



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO
MESTRADO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO

MARIA VALDETE DA COSTA

**RECUPERAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO POR PETRÓLEO USANDO
BIOESTIMULAÇÃO**

MOSSORÓ - RN

MARÇO - 2015

MARIA VALDETE DA COSTA

**RECUPERAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO POR PETRÓLEO USANDO
BIOESTIMULAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de “Mestre em Ecologia e Conservação”.

Linha de Pesquisa: Ecologia e Conservação de Ecossistemas Terrestres

Orientador: Prof. Dr. Celsemy Eleutério Maia.

MOSSORÓ - RN

MARÇO- 2015

©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.

C837c Costa, Maria Valdete da
Recuperação de solo contaminado por petróleo usando
bioestimulação / Maria Valdete da Costa. – Mossoró, RN,
2015.
57f. il.

Orientador: Prof. Dr. Celsemy Eleutério Maia

Dissertação (Pós-Graduação em Ecologia e Conservação)
– Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Pró-Reitoria
de Pesquisa e Pós-Graduação.

1. Biorremediação. 2. Fertilizantes. 3. Nutrientes. 4. NPK. I.
Maia, Celsemy Eleutério. II. Título.

CDD 631.8

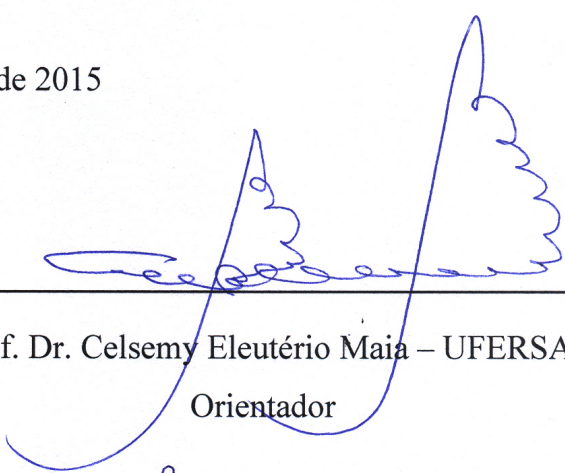
Bibliotecária: Marciele Oliveira de Souza
CRB 15/521

MARIA VALDETE DA COSTA

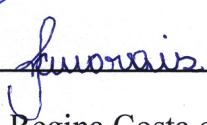
**RECUPERAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO POR PETRÓLEO USANDO
BIOESTIMULAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ecologia e Conservação da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), como parte dos requisitos para obtenção do título de “Mestre em Ecologia e Conservação”.

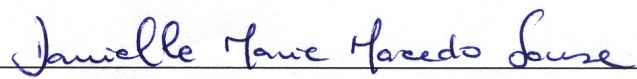
Aprovada em 25 de Março de 2015



Prof. Dr. Celsemy Eleutério Maia – UFERSA
Orientador



Profa. Dra. Elis Regina Costa de Moraes – UFERSA
Examinadora



Profa. Dra. Daniele Marie Macedo Sousa – PNPD/UFERSA
Examinadora

Aos meus pais não é somente respeitá-los, mas também assisti-los nas suas necessidades; proporcionar-lhes o repouso na velhice; cercá-los de solicitude, como eles fizeram por nós na infância.

Allan Kardec

E a Daianni Ariane da Costa Ferreira por nunca ter medido esforços para me ajudar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter derramado a sua graça por toda a minha vida.

Agradeço a toda a minha família nas pessoas da minha mãe, Francisca Maria Soares da Costa, e do meu pai, Antônio Varela da Costa, por terem me ensinado a caminhar pelo caminho da honestidade e da ética cristã.

Agradeço ao professor Celsemy Eleutério Maia, pela valiosa orientação, sendo de fundamental importância para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço a professora Elis Regina Costa de Moraes pelo apoio e por estar disponível sempre que precisei.

Agradeço a professora e amiga Daniele Marie Macedo Sousa por sempre ter me ajudado durante e após a realização da pesquisa.

Agradeço as minhas amigas, em especial a Daianni Ariane da Costa Ferreira, Ana Cecilia Sinclair Marinho, Ana Kaline da Costa Ferreira, Joelma Medeiros Dantas e ao meu amigo Elídio Andrade Barbosa por sempre estarem ao meu lado nessa caminhada.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação da UFERSA pela oportunidade que me foi dada para ingressar no curso.

A biorremediação é uma alternativa ecologicamente correta do ponto de vista da destinação final de resíduos e rejeitos. Mas... Melhor que a biorremediação é a prevenção.

RESUMO

O estudo da recuperação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo surgiu em virtude do grande impacto ambiental decorrente de acidentes envolvendo derrames de petróleo, na extração, transporte em dutos, embarcações e unidades industriais. Ultimamente, o processo de biorremediação tem sido uma alternativa para reduzir ou remediar as contaminações no ambiente provocado pelo petróleo, utilizando a estimulação da microbiota nativo do solo com fertilizantes. Desta forma, objetivou-se avaliar a capacidade de biorremediação de solo contaminado com compostos oleosos, utilizando a técnica de bioestimulação como uma alternativa capaz de tratar adequadamente as contaminações em solos decorrentes de derrames de petróleo. O solo foi contaminado com petróleo em doses crescentes de 0, 1, 3, 5 e 10 % (p/p) e bioestimulado com NPK em uma única carga no início do experimento em níveis de concentração de 0, 250, 500, 1250 e 2500 kg ha⁻¹. Os experimentos foram realizados durante 105 dias e a cada 7 dias determinada a produção de C-CO₂. Quanto à melhores resultados para produção de C-CO₂, obteve-se o valor de 3.539,40 mg kg⁻¹ para as doses de 9,20 % de petróleo e de 2.435 kg ha⁻¹ para o NPK.

Palavras-chave: Biorremediação. Fertilizantes. Nutrientes. NPK.

ABSTRACT

The study of areas contaminated by petroleum hydrocarbons recovery arose due to the large environmental impacts from accidents involving oil spills, in the extraction, transport in pipelines, vessels and industrial units. Lately, the bioremediation process has been an alternative to reduce or remedy contamination caused by oil in the environment using the stimulation of native soil microbial fertilizer. Thus, the objective was to evaluate the ability of bioremediation of soil contaminated with oily compounds using biostimulation technique as an alternative capable of adequately handling the contamination in soils resulting from oil spills. The soil was contaminated with oil in increasing doses of 0, 1, 3, 5 and 10 % (w / w) and NPK biostimulation in a single charge at the start of the experiment at concentration levels of 0, 250, 500, 1250 and 2500 kg ha⁻¹. The experiments were performed for 105 days and every 7 days determined the production of C-CO₂. As best results for the production of C-CO₂, gave a value of 3539.40 mg kg⁻¹ at doses of 9.20 % oil and 2435 kg ha⁻¹ for NPK.

Keywords: Bioremediation. Fertilizers. Nutrients. NPK.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química de alguns hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).	6
Figura 2 – Constituição de um solo ideal.	7
Figura 3 – Representação esquemática da rocha (R) e do regolito (tudo o que está acima da rocha). O regolito subdivide-se em saprolito (C) e solum, que, por sua vez, é composto de varias camadas (os horizontes O, A, E e B). Esquema de um perfil.	8
Figura 4 – Mostra o gráfico, pH ideal para que tenha uma atividade biológica máxima.	11
Figura 5 – Mostra a resposta típica de uma população de bactérias em função da variação da temperatura dos solos (modificado de TATE, 1995).	16
Figura 6 – Localização da área de estudo e mapeamento do solo encontrado na região. Imagem Spot (03/2001).	18
Figura 7 – Coleta do Solo.	19
Figura 8 – Produção acumulada de C-CO ₂ em função dos 105 dias com doses crescentes de petróleo e NPK.	23
Figura 9 – Produção acumulada de C-CO ₂ com doses crescentes de petróleo e NPK.	25
Figura 10 – Isoquantas das concentrações acumuladas de C-CO ₂ em função das doses NPK e petróleo.	26
Figura 11 – Doses de NPK em função das doses petróleo.	26
Figura 12 – Concentrações acumuladas de C-CO ₂ em função das doses petróleo.	27
Figura 13 – Concentrações acumuladas de C-CO ₂ em função das doses NPK.	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise elementar do petróleo.	3
Tabela 2 – Classificação do Petróleo segundo o grau API e o Teor de Enxofre.	5
Tabela 3 – Relação do tamanho da partícula e o tipo de solo.	7
Tabela 4 – Características químicas e físicas do solo coletado.	20

LISTA DE APÊNDICE

1 – Análise estatística	41
-------------------------------	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO PETRÓLEO	2
3.2 SOLO.....	6
4. BIORREMEDIAÇÃO.....	10
4.1 TÉCNICAS DE BIORREMEDIAÇÃO <i>EX SITU E IN SITU</i>	12
4.2 PRINCIPAIS BACTÉRIAS UTILIZADAS COMO BIORREMEDIADORAS	14
5. BIODEGRADAÇÃO.....	14
5.1 FATORES QUE INFLUENCIAM A BIODEGRADAÇÃO.....	15
6. RESPIROMETRIA AERÓBIA	17
7. MATERIAL E MÉTODOS	18
7.1 COLETA DO SOLO E CARACTERIZAÇÃO	18
7.2 MONTAGEM DO EXPERIMENTO.....	19
7.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE C-CO ₂	21
8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
9. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
10. CONCLUSÕES.....	29
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1. INTRODUÇÃO

O mundo atual está cada vez mais dependente do petróleo e de seus derivados para a manutenção da atividade industrial, entretanto as atividades de extração, transporte e refinamento de petróleo têm contribuído para a contaminação do solo com petróleo em todo o planeta (LOPES & PIEDADE, 2010). A exploração do petróleo e/ou de seus derivados vem motivando a realização de pesquisas para recuperação destas áreas contaminadas (AISLABIE et al., 2004; MARÍN et al., 2006).

Nas duas últimas décadas, a poluição causada por petróleo e seus derivados tem sido um dos principais problemas do meio ambiente. De acordo com a sua origem, as suas composições químicas e as suas propriedades físicas variam de um campo petrolífero para outro. Devido, principalmente, à complexidade dessa mistura, normalmente os tratamentos de áreas contaminadas por essas substâncias é bastante difícil e problemático. Os compostos que exigem maior preocupação ambiental são os compostos orgânicos, dentre eles os HPAs (Hidrocarbonetos Policiclo Aromáticos) e TPHs (Hidrocarbonetos Totais de Petróleo). Esses compostos são definidos como hidrocarbonetos cujas estruturas moleculares possuem como característica principal a presença do anel benzênico. Eles estão presentes, principalmente em solventes, em combustíveis e são os constituintes mais solúveis. Compostos estes que constituem em um grande problema ambiental, não somente no Brasil, mas em todo o mundo.

Dentre as técnicas desenvolvidas, a "biorremediação" vem se destacando como uma alternativa viável e promissora para o tratamento de solos contaminados por petróleo e seus derivados (DUA et al., 2002; RAHMAN et al., 2002; BENTO et al., 2003). 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). Desde os meados dos anos 80 do século XX, as estratégias de biorremediação têm sido adotadas como uma maneira eficaz e de custo baixo para o tratamento de solos contaminados com petróleo (DELFINO & MILES, 1985; TSAO et al., 1998; VAN DER HOEK et al., 1989). As diferentes estratégias de biorremediação, em geral, visam aumentar a população microbiana criando condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento (SILVA et al., 2004).

A bioestimulação é uma opção de biorremediação *in situ* na qual se busca, especialmente, estimular o crescimento da população microbiana nativa. Isto ocorre, fundamentalmente, pelo condicionamento do habitat natural desses microrganismos. Portanto,

a ideia fundamental é condicionar o local contaminado, de modo a acelerar o processo de atenuação natural, estimulando, sobretudo, o desenvolvimento dos microrganismos. Para que esta técnica de biorremediação seja utilizada de forma eficiente, o primeiro requisito a ser atendido é a necessidade dos microrganismos apresentarem a capacidade de descontaminar o poluente alvo. Neste contexto, a bioestimulação pode oferecer custo mais baixo em relação às demais técnicas de biorremediação (EPA, 2004).

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a degradação de petróleo bioestimulada com nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) como alternativa capaz de tratar adequadamente as contaminações de solo decorrente de derrames de material oleoso.

Objetivos Específicos

1. Estimar a produção de C-CO₂ utilizando o respirômetro de Bartha (adaptado) durante a recuperação do solo contaminado artificialmente por diferentes concentrações de hidrocarbonetos de petróleo e bioestimulado com doses crescente de nitrogênio, fósforo e potássio (NPK);
2. Avaliar as melhores doses de NPK para recuperar o solo contaminado por petróleo frente à técnica de bioestimulação.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO PETRÓLEO

O petróleo é uma mistura líquida complexa constituída por um vasto número de compostos de hidrocarbonetos, que consistem principalmente de carbono e hidrogênio em proporções diferentes, a composição do petróleo, em base elementar, incide dentro de certos limites, independentes da sua origem (FAHIM & MOHAMED, 2012).

