

**MICHELE CRISTINE KRENCZYNSKI**

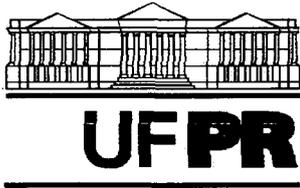
**AVALIAÇÃO DA BIORREMEDIAÇÃO DO SOLO CONTAMINADO COM RESÍ-  
DUOS OLEOSOS ATRAVÉS DO FRACIONAMENTO DA MATÉRIA ORGÂNICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia – área de concentração em Ciências do Solo, departamento de Solos do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título e grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Francisco José Pereira de Campos Carvalho, Ph.D.

**CURITIBA**

**2000**



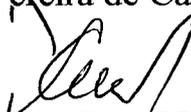
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE SOLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA: CIÊNCIA DO SOLO(MESTRADO) e  
MONITORAMENTO, MODELAGEM E GESTÃO AMBIENTAL(DOUTORADO)  
Rua dos Funcionários, 1540-Curitiba/PR-80035-050-Fone/Fax 41-350-5648  
E-mail: [pgcisolo@agrarias.ufpr.br](mailto:pgcisolo@agrarias.ufpr.br)

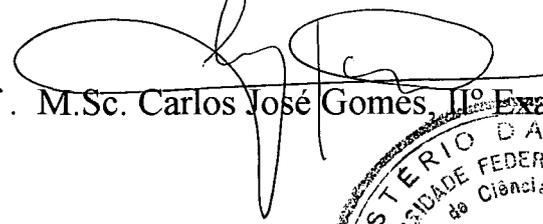
## P A R E C E R

Os Membros da Comissão Examinadora, designados pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Área de Concentração "Ciência do Solo", para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado, apresentada pela candidata **MICHELE CRISTINE KRENCZYNSKI**, com o título: **"Avaliação da biorremediação de solo contaminado com resíduo de refinaria"** para obtenção do grau de Mestre em Agronomia-Área de Concentração "Ciência do Solo" do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, são de Parecer pela **"APROVAÇÃO"** da Dissertação, com o conceito **"A"**, completando assim, os requisitos necessários para receber o diploma de **Mestre em Agronomia-Área de Concentração "Ciência do Solo"**.

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Área de Concentração "Ciência do Solo", em Curitiba 07 de dezembro de 2000.

  
Prof. Dr. Francisco José Pereira de Campos Carvalho, Presidente.

  
Prof. Carlos Raymundo Cano Núñez, 1º Examinador.

  
Prof. M.Sc. Carlos José Gomes, 2º Examinador.



*A minha filha dedico este trabalho pela oportunidade de sua presença em minha vida, dando-me força necessária para a conclusão deste trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço pelo incentivo, apoio e amor, à meu namorado Fabiano; aos meus pais Antonio Sérgio Krenczynski e Miriam Krenczynski ; e a meus irmãos Karla Regina, Thiago Vinícius e Pedro Ivo .

Agradeço ao professor Francisco José Pereira de Campos Carvalho pelo apoio e orientação no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos amigos do convênio “Meio Ambiente e Tecnologia de Resíduos” PETROBRAS/FUNPAR, biólogos Cláudia Martins Gonçalves, Patrícia Wekerlin e Silva, Juliana Ramos Gouveia, Durval do Nascimento Neto e Cassiana Moreira, engenheiro agrônomo Rodrigo de Azevedo Castro, e ao engenheiro florestal Sérgio que já deixou o Convênio, pelo incentivo, auxílio e amizade. Ao químico Nilson e pelo auxílio nas análises. Ao engenheiro Ernani pela intermediação e apoio no desenvolvimento do trabalho nas instalações da REPAR. Aos operadores do SEPROD, aos amigos da ASEMA e do SETINF da REPAR pela amizade que fizemos durante o período de trabalho.

Agradeço a minhas amigas Danielle Tortato e Clarissa Age pela grande amizade e carinho.

Enfim, a todos os técnicos, amigos, e professores que contribuíram direta ou indiretamente para a elaboração deste trabalho, muito obrigado e que Deus lhes abençoe.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	VII
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	VIII
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	IX
<b>RESUMO</b> .....	X
<b>ABSTRACT</b> .....	XI
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA</b> .....	5
2.1 MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO .....	5
2.2 DINÂMICA DA MATÉRIA ORGÂNICA .....	6
2.3 SUBSTÂNCIAS HÚMICAS .....	7
2.3.1 Ácidos fúlvicos .....	10
2.3.2 Ácidos húmicos .....	11
2.3.3 Humina .....	12
2.4 EFEITOS DA MATÉRIA ORGÂNICA SOBRE AS PROPRIEDADES DO SOLO: .....	12
2.5 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS .....	13
2.6 RESÍDUOS OLEOSOS .....	16
2.7 BIODEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS OLEOSOS .....	18
2.8 BIORREMEDIAÇÃO .....	21
2.9 ACOMPANHAMENTO DA BIODEGRADAÇÃO EM ÁREAS DE BIORREMEDIAÇÃO	24
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	26
3.1 SOLO .....	26
3.1.1 Solo da área testemunha .....	26
3.1.2 Solo da área de biorremediação .....	28
3.1.3 Amostragem .....	28
3.1.4 Análises granulométrica e química do solo .....	29
3.2 ORIGEM E COMPOSIÇÃO DOS RESÍDUOS APLICADOS NA ÁREA AB4 .....	29
3.3 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS .....	30
3.4 SUBSTRATO OLEOSO E RESÍDUOS OLEOSO .....	30
3.5 DETERMINAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS OLEOSOS ATRAVÉS DA MATÉRIA ORGÂNICA TOTAL (VIA SECA) .....	30
3.6 DETERMINAÇÃO DO CARBONO ADICIONADO PELOS RESÍDUOS OLEOSOS .....	31
3.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CARBONO NO SOLO VIA ÚMIDA .....	31
3.8 FRACIONAMENTO DAS FRAÇÕES DA MATÉRIA ORGÂNICA VIA ÚMIDA .....	31
3.9 CÁLCULOS .....	32

3.10 GRÁFICOS E TABELAS.....	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 ACOMPANHAMENTO DA BIODEGRADAÇÃO.....	34
4.1.1 Teor de carbono no solo.....	34
4.1.2 Fracionamento da matéria orgânica do solo.....	35
4.1.3 Análise comparativa de composição da matéria orgânica do solo nas diferentes frações através do teor de carbono.....	35
4.1.3.1 Fração matéria orgânica leve e hidrossolúveis.....	37
4.1.3.2 Ácidos fúlvicos totais.....	37
4.1.3.2.1 Fração ácidos fúlvicos livres.....	38
4.1.3.2.2 Fração ácidos fúlvicos ligados a pirofosfato.....	38
4.1.3.2.3 Fração ácidos fúlvicos ligados a soda.....	38
4.1.3.3 Ácidos húmicos totais.....	39
4.1.3.3.1 Fração ácidos húmicos ligados a pirofosfato.....	39
4.1.3.3.2 Fração ácidos húmicos ligados a soda.....	39
4.1.3.4 Humina.....	40
4.1.3.5 Pirofosfato.....	41
4.1.3.6 Fração soda.....	41
4.1.3.7 Fração substâncias húmicas totais.....	42
4.1.4 Incremento dos teores de carbono.....	43
4.2 CARACTERÍSTICAS DAS SUBSTÂNCIAS HUMICAS NA A4T E AB4.....	44
4.2.1 Variação relativa dos teores de carbono das diferentes frações dos tratamentos A4T e AB4.....	44
4.2.1.1 Teores relativos de carbono das frações da AB4 e A4T.....	45
4.2.1.2 Teores relativos da fração matéria orgânica leve e da fração hidrossolúveis.....	46
4.2.1.3 Teores relativos dos ácidos fúlvicos.....	47
4.2.1.3.1 Teores relativos da fração ácidos fúlvicos livres.....	48
4.2.1.3.2 Teores relativos da fração ácidos fúlvicos ligados a pirofosfato.....	48
4.2.1.3.3 Teores relativos da fração ácidos fúlvicos ligados soda.....	48
4.2.1.4 Teores relativos da fração ácido húmico.....	49
4.2.1.4.1 Teores relativos da fração ácidos húmicos ligados à pirofosfato.....	49
4.2.1.4.2 Teores relativos da fração ácidos húmicos ligados à soda.....	50
4.2.1.5 Teores relativos da fração humina.....	50
4.2.1.6 Teores relativos da fração pirofosfato.....	51
4.2.1.7 Teores relativos da fração soda.....	52
4.3 ANÁLISE COMPARATIVA DA COMPOSIÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA.....	53

4.3.1 Relação das Diferentes Frações em Relação a Ácidos Húmicos Totais na Área A4t E	
Ab4 .....	53
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>57</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>65</b>
APÊNDICE 1 - CARBONO ADICIONADO PELAS BORRAS OLEOSAS NO SOLO.....	65
APÊNDICE 2 -TEOR DE CARBONO NO SOLO .....	65
APÊNDICE 3 - REFERENTE AOS TEORES DE CARBONO NAS DIFERENTES REPETIÇÕES DA ÁREA A4T .....	66
APÊNDICE 4 - REFERENTE AOS TEORES DE CARBONO NAS DIFERENTES REPETIÇÕES DA AB4.....	66
APÊNDICE 5 - TEOR MÉDIO DE CARBONO NO SOLO.....	67
APÊNDICE 6 - PORCENTAGEM RELATIVA DE CARBONO NAS FRAÇÕES DA ÁREA A4T.....	67
APÊNDICE 7 - PORCENTAGEM RELATIVA DE CARBONO NAS FRAÇÕES DA ÁREA AB4.....	68
APÊNDICE 8 -PORCENTAGEM MÉDIA RELATIVA DE CARBONO NAS FRAÇÕES .....	68

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ANÁLISE DO SOLO DE ORIGEM DA ÁREA DE TESTEMUNHA- A4T E ÁREA DE BIORREMEDIAÇÃO-AB4.....	27
TABELA 2 - ESPÉCIES ENCONTRADAS NA ÁREA-A4T E ÁREA DE BIORREMEDIAÇÃO -AB4 .....	28
TABELA 3 - GRANULOMETRIA E QUÍMICA DOS SOLOS .....	29
TABELA 4 - RESÍDUOS APLICADOS NA ÁREA AB4 .....	30
TABELA 5 - TAXA DE BIODEGRADAÇÃO DA ÁREA DE BIODEGRADAÇÃO AB435	
TABELA 6 - INCREMENTO DE CARBONO.....	44
TABELA 7 - RELAÇÃO DAS DIFERENTES FRAÇÕES EM RELAÇÃO AOS ÁCIDOS HÚMICOS TOTAIS .....	53

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FLUXOGRAMA RESUMIDO DO FRACIONAMENTO DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO .....	33
FIGURA 2 - TEOR DE CARBONO NO SOLO DA ÁREA DE BIORREMEDIAÇÃO AB4.....	34
FIGURA 3 - TEORES DE CARBONO NAS FRAÇÕES DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO DA A4T E AB4 .....	36
FIGURA 4 - TEOR DE CARBONO NAS FRAÇÕES MATÉRIA ORGÂNICA LEVE E HIDROSSOLÚVEIS DA ÁREA A4T E AB4 .....	37
FIGURA 5 - TEORES DE CARBONO NAS FRAÇÕES ÁCIDOS FÚLVICOS DA ÁREA A4T E AB4.....	38
FIGURA 6 -TEORES DE CARBONO NOS ÁCIDOS HÚMICOS DA ÁREA 4T E AB4 .....	40
FIGURA 7 - TEORES DE CARBONO DA FRAÇÃO HUMINA DA A4T E AB4 .....	41
FIGURA 8 -TEORES DE CARBONO NA FRAÇÃO PIROFOSFATO E SODA DAS ÁREAS A4T E AB4.....	42
FIGURA 9 - TEOR DE CARBONO NA FRAÇÃO SUBSTÂNCIAS HÚMICAS TOTAIS DA A4T E AB4.....	43
FIGURA 10 - TEORES RELATIVOS DE CARBONO DAS FRAÇÕES AB4 E A4T .....	46
FIGURA 11 -TEORES RELATIVOS DE CARBONO DAS FRAÇÕES MATÉRIA ORGÂNICA LEVE E HIDROSSOLÚVEIS DA AB4 E A4T .....	47
FIGURA 12 - TEORES RELATIVOS DAS FRAÇÕES DE ÁCIDOS FÚLVICOS NA A4T E AB4.....	49
FIGURA 13 -TEORES RELATIVOS DOS ÁCIDOS HÚMICOS .....	50
FIGURA 14 -TEORES RELATIVOS DA FRAÇÃO HUMINA.....	51
FIGURA 15 -TEORES RELATIVOS DE CARBONO DA FRAÇÃO PIROFOSFATO E FRAÇÃO SODA .....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

AB4 = ÁREA DE BIORREMEDIAÇÃO -4 DA REPAR E OU/ TRATAMENTO AB4

AF = ÁCIDOS FÚLVICOS

AH = ÁCIDOS HÚMICOS

AHP = ÁCIDOS HÚMICOS LIGADOS A PIROFOSFATO

AHS = ÁCIDOS HÚMICOS LIGADOS A SODA

AHT = ÁCIDOS HÚMICOS TOTAIS

AFP = ÁCIDOS FÚLVICOS LIGADOS A PIROFOSFATO

AFS = ÁCIDOS FÚLVICOS LIGADOS A SODA

AFT= ÁCIDOS FULVICOS TOTAIS

A4T = SOLO DE ORIGEM DA ÁREA DE BIORREMEDIAÇÃO E/OU SOLO  
TESTEMUNHA

C = CARBONO

CNS = CARBONO NO SOLO HUM = HUMINA

CT = CARBONO TOTAL DAS FRAÇÕES

FP = FRAÇÃO PIROFOSFATO

FS = FRAÇÃO SODA

HID = HIDROSSOLÚVEIS

MO = MATÉRIA ORGÂNICA

MOL= MATÉRIA ORGÂNICA LEVE

SHT= SUBSTÂNCIAS HÚMICAS TOTAIS

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo principal o estabelecimento de critério de biorremediação com o fracionamento da matéria orgânica identificando as transformações nos resíduos e o estágio de biorremediação do solo da área de biorremediação experimental da REPAR contaminada por resíduos oleosos. Através do estudo e a avaliação da matéria orgânica pelo fracionamento de DABIN 1976, foi analisado comparativamente o solo contaminado em relação ao não contaminado (solo de origem) caracterizando as frações em relação a avaliação qualiquantitativa das frações, e cálculo das relações entre as frações ácido húmico e ácido fúlvico (AH:AF), e relação entre as frações solúveis nos extratos e o resíduo humina. Além da comparação do total do carbono obtido nas frações através das frações obtidas no fracionamento e o carbono no solo WALKLEY & BLACK, 1936, E a avaliação da biodegradação com o tempo, através da perda de massa pelo método de cinzas. Para este teste o tempo zero foi representado através do cálculo do índice do teor de carbono no petróleo. Os resultados obtidos através da análise da perda de massa da área de biorremediação AB4 na avaliação da biodegradação, indicou que houve decréscimo do percentual de carbono. No primeiro ano a perda de massa foi de 30,08%, e no ano seguinte foi 14,40% , mantendo-se constante nos outros anos. Na recuperação do carbono total, somatória dos valores obtidos por várias frações, em termos relativos, situaram-se entre 118 a 122% de variação. Através do fracionamento foi possível concluir pelo estudo dos teores de carbono extraídos que houve adição de carbono nas frações da matéria orgânica. O total de carbono nas frações em termos absolutos foi de 17,10% de carbono para a AB4 e 1,90% para a área testemunha. Este carbono foi adicionado nas frações humina, com 4.111% de incremento, confirmado através do estudo dos teores relativos percentuais das frações indicando variação na composição das frações do solo. O percentual relativo de carbono obtidos para a fração humina na AB4 foi de 81,10% no entanto a área testemunha A4T apresentou apenas 17,30%, indicando a incorporação do carbono na fração humina, provavelmente estabilizado. E para as outras frações da matéria orgânica, a variação dos teores percentuais representou adição negativa, mostrando que estas, não sofreram alteração devido a adição do óleo residual. A relação das diferentes frações em relação aos ácidos húmicos totais mostrou que as frações que apresentaram relação maior no solo da área de biorremediação AB4 em relação a área testemunha A4T foi a fração ácidos fúlvicos ligados a pirofosfato, a ácidos húmicos ligados a pirofosfato, não representando grande aumento e consideravelmente a fração humina Os resultados obtidos indicam a possibilidade de uso do fracionamento da matéria orgânica como critério de área de biorremediação e fornece a possibilidade para futuras caracterizações das mudanças das substâncias húmicas decorrentes da aplicação de resíduos oleosos no solo.

