum and Oil Compounds. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 3, n. 2, p.78-87, 2011. GN1 Genesis Network. DOI: 10.5935/1984-6835.20110013. Disponível em: <<http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewFile/173/176>>. Acesso em: 23 nov. 2015.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 10<sup>a</sup>.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2012, p.772.

TRINDADE, P.V.O. **Avaliação das técnicas de bioaugmentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo**. 2002. 127 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

USEPA. United States Office of Emergency. Environmental Protection and Remedial. Oil Program Center. **Understanding oil spills and oil spill response in freshwater environments**. Washington, 1999.

WEBER, Bruna Daniela; SANTOS, Antenor Aguiar. Utilização da biorremediação como ferramenta para o controle da degradação ambiental causada pelo petróleo e seus derivados. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 10, n. 1, p.114-133, jan. 2013. Disponível em: <<http://ferramentas.unipinhal.edu.br/engenhariaambiental/include/getdoc.php?id=2475&artid=1059&mode=pdf>>. Acesso em: 23 ago. 2015.

WENTZEL, K. F. IUFRO-studies on maximal SO<sub>2</sub> emissions standards to protect forests. In: ULRICH, B.; PANKRATH, J. (Ed.). **Effects of accumulation of air pollutants in forest, ecosystems**. Holland: D. Reidel publishing Company. 1983. 295-302 p.

YERGIN, Daniel. **O Petróleo**: Uma história mundial de conquistas, poder e dinheiro. São Paulo: Editora Paz e Terra, 2010.

YERUSHALMI, L.; ROCHELEAU, S.; CIMPOIA, R.; SARRAZIN, M.; SUNAHARA, G.; PEISAJOVICH, A.; LECLAIR, G.; GUIOT, S. R. Enhanced biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated soil. **Bioremed. J.**, Philadelphia, v.7, n.1, p.37-51, 2003. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/713914241?journalCode=bssc19>>. Acesso em: 27 jun. 2016.

ZAHED, Mohammad Ali et al. Application of statistical experimental methodology to optimize bioremediation of n-alkanes in aquatic environment. **Journal Of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 184, n. 1-3, p.350-356, dez. 2010. Elsevier BV. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.08.043>>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389410010599>>. Acesso em: 10 maio 2016.

## 8 APÊNDICE A – ANÁLISE ESTATÍSTICA

-----  
 Variável analisada: CO2

Opção de transformação: Variável sem transformação ( Y )  
 -----

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
OLEO	4	37126700.070432	9281675.017608	2504.029	0.0000
NPK	4	726528.397632	181632.099408	49.001	0.0000
OLEO*NPK	16	2648532.303168	165533.268948	44.658	0.0000
REP	2	14171.640288	7085.820144	1.912	0.1589
erro	48	177921.410112	3706.696044		
Total corrigido	74	40693853.821632			
CV (%) =	2.81				
Média geral:	2169.9368000		Número de observações:	75	