O petróleo é um líquido escuro acastanhado, de consistência oleosa, de cheiro desagradável e coloração que pode variar do preto ao castanho, originando-se da decomposição de animais e vegetais marinhos soterrados em desabamentos da crosta terrestre em épocas remotas. Alguns podem 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).

Um estudo realizado pelo American Petroleum Institute concluiu que todos os tipos de petróleos contêm substancialmente os mesmos hidrocarbonetos, mas em quantidades diferentes (Tabela 1).

Tabela 1 – Análise elementar do petróleo.

Elemento	% (em peso)
Hidrogênio	11 a 14
Carbono	83 a 87
Enxofre	0,06 a 8
Nitrogênio	0,11 a 1,7
Oxigênio	0,1 a 2
Metais	Até 0,3

Fonte: THOMAS, 2005.

Na norma técnica Standard Terminology Relating to Petroleum Products, and Lubricants – D 4175 09, a American Society for testing and Materials – ASTM – apresenta a seguinte definição para o petróleo:

“Uma mistura de hidrocarbonetos de ocorrência natural, geralmente em estado líquido, que também pode incluir compostos de enxofre, nitrogênio, oxigênio, metais e outros elementos”.

Conforme dito acima, o petróleo não é uma substância pura, pelo contrario, é constituído por uma grande quantidade de substâncias, onde predominam de forma significativa moléculas formadas somente pelos dois elementos químicos carbono e hidrogênio: os Hidrocarbonetos. Os hidrocarbonetos são substâncias compostas somente por átomos de carbono (C) e de hidrogênio (H), formando diversos tipos de moléculas. A

classificação do petróleo depende basicamente das características da rocha reservatório e do processo de formação. O petróleo classifica-se em:

- Hidrocarbonetos saturados, que contêm apenas ligações simples carbono-carbono e são conhecidos como parafinas (ou ciclo alcanos), se forem cíclicos;
- Hidrocarbonetos insaturados, que contêm apenas ligações múltiplas carbono-carbono (duplas, triplas ou ambas) e são insaturados, porque contêm menos hidrogênio por carbono do que parafinas. Hidrocarbonetos insaturados são conhecidos como olefinas, e aqueles que contêm uma ligação dupla carbono-carbono são chamados alcenos, ao passo que são aqueles com ligações triplas carbono-carbono é chamado de alcinos;
- Hidrocarbonetos aromáticos, que são uma classe especial de compostos cíclicos relacionados na estrutura do benzeno.

As principais características de um ‘tipo’ de petróleo são, conforme Martins (2004) a densidade do óleo, o tipo de hidrocarboneto – ou base – predominante na mistura e o teor de enxofre. De acordo com o autor, em relação à densidade, os diferentes tipos de petróleo são classificados segundo uma gradação que vai de leves (menos densos) a pesados (mais densos). De acordo com as normas do *American Petroleum Institute*, essa classificação é conhecida também como “grau API”. Segundo essa classificação, quanto menor a densidade do petróleo, maior o grau API e consequentemente maior o valor comercial do petróleo, tendo em vista que será possível produzir uma parcela maior de derivados nobres, de elevado valor comerciais, como a gasolina, o diesel e o GLP, relativamente a outro tipo de óleo, mais pesado (menor grau API). O grau API é maior quando se diz que o petróleo é mais leve. Petróleos com grau API maior que 32° são considerados leves; entre 24° e 31° API, são médios; abaixo de 23° API, são considerados pesados; e com grau API igual ou inferior a 10° são petróleos extrapesados. O óleo leve (alto grau 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 (PETERS & MOLDOWAN, 1993).

Quanto ao teor de enxofre, o petróleo pode ser classificado como doce ou ácido. São classificados como ácidos os óleos com percentual de enxofre superior a 0,5 %; estes têm seu valor comercial reduzido devido à corrosividade e toxicidade do enxofre, que resultam em maiores custos no processo de refino. A Tabela 2 relaciona a classificação do petróleo de acordo com o teor de enxofre e do grau API.

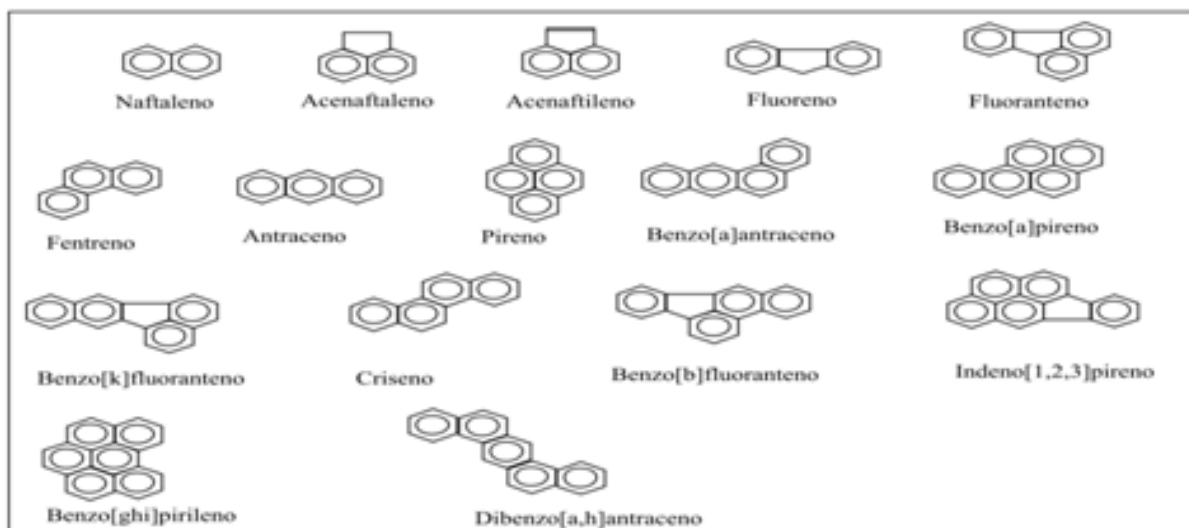
Tabela 2 – Classificação do Petróleo segundo o grau API e o Teor de Enxofre.

Categoria	% Enxofre	Grau API
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.

Os hidrocarbonetos que possuem dois ou mais anéis são denominados policíclicos aromáticos (HPA), estes são considerados os mais tóxicos componentes do petróleo e estão associados a efeitos carcinogênicos. Muitos dos HPAs de baixo peso molecular são solúveis em água, aumentando o risco de contaminação, e são os poluentes que mais preocupam tratando-se de poluição ambiental. O benzo (a) pireno, o mais extensivamente HPA estudado, têm sido demonstrado que produz metabólitos cancerígenos quando agem nas enzimas do corpo. Outra preocupação crescente é a contaminação do solo por HPA, que segue para águas subterrâneas, cuja contaminação é associada a uma grande gama e locais contaminados por substâncias perigosas (HAIMAM, 1995). Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, ainda são produzidos hoje por processos industriais da refinação de petróleo, produção de coque e estação de tratamento de esgotos na indústria petrolífera (CUTRIGHT & LEE, 1994). A estrutura dos HPAs tem efeito significativo sobre a biodegradação, uma vez que compostos com menores números de anéis aromáticos, como antraceno, fenantreno e pireno, são mais rapidamente degradados do que criseno, pirileno e 1,2 benzantraceno, que possuem maior número de anéis (ALAN & FERREK, 1993; ALEXANDER, 1994; LIEBEG & CUTRIGHT, 1999). A estrutura química de alguns HPAs é mostrada na Figura 1.

Figura 1 – Estrutura química de alguns hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).



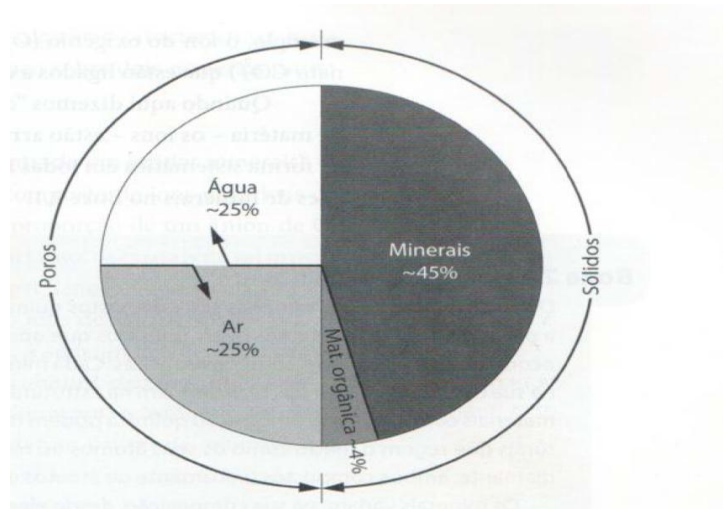
Fonte: GLASER e POTTER, 1996.

O conjunto de hidrocarbonetos presentes em uma amostra de petróleo ou de seus derivados é conhecido como TPH (Total Petroleum Hydrocarbons). Os TPH são definidos como a soma dos compostos alifático e aromáticos (WEISMAN, 1998).

3.2 SOLO

O solo é qualquer material mineral ou orgânico inconsolidado, de origem natural ou artificial, com potencial para o desenvolvimento de plantas (HOLLIS, 1991). Essa camada superficial da crosta terrestre é constituída por três fases: sólida, líquida e gasosa, que são intimamente combinadas. Segundo Rocha et al. (2004), em geral, a fase sólida, que é constituída de formações minerais e de fração orgânica, ocupa em média 50 % do volume total do solo, sendo que ~ 45 % são representados por minerais e ~ 4 % por matéria orgânica. O restante do volume do solo é ocupado por fases líquida e gasosa, representando, cada uma, ~ 25 % do volume total do solo (Figura 2).

Figura 2 – Constituição de um solo ideal.



Fonte: LEPSCH, 2011.

As partículas sólidas minerais do solo são divididas basicamente em três frações texturais que são: argila, silte e areia (PREVEDELLO, 1996). A classificação do solo é uma proporção relativa de diferentes tamanhos de partículas (Tabela 3).

Tabela 3 – Relação do tamanho da partícula e o tipo de solo.

Tipo de solo	Tamanho da partícula (mm)	Meios de observação
Arenoso	2,00 – 0,05	Olhos nus
Silte	0,05 – 0,002	Microscópio
Argiloso	< 0,002	Microscópio eletrônico

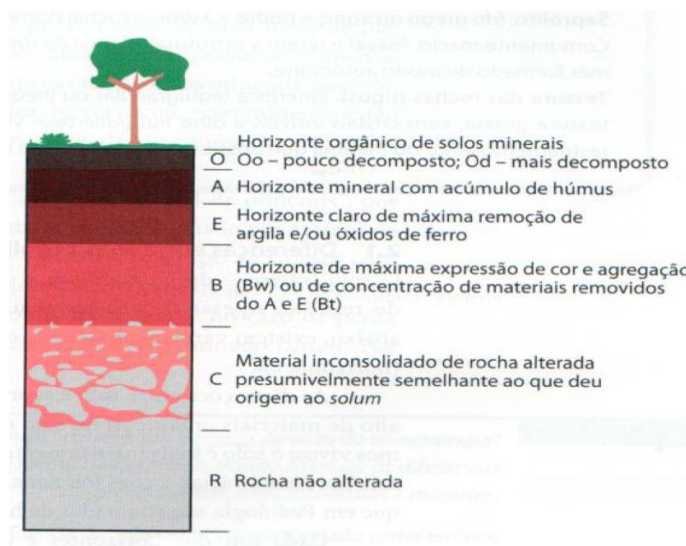
Fonte: PREVEDELLO, 1996.

Essas fases formam a estrutura do solo em camadas denominadas horizontes, sujeitas a constantes transformações antrópicas, através de processos de adição, remoção, translocação de natureza química, física e biológica. Sendo o resultado da interação da ação da atmosfera, hidrosfera, biosfera e litosfera (MENDONÇA, 2010).

O conjunto de horizontes (um corte vertical desde a superfície até o material semelhante ao que deu origem ao solo) chama-se o perfil do solo. As transformações e remoções, ocasionadas pelo intemperismo, ocorrem com maior intensidade na parte superior deste perfil. O perfil de um solo completo e bem desenvolvido possui basicamente quatro

tipos de horizontes, que costumavam ser chamados de “horizontes principais” (Figura 3) e são convencionalmente identificados pelas letras maiúsculas O, A, E, B, C e R (NRCS Soils).