## ABSTRACT

This work has as its principal target to establish the bioremediation standard for organic matter fractionating, to identify oil wastes transformation and the bioremediation phases of the soils of a given experimental area at REPAR, which was contaminated by oil wastes. Through the evaluation and study of the organic matter by the DABIN fractionation method 1976, it was compared analyzed the contaminated soil and the non contaminated soil defining the fractions qualitative and quantitative evaluation, and the calculation of the humic acid and fulvic acid relations (AH:AF), also the relation among soluble fractions at the extract and humina. Further to the total carbon comparison obtained at the fractions resulting from fractioning and the soil carbon accordingly to WALKLEY & BLACK 1936, and the time biodegradation evaluation, through the mass loss by the ashes method. For this test purposes, the zero time was represented by the index of carbon content at the petroleum. The results obtained through the loss of mass analyses of the bioremediation area 4 and the biodegradation evaluation; demonstrate a decrement of the carbon percentage. At the first year, mass loss resulted 30,08% and by the next year resulted 14,40% being the loss constant at the subsequent years. The total carbon recover, which is the summation of the values obtained at the various fractions, in relative's terms, were rated among 118 to 122% of variation. Through fractionation, it was possible to conclude by the extracted carbon contents study, the summation occurred at the organic matter fractions. The absolute terms of the total carbon at the fractions was established at 17,10% for carbon at AB4 and 1,90% for the witness area. This carbon was added to the humic fractions, with an increment equal to 4.111%, confirmed through the rate of relative percentage study of the fractions, which indicates variation at the soil fractions composition. The relative percentage of carbon obtained for the humina fraction at the bioremediation-4 area, was equal to 81,10%, however, the witness area A4T resulted 17,30% only, which indicates carbon assimilation at the humic fraction, stabilized probably. For the other fractions of the organic matter, the carbon percentage rate variation represented negative addition, demonstrating therefore that these had not suffer alterations by the addition of residual oil. The relationship of the various fractions in relation to the total humic acids, demonstrate that the fractions which showed higher ratio in the soil of the bioremediation-4, compared to the witness area, were the fulvic acids fractions related to pyrophosphate, not representing a higher increase of the humic fraction. The results obtained does indicated the possibility of the organic matter fractioning as a pattern for bioremediation, and does offer future possibilities for humic substances characterization, originated by oil waste in the soil.

## 1 INTRODUÇÃO

A degradação do meio ambiente atribuída às indústrias pela disposição indevida de resíduos sólidos provenientes de seus processos, tem causado grande preocupação à comunidade científica e à população. No entanto, tecnologias de disposição final vêm sendo aprimoradas, para fornecer destino adequado aos resíduos, através do estudo e desenvolvimento de critérios definidos. Especificamente, para áreas contaminadas, têm sido utilizados os parâmetros que envolvem o meio ambiente e a cada resíduo em particular.

Analisando as tecnologias atuais, é possível descrever algumas considerações sobre as dificuldades da escolha e utilização dos processos biológicos, considerando àqueles de menor agressão ao meio ambiente, que respeite e/ou, sejam mais adequados e criteriosos que aqueles propostos pelas políticas e normas estabelecidas através dos órgãos competentes.

Os padrões de remediação podem estar associados ou não ao uso do solo e da água subterrânea. A CETESB de São Paulo desenvolveu um critério Numérico Genérico, Padrões de referência e Remediação RAI (CASARINI, 1996), mas não é uma legislação específica para áreas contaminadas e analisa somente as condições da área a ser tratada.

A disposição de resíduos no Brasil é normalizada pela ABNT, segundo a norma estabelecida por esta agência, as áreas utilizadas para a dispor os resíduos, devem ser construídas e recuperadas pelo agente gerador de poluente (CETESB, 1992). Os resíduos sólidos e semi-sólidos de qualquer natureza não devem ser colocados ou armazenados a céu aberto, tolerando-se apenas a acumulação temporária de resíduos de qualquer natureza em locais previamente apropriados, desde que não ofereça risco a saúde pública (COLETÂNEA DE LEGISLAÇÃO AMBIENTAL SEMA, 1990).

Atualmente o processo de tratamento de resíduos como os aterros, tem sido considerado como áreas de armazenamento temporário, e não como forma de disposição final de resíduos. Quando é efetuado o fechamento do aterro o resíduo que foi disposto é devolvido para que o responsável da geração efetue o destino final de forma mais adequada. Esta consideração é importante, devido aos problemas decorrentes de sua utilização, como a contaminação do lençol freático e o desencadea-

mento para a formação de gases tóxicos e/ou explosivos que podem acarretar riscos à população. Os incineradores, apresentam-se como alternativa para a disposição final, mas esta tecnologia é altamente dispendiosa, além de contribuir para a poluição do ar pelos gases da combustão e por particulados não retidos nos filtros e precipitadores (CARVALHO, 1996).

Observando o solo, sua porosidade, e determinadas características físicas químicas e biológicas que este possui, torna-se atraente sua utilização como meio de depuração de resíduos. A sua eficiência em depurar resíduos é reconhecidamente superior à das coleções híbridas, derivado de sua maior biodiversidade e dos efeitos de retenção ou filtro, que apresenta em relação a uma parte dos componentes dos resíduos (GLÓRIA, 1992).

Importantes avanços sobre a recuperação de áreas principalmente as contaminadas com hidrocarbonetos vêm apresentando resultados espetaculares de biorremediação de ecossistemas afetados (LARRABE & MACKEPRANG, 1993).

Um terço das refinarias dos Estados Unidos vêm utilizando as facilidades do tratamento de resíduos no solo (BARBOSA & OLIVEIRA, 1992). Estes processos de degradação biológica de resíduos de atividades petrolíferas foram desenvolvidos na década de sessenta principalmente pela API nos Estados Unidos e apresentam vantagens em relação ao custo, manutenção, operação e emissão de gases (KRENCZYNSKI, 1996). São classificados segundo sua forma de disposição no solo (GONÇALVES, 1996). Entre eles *compostagem*, *biorremediação*, *landfarming*, e outros.

A biorremediação é o processo de biodegradação de resíduos realizado através da população microbiana do próprio solo ou alóctone selecionada pela inoculação. Compreende uma variedade de processos de biotratamentos que variam significativamente em seus mecanismos de ação principalmente os de mineralização, transformação parcial, humificação e alteração do potencial redox (METTING, 1992). Esta, bem monitorada, possibilita ao solo sua capacidade de estabilizar-se e novamente produzir (LYNCH, 1988). Representando o caminho principal no qual o óleo e seus hidrocarbonetos são removidos do ambiente (FISCHER *et al.*, 1995). Entretanto pode apresentar dificuldades relacionadas a falta de resultados em escala comercial e dos métodos de monitoramento do processo "in loco" e dos seus riscos, o co-

nhecimento sobre os processos biológicos envolvidos, e a regulamentação dos limites de seu uso (METTING, 1992).

O critério utilizado para as áreas de biorremediação da Refinaria Presidente Getúlio Vargas REPAR proposto, em janeiro de 1993, considera a norma EPA 800/81 que estabelece limites de saturação do solo com metais pesados em função da CTC de maneira a proporcionar, após a biorremediação, devolução da área com "qualidade" do solo para uso agrícola. No entanto, critérios complementares aos da norma EPA 800/81 com maior aprofundamento científico no estudo dos efeitos e dos possíveis níveis de recuperação destes solos são necessários. Neste sentido a REPAR, vêm junto à Universidade Federal do Paraná estabelecendo critérios de biorremediação dos solos contaminados com resíduos oleosos, colaborando, assim, no fornecimento de parâmetros para futuras reutilizações destas áreas. Entre estes estudos estão os relativos ao fracionamento da matéria orgânica do solo biorremediado, utilizando para o presente trabalho o método para a investigação das frações decorrentes da biorremediação.

Considerando que a matéria orgânica consiste de duas frações: uma facilmente biodegradável e outra que é estável é possível caracterizar a biodegradação de resíduos oleosos através da verificação das frações estabilizadas provenientes do óleo adicionado, através do método de Fracionamento da Matéria Orgânica de Dabin.

O presente estudo teve como objeto avaliação da matéria orgânica da área de biorremediação experimental da REPAR através do fracionamento da matéria orgânica, analisando comparativamente o solo contaminado em relação ao não contaminado, com a avaliação qualiquantitativa das frações, e cálculo das relações entre as frações ácido húmico e ácido fúlvico (AH: AF), e relação entre as frações solúveis nos extratos e o resíduo humina. Ainda nos materiais do solo foram determinadas a quantidade de óleos e graxas, cinzas e realizadas análises físicas e químicas de rotina.

O objetivo principal foi a possibilidade de estabelecimento de critério de biorremediação com o fracionamento da matéria orgânica identificando as transformações nos resíduos e o estágio de biorremediação de um determinado solo.

O presente trabalho partiu da hipótese que a biodegradação de resíduos oleosos em áreas de biorremediação podem resultar em processos de humificação do

material adicionado, atingindo frações no solo, com o mesmo comportamento das substâncias húmicas perante extratores ácidos e alcalinos, e que estas frações podem representar uma utilização/investigação dos resíduos oleosos e frações residuais do processo de biorremediação.

## 2 REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA

### 2.1 MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO

Os conceitos utilizados para definir a matéria orgânica do solo podem apresentar divergências entre os autores, quanto aos componentes integrantes de seu sistema. Principalmente quando é considerado seu estado de transformação e estabilização no solo (GLORIA, 1992; KAHIL, 1986; LONGO, 1982). A fração do solo chamada matéria orgânica é aquela onde se encontra um sistema complexo de substâncias, cuja formação depende da adição contínua de restos de plantas e animais, e materiais excretados pelos mesmos, independente de seu estado de decomposição, transformação, alterações químicas não enzimáticas e ressíntese (ALEXANDER, 1967).

O acúmulo de certas substâncias concentra-se sobre tudo na matéria orgânica do solo como os sedimentos, plantas, algas e animais (LANGENBACH, 1994). Alguns autores ressaltam que os materiais orgânicos dos resíduos, na sua grande maioria, necessitam sofrer transformações para que adquiram condições com aquilo que se convencionou chamar “matéria orgânica” (GLÓRIA, 1992).

Geralmente são utilizados dois critérios para conceituar a matéria orgânica: o critério microbiológico, ou critério de WAKSMAN, criado em mil novecentos e trinta e seis, e o critério químico (WAKSMAN, 1952). Segundo WAKSMAN, 1952 a matéria orgânica do solo é um complexo heterogêneo, no qual é possível isolar inúmeros compostos químicos que envolvem determinados grupos de constituintes que variam qualiquantativamente com a sua procedência, não considerando como distintas as frações individualizadas da matéria orgânica e atribui ao total as propriedades específicas do solo, que estão em constante estado de modificação e por isso apresentam um caráter dinâmico. O húmus não é, pois, um complexo químico relativamente definido, mas sim, um estado da matéria orgânica e deve ser identificado com a totalidade da matéria orgânica do solo. Destacando que o húmus e matéria orgânica do solo são iguais.

No entanto, para o critério químico, o que importa é o material originário do húmus, substâncias que o acompanham, e o húmus propriamente dito. (OSAKI, 1988).

As substâncias, que pela complexidade e variabilidade, não podem ser incluídas em grupos específicos da química orgânica do solo, são incluídas em grupos separados denominadas de substâncias húmicas (SIERRA & GIOVANOLA, 1997). LAVONRETI, 1996 diz que a matéria orgânica é uma mistura polidispersa de polieletrólitos orgânicos complexos, não é considerada anfólito e devido a dissociação de seus grupos ácidos, ela têm uma carga negativa dependente do pH.

## 2.2 DINÂMICA DA MATÉRIA ORGÂNICA

Muitos estudos foram realizados na tentativa de explicar a dinâmica da matéria orgânica nos solos, principalmente estudos onde os teores de carbono decresciam ao longo do tempo. A matéria orgânica é representada pelo teor de carbono orgânico, seu principal constituinte (ALEXANDER, 1980). Este ciclo pode ser dividido em três fases: Uma fase anabólica ou de organização do dióxido de carbono atmosférico, principalmente pelos microrganismos fotossintetizadores, uma fase de liberação dos produtos fotossintetizados e de sua estabilização no solo, uma fase catabólica ou de mineralização de substratos orgânicos e de transferência do carbono mineral à atmosfera (CERRI, 1987).

Sabe-se que a fração lábil da matéria orgânica constitui aproximadamente um terço do carbono orgânico do solo e tem uma alta taxa de decomposição e um curto período de permanência no solo. A resistência da fração estável da matéria orgânica do solo à decomposição está ligada à sua associação com a fração mineral do solo, seja através da estabilidade estrutural ou física ou da estabilidade coloidal (ligações estáveis) entre a matéria orgânica e cátions metálicos e minerais do solo. A gênese das substâncias húmicas ou humificação é a parte do ciclo do carbono na qual as formas orgânicas do carbono se acumulam e se estabilizam no solo (DUXBURY *et al.*, 1989)

Existem diferentes taxas de decomposição entre os diferentes constituintes dos resíduos de plantas e animais retornados ao solo, apesar de haver uma perda de 55 a 70% do carbono, na forma de CO<sub>2</sub>. Em geral, quanto mais carbono um substrato libera para a atmosfera mais carbono residual haverá na biomassa microbiana e menos restará estabilizado no húmus do solo. A maior parte do carbono residual oriundo dos substratos prontamente disponíveis. Encontram-se presentes no novo húmus, como peptídeos e polissacarídeos. As ligninas e muitas melaninas fúngicas,

que se decompõem lentamente, originam-se das muitas fontes de unidades aromáticas para os ácidos húmicos do solo. Suas estruturas são parcialmente degradadas, transformadas e recombinadas através de reações enzimáticas e autooxidantes para formar macromoléculas húmicas estáveis (STOTT & MARTIN, 1990; KAHIL, 1986). A resistência da fração estável da matéria orgânica do solo à decomposição está ligada à sua associação com a fração mineral do mesmo, seja através da estabilidade estrutural ou física (proteção da matéria orgânica em agregados) ou da estabilidade coloidal que correspondem às ligações estáveis entre a matéria orgânica e cátions metálicos e minerais do solo (BURLE, 1995), entretanto (FAHAD *et al.*, 1982) menciona que em condições naturais, que os compostos mais ricos em nitrogênio são rapidamente degradados.

Foi verificado que o húmus ligado à argila é muito mais resistente à degradação por microrganismos do que o húmus livre (PAUL, 1984 citado por NASCIMENTO, 1989).

Sob condições de cultivo intensivo, a perda de carbono se dá através da transformação oxidativa da matéria orgânica, o que pode resultar no aumento de grupos carboxílicos nos compostos orgânicos (FLAIG *et al.*, 1975). Quanto mais CO<sub>2</sub> é liberado, mais carbono residual haverá na biomassa microbiana e menos restará estabilizado no húmus (CERRI, 1987).

A matéria orgânica apresenta-se como um estágio da reciclagem dos elementos no solo, quando ocorre sua diminuição, pode haver posterior redução nos teores de vários elementos (BASTARDO, 1982). A decomposição lenta ou acelerada do resíduo pode influenciar não somente no conteúdo, como também, favorecer na síntese de determinada fração em detrimento de outras (NASCIMENTO, 1989).

O uso e o manejo do solo alteram a quantidade e a qualidade da matéria orgânica do solo, mais especificamente a proporção dos constituintes húmicos e restos vegetais (CERRI & MORAES., 1992).

### 2.3 SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

As substâncias húmicas são os maiores constituintes e sedimentos orgânicos distribuídos pela superfície da Terra (SCHNITZER & KAHN, 1972).

Por muito tempo, imaginou-se que as substâncias húmicas se formavam de restos orgânicos, mas sem mostrar a sua estrutura. Passados muitos anos desco-

briu-se que o que dava origem às substâncias húmicas eram principalmente as ligninas, e que por isso a decomposição era mais difícil e mais lenta, conforme a ação dos fungos e actinomicetos, acumulando-se no solo (OSAKI, 1988).

A formação das substâncias húmicas foi estudada por diversos pesquisadores (FLAIG *et al.*, 1975; KONONOVA, 1970; DABIN, 1975), mas nem todos os aspectos desta formação foram justificados isoladamente (OSAKI, 1988).

Os processos bioquímicos pelos quais o húmus é formado não são completamente compreendidos, entretanto, há um consenso na existência de 4 fases (FELBEK, 1971) cita quatro hipóteses para a sua formação:

- Decomposição dos componentes da biomassa, incluindo lignina, transformando-os em compostos simples;
- Metabolização microbiana dos compostos simples;
- Ciclagem do C, H, N e O entre a matéria orgânica e os organismos do solo;
- Polimerização mediada microbianamente dos compostos orgânicos ciclados (SPOSITO, 1989)

O conceito mais freqüentemente usado tem sido o proposto por KONONOVA, (1966), para representar as várias substâncias húmicas como um sistema de polímeros que variam na sistemática e conteúdo de elementos, acidez, grau de polimerização e peso molecular, estes compostos orgânicos presentes no solo são classificados e divididos em dois grupos principais: o primeiro grupo de substâncias, constituídas de componentes da decomposição de resíduos vegetais e animais, produtos dessa decomposição e produtos de ressíntese nas células dos microrganismos. Este grupo consiste de vários compostos orgânicos nitrogenados, e não nitrogenados, como exemplo, proteínas, carboidratos, ácidos orgânicos, ceras, resinas e outros, formam 10-15% do total da matéria orgânica do solo, e o outro grupo é denominado de substâncias húmicas, formam entre 85-90% do total da matéria orgânica do solo. As substâncias de ambos os grupos, incluindo os resíduos parcialmente decompostos formam a matéria orgânica do solo (KONONOVA, 1966).

Segundo (SPOSITO, 1989), o húmus compreende as biomoléculas e as substâncias húmicas. As substâncias húmicas não são sintetizadas diretamente para sustentar ciclos de vida da biomassa do solo. São, compostos poliméricos, produzidos através da ação microbiana e que diferem das biomoléculas, devido à sua

estrutura molecular e sua longa persistência no solo. A definição de substâncias húmicas não implica em um grupo específico de compostos orgânicos, mas na diferença estrutural em relação às biomoléculas e na natureza desenvolvida (SPOSITO, 1989). As substâncias húmicas são divididas em três frações principais: ácido húmico, ácido fúlvico e humina (SCHINITZER & KAHN, 1972).

O grau de humificação é diferenciado entre os diversos sistemas de preparo o que influencia na composição dos ácidos húmicos, fúlvicos e huminas (RESCK, 1997).

CARDOSO, 1992 diz que a composição química tem efeito profundo nos processos de humificação. Embora ainda não se conheça bem a necessidade de precursores fenólicos para sua geração. Os fenóis são compostos relativamente instáveis, susceptíveis a degradação com a abertura do ciclo aromático sob influência de numerosos microrganismos, podendo também ser oxidados com a formação de radicais livres (THAUK -TORNISIELO, 1997).

Atualmente, não é possível descrever a configuração molecular das frações das substâncias húmicas a não ser em termos gerais. Entretanto, os grupos funcionais, especialmente os mais reativos, com prótons e cátions metálicos, estão razoavelmente bem caracterizados. Eles incluem, por ordem decrescente de conteúdo típico (SPOSITO, 1986): Carboxilas > OH fenólicos e alcoólicos > quinonas e carboxilas cetônicas > aminas > sulfidrilas (SH), que dissociam entre pH 5 e 7.

Estudos espectroscópicos, e outros fisicoquímicos têm demonstrado as principais características estruturais dos ácidos fúlvicos e ácidos húmicos que influenciam na reatividade química:

1. **POLIFUNCIONALIDADE:** existência de uma variedade de grupos funcionais e um campo extenso de reatividade destes grupos, representativos de uma mistura heterogênea de polímeros interagindo.

2. **CARGA MACROMOLECULAR:** desenvolvimento de caráter aniônico em uma estrutura macromolecular, com os efeitos resultantes na reatividade do grupo funcional e na conformação molecular.

3. **HIDROFILICIDADE:** tendência de formar fortes pontes de hidrogênio com moléculas de água, solvatando grupos funcionais polares, como os ácidos carboxílicos e hidroxilas.

4. **INSTABILIDADE ESTRUTURAL:** capacidade de apresentar associações intermoleculares e mudar a conformação molecular em resposta a mudanças no pH, nas condições de redox, na concentração eletrolítica e nas ligações dos grupos funcionais (SCHINTZER, 1978).

Algumas das mais importantes propriedades da matéria orgânica do solo são resultantes da natureza orgânica dos ácidos associados com o húmus (MAGDOF, 1986).

Diversos constituintes orgânicos do solo, como ácidos mono, di, tricarboxílicos e polifenóis podem reagir com os metais, entretanto, devido a maior porcentagem dos ácidos fúlvicos e húmicos na matéria orgânica do solo, a contribuição destes na complexação dos elementos é maior (STEVERSON, 1982). Devido às características químicas dos grupos funcionais, as substâncias húmicas, as cargas superficiais dos materiais químicos, podem ser influenciados pelo pH contribuindo significativamente na capacidade de troca catiônica dos solos, proporcionando-lhes uma alta capacidade de tamponamento (VERDADE citado por OSAKI, 1988).

Segundo TISDALL & OADES (1982) citados por SIQUEIRA (1985), ligantes orgânicos estão envolvidos na estabilização dos agregados do solo. Os agentes persistentes consistem de material aromático, que associados à óxidos de ferro alumínio e alumino silicatos formam uma grande proporção dos componentes sólidos do solo. Estes componentes provavelmente incluem complexos de argila-metal polivalente-húmus.

Segundo (ANDREUX & BECERRA, 1975) Em solos ricos em argila ou silte, de alta superfície específica, aumenta a possibilidade de adsorção de moléculas orgânicas, o que favorece sua polimerização e transformação em compostos húmicos de alto peso molecular.

### 2.3.1 Ácidos fúlvicos

São considerados "ácidos fúlvicos" substâncias normalmente extraídas do solo por soluções alcalinas, são de cor amarelada isoladas por soluções ácidas, após a precipitação de ácidos húmicos (KAHIL, 1986).

A porcentagem de carbono nos ácidos fúlvicos é menor, em compensação apresenta maior porcentagem de oxigênio, e grande número de grupo ativos (carbo-

xílicos e fenólicos) em relação aos ácidos húmicos (SPOSITO, 1989; LONGO, 1982).

Os fulvatos, assim também conhecidos os ácidos fúlvicos, são resultantes da reação de um ácido com uma base, ou seja, resultantes da transformação relativamente rápida ao contato da fase mineral, dos precursores solúveis originados pelos detritos vegetais. Podem ser ácidos fenólicos e ácidos alifáticos que se organizam e se polimerizam mais ou menos rapidamente no solo. Conforme as atividades ecológicas locais e a atividade biológica global (DUCHAUFOR, 1966). Assim sendo pode se dizer que grupos carboxílicos e hidroxilas contribuem na natureza ácida dos ácidos fúlvicos, e que esses ácidos fúlvicos constituem-se em parte, de compostos fenólicos de ácidos benzeno carboxílicos unidos por pontes de hidrogênio formando estruturas polimerizadas de considerável estabilidade (SCHNITZER & KHAN, 1972).

STEVENSON, 1982 afirma que as combinações de metal e matéria orgânica insolúvel são aquelas associadas aos ácidos fúlvicos ou ácidos orgânicos.

### 2.3.2 Ácidos húmicos

Fração solúvel em álcalis e precipitada através da acidificação do extrato alcalino (SCHNITZER, 1978). Os ácidos húmicos aparentam estruturas moleculares complexas consistindo de substâncias que apresentam estrutura comum, embora não sejam idênticas. Apresentam grupos funcionais como hidroxilas fenólicas, hidroxilas alcoólicas, grupos metoxil e carbonilas, hidroxibonilas ácidos hidroxibenzóicos, toluenos e outros fragmentos aromáticos. Incluem-se nas recém formadas moléculas de ácidos húmicos os peptídeos, aminoácidos, aminoaçúcares, ácidos gordurosos, frações de parede celular e de citoplasma microbianas e outras estruturas alifáticas que compreendem a maioria do carbono nos ácidos húmicos.

Ácidos húmicos e polissacarídeos podem constituir mais de 80% do total de húmus extraível. Os ácidos húmicos pretos ou marrons escuros são a maior parte. Supõe-se que eles sejam, complexos de macromoléculas com aromáticos, aminoácidos, aminoacúcares, peptídeos, ácidos alifáticos e outros componentes alifáticos envolvidos em ligações entre grupos aromáticos (BRADY, 1983).

Alguns dos polissacarídeos estão fortemente associados aos colóides das argilas ou às moléculas dos ácidos húmicos (OSAKI, 1988).

À medida que aumenta a maturidade dos ácidos húmicos, sua natureza aromática torna-se cada vez mais definida. A razão entre estruturas aromáticas e alifáticas em suas moléculas determina o grau de manifestação de propriedades como capacidade de troca e afinidade com água (LONGO, 1982).

Os ácidos húmicos servem de ponte de ligação entre as partículas de argila, (SIQUEIRA, 1985) ligam-se através de eletrovalências negativas, quando estão cobertas por camadas de cátions positivos de 2 ou 3 eletrovalências, como exemplo, o alumínio, o ferro, o cálcio e o magnésio. Nos oxissolos tropicais para os ácidos húmicos obterem este efeito agregante, necessitam de muito ferro e alumínio (BURLE, 1995).

Os ácidos húmicos, fúlvicos, assim como os ácidos orgânicos mais simples podem dissolver ou decompor minerais tais como clorita, feldspatos, gibsitais, goetita, hematita e mica (NASCIMENTO, 1989).

### 2.3.3 Humina

A humina é menos conhecida, todavia parece ser mais condensada que os ácidos húmicos e sua insolubilidade pode estar relacionada com uma ligação muito íntima com a fração mineral do solo. Entretanto existem divergências entre vários autores (TAUK-TORNISIELO, 1997).

Segundo (LONGO, 1982; NASCIMENTO, 1989), são tidas como substâncias altamente desenvolvidas e resistentes a biodegradação, constituídas de ácidos húmicos de natureza mais simples, fortemente ligados com a fração mineral. A estabilidade destas ligações impede que a humina seja extraída pelo tratamento com soluções alcalinas, sendo possível a extração segundo PARRA, (1986) citado por NASCIMENTO, (1989) com hidróxido de sódio à quente.

## 2.4 EFEITOS DA MATÉRIA ORGÂNICA SOBRE AS PROPRIEDADES DO SOLO:

A matéria orgânica fresca trata-se de um material estabilizado de pouca reatividade, pouco biodegradável, porém com alta capacidade catiônica (100 a 300 meq), alta capacidade de retenção de água e passível de formar complexos organominerais, incrementando a estruturação do solo e passível de atuar como quelante de metais pesados (SCHNITZER, 1972). É fundamental para a produtividade do solo segundo MAGDOF, (1996).

Apresenta-se como um grande reservatório de nutrientes para plantas e especialmente fonte de N, P, S (CANTARELLA, H., ABREU, C. *et al.*, 1992).

ALEXANDER, 1967 além de constituir importante fonte de energia e nutrientes para os microrganismos heterotróficos, a matéria orgânica, colabora para a retenção de água e capacidade de retenção filtro, favorecendo o desenvolvimento microbiano.

Conforme Vieira & Costa, (1997) o húmus possui função multiforme, tornando-se sustentáculo de atuação como condicionador nutricional em ambientes normais em que se processa a exploração do solo.

A diminuição do teor de matéria orgânica do solo representa uma redução nos teores de vários elementos que a compõem, tornando evidente que o comportamento físico-químico de um solo pode ser drasticamente alterado pela incorporação ou pela destruição da matéria orgânica (SIQUEIRA, 1994).

CASAGRANDE *et al.*, 1997 concluiu que a matéria orgânica presente no solo ácido de superfície diminui a concentração de chumbo na solução de equilíbrio, em condições ácidas, mais efetivamente que os componentes minerais. Além destas características, a matéria orgânica, segundo (BOLLAG, 1996), têm se revelado muito importante na retenção de pesticidas, reduzindo a lixiviação, "runoff" protegendo assim a qualidade das águas subterrâneas.

## 2.5 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

A caracterização das substâncias húmicas é um importante instrumento para o conhecimento das propriedades fundamentais do sistema orgânico do solo. Os dados obtidos, podem ser aplicados ao estudo das interações existentes entre a fração orgânica e inorgânicas do solo, influência de clima, solo e vegetação, na formação das substâncias húmicas, processos de humificação, atuação de substâncias húmicas como controladores de funções fisiológicas dos organismos vivos, fertilidade do solo, microbiologia do solo, efeitos geoquímicos e outros (FLAIG *et al.*, 1975).

A caracterização analítica detalhada do húmus pode ser realizada, por diversas técnicas, tais como espectroscopia no ultravioleta (UV-Vis), infravermelho (IV), infravermelho com transformada por Fourier (IVTF), ressonância magnética nuclear, medidas de peso molecular, entre outras, além dos tradicionais acima citados (MARTIN NETO *et al.*, 1991).

BENITES *et al.*, 1999 através da espectroscopia no infravermelho e análise termodiferencial relatou que estas foram importantes ferramentas na identificação de diferenças qualitativas entre ácidos húmicos provenientes de diferentes pedo ambientes, notadamente por apresentarem um custo relativamente baixo, quando comparadas com outras técnicas espectroscópicas. Neste estudo, verificou-se que grupos carboxílicos estavam envolvidos nos processos de ligação entre os ácidos húmicos e matriz mineral, embora esta técnica não tenha sido suficiente para confirmar tal afirmativa.

MARTIN NETO *et al.*, 1997 caracterizou a matéria orgânica através do uso da NMR (ressonância magnética nuclear) em substâncias húmicas, contudo poucos são os resultados e recentes os grupos que se utilizam desta técnica. Em 1996 o mesmo autor realizou estudo de caracterização sobre as interações a nível molecular para determinar parâmetro da adsorção do solo, perda da atividade fitotóxica, grau de toxidez dos resíduos gerados, pelo uso de herbicidas atrazina 2,4 D, com ácidos húmicos extraídos pelo uso simultâneo de diferentes métodos espectroscópicos (MARTIN NETO, 1996).

TIPPING & COOKE, 1982 mostraram através da eletroforese que amostras de goetita tornam-se negativamente carregadas devido à adsorção de substâncias húmicas.

Geralmente, a matéria orgânica do solo é caracterizada pelo teor de carbono orgânico e pela relação C/N que expressa seu grau de decomposição (VOLKOFF & ANDRADE, 1976). Este tipo de análise, porém, não diferencia a matéria orgânica não decomposta (matéria orgânica leve) da matéria orgânica decomposta (ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e huminas), das excreções das raízes e da fauna edáfica (macro, meso e microrganismos) e não distingue adequadamente a matéria orgânica da turfa e das substâncias húmicas (OSAKI, 1988).

BAYER & BERTOL, 1999 na caracterização química de um cambissolo húmico afetado por sistemas de preparo, com ênfase na matéria orgânica, verificou que a CTC efetiva relacionou-se significativamente com o teor de carbono e com o pH do solo além de concluir que os aumentos relativos de carbono e nitrogênio foram maiores na fração grosseira da matéria orgânica do que na matéria orgânica total do solo.

CERRI, 1992 utilizou-se de  $^{13}\text{C}$  como traçador natural, verificando a dinâmica da matéria orgânica do solo sob plantação de cana de açúcar, na qual ocorre um decréscimo de carbono. CONDRON, 1998 caracterizou a natureza química da matéria orgânica do solo sobre a pastagem através do carbono  $^{13}\text{C}$  -NMR espectroscopia.

Estudando o efeito do lodo de esgoto adicionado a um solo latossolo de cultivo de cana-de-açúcar (MELO *et al.*, 1994), através do teor de carbono orgânico verificou que o carbono orgânico contido no lodo de esgoto foi rapidamente transformado em C-humina.

O conceito oficial da matéria orgânica era representado pelo “carbono multiplicado por 1,724, e determinado por via úmida (combustão) ou via seca”. Este fator surgiu considerando-se que a matéria orgânica do solo possuía 58% de carbono. Mas recentemente os pesquisadores estão concluindo que 52% de carbono se aproxima melhor da realidade, e por essa razão, começaram a utilizar o fator 1,93 mudando assim, o seu conceito (OSAKI, 1988).

Os componentes orgânicos e inorgânicos são intimamente associados, e geralmente é necessário primeiro separá-los para poder estudá-los em maiores detalhes (SCHINITZER & KHAN, 1978). Porém muitos trabalhos realizados apresentaram diferentes resultados usando os métodos de extração, devido às propriedades físicas e químicas dessas substâncias e, pelas ligações com a fração mineral do solo (TAUK-TORNISIELO, 1997). O mesmo autor comenta sobre as dificuldades da extração, sem que as moléculas sejam modificadas e sem provocar a humificação artificial.

O método clássico de extração do húmus é por solubilização com álcalis. As principais desvantagens deste método são a dissolução da sílica mineral e de tecidos orgânicos frescos que contaminariam o extrato, a autoxidação de alguns constituintes orgânicos (STEVEYSON, 1982). Diversos métodos, físicos e químicos têm sido recomendados para o fracionamento da matéria orgânica do solo (SCHINITZER & KHAN, 1978).

DUCHAFOUR, 1980 tem obtido dados sobre as substâncias húmicas de numerosos solos da África baseado no método de extração com pirofosfato e eletroforese.

Um estudo comparativo de extratores químicos de substâncias húmicas em um latossolo roxo sob floresta tropical permitiu detectar que os teores de substâncias húmicas extraídas do solo foram dependentes das características químicas das soluções extratoras. A solução  $\text{NaP}_2\text{O}_7$  de DABIN foi a que extraiu maiores quantidades de substâncias húmicas com um valor médio de  $183,79 \text{ d.}^\circ\text{g}^{-1}$  de solo, seguidas das soluções de  $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  (IHSS),  $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol.L}^{-1} + \text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \text{ mol.L}^{-1}$  (KONONOVA, 1996),  $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol}^{-1}$  (Dabin e CHELEX 100 (FREIXO *et al*, 1997).

Os materiais orgânicos recém decompostos no solo podem ser extraídos e as proporções relativas de cada uma das frações podem ser avaliadas isoladamente (VOLKOFF e ANDRADE, 1976). Este processo consiste em separar a fração não humificada da fração denominada matéria orgânica leve da fração humificada. Logo a seguir, extraí-se os ácidos fúlvicos e os ácidos húmicos e realiza-se a dosagem da fração humina que corresponde a matéria orgânica humificada dificilmente extraível (VOLKOFF & ANDRADE, 1976). A separação é possível após a extração das frações da matéria orgânica, com base nas características de solubilidade, mas através de extrações brandas, e após determinadas pelo fracionamento da matéria orgânica como propôs (DABIN, 1971).

Estudos com solos contaminados de petróleo envolvem a caracterização da matéria orgânica e/ou o carbono total (CARVALHO, 1995).

## 2.6 RESÍDUOS OLEOSOS

As borras oleosas constituem-se de uma variedade de compostos sólidos, semi-sólidos, pastosos e líquidos originados de diferentes processos industriais (NELSON, 1949).