Figura 3 – Representação esquemática da rocha (R) e do regolito (tudo o que está acima da rocha). O regolito subdivide-se em saprolito (C) e solum, que, por sua vez, é composto de varias camadas (os horizontes O, A, E e B). Esquema de um perfil.



Fonte: LEPSCH, 2011.

Assim, esse corpo natural, com uma composição extremamente diversa, interage com uma enormidade de fatores, como o clima, material de origem e sua utilização pelo homem (KABATAS-PENDAIS et al., 1986). O material de origem pode ser modificado pelos processos de formação dos solos, contribuindo para a formação de diferentes camadas, e produzindo uma grande variedade de solo.

A grande variedade de solos proporciona diferentes estruturas, que por sua vez pode implicar na descontaminação dos mesmos. Portanto, determinar a estrutura do solo é imprescindível, pois um grande número de propriedades físicas, processos químicos e biológicos são afetados pelo tamanho, tipo e grau de desenvolvimento dos agregados do solo, implicando também na permeabilidade de água. Por esse motivo, os solos argilosos são menos permeáveis e mais difíceis de serem trabalhados no cultivo das lavouras (LEPSCH, 2011).

O desequilíbrio ambiental, também pode ser ocasionado pelo aumento da atividade industrial, junto com essas atividades cresce também os riscos ambientais, em especial os

acidentes ambientais, que podem causar grandes contaminações de solo e água gerando problemas sociais e de saúde pública (DAL FORNO, 2006). Portanto, com um aumento populacional, tornou-se necessário pensar em práticas sustentáveis para preservar os recursos naturais do planeta e manter os seres humanos em harmonia com o meio. Entre as medidas de conservação, estão aquelas que visam ter efeitos positivos na qualidade do solo, permitindo produções de alimentos maiores na mesma área e por mais tempo.

Ocorrendo uma contaminação do solo, a microbiota é afetada imediatamente, sendo assim, parâmetros como pH, matéria orgânica, teor de argila e manejo de colheita, devem ser fiscalizados. Portanto, estudar tais parâmetros pode ser útil na avaliação da resiliência microbiológica de diferentes solos e a sua capacidade potencial em relação não só a degradação, mas também a volatilização e adsorção de hidrocarbonetos na matriz organomineral (FRANCO et al., 2004). Valores extremos de pH são inibitórios para a grande maioria dos processos microbianos de degradação (MORAIS, 2005). Além de estar diretamente relacionada ao metabolismo dos microrganismos, a alteração de pH pode influenciar a solubilidade dos contaminantes em água como também a intensidade da sorção destes no solo (TRINDADE, 2002). A matéria orgânica do solo influencia na sustentabilidade agrícola de agroecossistema, pois o manejo eficiente da matéria orgânica do solo constitui o método mais efetivo para melhorar a qualidade do solo (USDA-NRCS, 2011). A matéria orgânica é considerada um dos indicadores mais importantes de qualidade do solo, pois interage com o solo afetando a capacidade de troca catiônica pela geração de cargas do material orgânico humificado aumentando a disponibilidade de nutriente às plantas (BRONICK & LAL, 2005).

Trindade (2002) observou uma grande dificuldade na recuperação de solos impactados por petróleo e/ou seus derivados quando estes apresentam características argilosas. Solos com uma baixa permeabilidade, por exemplo, são difíceis de aerar, e frequentemente formam aglomerados, tornando difícil a distribuição de umidade, ar, adição de nutrientes e de microrganismos. Assim, materiais de baixa densidade, ou agentes estruturantes, são adicionados ao solo para reduzir a sua densidade, aumentar a porosidade e a possibilidade de aumentar a difusão de oxigênio.

Os tratamentos físicos envolvem a separação das fases do solo e contaminante, é utilizada na remediação de solos não saturados contaminados com compostos orgânicos voláteis e semivoláteis. Os tratamentos químicos se baseiam nas diferenças das propriedades

químicas dos diversos componentes dos contaminantes e envolvem, geralmente, uma ou mais das reações químicas de neutralização, fotólise e/ou oxi-redução (MARIANO, 2005). O tratamento biológico, ao contrário dos processos físicos e químicos, é considerado um método seguro, eficiente e de menor custo a ser aplicado na remediação de solos contaminados por compostos orgânicos (TRINDADE, 2002; D'ANNIBALE et al., 2006).

No tratamento biológico de solos contaminados por petróleo, os microrganismos, sendo as bactérias as mais estudadas, utilizam os hidrocarbonetos, principais constituintes do contaminante, como fonte de carbono e energia alternativa para formação de biomassa (HIGGINS & BURNS apud MORAIS, 2005). O tratamento biológico é menos agressivo ao meio ambiente, é mais seguro e com custo relativamente baixo, quando comparados aos processos físico-químicos. Além de empregar seus esforços em aperfeiçoar o processo natural existente nos solos contaminados, sendo conhecido como biorremediação (MARTINS et al., 2003; BRITO et al., 2004; MOLINA-BARAHONA et al., 2004; D'ANNIBALE et al., 2006).

4. BIORREMEDIAÇÃO

A técnica de biorremediação consiste na utilização de microrganismos com o objetivo de degradar compostos tóxicos transformando-os em produtos neutros que não irão agredir o meio ambiente (MESQUISTA, 2004). Vêm sendo amplamente estudadas e utilizadas para remediação de ambientes contaminados com substâncias orgânicas e têm como pré-requisito básico o aumento da eficiência da remoção natural feita pelos microrganismos (CHAGAS-SPINELLI, 2007). O emprego da biorremediação na recuperação de ambientes contaminados iniciou-se em 1988, quando cientistas utilizaram microrganismos para tratar o solo contra poluentes e lixos tóxicos (TORTORA, 2005). As técnicas de biorremediação podem ser executadas tanto *ex situ* como *in situ*. Nos processos *ex situ* o meio é extraído e tratado em instalação de depuração específica. Já nos processos *in situ*, a biorremediação é feita no próprio local de contaminação (SEABRA, 2001). Portanto, 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 (MARIANO, 2006).

O princípio básico desta tecnologia baseia-se no potencial apresentado pelos microrganismos, para degradar, modificar ou remediar substâncias tóxicas. Hidrocarbonetos

aromáticos derivados do petróleo, presentes na natureza ou incorporados como compostos xenobióticos, podem ser degradados pelos microrganismos através de rotas catabólicas específicas (CUNHA et al., 2008).

Muitos ambientes contaminados por hidrocarbonetos são anóxicos, como os aquíferos, sedimentos aquáticos e solos submersos. Em tais condições, a biodegradação é realizada por microrganismos anaeróbicos estritos ou facultativos, utilizando aceptores de elétrons como o nitrato (desnitrificantes), sulfato redutores, redutores de Fe^{3+} , CO_2 (organismos metanogênicos), ou outros aceptores (Mn, Cr, U, etc.) (CHAKRABORTY & COATES, 2004; FOGHT, 2008).

A biorremediação também pode ser limitada, isso ocorre se as condições do solo não forem favoráveis à sobrevivência e à atividade dos microrganismos degradadores. O fator ambiental mais crítico na biodegradação, é a umidade do solo, pois uma alta atividade microbiana somente ocorrerá se houver adequada disponibilidade de água aos microrganismos. Além disso, o teor de água no solo tem relação inversa com a disponibilidade de oxigênio e, conseqüentemente, com a atividade dos microrganismos aeróbios, que são os principais responsáveis pela degradação dos HAPs. Alguns fatores afetam o processo de biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos, como por exemplo, a temperatura, concentração de oxigênio, teor de umidade, pH e nutrientes. Em temperaturas baixas, hidrocarbonetos líquidos se transformam em parafinas sólidas, hidrocarbonetos solúveis precipitam e ocorre uma queda considerável na solubilidade destes compostos, afetando as taxas de degradação dos hidrocarbonetos contaminantes (BANERJI et al., 1995).

Em relação ao teor de umidade, durante o processo de biorremediação de solos contaminados, esse teor deve ser mantido entre 50-80 % da capacidade de campo do solo para que taxas ótimas de degradação sejam obtidas (DEUEL & HOLLDAY, 1997). Condições aeróbias são necessárias para que ocorra a biodegradação relativamente rápida de petróleo, pois o oxigênio é utilizado pelos microrganismos não só comoceptor final de elétrons na respiração aeróbia, mas como substrato nas reações biodegradativas catalisadas pela enzima oxigenase (BANERJI et al., 1995). Os organismos aeróbios envolvidos no processo de biorremediação de solos contaminados por petróleo utilizam o oxigênio como oceptor final de elétrons e o carbono orgânico, proveniente dos contaminantes, como fonte de carbono.

Nitrogênio e fósforo são, por sua vez, os principais nutrientes inorgânicos adicionados, se necessário, durante os processos de biorremediação (RIZZO, 2008).

4.1 TÉCNICAS DE BIORREMEDIAÇÃO *EX SITU* E *IN SITU*

A bioaugmentação consiste na adição de culturas bacterianas com comprovada atividade degradadora dos poluentes a um local. Esta técnica pode ser utilizada tanto *in situ* quanto *ex situ*, sendo particularmente importante para tratamentos *in situ*, quando não há populações microbianas indígenas capazes de degradar o contaminante (MARIANO et al., 2007; YAKUBU, 2007; FOGHT, 2008). A utilização da bioaugmentação em solos, basicamente, é justificada pela necessidade de uma biodegradação rápida do composto poluente e da redução do período de adaptação que normalmente antecede o processo de degradação pelos microrganismos autóctones.

A bioventilação é normalmente utilizada para o tratamento de solos contaminados e baseia-se na introdução de oxigênio no substrato para estimular a atividade dos microrganismos aeróbios, podendo ser aplicada *in situ* ou *ex situ*, de acordo com o local a ser tratado (BOOPATHY, 2000).

O sistema de landfarming é aplicado para o tratamento da fase sólida de solos contaminados e pode ser realizado *in situ* ou *ex situ* (BOOPATHY, 2000). Nesta técnica, os microrganismos da camada superficial do solo são estimulados a degradar os poluentes transformando-os em substâncias inertes como CO₂ e água, por meio do revolvimento do solo e uso de aração, além da adição de nutrientes e, se necessário, de irrigação, bioaugmentação e surfactantes (DOELMAN & BREEDVELK, 1999 citado em JACQUES et al., 2007; JORGENSEN et al., 2000).

A compostagem é outro processo de descontaminação de solos, realizado por microrganismos aeróbios *ex situ*. No emprego desta técnica, o substrato contaminado é removido do local de origem e colocado em pilhas, com ou sem aeração, controlando-se a lixiviação e o escoamento superficial dos líquidos provenientes dessas pilhas (JORGENSEN et al., 2000; JACQUES et al., 2007).

A fitorremediação é uma estratégia na qual se utiliza sistema vegetal e a sua microbiota visando à aceleração do processo de degradação. As plantas podem atuar sobre diversos tipos de contaminantes (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

A fitorremediação de áreas poluídas é bastante útil para o meio ambiente devido à utilização de plantas específicas, no intuito de amenizar ou até mesmo despoluir totalmente áreas contaminadas (COUTINHO et al., 2007). Porém, a eficiência desta técnica é obtida utilizando-se plantas que possuam determinadas características como uma boa capacidade de absorção, sistema radicular profundo, acelerada taxa de crescimento, fácil colheita e que apresentem uma grande resistência ao poluente (COUTINHO et al., 2007). Estudando a fitorremediação de solo contaminado por herbicida, Santos et al. (2006) utilizaram diferentes densidades de feijão-de-porco, por apresentar as características necessárias como espécie remediadora, além de servir como adubo verde, os autores concluíram que houve eficiente remediação do solo com densidade populacional mínima de 20 plantas m², e ainda que, a maior densidade populacional de plantas em uma determinada área pode proporcionar maior volume de raízes e de solo explorado o que resulta em um incremento da absorção e degradação. No entanto, a desvantagem dessa técnica é a dependência do ciclo vital da planta, dificultando a visualização dos resultados e também o fato de possivelmente fazer parte da cadeia alimentar, aumentando os danos ambientais. Apresenta também a dificuldade de utilização em alguns tipos de solos contaminados com grande mistura de compostos químicos, onde há uma dificuldade em selecionar uma planta resistente para este conjunto de substâncias (COUTINHO et al., 2007).