A composição das borras é bastante variável, visto que são diversas fontes que as originam e fatores como qualidade do petróleo refinado, eficiência de equipamentos e qualidade no processo no processo de separação de óleo e água, limpeza de equipamentos e tubulações com solventes e mistura com resíduos acumulados que interferem na sua composição, com grandes variações qualitativas e quantitativas, e contribuem para a variabilidade na composição de químicos das borras oleosas.

Basicamente, constitui-se de água, areia, graxas, óleos, compostos orgânicos e minerais, compostos químicos e metais pesados como Zn, Cr, Vn, Pb, Fe e

outros em pequenas quantidades (CASARINI, 1987 citado por MIELNICZUK, 1991). A fase oleosa é composta por uma mistura complexa de numerosos constituintes orgânicos (MIELNIZUK, 1991).

Sabe-se que os resíduos do processamento do petróleo são constituídos de compostos polares e de hidrocarbonetos. Os compostos polares possuem moléculas que contém N, S e O adicionados ao carbono e hidrogênio e são representados por asfaltenos e resinas. Os hidrocarbonetos constituem-se de cadeias saturadas ou aromáticas sendo que as cadeias saturadas formam alcanos e compostos cíclicos. Nos alcanos, as ligações podem ser simples ou ramificadas. Os hidrocarbonetos com cadeias aromáticas são classificados como mononucleares e polinucleares (PAH) (HUESEMANN, 1994).

Em pesquisas realizadas por KARR (1985), citado por MIELNICZUK (1991), os PAH foram encontrados em diversos resíduos provenientes dos separadores de água e óleo de indústrias petroquímicas e a correlação química/toxicológica revelou que os PAH contribuem significativamente para as propriedades toxicológicas do resíduo.

Em geral, as indústrias do setor petrolífero, possuem suas próprias estações de tratamento de águas residuais, compostas basicamente por três etapas de limpeza e depuração da água (CARVALHO & ALMEIDA, 1995):

- Tratamento primário: Consiste da separação da água e do óleo além das partículas sólidas sobrenadantes, é realizada em piscinas de separação (SAO) e flautas móveis de arraste, retiram a fração sobrenadante;
- Tratamento secundário: Consiste da retiradas das partículas sólidas em suspensão na água (argilas e agregados). Onde a separação é realizada em tanques de flotação e floculação dos sedimentos. No tratamento secundário, ocorre também a digestão aeróbica da água residual, promovida pela população de microrganismos presentes no lodo ativado;
- Tratamento terciário: Consiste da fase final do processo de depuração da água residual que consiste na permanência, em uma lagoa de estabilização, da água provinda do tratamento aeróbico. Nesta fase, os compostos inorgânicos residuais remanescentes são consumidos principalmente por algas e pela microfauna aquática (BARTHA, RUTGERS e BRUNWI-

CH, 1986). As borras oleosas são constituídas principalmente pelos materiais não retidos nos tratamentos primário e secundário (SOUZA, 1999).

Além dos rejeitos provenientes das estações de tratamento de efluentes (ETE), as borras ainda podem proceder das limpezas dos separadores de água e óleo, limpeza dos diques e fundos dos tanques, limpeza de canaletas e caixas de drenagem, limpeza de lagoas para estabilização de efluentes, serragens e palhadas contaminadas com óleo aquática (BARTHA, RUTGERS e BRUNWICH, 1986).

Conforme a ABNT (1987), os resíduos oleosos são classificados como Classe I. Estes materiais tóxicos devem ser tratados ou armazenados de maneira que não causem danos ao homem e meio ambiente.

## 2.7 BIODEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS OLEOSOS

Se usado na biodegradação corretamente, o composto xenobiótico alvo servirá como principal fonte de carbono para o microrganismo, induzindo a síntese apropriada de enzimas, se necessário for (LYNCH, 1989).

A biodegradabilidade geral de qualquer produto de petróleo irá depender de elementos ou compostos químicos degradáveis do qual é composto (RAYMOND *et al.*, 1990). Poucos microrganismos são capazes de biodegradar completamente uma substância e os xenobionetes, geralmente, são degradados por um consórcio de muitos microrganismos (LANGEWNBACH 1994). São necessárias a adequada caracterização química do resíduo e a avaliação dos seus efeitos no solo (GLÓRIA, 1992).

A variabilidade do solo, a localização espacial da contaminação e a limitação de métodos analíticos também limitam a claridade da demonstração dos resultados dos projetos (LA BELLE & HADLEY, 1994).

Segundo HUNGRIA & URQUIAGA (1992) citado pôr SOUZA (1994), no rizoplane, os microrganismos liberam ácidos que decompõem minerais presentes no solo e nas rochas, excretam sideróforos (quelantes de baixo peso molecular) que complexam íons metálicos e promovem reações de oxidação e redução.

A adaptabilidade dos microrganismos é enorme cada geração ocorre, geralmente, num curto período de tempo, de até trinta minutos, garantindo desta forma uma alta probabilidade de aparecimento de mutantes. Conseqüentemente a adaptação às condições inicialmente adversas é maior e, com isto, as possibilidades de

sobrevivência da população aumentam KOCH, (1993) citado pôr LANGERBACH, (1994).

Para que se entenda a variação das vias catabólicas é preciso considerar a biodiversidade microbiana, pois algumas substâncias são degradadas por um consórcio de microrganismos SLATER & LOVAT, (1994) citado pôr LANGERBACH, (1994).

Estudos têm revelado efeito da biodegradação pela inoculação. ZOBELL (1946), citado pôr HAIMANN (1995), notou que várias espécies representando 30 gêneros de microrganismos utilizam-se de hidrocarbonetos.

Alguns pesquisadores como SKALADANY & MEETING JUNIOR, (1992) reduziram contaminações de petróleo em 7% do peso.

ATLAS e BARTHA (1972) citados pôr HAIMANN (1995), assinalaram 22 gêneros de bactérias, 1 gênero de alga e 14 fungos, todos capazes de se utilizarem de hidrocarbonetos.

KADRI *et al.* (1986) citado pôr FISCHER *et al.* (1995), identificaram *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter spp.* e *Escherichia coli*, como sendo bactérias que biodegradam óleo na Baía do Kuwait.

Durante o tratamento os hidrocarbonetos são convertidos pelos microrganismos em dióxido de carbono, água e bioamassa (ATLAS & BARTHA, 1981). A biodegradação é decorrente do metabolismo de microrganismos. Estes para alimentar-se necessitam de substratos e assim, desencadeiam reações que propiciam o aparecimento de subprodutos, ou total desaparecimento de outros.

Um número considerável de microrganismos existentes no solo, são capazes de degradar hidrocarbonetos provenientes de resíduos de petróleo, e podem ser estimulados pela adição de nutrientes que são limitantes na degradação de hidrocarbonos (CONCAWE, 1980; ENGLERT *et al.*, 1993 ; API, 1995).

SKLADANY & METTING (1992), descrevem que nem todos os compostos xenobióticos são susceptíveis a rápidas e completas biodegradação, necessitando de uma população com capacidade metabólica em condições de crescimento e concentração apropriada de substrato e nutriente.

No trabalho de AELION & BRADLEY (1991) citado por CASTRO (2000), embora trabalhando com aquíferos, notaram a presença de uma população microbi-

ana, capaz de crescer e utilizar muitos compostos orgânicos dos combustíveis, em solos altamente contaminados. Notaram ainda que o nitrogênio pode ser limitante ao processo de biodegradação de hidrocarbonetos.

CONCAWE (1980); SKLADANY & METTING (1992) comentam sobre a capacidade de certos microrganismos do solo em degradar hidrocarbonetos, tornam-se especializados na degradação de hidrocarbonetos, quando estes são adicionados ao solo.

McGILL *et al.*, (1981), notou um subsequente declínio na respiração após alguns dias de incubação, na atividade dos microrganismos devido a completa decomposição de frações mais lábeis ou à disponibilidade limitada de nutrientes, como nitrogênio e fósforo.

ANDERSON (1979) cita que fatores do solo podem influenciar na biodisponibilidade dos resíduos oleosos, que podem promover acúmulos destes nos locais aplicados. A estabilização pode ocorrer através de mecanismos físicos e químicos, RASIAH *et al.* (1991) demonstraram que a dispersão física aumenta a disponibilidade dos resíduos oleosos orgânicos estabilizados para a biodegradação pelos organismos do solo.

OTTE (1997) citado por CASTRO (2000), trabalhando com degradação de pentaclorofenol (PCP) na presença de diferentes substratos obteve o melhor resultado quando o substrato era solo contaminado. As partículas de solo agem como um meio de imobilização e proteção para a biomassa promovendo decréscimo na toxicidade do contaminante mantendo a biodisponibilidade do mesmo para os microrganismos indígenas. A adição de partículas de solo contaminadas, além de servir como suporte para a biomassa é também fonte de inóculo ativo.

PARFITT & MORTLAND (1968) e RAMAN & MORTLAND (1969), demonstraram que a estabilização química também ocorre através de reações entre partículas de argila e os resíduos oleosos. A adsorção dos resíduos oleosos na fração argila ocorre através de pontes de hidrogênio, que embora sejam fracas ocorrem em um número muito grande, tornando-as fortes. RIIS *et al.*, (1995) citam que a degradação de óleos minerais pode ser prejudicada pela insuficiente biodisponibilidade dos hidrocarbonetos como adsorção, inclusão do substrato num poro não acessível e ligação com matéria húmica.

GREGORICH *et al.*, (1989) descreveu sobre a presença de somas significativas de material orgânico húmico biodegradável que estão fisicamente protegidos internamente pelos agregados do solo.

MORTLAND (1986) citado por CASTRO (2000), observou que muitos dos constituintes dos resíduos oleosos são hidrofóbicos e polares, quando estes interagem com as partículas de argila. Adições constantes de resíduos oleosos poderão ser adsorvidas pelos complexos argilo-orgânicos e eventualmente levar a formação de agregados do solo hidrofóbicos por microrganismos (BARTHA, 1986).

GRUIZ E KRISTON (1995), encontraram valores de respiração pela evolução do CO<sub>2</sub> dez vezes maior que o normal, provando a presença da biodegradação em solos contaminados com óleo. Citam também o decréscimo no conteúdo de óleo.

DOBSON E WILSON (1964) em seus estudos de biodegradação mostraram que o consumo de O<sub>2</sub> pelo solo com querosene era significativamente maior do que o solo com óleo mineral ou petróleo, amostras com 2% de petróleo cru possuíam maior taxa de respiração 35,84 ml de O<sub>2</sub> / 60 horas. Amostras com 10% apresentaram consumo de 26,75 ml de O<sub>2</sub> / 60 horas; e amostras com 20 % apresentaram consumo de 11,78 ml de O<sub>2</sub> / 60 horas, valor este muito próximo ao obtido pelo controle que foi de 9,0 ml de O<sub>2</sub> / 60 horas.

## 2.8 BIORREMEDIAÇÃO

O uso da biotecnologia tem realizado importantes avanços, no último decênio sobre a recuperação de áreas, principalmente as contaminadas com hidrocarbonetos, apresentando resultados espetaculares de biorremediação de ecossistemas afetados (LARRABE & MACKEPRANG, 1993).

Nestes sistemas a biorremediação de solo, é realizada através de microrganismos do próprio solo ou inoculados, que promovem a degradação de resíduos orgânicos biodegradáveis, (ATLAS & BARTHA, 1981).

A remediação compreende uma variedade de sistemas que variam significativamente em seus mecanismos de ação, (MEETING, 1992).

Apresentam diferentes formas de disposição: "ex situ" e "in situ". Na disposição "ex situ" a biodegradação é mais acelerada, há facilidade de controle e utiliza-se de uma gama ampla de contaminantes e tipos de solo. Porém nos sistemas de tratamento "in situ" não é necessário escavar o solo contaminado, levantam menor

quantidade de poeira, liberam menos contaminante e podem tratar uma grande quantidade de solo, e apresentam custos mais baixos que as técnicas "ex situ" (EPA, 1996).

A degradação biológica de resíduos de atividades petrolíferas foi desenvolvida principalmente pela API na década de sessenta. Um terço das refinarias dos Estados Unidos utilizam-se das facilidades do tratamento no solo (BARBOSA & OLIVEIRA, 1992).

Entre os sistemas mais utilizados de disposição "in situ", destacam-se as áreas de biorremediação e landfarming. A biorremediação bem monitorada possibilita ao solo sua capacidade de estabilizar-se e novamente produzir (LYNCH, 1988). Representando o caminho principal no qual o óleo e seus hidrocarbonetos são removidos do ambiente (FISCHER *et al.*, 1995).

O *landfarming* difere das áreas de biorremediação, pois se trata de um sistema de tratamento de resíduos sólidos funcionando como um reator biológico para decomposição principalmente de compostos recalcitrantes (CARVALHO *et al.*, 1995).

Estes processos têm a capacidade de transformar compostos químicos complexos em compostos químicos mais simples pela ação de microrganismos do solo ou inoculados. A transformação que ocorre não é sempre considerada total, mas pode ocorrer oxidação e/ou redução de alguns compostos (MEETING, 1992).

Os contaminantes que podem ser biodegradados neste sistema são os compostos não halogenados, tanto voláteis como semi voláteis e combustíveis. A eficácia das medidas biocorretivas é limitada em locais que apresentam alta concentração de metais, compostos orgânicos altamente clorados e sais orgânicos porque estes compostos são tóxicos para os microrganismos (EPA, 1996).

Muitos xenobiontes são utilizados como fonte de carbono e, portanto de energia para a proporção e a disponibilidade de substratos e nutrientes as condições de umidade, a aeração e temperatura e a presença de compostos inibitórios são fatores que geralmente limitam a biorremediação (SHANNON & ULTERMAN, 1993 citado por SIQUEIRA, 1994).

HAIMAN (1995), utilizou o fungo branco macerador como inoculante para acelerar a biodegradação de hidrocarbonetos e pentacloretofenol no solo.

JOBSON *et al.*, (1974), trabalhou com a adição de óleo, fertilizantes e bactérias inoculadas em um solo, onde os experimentos foram realizados através de tratamentos de forma isolada ou combinada. Obtiveram aumento significativo na degradação de óleo quando da adição de nitrogênio e fósforo. Observaram que a adição de bactérias incrementa levemente a taxa de degradação do óleo. Os autores atribuem esse fato ou pelo baixo nível de aplicação do microrganismo ou pela inabilidade desta bactéria em sobreviver às condições naturais de campo existentes na área, no tratamento que envolvia somente a aplicação de óleo notaram parcial utilização de frações saturadas demonstrando que o solo utilizado possuía microrganismos capazes de degradar óleo cru.

BOLLAG, (1994), relatou que a técnica de biorremediação "in situ" geralmente envolve o aumento da atividade microbiana indígena, ou inoculação de microrganismo cultivados no meio contaminado. HALLGARTH *et al.* (1997) citam em seu experimento que existem micróbios que podem ser aclimatados para degradar compostos tóxicos e persistentes, se os mesmos são supridos de nutrientes, carbono e oxigênio. FREDRICKSON *et al.* (1991), citado por SOUZA, (1994), trabalhou com uma bactéria capaz de degradar uma variedade de compostos aromáticos e concluíram que microrganismos indígenas podem ter potencial para degradação "in situ" de contaminantes orgânicos.

Entretanto, fatores como a toxidez variável dos resíduos, manejo inadequado do solo, dificuldades analíticas para determinação da velocidade de degradação, o desconhecimento da ecologia da maioria destes microrganismos especializados, fazem diminuir a eficiência de degradação do resíduo no solo (GRUIZ & KRISTON, 1995).

Portanto, existem critérios para avaliação em laboratório que devem ser levados em consideração para a aceleração do processo de biodegradação, como a heterogeneidade do resíduo, o efeito da concentração, compostos tóxicos persistentes a degradação e microrganismos específicos (HUESEMANN, 1994).

Além da relação C/N que é um parâmetro fundamental a ser avaliado antes da incorporação, devem ser consideradas outras diferenças qualitativas entre compostos orgânicos. A maior parte dos resíduos é constituída de polímeros mais ou menos complexos, os quais sofrem inicialmente uma hidrólise enzimática (com atuação fundamental das exoenzimas microbianas). De acordo com a facilidade de de-

composição algumas substâncias orgânicas têm uma vida muito efêmera no solo, enquanto outras, mais recalcitrantes, permanecem quase que inalterados por longos períodos de tempo (CARDOSO, 1992).

## 2.9 ACOMPANHAMENTO DA BIODEGRADAÇÃO EM ÁREAS DE BIORREMEDIAÇÃO

Algumas metodologias de avaliação são fundamentais para o acompanhamento da transformação ocorrida no solo após a aplicação de resíduos oleosos em áreas de biorremediação. Como foi descrito no item anterior, a área deve ser analisada levando em consideração as características do solo, do resíduo da biota e as transformações decorrentes de outros fatores químicos físicos e biológicos que envolvem este ecossistema. As análises são fundamentais para traçar os parâmetros que envolvem a recuperação deste sistema dinâmico que é o solo. A dinâmica do carbono é responsável pelas principais modificações que envolvem este sistema, sendo caracterizada através das transformações que envolvem o balanço quantitativo e qualitativo do sistema orgânico envolvido, e pode se aproximar da realidade dos fatores que envolvem a mineralização e as incorporações de fragmentos dos resíduos oleosos passíveis de transformações, caracterizando os efeitos das transformações ocorridas através da biodegradação do óleo.

O uso combinado de tecnologias pode minimizar os problemas decorrentes de erros de metodologia analítica, e o acompanhamento da degradação pode ser feito através do uso combinado das determinações de óleos e graxas (por extração com solventes), de cinzas e carbono no solo (CARVALHO, 1995).

É relevante a determinação do teor de óleo utilizada para *Landfarming*, e área de Biorremediação REPAR (Método de Ensaio M-6360-026 Determinação do Teor de água de solúveis em n-Heptano e Tolueno, em solos e Borrás), apresenta o inconveniente de, principalmente, superestimar a degradação devido a dificuldade de extração (recuperação) do óleo adicionado ao solo, e por não considerar as frações decorrentes do óleo adicionado ao solo, e por não considerar as frações decorrentes das transformações deste óleo, que não são determinadas.

A biodegradação dos resíduos também pode ser medida indiretamente através de respirometria da camada reativa do solo, que têm valor prático, principalmente para a avaliação da atividade de degradação em um determinado momento, for-

necendo dados que refletem a biodegradação de todas as frações que estiverem sendo metabolizadas (não somente o óleo, mas também os demais componentes dos resíduos das frações transformadas). Teoricamente, em conjunto com a determinação do carbono orgânico, este método poderia vir a ser a forma ideal de medir a degradação da camada reativa do solo, porém ainda são necessárias adaptações de metodologia para uso nas condições da área de biorremediação AB4, também é interessante o estudo através de bioindicadores vegetais. (NASCIMENTO NETO, 1996).

O balanço de carbono da área de biorremediação também pode ser realizado através da combinação de métodos de ensaio, principalmente o fracionamento através do uso de solventes orgânicos e/ou álcalis ou ácidos fortes. Os métodos tradicionais normalmente apresentam problemas analíticos para uso com solos contaminados. Para tanto é necessário desenvolver um índice de degradação através dos parâmetros obtidos pelo estudo de um solo de mesma origem, que apresenta as mesmas características químicas iniciais da área de biorremediação a ser estudadas. A avaliação pode ser realizada através da extração química das frações húmicas do solo, com o uso de solventes pelo Método de DABIN adaptado. Utilizando-se de extrações brandas sucessivas, e além do fracionamento, deve ser realizada também a análise do carbono total no solo, através da determinação do Carbono Orgânico pelo método de redução do dicromato de WALKLEY & BLACK (1934). Para verificar a confiabilidade dos dados obtidos através dos diferentes métodos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Município de Araucária, região Metropolitana de Curitiba, na Refinaria Presidente Getúlio Vargas - REPAR, localizada na Rodovia do Xisto, Km 16,5, BR-476, entre as coordenadas geográficas de 25° 35' 21" SS de latitude e 49° 25' 00" W Gr de longitude. Nesta região o clima é classificado como Cfb, de acordo com Köppen, clima quente-temperado sub-tropical e fresco até frio, no inverno. A precipitação média anual é de 1.500 mm e a altitude 897 m.

#### 3.1 SOLO

Os solos utilizados neste trabalho são provenientes de áreas de empréstimo decorrentes do deslocamento de horizontes superficiais, para regiões de aterro na época da construção da REPAR através de operações de terraplenagem. Antes da atividade antrópica a região caracterizava-se pela existência de latossolo vermelho-amarelo e podzólico vermelho amarelo. Os solos são predominantemente constituído de argila siltosa com permeabilidade variando entre  $2,04 \times 10^{-7}$  e  $1,0 \times 10^{-8}$  cm<sup>3</sup>/s.

##### 3.1.1 Solo da área testemunha

A área testemunha, que será referida como área A4T, apresenta o solo com as características químicas do solo descritas na tabela 1. As análises químicas e físicas do solo da área testemunha A4T, foram realizadas pelo Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR conforme a metodologia descrita na circular no 9/78 do IAPAR (MUZILLI, 1978).

TABELA 1 - ANÁLISE DO SOLO DE ORIGEM DA ÁREA DE TESTEMUNHA- A4T E  
ÁREA DE BIORREMEDIAÇÃO-AB4

Análises	Peso (%)	pH Em CaCl <sub>2</sub> 0,01M	Teores Trocáveis (e.mg/ 100cm <sup>3</sup> )	Teor Solúvel (ppm)
Areia	35,6	-	-	-
Limo	28,0	-	-	-
Argila	36,4	-	-	-
pH	-	5,2	-	-
Alumínio	-	-	0,4	-
Ca + Mg	-	-	21,3	-
Cálcio	-	-	16,4	-
Magnésio	-	-	4,9	-
H + Al	-	-	2,7	-
Potássio	-	-	0,19	-
Fósforo	-	-	-	14

Fonte: KRENCZYNSKI, 1996

Atualmente sua vegetação é constituída por poáceas de ocorrência natural, entre elas: *Digitaria speciosa*, pensacola, braquiária. E no ano de 1995, foi realizado em 1 ha desta área, o plantio de espécies nativas e exóticas, (SOUZA, 1999) tabela 2.

TABELA 2 - ESPÉCIES ENCONTRADAS NA ÁREA-A4T E ÁREA DE BIORREMEDIAÇÃO -AB4

ESPÉCIES-	NATUREZA
Pitanga [Eugenia uniflora]	Nativa
Erva – Mate [Ilex paraguariensis]	Nativa
Cinamomo [Melia azedarach]	Exótica
Cupressus [Cupressus lusitanica]	Exótica
Ipê Amarelo [Tabebuia chrysotricha]	Nativa
Tipuana [Tipuana tipu]	Exótica
Eucalyptus [Eucalyptus dunnii]	Exótica
Bracatinga [Mimosa scabrella]	Nativa
Acácia Negra [Acacia mearnsii]	Exótica
Aroeira [Schinus therebinthifolius]	Nativa
Canafístula [Peltophorum dubium]	Nativa
Guabiroba [Campomanesia xanthocarpa]	Nativa
Casuarina [Casuarina equisetifolia]	Exótica

Fonte: SOUZA, 1999

### 3.1.2 Solo da área de biorremediação

A área de biorremediação AB4, que será referida no trabalho como área AB4 é uma área experimental de disposição final de resíduos oleosos, seu solo de origem apresenta as características químicas já descritas na TABELA 1. A AB4 recebeu 3.423,37 m<sup>3</sup> /ha de resíduo oleosos, ver TABELA 4 abaixo, tendo a aplicação sido realizada conforme a recomendação da EPA 800/81, que estabelece parâmetros de acumulação de metais pesados no solo através da capacidade de troca catiônica do solo (CTC) .

Em 1995 foi realizado o plantio de espécies nativas e exóticas em 1ha, correspondendo às mesmas espécies encontradas na área testemunha, que estão descritas acima na tabela 2. Em 1998, foram introduzidas gramíneas (braquiária e pensacola) e leguminosa (ervilhaca) por semeadura.

### 3.1.3 Amostragem

Amostragem para o fracionamento da matéria orgânica de DABIN em tempo zero. As amostras foram coletadas das áreas 4T e A4 em 1998, utilizando trado tipo holandês, em zig-zag. Sendo retiradas 30 amostras com 20 cm de profundidade de cada área, o solo foi homogeneizado e seco ao ar, após foi tamisado em peneira de 0,5 mm, acondicionadas em sacos plásticos e analisadas após 4 meses.

### 3.1.4 Análises granulométrica e química do solo

As análises de granulometria e química do solo, estão descritas na tabela 3 obtidas por SOUZA em 1999 na área em questão.

TABELA 3 - GRANULOMETRIA E QUÍMICA DOS SOLOS

PARÂMETRO	ÁREA	
	AB4	A4T
Densidade real $\mu_{re}$	1,04	1,41
Densidade aparente $\mu_{ap}$	2,04	2,49
Areia (%)	36	38
Silte (%)	34	30
Argila (%)	30	32

### 3.2 ORIGEM E COMPOSIÇÃO DOS RESÍDUOS APLICADOS NA ÁREA AB4

As borras oleosas aplicadas na área de biorremediação 4 - AB4, originaram-se da Unidade de Tratamento de Resíduos Industriais - UTDI, das canaletas de captação de águas contaminadas, e dos depósitos de armazenamento de borras acumuladas. Na UTDI, utilizaram-se borras das diferentes etapas do processo de tratamento das águas residuais. Neste trabalho, as borras são citadas com a identificação dos tanques ou locais que as originaram: borras do tanque de equalização da UTDI - TQ 63201; tanque de recebimento diário de borras da UTDI - TQ 63209; tanque de equalização do separador de água e óleo (SAO) - TQ 63210; tanque de gasolina-TQ 4242 e dos depósitos de borras acumuladas - B 2 e B 3. As aplicações realizadas na área de Biorremediação 4 - AB4 iniciaram-se em 1994 e estenderam-se até abril de 1996. Para a coleta das borras, transporte e distribuição na área experimental, foi utilizado um caminhão tipo tanque a vácuo com moto bomba para sucção e descarga, com capacidade de carga de 6m<sup>3</sup>. Na aplicação, utilizou-se um mangote com diâmetro de 2,5 polegadas, acoplado ao caminhão, e dois operadores para distribuição homogênea e uniforme do material no solo.

As diferentes origens e quantidades de resíduos aplicados, podem ser visualizados na tabela 4 abaixo:

TABELA 4 - RESÍDUOS APLICADOS NA ÁREA AB4

Resíduo	Total (ton/ha)
TQ – 63209	80
TQ – 63201	968,72
TQ – 63210	243,95
TQ – 4242	16,62
Buraco 2	720,69
Buraco 3	1383,13
Tambores	10,23
<b>Total de resíduos aplicados</b>	<b>3423,37</b>

Fonte: Relatório Parcial sobre o Plano de disposição

### 3.3 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Sempre que possível procurou-se utilizar, reagentes e solventes com graus de pureza superior ao P.A.

### 3.4 SUBSTRATO OLEOSO E RESÍDUOS OLEOSO

O teor de carbono do óleo e do substrato oleoso e dos resíduos oleosos foi determinado através da queima em mufla do resíduo, anteriormente seco em estufa, e multiplicado pelo índice de carbono, adaptado através do método de ensaio ME-6380-033 (PETROBRAS, 1997). Este número foi calculado a partir dos teores de óleo utilizando o fator 0,84%, (NELSON, 1949) sobre a quantidade de carbono presente no petróleo, este foi calculado proporcionalmente em relação às borras aplicadas e seus teores de concentração em termos de carbono. O teor de carbono no resíduo, foi utilizado para calcular a degradação aproximada da AB4, determinado pela diferença das frações orgânicas, e o valor foi utilizado para definir o índice referente ao óleo biodegradado com o tempo.

### 3.5 DETERMINAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS OLEOSOS ATRAVÉS DA MATÉRIA ORGÂNICA TOTAL (VIA SECA)

A determinação da degradação através da matéria orgânica total foi realizada de acordo com o método de ensaio ME-6360-033 (PETROBRÁS, 1997). Neste método o solo é oxidado à 550°C e 800°C para determinação da porcentagem do carbono total (CT) das frações da matéria orgânica. A diferença de peso, após a de-

sidratação e a última queima na mufla, determina o teor de carbono orgânico total. Os valores encontrados representam a perda de massa obtida através da queima do carbono.

### 3.6 DETERMINAÇÃO DO CARBONO ADICIONADO PELOS RESÍDUOS OLEOSOS

Para avaliar a adição de carbono no solo com os diferentes resíduos, foi realizado para o tempo zero uma mistura, utilizando -se 2g de solo de A4T misturado com 3,7 g de resíduo, esta mistura foi então analisada conforme norma ME-6360-033 (PETROBRÁS, 1997). O teor de carbono adicionado no tempo zero foi calculado a partir destes resultados.

### 3.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CARBONO NO SOLO VIA ÚMIDA

O teor de Carbono no solo foi determinado por via úmida através da oxidação com o dicromato de potássio segundo metodologia modificada por (WALKLEY & BLACK 1934).

### 3.8 FRACIONAMENTO DAS FRAÇÕES DA MATÉRIA ORGÂNICA VIA ÚMIDA

Para investigar as transformações sofridas pelo óleo e os efeitos nas diferentes frações da matéria orgânica obtidas, no sentido de fornecer subsídios para a análise do observado através do cálculo dos índices da matéria orgânica total do solo e a sua comparação com o solo original da testemunha A4T. Utilizou-se o método de DABIN, 1976. Devido às suas características em fornecer frações resultantes de um ataque progressivo, por extratores cada vez mais enérgicos, obtendo-se frações sucessivas, que podem representar diferentes graus de afinidade com as micropartículas do solo.

As frações obtidas foram avaliadas quantitativamente através da dosagem de carbono conforme o método. Neste método para a determinação do carbono da matéria orgânica leve e da humina, foi utilizado dicromato de potássio 8%, fervendo em banho-maria durante 60 minutos, e para a dosagem de carbono nos extratos foi usado dicromato a 2% durante 60 minutos, e ambos titulados por solução de Mohr a 2N.

A padronização foi realizada para cada conjunto de amostras, em cada determinação, utilizando provas em branco e padrão EDTA, e duas repetições por a-

mostras. A matéria orgânica leve foi obtida através do uso de lã de vidro, que reteve os restos orgânicos, resultante do material que foi flotado durante a obtenção das frações de hidrossolúveis e ácidos fúlvicos livres. Estas extrações foram obtidas através das soluções com água e ácido fosforico 2M. As frações orgânicas foram separadas utilizando pirofosfato e soda, que correspondem respectivamente às frações de ácidos fúlvicos ligado ao pirofosfato, ácidos fúlvicos ligados à soda e ácidos húmicos ligados à soda.

Foram utilizados padrões de etileno diamino tetra acetato de sódio (EDTA).

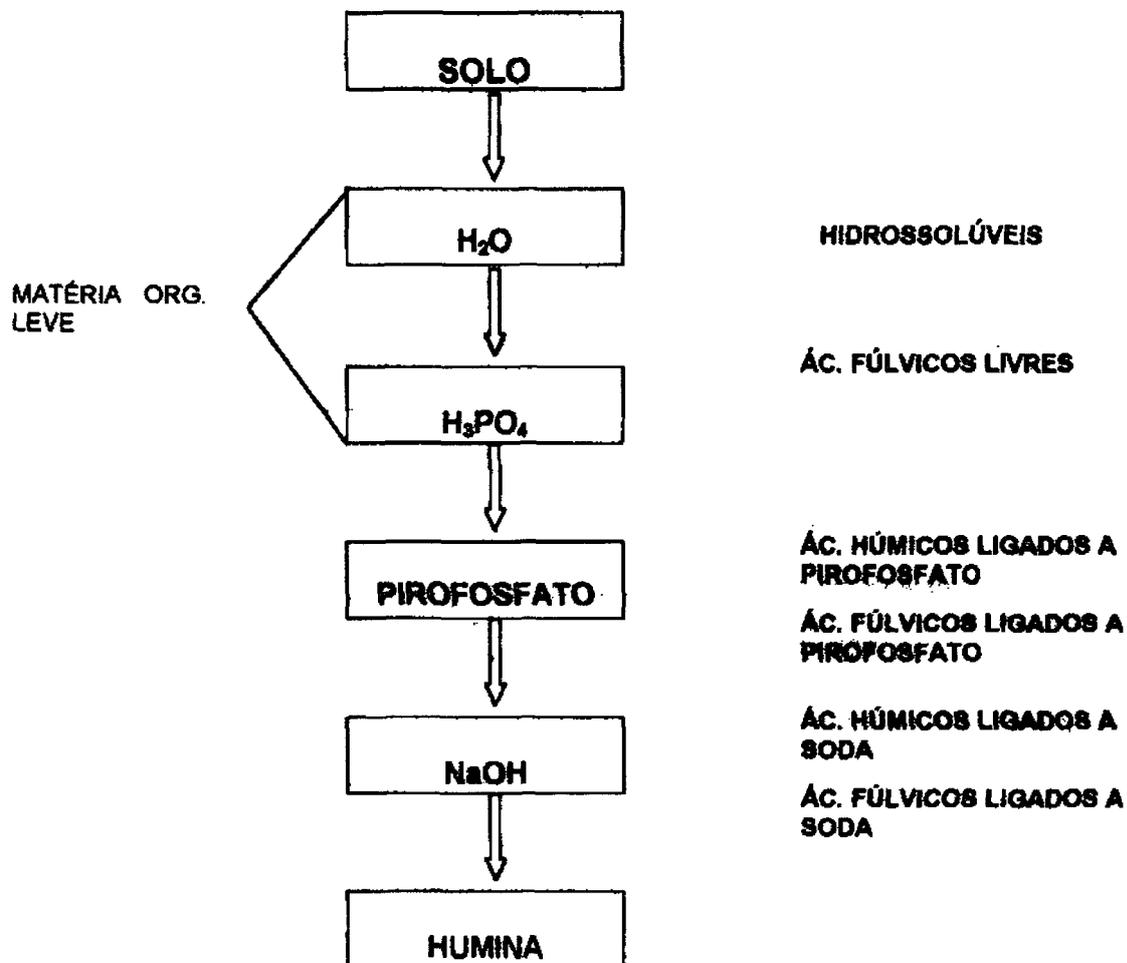
### 3.9 CÁLCULOS

Os cálculos foram realizados, com o auxílio do Microsoft Excel, análise de dados.