A bioestimulação é uma técnica realizada onde a microbiota nativa do local, otimizando suas condições de crescimento por meio da adição de nutrientes orgânicos e inorgânicos, regulação de pH, temperatura e aeração (MANDRI & LIN, 2007; MARIANO et al., 2007; YAHUBU, 2007; FOGHT, 2008; ANDRADE, 2010). Esta técnica também pode ser realizada tanto *in situ* quanto *ex situ*. Para que esta técnica de biorremediação seja utilizada de forma eficiente, o primeiro requisito a ser atendido é a necessidade dos microrganismos nativos apresentarem a capacidade de descontaminar o poluente alvo. Quando utilizada de forma controlada, é capaz de acelerar o processo natural e diminuir o tempo de biorremediação do local. A otimização das condições ambientais permitem aumentar a taxa de crescimento e as atividades metabólicas dos microrganismos, com o consequente aumento da velocidade e da porcentagem de biodegradação (ANDRADE, 2010). O bioestímulo consiste na adição de nutrientes (nitrogênio, fósforo e potássio) para aumentar a atividade microbiana e a eficácia do processo. O nitrogênio pode ser utilizado para o crescimento celular (NH₄ ou NH₃) e como aceitor final de elétrons (NO₃), podendo ser adicionado na forma de uréia,

cloreto de amônio ou como qualquer sal de amônio. O fósforo pode ser empregado como fosfato de sódio, fosfato de potássio, sais orto fosfóricos e polifosfatos. Essas fontes são facilmente assimiladas pelo metabolismo microbiano, estimulando a biodegradação dos contaminantes (LIEBEG & CUTRIGHT, 1999).

4.2 PRINCIPAIS BACTÉRIAS UTILIZADAS COMO BIORREMEIADORAS

Dentre as bactérias mais utilizadas atualmente como biorremediadores, estão às espécies do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus*. As *Pseudomonas*, são capazes de degradar petróleo para suas necessidades de carbono e energia, na presença de oxigênio, metabolizam dois carbonos de cada vez de uma molécula grande de petróleo (TORTORA et al., 2005). A cepa bacteriana da espécie *Pseudomonas putida*, foi a primeira a ser geneticamente construída e patenteada para esta finalidade. A *P. putida* apresenta a capacidade de metabolizar quatro hidrocarbonetos de petróleo bruto: cânfora, octano, xileno e naftaleno (PELEZAR JR., 1997). Por outro lado, Mariano et al. (2007) identificaram as bactéria gram-positivas *Staphylococcus hominis* e *Kocuria palustres*, em solos contaminados por hidrocarbonetos. Já em relação aos gêneros bacterianos mais importantes envolvidos na degradação de hidrocarbonetos de petróleo tanto em ambientes terrestres como em ambientes marinhos, de acordo com Laehy & Colwell (1990) são: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Bacillus*, *Flavo bacterium*, *Nocardia* e *Pseudomonas spp*. Já o gênero *Vibrio spp*, degrada hidrocarbonetos, exclusivamente, em ambientes marinhos.

5. BIODEGRADAÇÃO

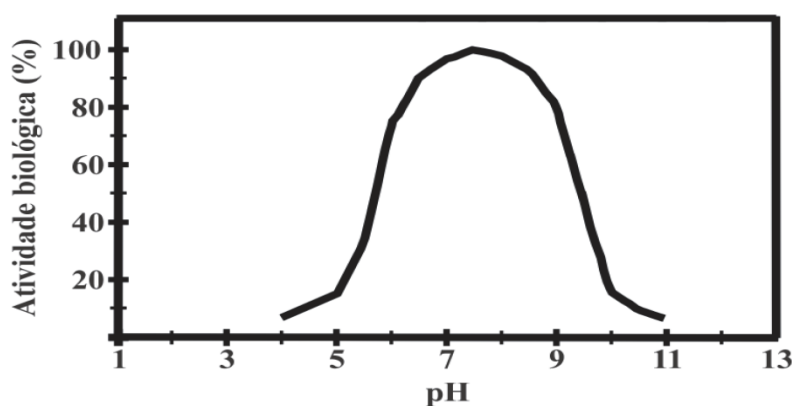
A biodegradação pode ainda, ser limitada pela incapacidade dos microrganismos nativos em metabolizar os poluentes ou por condições ambientais desfavoráveis à sobrevivência e atividade dos microrganismos degradadores (JOHNSEN et al., 2005; JACQUES et al., 2007). A produção de metabólitos tóxicos, repressão de enzimas, presença de substratos preferenciais, e a falta de substratos indutores podem, também, ser considerados como fatores limitantes (BOOPATHY, 2000; VAN HAMME et al., 2003; JACQUES et al., 2007).

5.1 FATORES QUE INFLUENCIAM A BIODEGRADAÇÃO

- pH

O pH é um fator químico que afeta diretamente a atividade microbiana, devido aos efeitos dos íons H^+ 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 (JACQUES et al., 2007). Segundo Jacques (2010) a faixa ideal de pH para que os microrganismos tenham atividade máxima é entre 6,5 e 8,5 e ideal mesmo que seja próximo da neutralidade (Figura 4).

Figura 4 – Mostra o gráfico, pH ideal para que tenha uma atividade biológica máxima.



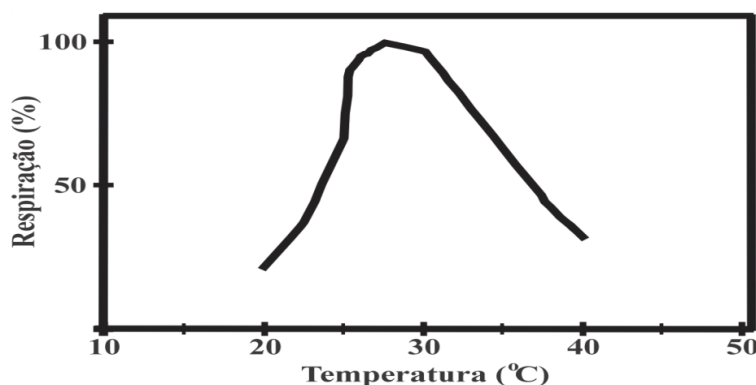
Fonte: JACQUES, 2010.

- Temperatura

A temperatura é um fator físico que influencia o consumo de substrato pela microbiota, sua atividade metabólica, e por consequência, a biodegradação dos HAPs (HAIDER, 1999). De acordo com Leahy & Colwell (1990), baixas temperaturas limitam a degradação destes poluentes, uma vez que o metabolismo microbiano diminui e a viscosidade dos HAPs aumenta nestas condições. Em contrapartida, em altas temperaturas, a toxicidade destes compostos aumenta. Assim, a degradação dos HAPs é melhorada na faixa de temperatura entre 30 e 40 °C, diminuindo a viscosidade dos compostos e aumentando o metabolismo microbiano. A faixa de temperatura ideal (Figura 5) para os microrganismos

metabolizarem os contaminantes com eficiência ótima está entre 25 e 30 °C, na qual se encontra a temperatura média da maior parte dos solos do Brasil contendo áreas degradadas por contaminação de hidrocarbonetos do petróleo (TATE, 1995; JACQUES et al., 2010).

Figura 5 – Mostra a resposta típica de uma população de bactérias em função da variação da temperatura dos solos (modificado de TATE, 1995).



Fonte: JACQUES, 2010.

- Umidade

A umidade é considerada por Haider (1999), o fator ambiental mais crítico na biodegradação no solo, uma vez que uma atividade microbiana elevada ocorre apenas com disponibilidade de água adequada. Entretanto, o teor de água no substrato tem relação inversa com a disponibilidade de oxigênio, ou seja, um alto teor de água resulta em baixa concentração de O₂, causando prejuízos diretos à atividade dos microrganismos aeróbios, que são importantes agentes na degradação dos HAPs (LEAHY & COLWELL, 1990; JACQUES et al., 2007). No entanto, em condições de hipóxia ou anoxia, as bactérias anaeróbicas ou aeróbicas facultativas se tornam dominantes na comunidade microbiana devido à sua capacidade de usar aceptores de elétrons alternativos em substituição ao oxigênio (JOHNSEN et al., 2005; CAMEOTRA & SINGH, 2009).

- Matéria orgânica

A matéria orgânica consiste na fonte de carbono e energia para os microrganismos, ou seja, um alto teor de matéria orgânica está associado a uma maior abundância e diversidade

microbiana. Níveis mais baixos de matéria orgânica, normalmente, relacionam-se com uma menor abundância bacteriana (BOOPATHY, 2000). Em contrapartida, uma grande quantidade de matéria orgânica, está normalmente relacionada a substratos de partículas finas, que propiciam a sorção dos HAPs, em virtude da baixa solubilidade em água e às partículas sólidas, sua biodisponibilidade aos microrganismos degradadores é reduzida.

6. RESPIROMETRIA AERÓBIA

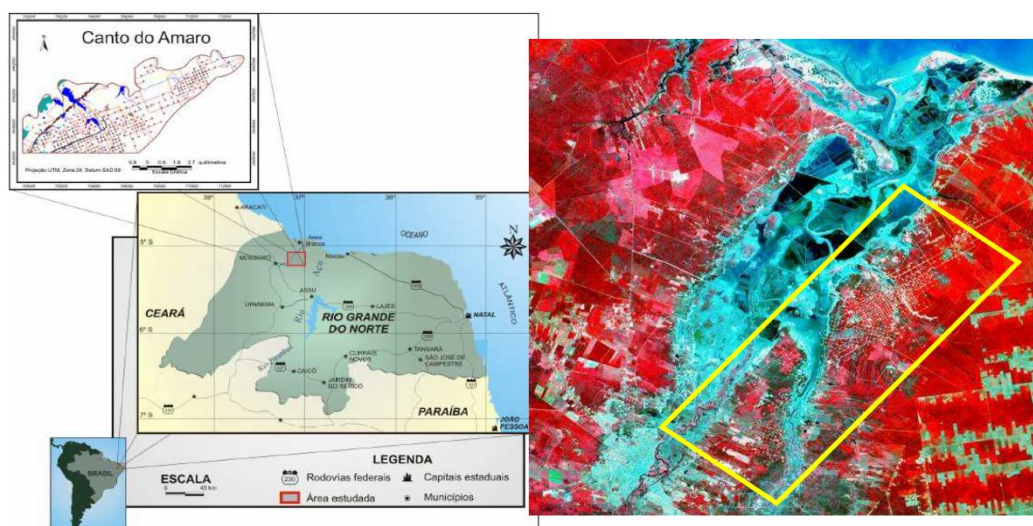
A respirometria é uma metodologia bastante adequada à quantificação da atividade biológica aeróbia, a qual determina a velocidade de respiração de uma biomassa ativa. A NBR 14.283 especifica o método respirométrico de Bartha para determinação do índice de biodegradação da matéria orgânica contida em resíduos a serem tratados em solos. Por meio desse método é possível avaliar a tratabilidade de resíduos em solos e inferir as condições de manejo de sistema de tratamento de resíduos em solo. O método respirométrico de Bartha, adaptado de uma norma holandesa, é um método simples e economicamente viável para determinar a atividade microbiológica pela geração de gás carbônico e, indiretamente, a biodegradação de contaminantes orgânicos no solo.

O oxigênio pode ser fornecido sem fluxo de ar, com retenção passiva de CO₂, e com fluxo de ar, contínuo ou intermitente, pelo sistema chamado de aeração forçada. O primeiro processo é de simples utilização, principalmente quando se tem um grande número de tratamentos envolvidos, porém pode se tornar limitado em ensaios prolongados (CALDEIRA, 1997). Os métodos utilizados para a determinação da eficiência de biodegradação baseiam-se na medição de CO₂ gerado no processo de biodegradação e construção de uma curva da massa acumulada desse CO₂ em função do tempo, que deverão apresentar fases distintas, tais como: início da curva com baixíssima inclinação, que deverá corresponder à fase de adaptação dos microrganismos, seguida de um elevado crescimento exponencial, uma vez que nesta fase estará ocorrendo elevada atividade microbiana e, por fim, a formação de um patamar, onde a eficiência da biodegradação é drasticamente reduzida (BORGES, 2006).

7. MATERIAL E MÉTODOS

A área de coleta está localizada no campo de extração de petróleo de Canto do Amaro, pertencente ao município de Mossoró-RN, recobre parte da zona oeste da Bacia Potiguar (no continente), situada na região noroeste do estado do Rio Grande do Norte (Figura 6). Possui uma área total de aproximadamente 250 km², sendo o maior campo de produção de petróleo em terra no país. O petróleo encontrado nessa região apresenta classificação como base parafínica, grau API variando entre 28 e 44 °C a depender da zona produtora segundo Petta et al. (2007).

Figura 6 – Localização da área de coleta e mapeamento do solo encontrado na região. Imagem Spot (03/2001).



Fonte: PETTA, 2007.

7.1 COLETA DO SOLO E CARACTERIZAÇÃO

O solo foi coletado no mês de agosto de 2014. Inicialmente realizou-se a limpeza da área com auxílio de uma pá, em seguida amostras simples foram coletadas iniciando do topo até uma profundidade 15 cm (Figura 7). As amostras foram acondicionadas em sacos de plásticos limpos e levadas ao Laboratório de Hidrogeoquímica Ambiental, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), no Departamento de Ciências Ambientais e Tecnológicas.