### 3.10 GRÁFICOS E TABELAS

As tabelas e gráficos foram desenvolvidos com o auxílio dos programas Microsoft Excel e Microsoft Word, WINDOWS 97.

FIGURA 1 – FLUXOGRAMA RESUMIDO DO FRACIONAMENTO DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO



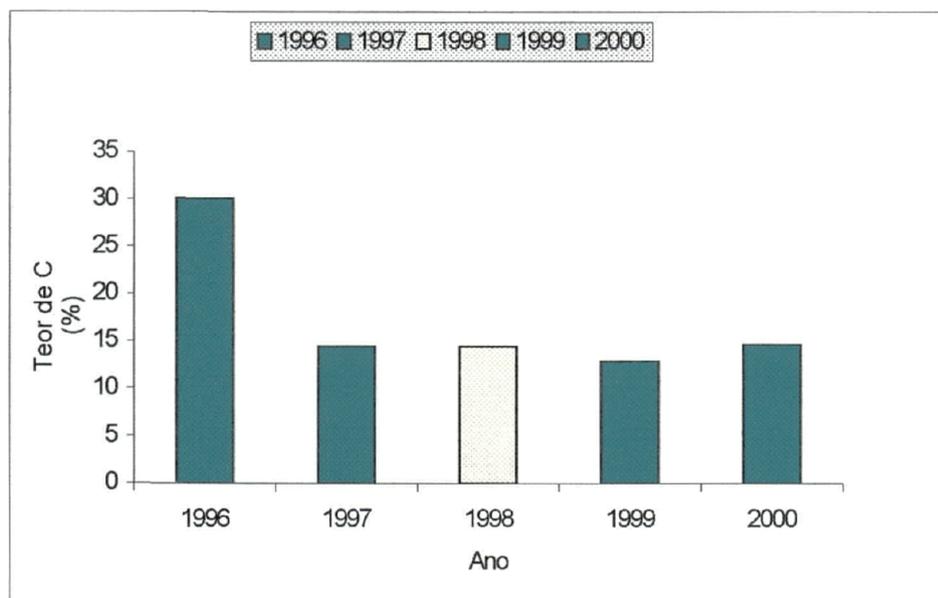
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ACOMPANHAMENTO DA BIODEGRADAÇÃO

#### 4.1.1 Teor de carbono no solo

O acompanhamento da biodegradação através dos teores de carbono no solo da área de biorremediação - AB4, pode ser observado na figura 2. O valor correspondente ao tempo zero foi calculado conforme descrito no item 3.6 e apêndice 1, e os demais teores de carbono no solo foram determinados conforme descrito na secção 3.5 e apêndice 2, teor de carbono adicionado pelo resíduo oleoso no solo da AB4 em 1996 corresponde a 30,08%. A queda do teor de carbono para 14,40%, pode ser explicada pela biodegradação dos resíduos oleosos adicionados. Após este ano, mantiveram-se praticamente constantes em 1998, com 14,43%.

FIGURA 2 - TEOR DE CARBONO NO SOLO DA ÁREA DE BIORREMEDIAÇÃO AB4



Os teores de carbono da figura 2 representaram a perda de massa que estão relacionadas com a dinâmica do carbono do solo, podendo ser considerada como equivalente à taxa de biodegradação anual da área AB4, expressa em percentual, conforme mostrado na tabela 5.

TABELA 5 - TAXA DE BIODEGRADAÇÃO DA ÁREA DE BIODEGRADAÇÃO AB4

PERÍODO	TAXA DE BIODEGRADAÇÃO (%)
1996-1997	54,97
1997-1998	-0,12
1998-1999	5,46
1999-2000	-6,20

É importante notar que houve taxa de biodegradação negativa em 2000, de -6,20%, provavelmente reflete o aumento de carbono no solo devido à biomassa pelo plantio de gramíneas em 1998.

A análise dos teores de carbono do solo e as taxas e biodegradação anuais são parâmetros importantes, porém não suficientes para avaliar a dinâmica do carbono no solo contaminado e a composição das frações da matéria orgânica que foram influenciadas pelo óleo biodegradado e as possíveis transformações decorrentes da biodegradação. Assim, para investigar estas frações, foi utilizado o fracionamento da matéria orgânica do solo através do Método de Dabin (1976), ver item 3.8.

#### 4.1.2 Fracionamento da matéria orgânica do solo

A metodologia utilizada, demonstrou, ser confiável no tocante a reprodutibilidade entre as diferentes repetições, realizadas em diferentes bateladas, e na recuperação do carbono total (soma dos valores obtidos por várias frações) que, em termos relativos, situaram-se entre 118 a 122% de recuperação.

As frações obtidas neste estudo foram: total de matéria orgânica do solo, fração matéria orgânica leve e hidrossolúveis, fração ácidos fúlvicos, fração ácidos húmicos, fração humina, fração pirofosfato e fração soda. (item 4.1.3).

#### 4.1.3 Análise comparativa de composição da matéria orgânica do solo nas diferentes frações através do teor de carbono

Os valores obtidos através das análises do carbono, realizadas nas diferentes frações, são mostrados a seguir. As explicações no tocante a composição da matéria orgânica da AB4, e a área A4T, são obtidas através da análise dos dados dos teores de carbono total para cada fração e os teores relativos de cada fração. Estes resultados podem indicar quais frações são responsáveis pelas mudanças na composição da Área AB4 em relação a A4T. Assim sendo, foram realizadas análises

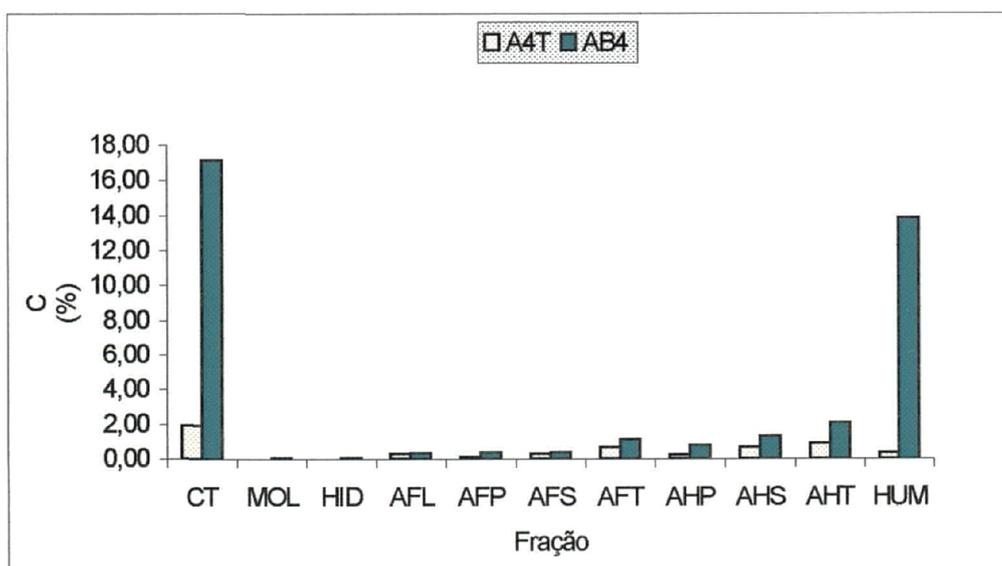
comparativas das frações da matéria orgânica do solo individualmente. Os valores obtidos estão representados na figura 3. A análise destas frações provenientes da adição do carbono adicionado pelos resíduos, pode servir de ferramenta para especular sobre a existência de frações estabilizadas do óleo no solo, e sua participação na composição das substâncias húmicas em comparação com o solo de origem.

Provavelmente ocorre a formação de frações de composição complexas no solo da AB4 devido à adição do resíduo oleoso, que pela incorporação ao solo original, pode propiciar a síntese acelerada de frações estabilizadas. por exemplo, a fração húmica da AB4, que apresentou diferença dos teores de carbono em relação a fração húmica da A4T, ou seja aumento dos teores das frações da AB4 foram significativos. (item 4. 1.4 e figura 7).

Conforme TATE (1980), a fração Biodegradável poderá ser considerada mais diretamente associada a processos de curta duração relacionados a crescimento vegetal, enquanto o acúmulo da fração pesada aparentemente é mais relacionado a processos envolvidos na síntese das frações orgânicas mais resistentes a biodegradação.

As diferenças dos teores de carbono dos tratamentos da AB4 em relação a A4T, serão melhor avaliadas através do estudo das frações isoladas.

FIGURA 3 - TEORES DE CARBONO NAS FRAÇÕES DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO DA A4T E AB4

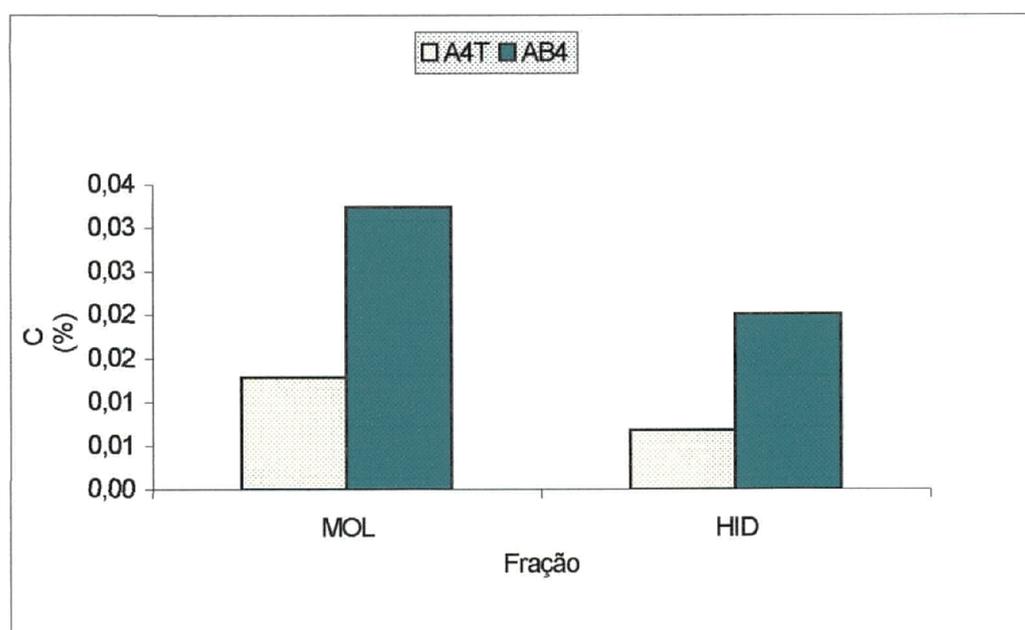


#### 4.1.3.1 Fração matéria orgânica leve e hidrossolúveis

Os teores de carbono observados na fração matéria orgânica leve foi de 0,01% para a A4T e 0,03% de C para AB4, como mostra a figura 4. Considerando o solo contaminado do tratamento da AB4 e o solo testemunha do tratamento A4T em relação aos teores de carbono da fração matéria orgânica leve foi verificado aumento desprezível para a A4T.

Os teores de carbono observados na fração hidrossolúvel da área A4T foi de 0,007% e 0.02% para a AB4, figura 4, estes valores provavelmente são devido a cobertura vegetal, entretanto os hidrossolúveis presentes podem ser frações intermediária dos resíduos oleosos adicionados.

FIGURA 4 - TEOR DE CARBONO NAS FRAÇÕES MATÉRIA ORGÂNICA LEVE E HIDROSSOLÚVEIS DA ÁREA A4T E AB4



#### 4.1.3.2 Ácidos fúlvicos totais

Os ácidos fúlvicos totais compreendem a somatória das frações ácidos fúlvicos livres, ácidos fúlvicos ligados ao pirofosfato e ácidos fúlvicos ligados a soda. O teor de carbono observado na A4T foi de 0,66 % e para AB4 1,11%, figura 5.

#### 4.1.3.2.1 Fração ácidos fúlvicos livres

Os teores de carbono observados na fração ácidos fúlvicos livres foi de 0,29% para a A4T e 0,34% para a AB4, figura 5. O aumento dos teores de carbono para fração ácidos fúlvicos livres da AB4, pode indicar síntese destas substâncias, pois geralmente estas estão envolvidas no estágio inicial de transformação e estabilização das substâncias húmicas. A diferença da quantidade de ácidos fúlvicos livres não foi significativa, observando-se na extração apenas, uma diferença de coloração.

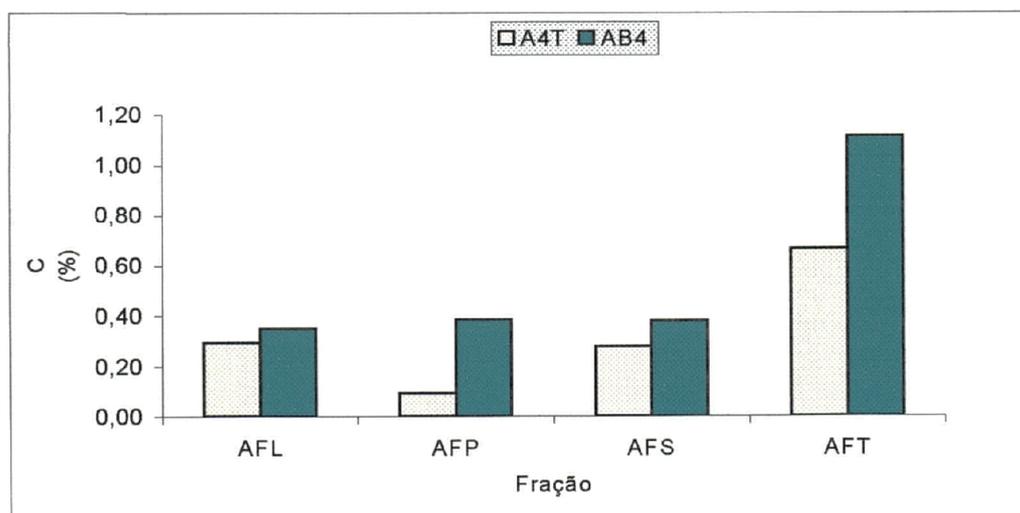
#### 4.1.3.2.2 Fração ácidos fúlvicos ligados a pirofosfato

Os teores de carbono referentes à fração ácidos Fúlvicos ligados a Pirofosfato foi de 0,09% para a A4T e 0,38% de C para a AB4, como mostra a figura 5. Comparando-se os valores obtidos para os teores de carbono nos diferentes tratamentos é possível observar que houve maior concentração desta fração na AB4 .

#### 4.1.3.2.3 Fração ácidos fúlvicos ligados a soda

Os teores de carbono observados, na fração ácidos fúlvicos ligados a soda, foi 0,28% para a A4T, e 0,38% para AB4. Não havendo muita diferença nos teores carbono da AB4 em relação a A4T, ver figura 5.

FIGURA 5 - TEORES DE CARBONO NAS FRAÇÕES ÁCIDOS FÚLVICOS DA ÁREA A4T E AB4



#### 4.1.3.3 Ácidos húmicos totais

A fração ácidos húmicos totais corresponde a somatória das frações ácidos húmicos ligados a pirofosfato e ácidos húmicos ligados a soda.

Os valores referentes ao teor total de carbono da fração ácidos húmicos foi de 0,33% para A4T e 13,58% para AB4, FIGURA 6. Este aumento para teores de carbono na fração ácidos húmicos para a AB4, pode estar relacionado com a formação de substâncias húmicas através do óleo adicionado, que pode estar sendo transformado pelos microrganismos, ou devido a polimerização das frações adicionadas.

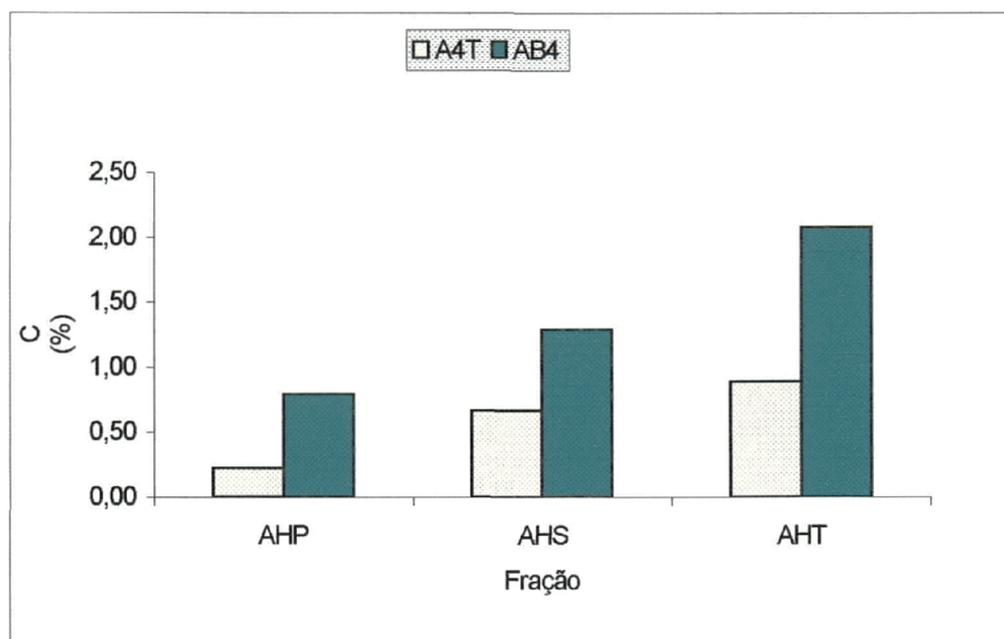
##### 4.1.3.3.1 Fração ácidos húmicos ligados a pirofosfato

Os teores de carbono observados, na fração ácidos húmicos ligados a pirofosfato foi de 0,22% para a A4T e 0,79% para a AB4, observando-se um acréscimo pequeno desta fração para a AB4 .

##### 4.1.3.3.2 Fração ácidos húmicos ligados a soda

O teor de carbono das frações ácidos húmicos ligados a soda foi de 0,66% para a A4T e de 1,29% para AB4. Na figura 6 é possível visualizar, que a relação de aumento do carbono da A4T para a AB4 foi ligeiramente menor do que os teores de carbono referente a fração ácidos húmicos ligados a pirofosfato.

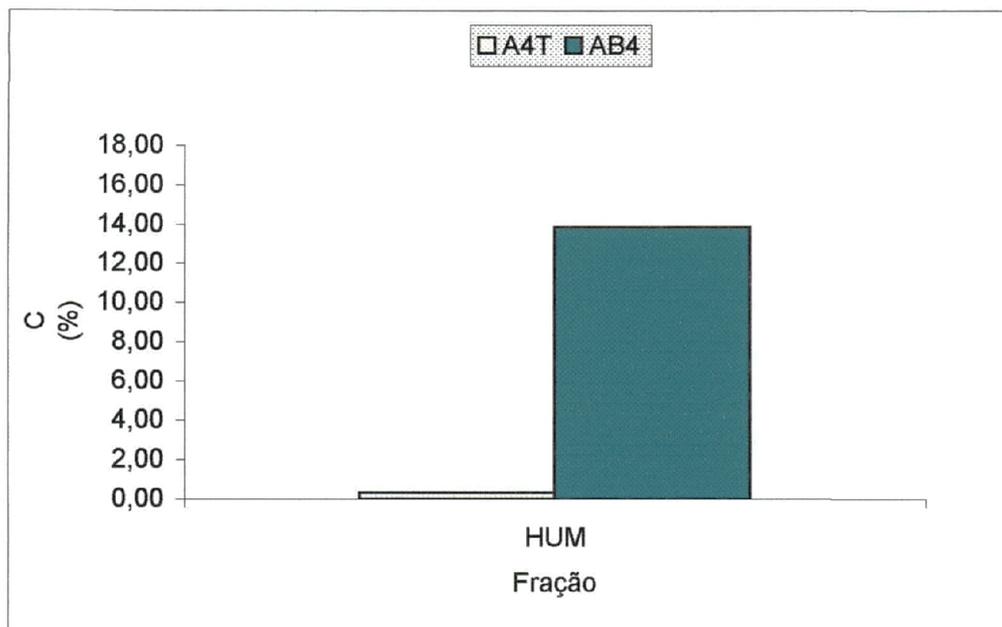
FIGURA 6 -TEORES DE CARBONO NOS ÁCIDOS HÚMICOS DA ÁREA 4T E AB4



#### 4.1.3.4 Humina

A fração humina corresponde ao material orgânico que não foi extraído pelos solventes ácidos e alcalinos. O teor de carbono observado nesta fração para os tratamentos, foi de 13,86% para AB4 e 0,33% A4T. A humina foi a fração que representou maior diferença entre os tratamentos, os teores de carbono da AB4 foram significativamente maiores aos da A4T, ver figura 7. Provavelmente nesta fração tenha ocorrido a transformação rápida das frações do resíduo oleoso adicionado, o qual pode ter sido alterado quimicamente, polimerizado, ou sofrido modificações devido a ação dos microrganismos do solo nestas frações.

FIGURA 7 - TEORES DE CARBONO DA FRAÇÃO HUMINA DA A4T E AB4



#### 4.1.3.5 Pirofosfato

Os teores de carbono referentes a fração pirofosfato foi de 0,32 % para a A4T e de 1,17% para a AB4, quando comparados, seguem a mesma tendência de aumento da AB4 em relação a A4T que as outras determinações realizadas nas demais frações dos diferentes tratamentos, como pode ser observado na figura 8.

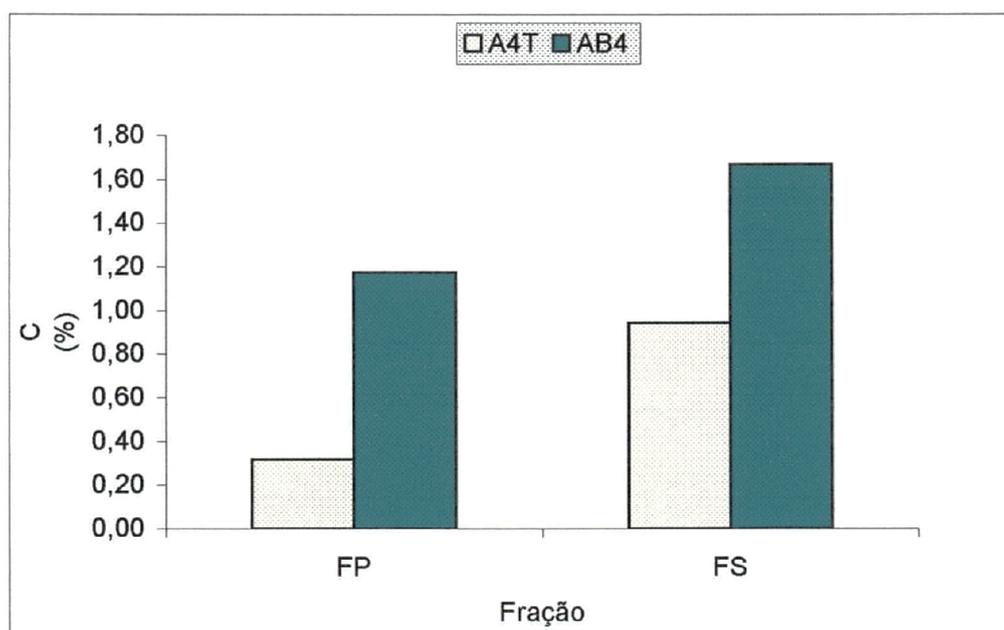
Considerando este aumento determinado pela análise quantitativa, é possível que tenha havido síntese de ácidos fúlvicos e ácidos húmicos ligados a pirofosfato, que provavelmente correspondem as frações proveniente do óleo adicionado no tempo 0, podendo estas frações estar em fase de estabilização no solo.

A partir da fração pirofosfato, são obtidas duas outras frações que são denominadas de ácidos fúlvicos ligados a pirofosfato e ácidos húmicos ligados a pirofosfato. Somando-se os teores de carbono das duas frações é reproduzido o total de pirofosfato.

#### 4.1.3.6 Fração soda

A fração soda é composta por duas frações os ácidos húmicos ligados a soda e os ácidos fúlvicos ligados a soda. Os teores de carbono observados nesta fração, foi de 1,67 % para AB4 e 0,94% para A4T, como mostra a figura 8.

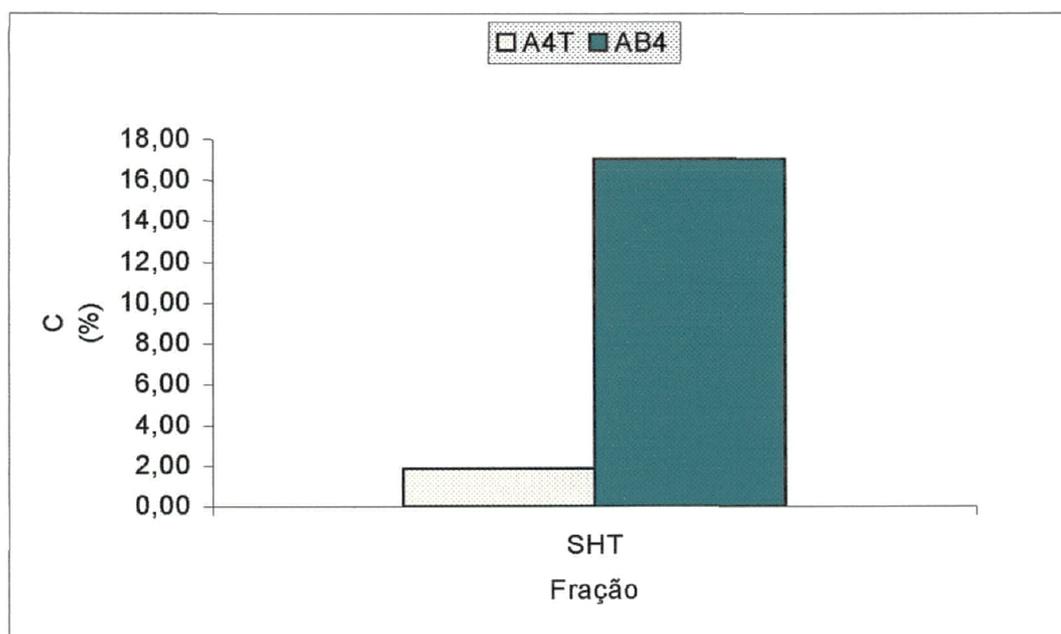
FIGURA 8 -TEORES DE CARBONO NA FRAÇÃO PIROFOSFATO E SODA DAS ÁREAS A4T E AB4



#### 4.1.3.7 Fração substâncias húmicas totais

A fração das substâncias húmicas totais é reproduzida pela soma dos teores das frações ácidos fúlvicos totais, ácidos húmicos totais e humina. O teor de carbono da fração substância húmica da A4T foi 1,23% e da AB4 foi 28,83%. Houve um aumento significativo no teor de carbono da AB4. Aumento este devido às frações adicionadas pelo óleo e pela biomassa vegetal, figura 9.

FIGURA 9 - TEOR DE CARBONO NA FRAÇÃO SUBSTÂNCIAS HÚMICAS TOTAIS DA A4T E AB4



#### 4.1.4 Incremento dos teores de carbono

A adição de resíduos deve proporcionar incrementos nas diferentes frações da área AB4 como citado acima. Este aumento de carbono no solo não biodegradado junto com a formação de substâncias húmicas pode representar parâmetro de biorremediação. Considerando a estabilização das partículas do solo, em substâncias húmicas, principalmente a humina que corresponde a fração que teoricamente demora mais ou menos 10 anos para se formar na matéria orgânica e no solo da AB4 se formou em 4 anos, como a fração de maior incremento a partir dos dados obtidos com 4.111% de aumento em relação ao solo A4T. Sendo assim torna-se possível concluir que as características de solubilidade do óleo, a possibilidade de modificações químicas no óleo introduzidas pelos microrganismos do solo e a possibilidade de restos não biodegradáveis e os processos de polimerização têm sido responsáveis pelo aumento das frações estabilizadas. Estas características podem estar relacionadas a aspectos intrínsecos do resíduo adicionado e a transformação rápida de seus polímeros. Para caracterizar estas transformações é necessário o estudo através de solventes orgânicos e métodos hidrolíticos e análise das frações por métodos de análise elementar e espectroscópicas.

TABELA 6 - INCREMENTO DE CARBONO

FRAÇÕES	INCREMENTO (%)
Carbono Total	799,00
<i>Matéria Orgânica Leve</i>	152,00
<i>Hidrossolúveis</i>	199,00
<i>Ácidos Fúlvicos Livres</i>	19,00
<i>Ácidos Fulvicos Ligados a Pirofosfato</i>	311,00
<i>Acidos Fulvicos Ligados a Soda</i>	36,00
<i>Acidos Fúlvicos Totais</i>	67,00
<i>Acidos Húmicos Ligados a Pirofosfato</i>	253,00
<i>Acidos Húmicos Ligados a Soda</i>	94,00
<i>Acidos Humicos Totais</i>	134,00
Humina	4.111,00

#### 4.2 CARACTERÍSTICAS DAS SUBSTÂNCIAS HUMICAS NA A4T E AB4

A caracterização das substâncias húmicas dos tratamentos, é efetuada através da análise das percentagens relativas em relação ao carbono total do solo para cada fração, obtida durante o fracionamento da matéria orgânica do solo. Esta análise é realizada de duas maneiras: das frações individualmente, quando se obtém valores específicos para explicações de variações relativas da matéria orgânica do solo, e comparativamente através da somatória de todas frações obtidas. Sendo em seguida demonstrado os resultados obtidos:

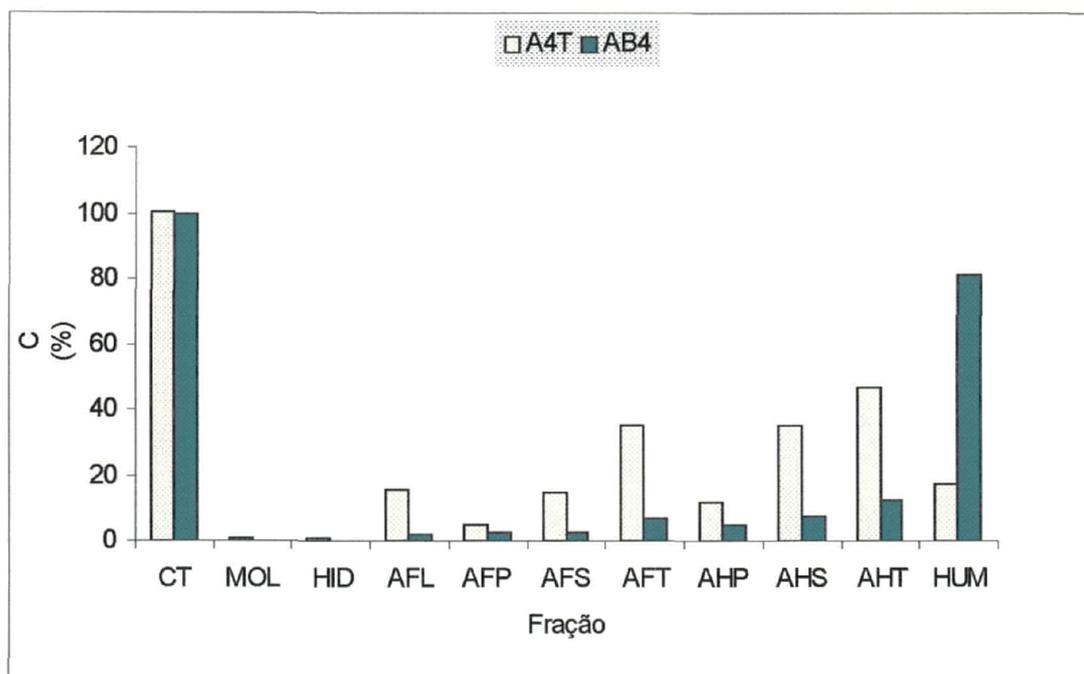
##### 4.2.1 Variação relativa dos teores de carbono das diferentes frações dos tratamentos A4T e AB4

A variação relativa dos teores de carbono das diferentes frações, que foram obtidas através da determinação dos valores percentuais em relação ao carbono total do solo, forneceram dados sobre as diferenças qualitativas da composição das frações do solo contaminado com resíduo oleoso AB4, em relação ao solo testemunha do tratamento A4T em questão. Apesar das explicações expostas sobre as possíveis diferenças na composição, esses resultados são importantes para o estudo das frações que se elevam significativamente. Sendo nos resultados, são consideradas como variáveis que indicam as modificações das diferentes frações da matéria orgânica.

#### 4.2.1.1 Teores relativos de carbono das frações da AB4 e A4T

Os teores relativos das frações que foram comparadas e calculadas, a partir dos teores de carbono total dos tratamentos (AB4 e A4T), possibilitaram verificar que as frações da matéria orgânica da AB4 foram modificadas em sua composição devido a adição do óleo, o qual foi incorporado nas diferentes frações da matéria orgânica do solo AB4. Através da FIGURA 10, foi possível visualizar que a percentagem relativa de carbono nas frações hidrossolúveis e matéria orgânica leve da AB4, não indicam variação das frações na composição do solo da AB4 em relação as frações encontradas para A4T, FIGURA 10, deve ser levado em consideração que em termos absolutos quantitativos os teores de carbono são maiores para a AB4, entretanto, esta diferença como citado no item 4.1.2 também não foi observada. Na mesma figura é possível também observar que a fração que obteve aumento significativo dos teores relativos para a AB4 em relação a A4T foi a humina, tal percentual revelou variação qualitativa na composição do solo, representada através da análise comparativa dos tratamentos, a qual mostrou que o carbono adicionado pelo resíduo oleoso se concentrou-se nesta fração. Possivelmente às frações do óleo que foram sintetizadas no solo AB4 estão relacionadas com a formação da fração humina, ocorrendo transformação acelerada das frações do óleo resultando na síntese destas substâncias no solo, fato em condições naturais, provavelmente levariam vários anos para se formar no solo. Esta consideração é melhor detalhada conforme os ÍTENS 4.2.3.5 que trata da descrição isolada das frações entre os tratamentos.