Posteriormente o solo seco ao ar foi homogeneizado, passado em peneira com malha de 2 mm de abertura para remover restos de material vegetal e diminuir grandes torrões de terra, melhorando assim sua homogeneidade. Em seguida, o solo peneirado foi retirado amostras para caracterização física e química (Tabela 4), segundo a metodologia recomendada por EMBRAPA (2009).

A caracterização física consistiu da análise granulométrica. Para a caracterização química foram determinados o pH, pela relação solo: água 1:2,5; Fósforo (P), Carbono (C), Cálcio (Ca^{2+}), Magnésio (Mg^{2+}), Sódio (Na^+), Potássio (K^+), Alumínio + Hidrogênio (Al + H), Alumínio (Al^{3+}).

Figura 7 – Coleta do Solo.



Fonte: AUTORA, 2014.

7.2 MONTAGEM DO EXPERIMENTO

Foram pesados 2000 g de solo para cada dose de petróleo 0, 20, 60, 100 e 200 g, que correspondem 0, 1, 3, 5 e 10 % (p/p), para elevar o pH entre 6,5 a 7,0 adicionou-se 3,5 ml da solução NaOH 0,25 M e homogeneizou. Com o solo contaminado pesou-se 100 g, acondicionou em potes de vidro com tampa de rosca, hermeticamente fechados e com capacidade de $0,6 \text{ dm}^{-3}$ cada. As doses de fertilizantes (NPK) foram equivalentes a 0, 250, 500, 1250 e 2500 kg ha^{-1} , respectivamente. Segundo Quideau et al. (2012), a dose recomendada seria de 250 kg ha^{-1} de 10:30:20 (NPK). Para isto, preparou-se uma solução

concentrada de (NPK), como fonte de Nitrogênio usou uréia, de Fósforo MAP (monofosfato de amônio) e para potássio, Cloreto de potássio. Em seguida efetuaram-se as diluições com as respectivas concentrações, e desta solução adicionaram-se 10 ml em todos os tratamentos.

Em cada parcela foi adicionada 20 ml de solução de NaOH 0,5 M em copo de polietileno de 50 ml para capturar o CO₂ produzido pela biorremediação.

O experimento foi conduzido no período de agosto a dezembro de 2014, sendo os tratamentos distribuídos em blocos casualizado, esquema fatorial 5 x 5, sendo 5 doses de petróleo e 5 de NPK, com 3 repetições, perfazendo um total de 75 parcelas. O experimento foi montado em temperatura ambiente e acompanhado diariamente, com a temperatura variando de 31,9 a 34,3 °C.

Tabela 4 – Características químicas e físicas do solo coletado.

Característica	Resultado	Unidade
pH (Água)	5,53	Adimensional
CE	0,08	dS m ⁻¹
Matéria orgânica	13,40	g kg ⁻¹
P	2,7	mg dm ⁻³
K	47,5	mg dm ⁻³
Na ⁺	49,5	mg dm ⁻³
Ca ⁺²	1,70	cmol _c dm ⁻³
Mg ²⁺	0,40	cmol _c dm ⁻³
Al ³⁺	0,05	cmol _c dm ⁻³
H+Al	2,3	cmol _c dm ⁻³
SB	2,44	cmol _c dm ⁻³
t	2,49	cmol _c dm ⁻³
CTC	4,83	cmol _c dm ⁻³
V	50	%
Saturação por Al ⁺³ (m)	2	%
PST	4	%
Silte	0,07	kg kg ⁻¹
Areia	0,85	kg kg ⁻¹
Argila	0,08	kg kg ⁻¹

Fonte: AUTORA, 2014.

7.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE C-CO₂

A avaliação foi realizada semanalmente, os frascos foram abertos, em seguida retirada a solução de NaOH 0,5 M era adicionado 1 ml de BaCl₂ 1 M, e titulada com HCl 0,5 M padronizado, utilizando fenolftaleína como indicador. Antes do fechamento dos frascos, o solo era mecanicamente revolvido para promover sua aeração. Sendo a produção de C-CO₂ expressa em kg de solo seco, quantificada através da fórmula de Stotzky (1965):

$$\text{C-CO}_2 \text{ (mg kg}^{-1} \text{ solo)} = (B - T) \times \text{eq} \times M \times 10$$

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.

8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos resultados foram determinadas as interações e influências significativas de cada variável, utilizando os dados obtidos para a confecção de uma superfície de resposta para a visualização de seus efeitos por meio das curvaturas e isolinhas de contorno obtidas. Para a determinação de tais análises foi utilizado o *software Statistica* 9.1.

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando a produção de C-CO₂, observa-se que os valores obtidos na ausência do petróleo variaram de 353 mg kg⁻¹ a 526 mg kg⁻¹ (Figura 8A). Com a adição das doses de petróleo, esses valores variaram de 1.014 a 1.221 mg kg⁻¹; 1.689 a 2.059 mg kg⁻¹; 1.836 a 2.792 mg kg⁻¹ e 1.377 a 3.525 mg kg⁻¹ para as doses crescentes de petróleo 1, 3, 5 e 10 %, respectivamente (Figuras 8B, 8C, 8D e 8E), evidenciando aumento na biorremediação com o aumento das doses de petróleo e com as doses de NPK, com a dose máxima de petróleo obteve-se a maior produção de C-CO₂ de 3.539,40 mg kg⁻¹ (Figura 8E), devido aos microrganismos utilizarem o petróleo como fonte de carbono, aumentando população microbiana e consequentemente liberando mais C-CO₂. Segundo Alexander (1994), os microrganismos dos solos possuem amplas atividades catabólicas e uma simples maneira de eliminar poluentes orgânicos, consiste na adição dos compostos ou nutrientes no solo para ação da microflora nativa. De acordo com Baptista & Rizzo (2004), o processo natural de um poluente orgânico no solo, sem a adição de nutrientes ou qualquer adequação das condições ambientais, pode ocorrer lentamente devido à adaptação dos microrganismos do solo natural.

De acordo com Spinelli et al. (2005), de maneira geral, uma maior produção de microrganismos corresponde a uma maior evolução de C-CO₂ e a maior degradação dos compostos orgânicos. Esta maior produção de C-CO₂ também foi observada por Colla (2012) ao relatar que diante de condições abióticas adequadas, os microrganismos residentes tiveram seu metabolismo e crescimento estimulados, provocada pela relação direta entre a densidade populacional e a produção de C-CO₂. Os efeitos da atividade microbiana sobre um solo previamente contaminado por petróleo foi verificado por Taccari et al. (2012) e Aleer et al. (2011). A atividade metabólica microbiana nos solos é uma das formas de quantificação do C-CO₂, a técnica fornece importante informação acerca da biodegradação dos compostos oleosos, pois é indicativa do grau de mineralização dos contaminantes presentes no substrato conforme citado por Horel & Schiewer (2009) e verificado a completa degradação dos mesmos por Mariano et al. (2008). No entanto, a quantidade de contaminante degradado pode ser subestimada, caso parte da matéria orgânica degradada seja utilizada na produção de biomassa, ou superestimada, se o C-CO₂ produzido provir da degradação de uma fonte de carbono disponível no solo que não o contaminante (HOREL & SCHIEWER, 2009).

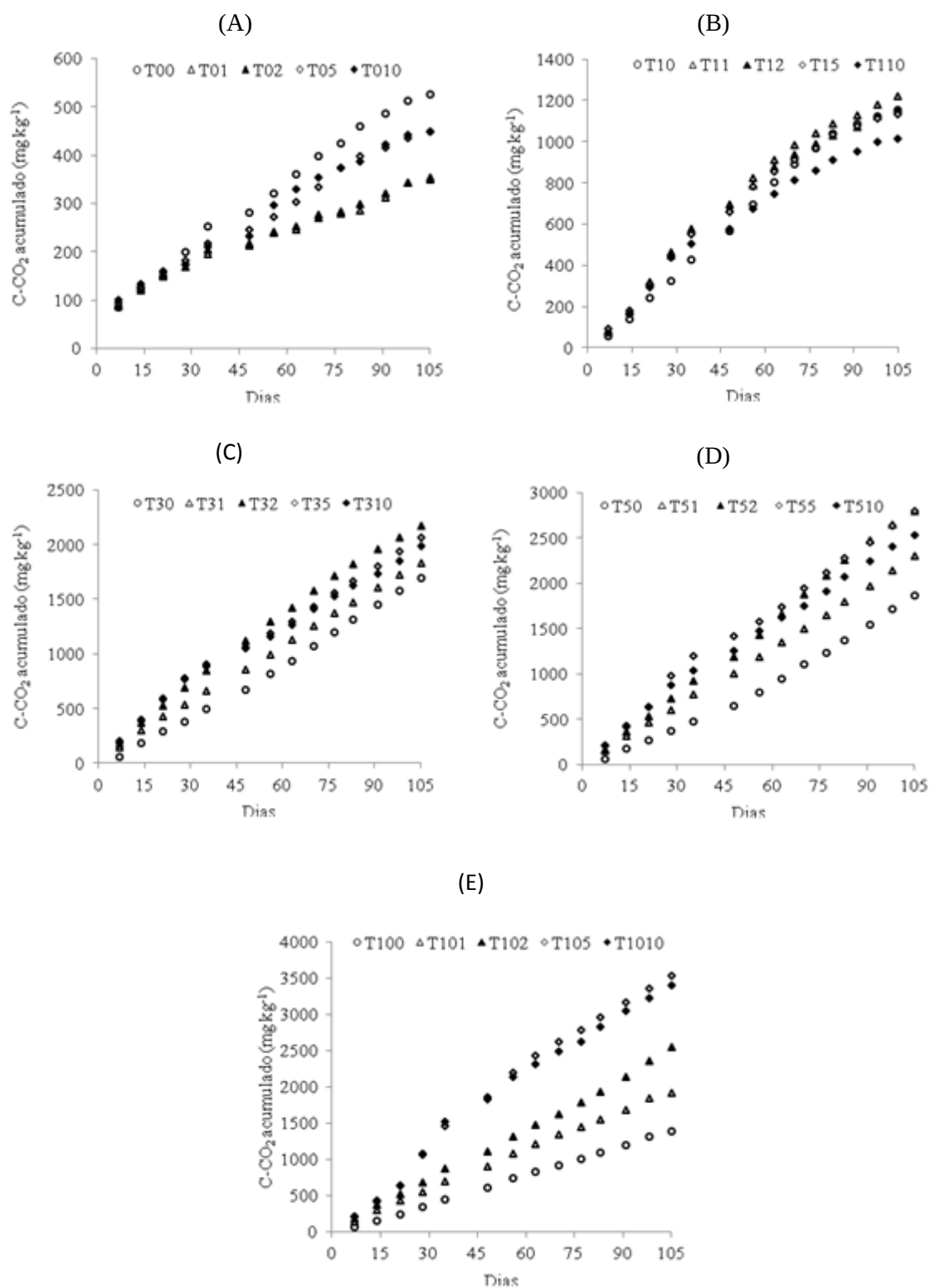


Figura 8 – Produção acumulada de C-CO₂ em função dos 105 dias com doses crescentes de petróleo e NPK. A – (0 % Petróleo + doses de NPK); B – (1% Petróleo +

doses de NPK); C – (3% Petróleo + doses de NPK); D – (5 % Petróleo + doses NPK); E – (10 % Petróleo + doses de NPK).

Evidenciando a maior degradação do petróleo na presença da matéria orgânica do solo. Santos (2007) estudou a atuação da matéria orgânica sobre o aumento da atividade microbiana no solo, incluindo a formação do húmus, nitrificação, entre outros processos, e observou a contribuição da matéria orgânica para as alterações da disponibilidade de nutrientes dos solos, atribuiu estes resultados aos microrganismos presentes no solo a responsabilidade pelas transformações fundamentais na produção do C-CO₂. Schroeder et al. (2002) também verificou no seu trabalho a influência da matéria orgânica sobre os microrganismos do solo.

Pelo ajuste do modelo da superfície de resposta, obteve-se o coeficiente de determinação (R²) igual a 0,9445 (equação 1), verificando que tanto para o NPK quanto para o petróleo, o efeito foi quadrático na produção de C-CO₂, consequentemente maior degradação de petróleo (Figura 9). A maior produção de C-CO₂ foi obtida para as doses de 2.435 kg ha⁻¹ de NPK_{max} e 9,20 % de P_{max}, respectivamente, para uma produção máxima de 3.539,40 mg kg⁻¹ de C-CO₂ (Figura 9). Namkoong et al. (2002) verificaram que a degradação do petróleo estava significativamente relacionada com a respiração microbiana, medida em termos de produção de C-CO₂. Dessa forma, a degradação de petróleo procede mais rapidamente quando submetida a contaminações mais baixas (Li et al., 2007; Silva et al., 2012). Meyer (2011) avaliou a biodegradação das misturas de diesel/biodiesel em solo arenoso sob a estratégia de biorremediação com a atenuação natural, no final dos 60 dias, obteve-se a maior produção de C-CO₂ foi de 3.886,92 mg kg⁻¹. De acordo com Komilis et al. (2010), a degradação do diesel foi estudada via medição indireta da produção de C-CO₂, através da adição de nitrogênio na biorremediação aeróbia de um solo contaminado com diesel em uma concentração inicial de 2 % através do método respirométrico, verificou-se uma faixa de degradação de 0,15 g N/g de diesel ou 1400 mg N/kg de solo.

$$C - CO_2 = 408,98 + 525,36P - 39,34P^2 + 146,49NPK - 17,16NPK^2 + 20,40P.NPK \quad (\text{eq.1})$$

$$R^2 = 0,9445$$

$$CO = 408,9797 + 525,3638 * x + 146,487 * y - 39,3401 * x^2 + 20,3976 * x * y - 17,1581 * y^2$$

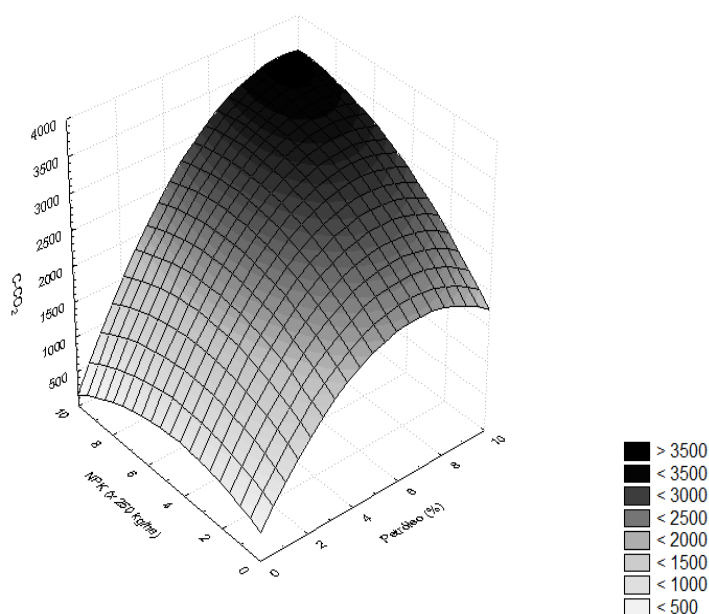


Figura 9 – Produção acumulada de C-CO₂ com doses crescentes de petróleo e NPK.

Capelli et al. (2001) estudaram a biodegradação das frações de hidrocarbonetos presentes em resíduos oleosos provenientes do refinamento do petróleo e observaram que os compostos saturados e aromáticos foram reduzidos em 70 e 60 % respectivamente. Baptista (2003) verificou que a degradação de petróleo está relacionada com a produção de C-CO₂, observou a maior produção de 4.000 mg kg⁻¹ C-CO₂, e quantificou a degradação dos hidrocarbonetos em aproximadamente em 35 %. Em atividade microbiana, Cavelhão et al. (2011) verificaram a maior produção de C-CO₂ com a bioestimulação de doses de NPK, verificando uma produção máxima de 3.000 mg kg⁻¹, o que proporciona a maior degradação do petróleo, representada por 92 % em 90 dias de experimento. Estes resultados de degradação corroboram com os dados obtidos no presente estudo pelo método respirométrico.

Levando em consideração que existem várias combinações de NPK e P entre os tratamentos, observou-se uma região racional de 1067,5 kg ha⁻¹ de NPK e 6,68 % para P, respectivamente, como observado nas isoquantas da Figura 10.

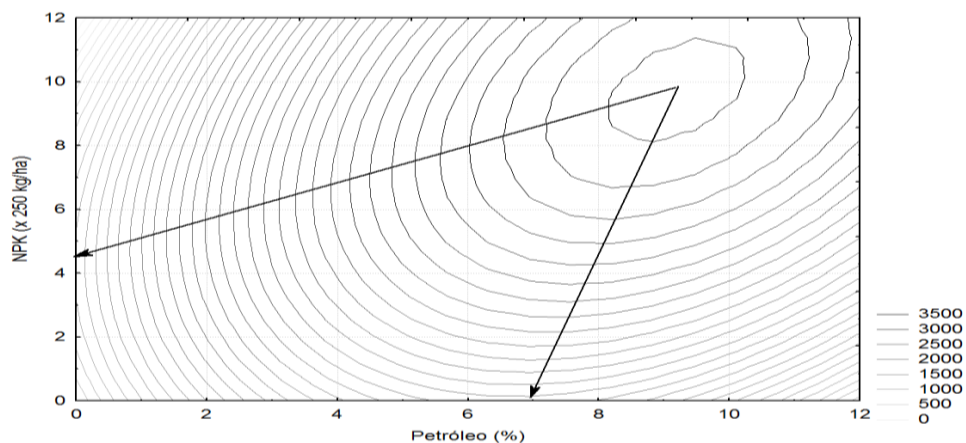


Figura 10 – Isoquantas das concentrações acumuladas de C-CO₂ em função das doses NPK e petróleo.

Analisando-se o acréscimo das doses de NPK em função das doses de petróleo (Figura 11), verificou-se relação linear, com intercepto e coeficiente angular, iguais a 0,00 e 148,66, respectivamente. Millioli (2009) investigou a bioestimulação das fontes de nitrogênio, fósforo e potássio sobre os contaminantes, observando a facilidade com que os microrganismos os assimilam e quando em concentrações apropriado vão instigar a biodegradação dos contaminantes.

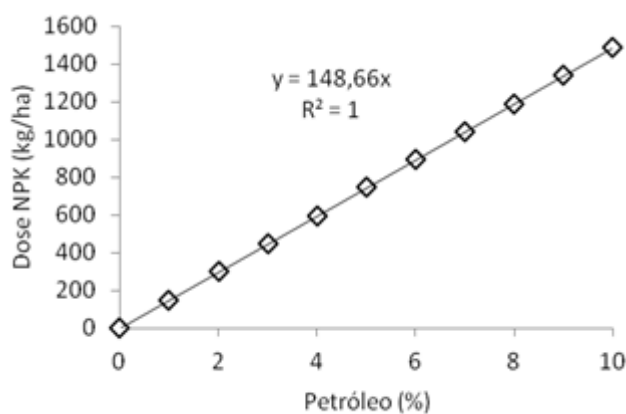


Figura 11 – Doses de NPK em função das doses petróleo.

Descontando a produção de C-CO₂ do tratamento na ausência de NPK e petróleo, para a produção de C-CO₂ em função das doses de petróleo (Figura 12), o comportamento foi quadrático com ponto de máximo, observou-se um aumento na produção de C-CO₂ com aumento das doses de petróleo em todos os tratamentos, porém, com decréscimo na taxa de C-

CO₂ a partir do ponto máximo (Figura 12), provavelmente devido à toxidez causada pelo excesso de petróleo. No entanto, solos com alta carga de contaminação apresentam excesso de carbono, que tende a desequilibrar a sua razão, tornando-se tóxico para os microrganismos (RUBERTO et al., 2009; KAUPPI et al., 2011). Estas mesmas variações ocorridas na produtividade do C-CO₂ também foram detectadas no trabalho de Marin et al. (2005), trabalhando com a disponibilidade de nutrientes e hidrocarbonetos, favorecendo desta forma a biodegradabilidade.

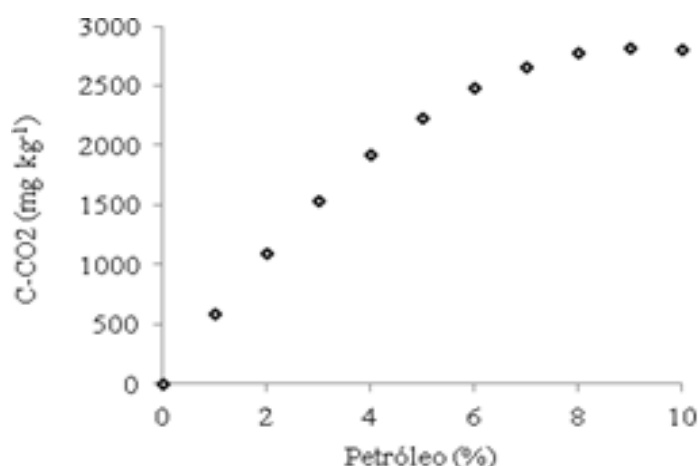


Figura 12 – Concentrações acumuladas de C-CO₂ em função das doses petróleo.

Avaliando-se a produção de C-CO₂ em função das doses de NPK (Figura 13), verificou-se máxima eficiência física (MEF) foi de 1.372,97 kg ha⁻¹. Considerando a máxima eficiência econômica de 90 %, obteve-se valores de 2.825,92 mg kg⁻¹ de C-CO₂ e 938,95 kg ha⁻¹ para o NPK, respectivamente. A economia foi estimada pela subtração entre C-CO₂ e NPK em 434 kg ha⁻¹ de NPK, correspondente a uma economia de 32 % de fertilizante. Segundo Quideau (2012), o aumento da população microbiana está intimamente relacionado com a fertilização de solos de poucos nutrientes, como também os microrganismos são influenciados pelo tratamento de fertilização com NPK, o que aumentou a população microbiana em até 85 %, ocorrendo uma interação significativa entre o tipo de solo e adubação. Esse comportamento está relacionado à adição de fertilizantes que possuem em sua composição os macronutrientes: nitrogênio, fósforo e potássio (N, P, K) (RIZZO et al., 2006), pois se tem a finalidade de estabelecer relações ótimas de N:P:K (10:30:20) para o aumento

das populações microbianas e, conseqüentemente, aumento significativo das taxas de degradação do contaminante orgânico (TRINDADE et al., 2005).

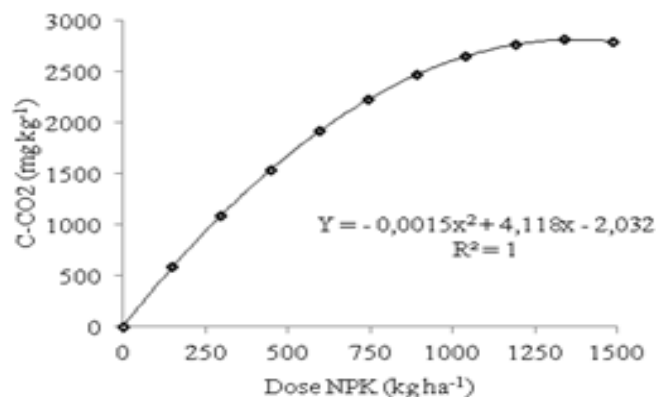


Figura 13 – Concentrações acumuladas de C-CO₂ em função das doses NPK.

Souza (2003) em seus resultados mostrou que a biorremediação com a utilização de NPK, na proporção de 10 % (p/v) do volume de óleo derramado, contribuiu para retirada de aproximadamente 30 % dos alcanos e chegando a 80 % após um mês. Nascimento (2006) avaliou a aplicabilidade da técnica de biorremediação, com a utilização de nutriente na forma de fertilizante solúvel NPK, sobre derrames de petróleo simulados em amostras de substrato de manguezal, coletadas de uma região ainda não contaminada na foz do Rio das Ostras, a biorremediação foi capaz de eliminar, aproximadamente, 94 % da massa de óleo derramada, ao final de 56 dias de experimento. Coelho (2005) concluiu que a técnica de biorremediação utilizando o fertilizante NPK imobilizado, favorável à liberação contínua de nutriente durante todo o experimento, foi eficaz na biodegradação completa de n-alcanos e na biodegradação parcial de compostos policíclicos aromáticos. De acordo com Muteca et al. (2012) a remoção do petróleo foi de 62 %, aproximadamente, que pode ser considerado uma redução boa, maiores valores não foram alcançados provavelmente devido à alta concentração dos contaminantes e toxicidade, corroborando os resultados de Oliveira e de França (2004) e de Vasconcelos et al. (2011) ambos trabalharam com alternativas de bioestímulo na degradação de petróleo. Todos estes resultados sugerem que o sucesso da biorremediação é função das propriedades do petróleo, a natureza dos produtos de biorremediação e das características dos ambientes contaminados.

10. CONCLUSÕES

1. A técnica de bioestimulação com NPK teve efeito significativo sobre a produção de C-CO₂ em função das doses de petróleo.
2. A maior produção de C-CO₂ foi de 3539,40 mg kg⁻¹ obtida para as doses de 2.435 kg ha⁻¹ de NPK e 9,20 % de petróleo.
3. Na faixa racional a dose máxima foi de 1067,50 kg ha⁻¹ de NPK e 6,68 % de petróleo para uma produção de 3057,20 mg kg⁻¹ de C-CO₂.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Resíduos em solos: determinação da biodegradação pelo método respirométrico**. NBR 14.283. Rio de Janeiro, 1999.

AISLABIE, J. M.; BALKS, M. R.; FOGHT J. M. & WATERHOUSE, E. J. **Hydrocarbon spills on Antarctic soils: effects and management**. Environ. Sci. Technol., 38:1265-1274, 2004.

ALAN, A. A & FERREK, J. R. Advantage and disadvantages of burning oil In: **International Oil Spill Conference**. API, Washington. pp. 765–772. 1993.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**. Academic press, Inc. 302 p., 1994.

ALLER, S.; ADETUTU, E. M.; MAKADIA, T. H.; PATIL, S.; BALL, A. S. Harnessing the Hydrocarbon-Degrading Potential of Contaminated Soils for the Bioremediation of Waste Engine Oil. **Water, Air and Soil Pollution**, Holanda, v. 218, p. 121-130, 2011

AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE. Disponível em: <http://www.api.org/> Acesso em: 12 set. 2014.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard Terminology Relating to Petroleum Products of timber: ASTM D 4175-09**. Philadelphia, 2009.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO F. & JARDIM, I. F. Biorremediação de solos contaminados por Petróleo e seus derivados. **Eclética Química**, Campinas, v. 35, n. 3, p. 17-43, 2010.

BANERJI, S. K.; ZAPPI, M. E.; TEETER, C. L.; GUNNISON, D.; CULLINANE, M. J. & MORGAN, R. T. In: **Bioremediation of soils contaminated with petroleum hydrocarbons using bioslurry reactors**. U.S. Army Corps of Engineers, Washington, DC, october, 61 p., (1995).

BAPTISTA, P. M. e RIZZO, A. C. de. L. **Acompanhamento do processo de Atenuação Natural de solo contaminado por petróleo**. In: XII Jornada de Iniciação Científica do CETEM/MCT, 2004.

BAPTISTA, S. J. **Seleção das melhores condições de biodegradação de petróleo em solo argiloso**. UFRJ/EQ, 2003. xvi, 163 p.; il. (Dissertação) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2003.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B.; FRANKENBERGER-JÚNIOR, W. T. **Bioremediation of soil contaminated by diesel oil**. Braz. J. Microbiol., 34:65-68, 2003.

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.

BOOPATHY, R. **Factors limiting bioremediation technologies**. Bioresource Technology. v. 74, p. 63, 2000.

BORGES, F. A. T. **Biodegradação de fluidos de base e de cascalhos oriundos da perfuração de poços de petróleo e gás**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória, 2006.

BRITO, N. N.; ZAMORA, P. P.; NETO, A. L. O.; DE BATTISTI, A.; PATERNIANI, J. E. S.; PELEGRINI, R. T. (2004). **Biorremediação e Controle Ambiental. IV Fórum de Estudos Contábeis**, Faculdades Integradas Claretianas, Rio Claro, SP. Disponível em: www.ceset.unicamp.br/lte/artigos/4fec02_2004 Pesquisado em 16/05/2014 as 10:45.

BRONICK, C. J.; LAL, R. Soil structure and management: a review. **Geoderma. Amsterdam**, v. 124, p. 3-22, 2005.

CALDEIRA, D. S. A. **Cinética da degradação de compostos orgânicos no solo**. Piracicaba. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 1997.

CAMEOTRA, S. S. & SINGH, P. Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane up take by *Pseudomonas* species. **Microbial Cell Factories**, 8:16. 2009.

CAPELLI, S. M.; BUSALMEN, J. P.; SÁNCHEZ, S. R. Hydrocarbon bioremediation of mineral-base contaminated waste from crude oil extraction by indigenous bacteria. Int. **Biodeterior. Biodegrad.**, Oxford, v. 47, p. 233-238, 2001.

CAVELHÃO, G.; MENEGHETTI, L. R. R.; REGINATTO, C.; THOMÉ, A. **Bioventilação e bioestimulação de solo residual de basalto contaminado com biodiesel**. In: VI Seminário de Engenharia Geotécnica do Rio Grande do Sul GeoRS, 2011, Passo Fundo. Anais do GeoRS, 2011.

CHAGAS-SPINELLI, A. C. O. **Biorremediação de solo argiloso contaminado por hidrocarbonetos provenientes de derrame de óleo diesel**. 2007. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007. 174 p.

CHAKRABORTY, R. & COATES, J. D. Anaerobic degradation of mono aromatic hydrocarbons. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 64: 437-446. 2004.

COELHO, M. F. **Estudo do uso de fertilizante NPK imobilizado na Biorremediação de derrames de petróleo no mar Simulação em laboratório**. 2005. 36f. Monografia (Bacharelado em Engenharia de Exploração e Produção de Petróleo), Universidade Estadual do Norte Fluminense, Macaé/RJ, 2005.

COLLA, T. S. **Avaliação da biorremediação de solo contaminado pela mistura B10 por consórcio bacteriano**. 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 138 p.

COUTINHO, H. D.; BARBOSA, A. R. **Fitorremediação: Considerações Gerais e Características de Utilização**. *Silva Lusitana*, v.15, n. 1, p. 103-117, 2007.

CUNHA, C. D. **Biorremediação de água subterrânea contaminada com gasolina e análise molecular da comunidade bacteriana presente**. CETEM/MCT - Série Tecnologia Ambiental. Rio de Janeiro: p. 45, 2008.

CUTRIGHT, T. J.; LEE, S. **In Situ Soil Remediation: Bacteria or Fungi**. Department of Chemical Engineering, University of Akron. Akron - Ohio - USA. s/v, p. 413-419. 1994.

DAL FORNO, R. G. **Avaliação da poluição do solo por derivados de petróleo e sua remediação**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, 80 p. 2006.

D'ANNIBALE, A.; ROSETTO, F.; LEONARDI, V.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI M. (2006) Role of Auto chthonous Filamentous Fungi in Bioremediation of a Soil Historically Contaminated with Aromatic Hydrocarbons. **Applied and Environmental Microbiology** (72), 1: 28-36.

DELFINO, J. J. & MILES, C. J. **Aerobic and anaerobic degradation of organic contaminants in Florida ground water**. Soil Crop Sci. Soc. Fl. Proc., 44:9-14, 1985.

DEUEL, L. E. & HOLLIDAY, G. H. **Soil Remediation for the Petroleum Extraction Industry**. Penn Well, 2nd. Ed., TULSA, U.S.A., 242 p.1997.

DOELMAN, P.; BREEDVELK, G. In situ versus on site practices. In: ADRIANO, D. C. et al. (Ed). Bioremediation of contaminated soils. **Madison: ASA/CSSA/SSSA**, p. 539-558, 1999.

DUA, M.; SINGH, A.; SETHUNATHAN, N. & JOHRI, A. K. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. **Appl. Microbiol. Biot.**, 59:143-152, 2002.

EMBRAPA-CNPS. 1999. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: Embrapa-SPI; Rio de Janeiro: Embrapa-CNPS, 412 p., il.

EPA: ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, UNITED STATES. 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, 2004 d.

FAHIM, MOHAMED. **Introdução ao Refino de petróleo** / Mohamed Fahaim, Taher A. Alsahhaf, Amal Elkilani; tradução de Lersch Traduções. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

FOGHT, J. 2008. Anaerobic Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons: Pathways and Prospects **Journal of Molecular and Microbiology and Biotechnology**, 15: 93-120.

FRANCO, I.; CONTIN, M.; BRAGATO, G.; DE NOBILI, M. Microbiological resilience of soils contaminated with crude oil. **Geoderma**, 121: 17–30. 2004.

GLASER, J. A.; POTTER, C. L. **Soil bioremediation research EPA**. Biocycle. pp. 50–54. Jan. 1996.

HAIMANN, R. A. **Fungal Technologies for the treatment of hazardous waste**. **Environmental Progress, Santa Ana**. California, vol. 14, nº 3, p. 201-203, 1995.

HAIDER, K. Microbe-soil-organic contaminant interactions. In: ADRIANO, D. C. et al. (Ed). **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1999. p. 33-51.

HIGGINS, I. J.; BURNS, R. G. (1975). The chemistry and microbiology of pollution. London: Academic Press Inc, 248 p. apud MORAIS, E. B. (2005). **Biodegradação de Resíduos Oleosos Provenientes de Refinaria de Petróleo Através do Sistema de Biopilhas**. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.

HOLLIS, J. M. 1991. **The classification of soils in urban areas**. In: BULLOCK, P.; GREGORY, P. J. (eds), *Soils in the Urban Environment*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 5-27.

HOREL, A.; SCHIEWER, S. Investigation of the physical and chemical parameters affecting biodegradation of diesel and synthetic diesel fuel contaminating Alaskan soils. **Cold Regions Science and Technology**. v. 58, p. 113–119, 2009.

JACQUES, R. J. S. et al. Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon degrading microbial consortium from a petrochemical sludge landfarming site. **Bioremediation Journal**, Philadelphia, v. 11, n. 1, p.1-11, 2007.

JACQUES, R. J. S.; SILVA, K. J.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. 2010. **Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas**. *Ciência Rural*, 40(2): 310-317.

JOHNSEN, A. R. et al. Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 133, n. 1, p. 71-84, 2005.

JORGENSEN, K. S.; PUUSTINEN, J.; SUORTTI, A. M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. **Environmental Pollution**. Finland, v. 107, p. 245-254, 2000.

KABATAS-PENDIAS A, P. H. 1986. Trace elements in soils and plants. **Boca Raton, FL: CRC Press**, p. 135-136.

KAUPPI, S.; SINKKONEN, A.; ROMANTSCHUK, M. Enhancing bioremediation of diesel-fuel-contaminated soil in a boreal climate: comparison of biostimulation and bioaugmentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Reino Unido, v. 65, p. 359-368, 2011.

KOMILIS, D. P.; VROHIDOU, AGGELIKI-ELENI K.; VOUDRIAS, E. A. Kinetics of aerobic bioremediation of a diesel contaminated Sandy soil effect of nitrogen addition. **Water, air and Soil pollution**. v. 208, p. 193-208, 2010.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. 1990. Microbial degradation of Hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews**, vol. 54, nº 3. pp. 305-315, 1990.

LEPSCH, I. F. **19 Lições de pedologia** – São Paulo: Oficinas de textos, 2011.

LI, H.; ZHANG, Y.; KRAVCHENKO, I.; XU, H.; ZHANG, C-G. Dynamic changes in microbial activity and community structure during biodegradation of petroleum compounds: A laboratory experiment. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, p. 1003-1013, 2011.

LIEBEG, E. W.; CUTRIGHT, T. J. The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAHs contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**. vol. 44, pp. 55– 64. 1999.

LOPES, A.; PIEDADE, M. T. F. **O período da contaminação com petróleo influencia a rebrota de *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchcock em solo de várzea da Amazônia Central**. *Biota Neotropica*, Campinas, v. 10, n. 4, p. 143-148, 2010.

MARÍN, J. A.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C. **Bioremediation of oil refinery sludge by land farming in semiarid conditions: influence on soil microbial activity.** Environmental Research, v. 98, p. 185-195, 2005.

MANDRI, T. & LIN, J. 2007. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. **African Journal of Biotechnology**, 6 (1): 023-027.

MANUAL DE ANÁLISES QUÍMICAS DE SOLOS, plantas e fertilizantes / editor técnico, Fábio Cesar da Silva. - 2. ed. rev. ampl. - Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2009.627 p.: il.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel, Rio Claro.** 2006. 162 f. Tese (Doutorado)-Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, [S.I], 2006.

MARIANO, A. P.; TOMASELLA, R. C.; MARCONDES DE OLIVEIRA, L.; CONTIERO, J.; DE ANGELIS, F. **Biodegradability of diesel and biodiesel blends.** African Journal of Biotechnology, v. 7, p. 1323-1328, 2008.

MARIANO, A. P.; KATAOKA, A. P. A. G.; ANGELIS, D. F. & BONOTTO, D. M. 2007. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. **Brazilian Journal of Microbiology**, 38: 346-353.

MARIANO, J. B. (2005) **Impactos Ambientais do Refino de Petróleo.** Rio de Janeiro: Interciência.

MARÍN, J. A.; MORENO, J. L.; HERNÁNDEZ, T. & GARCÍA, C. Bioremediation by composting of heavy oil refinery sludge in semiarid conditions. **Biodegradation**, 17:251-261, 2006.

MARTINS, A.; DINARDI, A. L.; FORMAGI, V. M.; LOPES, T. A.; BARROS, R. M.; CONEGLIAN, C. M. R.; BRITO, N. N.; SOBRINHO, G. D.; TONSO, S.; PELEGRINI, R. (2003). **Biorremediação. III Fórum de Estudos Contábeis**, Faculdades Integradas Claretianas, Rio Claro, SP. Disponível em: www.ceset.unicamp.br/lte/artigos/3fec2401 Pesquisado em 16/05/2014 as 10:30.

MARTINS, B. A. D. 2004. **Avaliação da cinética de biodegradação do etanol em concentrações mínimas necessárias dos nutrientes nitrogênio e fósforo.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, Brasil. 86 p.

MENDONÇA, José Francisco Bezerra. **Solo: substrato da vida** / José Francisco Bezerra Mendonça. – 2. ed. – Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 129 p.; 18 cm x 25 cm.

MESQUITA, A. C. **Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004. 158 p.

MEYER, D. D. **Avaliação da biodegradabilidade de misturas de diesel e de biodiesel (B0, B20 e B100) em dois solos com diferentes granulometrias**. 2011. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) – Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

MILLIOLI, V. S.; SERVULO, E. F. C.; SOBRAL, L. G. S.; DE CARVALHO, D. D. **Bioremediation of crude oil-bearing soil: evaluating the effect of Rhamnolipid addition to soil toxicity and to crude oil biodegradation efficiency**, Global NEST Journal, v. 11, n.2, p. 181, 2009.

MOLINA-BARAHONA, L.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; HERNÁNDEZ-VELASCO, M.; VEGA-JARQUÍN, C.; ZAPATA-PÉREZ, O.; MENDOZA-CANTÚ, A.; ALBORES, A. Diesel removal from contaminate soils by biostimulation and supplementation with cropresidues. **Applied Soil Ecology**, 27: 165–175. 2004.

MORAIS, E. B. (2005). **Biodegradação de resíduos oleosos provenientes de refinaria de petróleo através do sistema de biopilhas**. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Xenobióticos do solo. Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Cap. 6, p. 263-311, 2006.

MUTECA, F. L. L. **Biorremediação de solo contaminado com óleo cru proveniente de Angola**. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

NAMKOONG, W.; HWANG, E.; PARK, J.; CHOI, J. Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. **Environmental Pollution**, 2002, v. 119, p. 23 – 31. 2002.

NASCIMENTO, T. V. **Aplicação da biorremediação a derrames de petróleo em manguezal do Rio Das Ostras, RJ: Simulação Laboratorial**. 2006. 73f. Monografia (Bacharel em Engenharia de Exploração e Produção de Petróleo), Universidade Estadual Norte Fluminense, Macaé, 2006.

NATURAL RESOURCES CONSERVATION SERVICE (NRCS). Hydrology. **In: National Engeneering Handbook**. 1972.

NAS (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES), 1985. **Oil in the Sea, Imputs, Fates and Effects**. **National Academy Press**. Washington, DC, Chap. 4, p. 270-368.

OLIVEIRA, F. J. S.; DE FRANÇA, F. P. **The use of biostimulation and intinsic bioremediation methodologies for the treatment of sandy sediment contaminated with oil**. Solos e Rochas. São Paulo. v. 27, n. 3, p. 287-292, 2004.

PEDROTI, G. I. **Ensaio de biodegradabilidade aeróbia de hidrocarbonetos derivados do petróleo em solos**. 2007. Dissertação (mestrado) Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil.119 p.

PELCZAR, JR.; JOSEPH, M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. Volume 2, 2ª.ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 1997, Cap. 31, p. 412 à 416.

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

PETTA, R. A.; SINDERN, S.; CAMPOS, T. F. C.; NASCIMENTO, P. S. R. **Sig marisco – um sistema ambiental para avaliação das vulnerabilidades em áreas de exploração de petróleo no semi-árido**. 4º PDPETRO, Campinas-SP 6.2.289.1 – 1 21-24 de Outubro de 2007.

PREVEDELLO, C. L. **Física do solo**. Editora SAEAFS; Curitiba, 250 p. 1996.

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.

RAHMAN, K. S. M.; BANAT, I. M.; THAHIRA, J. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. **Bioresour. Technol.** 81:25-32, 2002.

RIZZO, A. C. L. **Desenvolvimento de biorreator não convencional para o tratamento de solos contaminados por petróleo**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 188 p. 2008.

RIZZO, A. C. L.; LEITE, S. G. F.; SORIANO, A. U.; SANTOS, R. L. C.; SOBRAL, L. G. S. **Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase em biorreatores**. Rio de Janeiro: CETEM/MCTI, n. 37, 76 p, 2006.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; CARDOSO, A. A. **Introdução à química ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2004.

RUBERTO, L.; DIAS, R.; LO BALBO, A.; VAZQUEZ, S. C.; HERNANDEZ, E. A.; MAC CORMACK, W. P. Influence of nutrients addition and bioaugmentation on the hydrocarbon biodegradation of a chronically contaminated Antarctic soil. **Journal of Applied Microbiology**. Reino Unido, v. 106, p. 1101-1110, 2009.

SANTOS, J. B.; PROCÓPIO, S. O.; PIRESF, R.; SILVA, A. A.; SANTOS, E. A. **Fitorremediação de solo contaminado com trifloxysulfuron-sodium por diferentes densidades populacionais de feijão-de-porco** (*Canavalia ensiformis* (L.). DC.). Ciências Agrotécnicas. Lavras, v. 30, nº 3, p. 444-449, maio/junho, 2006.

SANTOS, R. M. **Avaliação da adição do pó da casca de coco verde, como material estruturante, na biorremediação de solo contaminado por petróleo**. Dissertação (Mestrado) - Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 143 p, 2007.

SEABRA, P. N. **Uso da biorremediação em áreas impactadas pela indústria do petróleo**. Rio de Janeiro: CENPES, 2001.

SILVA, E.; FIALHO, A. M.; SA-CORREIA, I.; BURNS, R. G.; SHAW, L. J. Combined bioaugmentation and biostimulation to cleanup soil contaminated with high concentrations of atrazine. **Environ. Sci. Technol.**, 38:632-637, 2004.

SILVA, G. S.; MARQUES, E. L. S.; DIAS, J. C. T.; LOBO, I. P.; GROSS, E.; BRENDDEL, M.; DA CRUZ, R. S.; REZENDE, R. P. Biodegradability of soy biodiesel in microcosmo experiments using soil from the Atlantic Rain Forest. **Applied Soil Ecology**, Holanda, v. 55, p. 27-35, 2012.

SOUZA, E. S. **Desenvolvimento de métodos de biorremediação aplicados a derrames de petróleo em água do mar - testes laboratoriais**. 2003. 315f. Tese (Doutorado em Engenharia de Reservatório e Exploração de Petróleo), Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, Macaé – RJ, 2003.

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

SCHMIDT, C. A. B. 2004. **Aplicação de Técnica Eletrocinética em Laboratório a Dois Tipos de Solos Argilosos**. Tese de Doutorado em Ciências em Engenharia Civil – Rio de Janeiro-RJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ.

SCHROEDER, R. H. A.; RODRÍGUEZ, V. I. D.; CARRILLO, L.V. (2002). **Evaluation of Microbial Respiration and Ecotoxicity in Contaminated Soils Representative of the Petroleum producing Region of Southeastern Mexico**. Terra, 20: 3.

SPINELLI, L. F. **Biorremediação, toxicidade e lesão celular em derrames de gasolina**. Tese (Doutor em Engenharia) – Pós Graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

TACCARI, M.; MILANOVIC, V.; COMITINI, F.; CASUCCI, C.; CIANI, M. Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Reino Unido, v. 66, p. 39-46, 2012.

TATE, R.L. **Soil Microbiology**. New York, John Wiley, 1995, p. 107.

TEÓDULO, JOSÉ MÁCIO RAMALHO. **Uso de técnicas de Geoprocessamento e Sensoriamento Remoto no levantamento e integração de dados necessários a gestão ambiental dos campos de extração de óleo e gás do Canto do Amaro e Alto da Pedra no município de Mossoró - RN** / José Macio Ramalho Teódulo. Natal, RN, 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 8ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 772 p.

TRINDADE, P.V.O. (2002). **Avaliação das técnicas de bioaugmentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo**. Tese M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 127 p.

TRINDADE, P. V. O.; SOBRAL, L. G.; RIZZO, A. C. L.; LEITE, S. G. F.; SORIANO, A. U. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. **Chemosphere**, Rio de Janeiro, v. 58, n. 4, p. 515 – 522, 2005.

TSAO, C. W.; SONG, H. G.; BARTHA, R. Metabolism of benzene, toluene, and xylene hydrocarbons in soil. **Appl. Environ. Microbiol.** 64:4924-4929, 1998.

USDA - NRCS. **Soil Quality Institute**. Disponível em: <<http://soil.usd.gov/sqi/>> Acesso em: 24 junho 2014. v. 107, p. 245-254, 2000.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A. WARD O. P. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 67 (4): 503-549.

VAN DER HOEK, J. P.; URLINGS, L. G. C. M.; GROBBEN, C. M. Biological removal of polycyclic aromatic hydrocarbons, benzene, toluene, ethyl benzene, xylene and phenolic compounds from heavily contaminated ground water and soil. **Environ. Technol. Lett.**, 10:185-194, 1989.

VASCONCELOS, U.; DE FRANÇA, F. P. **Removal of High-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons**. Química Nova, v. 34, n. 2, p. 218-221, 2011.

WEISMAN, W. Analysis of petroleum hydrocarbon in environmental. Amherst, Massachusetts: **Amherst Scientific** (Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group Series, V1), 1998.

YAKUBU, M. B. 2007. Biological approach to oil spills remediation in the soil. **African Journal of Biotechnology**, 6 (24): 2735-2739.

APÊNDICE

1 -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	49756074.851965	12439018.712991	436.965	0.0000
ADUBA	4	4522864.617379	1130716.154345	39.720	0.0000
OLEO*ADUBA	16	8226632.642235	514164.540140	18.062	0.0000
REP	2	22803.586763	11401.793381	0.401	0.6722
erro	48	1366409.594837	28466.866559		
Total corrigido	74	63894785.293179			
CV (%) =	9.91				
Média geral:	1701.7538667	Número de observações:	75		

Teste Tukey para a FV OLEO

DMS: 174,658263859768 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 15
Erro padrão: 43,563644291321

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
0	420.570000	a1
1	1135.096000	a2
3	1941.797333	a3
5	2458.696000	a4
10	2552.610000	a4

Teste Tukey para a FV ADUBA

DMS: 174,658263859768 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 15
 Erro padrão: 43,563644291321

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
0	1318.429333	a1
1	1524.328000	a2
2	1802.084667	a3
10	1872.603333	a3 a4
5	1991.324000	a4

Análise do desdobramento de ADUBA dentro de cada nível de:

OLEO

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV		GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ADUBA	/1	4	69959.523067	17489.880767	0.614	0.6538
ADUBA	/2	4	68586.014760	17146.503690	0.602	0.6622
ADUBA	/3	4	464539.424427	116134.856107	4.080	0.0062
ADUBA	/4	4	1837537.918560	459384.479640	16.138	0.0000
ADUBA	/5	4	10308874.378800	2577218.594700	90.534	0.0000
Erro		48	1366409.594837	28466.866559		

Codificação usada para o desdobramento

cod. OLEO

1 = 0
 2 = 1
 3 = 3
 4 = 5
 5 = 10

Teste de Tukey para o desdobramento de ADUBA dentro da codificação:

1

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente

Teste Tukey para a FV ADUBA

DMS: 390,547750822536 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 97,4112699830143

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
2	343.553333	a1
1	348.680000	a1
10	435.916667	a1
5	448.200000	a1
0	526.500000	a1

Teste de Tukey para o desdobramento de ADUBA dentro da codificação: 2

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente.

Teste Tukey para a FV ADUBA

DMS: 390,547750822536 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 97,4112699830143

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
10	1014.400000	a1
5	1130.550000	a1
2	1152.670000	a1
0	1156.000000	a1
1	1221.860000	a1

Teste de Tukey para o desdobramento de ADUBA dentro da codificação: 3

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente.

Teste Tukey para a FV ADUBA

DMS: 390,547750822536 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 97,4112699830143

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
0	1668.746667	a1
1	1828.440000	a1 a2
10	1982.520000	a1 a2
5	2059.720000	a2
2	2169.560000	a2

Teste de Tukey para o desdobramento de ADUBA dentro da codificação: 4

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente.

Teste Tukey para a FV ADUBA

DMS: 390,547750822536 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 97,4112699830143

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
0	1863.040000	a1
1	2303.180000	a2
10	2535.080000	a2 a3
5	2793.140000	a3
2	2799.040000	a3

Teste de Tukey para o desdobramento de ADUBA dentro da codificação: 5

Obs. Identifique a codificação conforme valores apresentados anteriormente.

Teste Tukey para a FV ADUBA

DMS: 390,547750822536 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3

Erro padrão: 97,4112699830143

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
0	1377.860000	a1
1	1919.480000	a2
2	2545.600000	a3
10	3395.100000	a4
5	3525.010000	a4