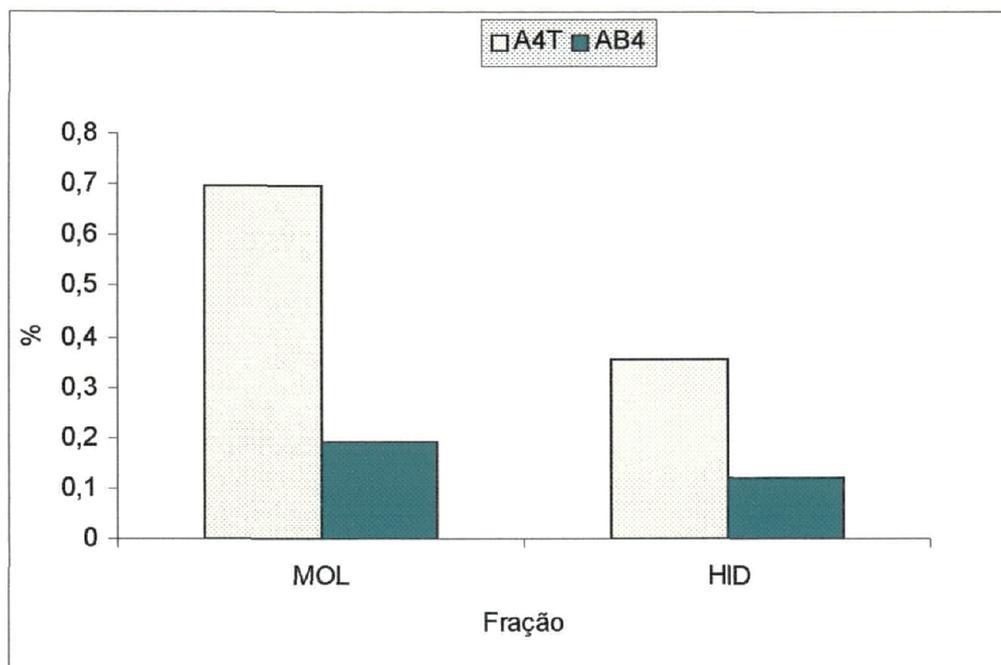
FIGURA 10 - TEORES RELATIVOS DE CARBONO DAS FRAÇÕES AB4 E A4T



#### 4.2.1.2 Teores relativos da fração matéria orgânica leve e da fração hidrossolúveis

Em termos qualitativos não houve variação nestas frações, conforme demonstrado no item anterior. Observa-se que os teores relativos de carbono da fração matéria orgânica leve foi 0,70% para a A4T e 0,19% para AB4. Para a fração hidrossolúveis, os teores relativos da fração foi de 0,35% para a A4T e 0,12% para a AB4, ver figura 11. Desta forma é possível inferir que a fração matéria orgânica leve e a fração hidrossolúvel da AB4, não representam incorporação do óleo residual.

FIGURA 11 -TEORES RELATIVOS DE CARBONO DAS FRAÇÕES MATÉRIA ORGÂNICA LEVE E HIDROSSOLÚVEIS DA AB4 E A4T



#### 4.2.1.3 Teores relativos dos ácidos fúlvicos

Conforme item 4.1 anterior, verifica-se que houve adição de carbono em termos absolutos, da fração ácidos fúlvicos AB4, porém os teores relativos referentes a fração ácidos fúlvicos totais dos tratamentos foram de 15,53% para A4T e 6,49% para AB4. A análise comparativa apresentou certa variação significativa da composição da fração ácidos fúlvicos totais. Estas considerações demonstram que esta fração do solo AB4 apresentou decréscimo relativo de percentual de carbono em relação ao total do solo da AB4 em comparação a A4T, figura 12, sendo que esta redução nas frações ácidos fúlvicos da AB4 sugere estar intimamente envolvida na formação das huminas que apresentaram-se com aumento.

Segundo SCHNITZER, (1978) em solos naturais, os ácidos fúlvicos apresentam grande número de grupos ativos (carboxílico e fenólico), em comparação com ácidos húmicos. A atividade dos ácidos fúlvicos, segundo ele, esta também relacionada com sua capacidade de adsorção de compostos orgânicos e inorgânicos na superfície e no interior dos poros existentes nas moléculas de ácidos fúlvicos e

este comportamento pode ser interessante na preservação do meio ambiente principalmente se os compostos forem tóxicos e poluentes.

É possível que após rápida modificação das substâncias envolvidas nas frações ácidos fúlvicos através da ação de microrganismos, ou através da polimerização rápida das frações sejam transformados para a fração humina. Sendo necessárias maiores investigações através de métodos espectroscópicos.

#### 4.2.1.3.1 Teores relativos da fração ácidos fúlvicos livres

Os teores relativos observados na fração ácidos fúlvicos livres foi de 15,53% para a A4T e 2,03% AB4. As frações relativas dos tratamentos observadas, representam a diferença da composição da fração ácidos fúlvicos livres da Área A4T em relação a AB4 mostrado na figura 12. Tais percentuais revelam ser esta a fração que mais contribui com o decréscimo relativo da fração ácidos fúlvicos.

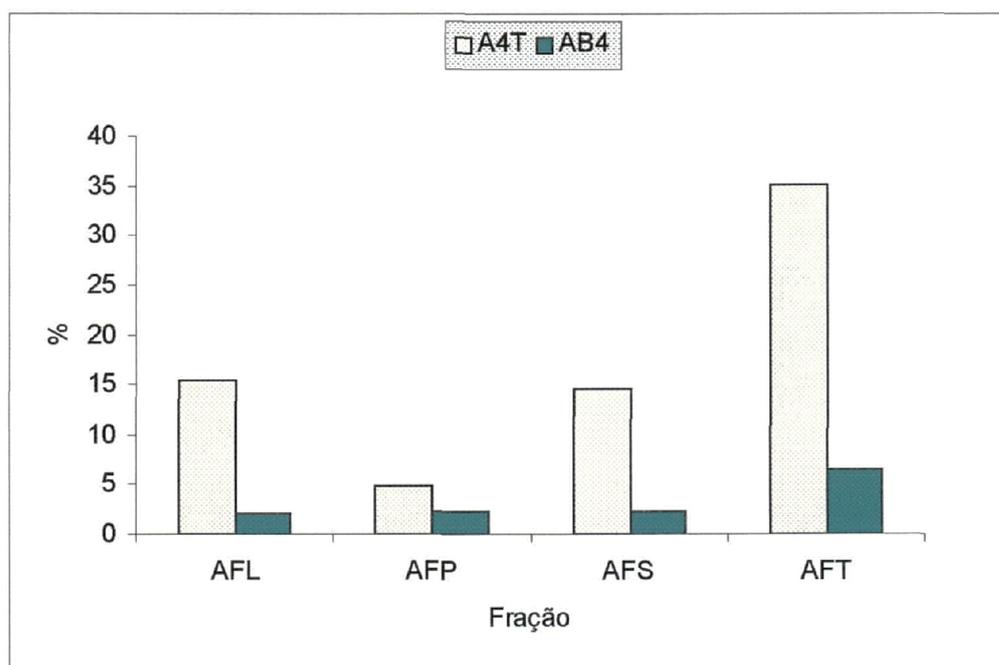
#### 4.2.1.3.2 Teores relativos da fração ácidos fúlvicos ligados a pirofosfato

Nesta fração, os teores relativos observados para o tratamentos A4T foi de 4,90 % e 2,25% para a AB4. Não havendo variação na composição das frações nos diferentes tratamentos, ver figura 12.

#### 4.2.1.3.3 Teores relativos da fração ácidos fúlvicos ligados soda

A fração ácidos fúlvicos ligados a soda para cada tratamento, apresentou variação dos teores relativos de carbono da fração. Na A4T o teor relativo da fração foi de 14,61% e na AB4 foi 2,20% . Em termos de composição houve variação nos teores da fração nos diferentes tratamentos.

FIGURA 12 - TEORES RELATIVOS DAS FRAÇÕES DE ÁCIDOS FÚLVICOS NA A4T E AB4



#### 4.2.1.4 Teores relativos da fração ácido húmico

Os teores relativos de carbono da fração ácidos húmicos no tratamento A4T foi de 46,61 %, para a mesma fração no tratamento AB4 foi de 12,18%. A variação da composição da fração ácidos húmicos nos tratamentos, seguem a mesma tendência que os ácidos fúlvicos apresentados no item 4.2.1.3, principalmente quando avaliada a fração ácidos húmicos ligados a soda figura 13. Demonstrando que estas frações na área de biorremediação não podem ser sintetizadas de maneira proporcional a adição de carbono dos resíduos oleoso, em curto espaço de tempo, na mesma relação que isto ocorre para a humina como descrito no item 4.2.1.5 a seguir. Mesmo observando-se aumento dos teores de carbono das frações ácidos húmicos da AB4 em relação a fração ácidos húmicos da A4T, item 4.1.3.3, as frações ácidos húmicos sofrem alteração da composição do solo da AB4 em relação ao solo da A4T.

##### 4.2.1.4.1 Teores relativos da fração ácidos húmicos ligados à pirofosfato

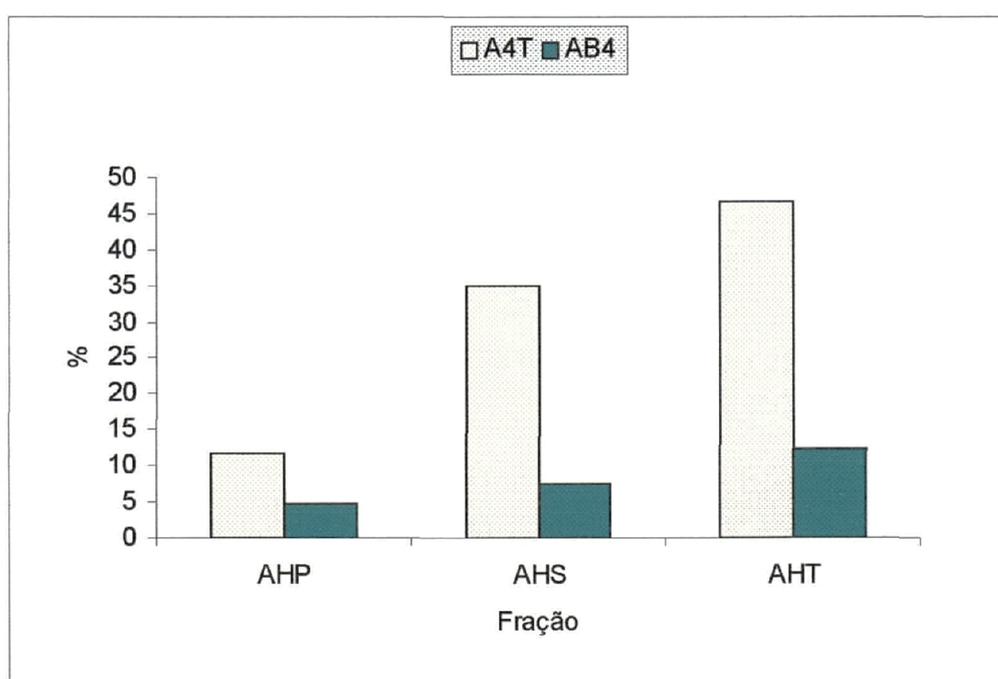
O percentual relativo de carbono na fração no solo A4T foi de 11,83% e para o solo AB4 foi de 4,67%. Estes resultados indicam variação na composição da

fração nos tratamentos, conforme figura 13, entretanto esta fração não exerce muita participação na mudança da composição da fração ácidos húmicos totais.

#### 4.2.1.4.2 Teores relativos da fração ácidos húmicos ligados à soda

Os teores relativos de carbono da fração ácidos húmicos ligados a soda apresentaram aumento da ordem de 34,78% no solo A4T para 7,51% no solo da AB4, ver figura 13. A diminuição destes percentuais indicam variação na composição da AB4 em relação a A4T.

FIGURA 13 -TEORES RELATIVOS DOS ÁCIDOS HÚMICOS



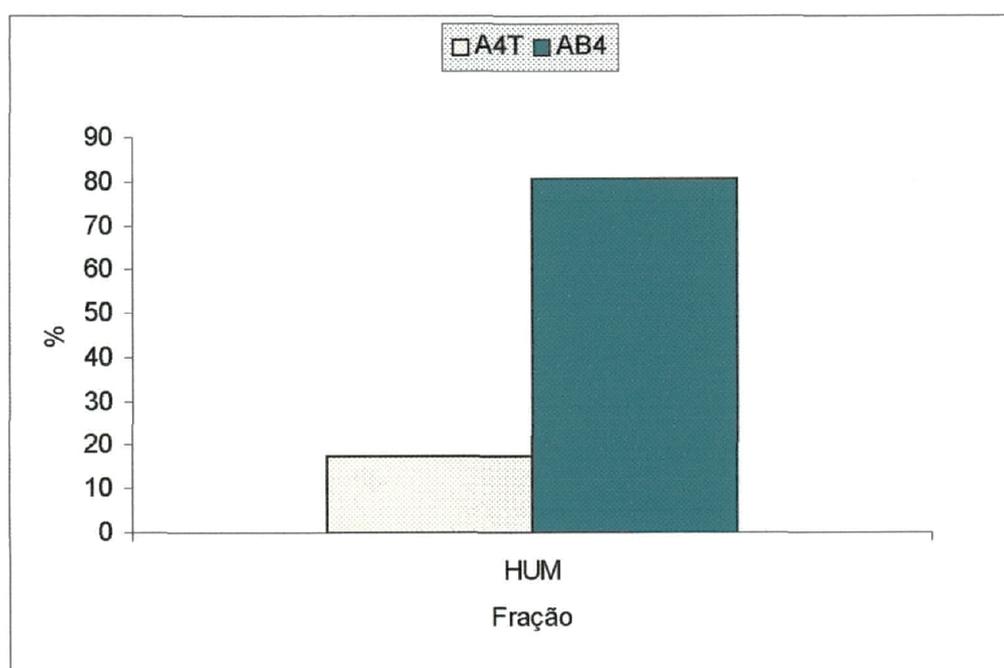
#### 4.2.1.5 Teores relativos da fração humina

Os teores relativos de carbono obtidos da fração humina na AB4 foi de 81,10%, no entanto a área testemunha A4T apresentou apenas 17,30%, figura 14.

O teor relativo da fração humina da AB4 provavelmente representa a fração pelo qual os produtos da decomposição do óleo são incorporadas na matéria orgânica do solo, ou óleo residual não biodegradado. Este aumento observado no teor relativo da fração humina acarretou alterações que podem estar envolvidas com os microrganismos do solo e a polimerização ou modificação rápida das moléculas e/ou frações do óleo adicionado. Considerando que o mecanismo de estabilização

ocorre de forma acelerada no solo, e as características das extrações da matéria orgânica de Dabin, pode-se especular a hipótese das frações do resíduo oleoso terem sofrido modificações químicas. Neste caso, embora seja necessário estudos químicos mais aprofundados, a influência em relação a fertilidade do solo não foi negativa. Sendo assim, independente da origem, pode-se considerar inicialmente que a citada fração que não está tendo efeitos ambientais negativos.

FIGURA 14 -TEORES RELATIVOS DA FRAÇÃO HUMINA



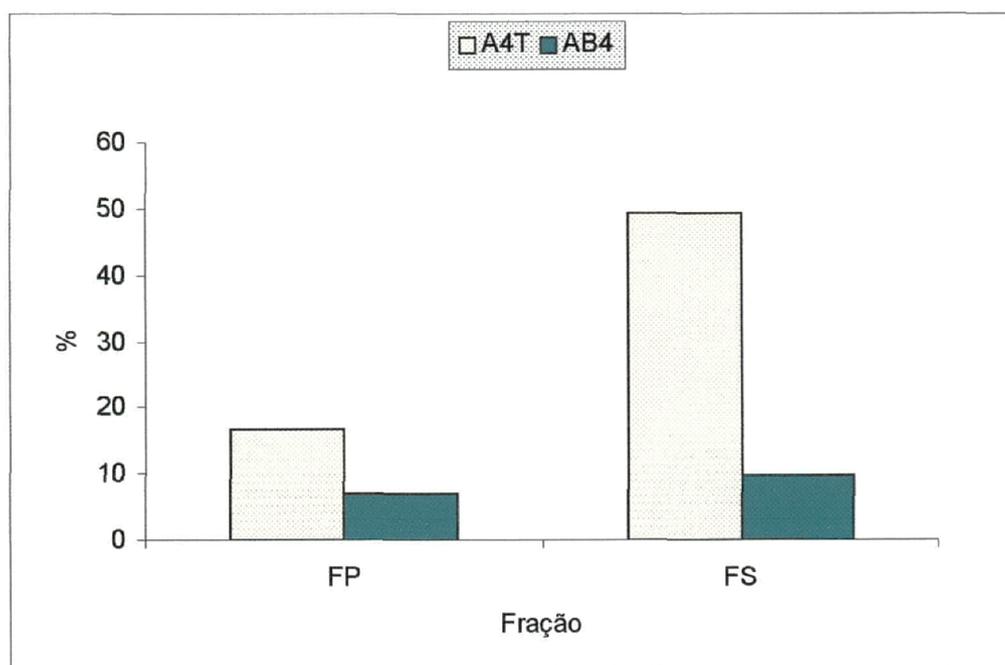
#### 4.2.1.6 Teores relativos da fração pirofosfato

Os teores relativos da fração pirofosfato observados nos tratamentos foi de 11,83 para a A4T, e 4,67 para a AB4. Estes valores, quando comparados, indicam que houve variação da composição da fração pirofosfato em relação ao carbono total dos tratamentos, figura 15, já observado anteriormente, nos teores das frações ácidos fúlvicos e ácidos húmicos ligados ao pirofosfato, itens 4.2.1.3 e 4.2.1.4 em relação ao teores relativos da A4T e AB4. As frações estabilizadas no solo através da adição do resíduo, são representadas, pela somatória das fração ácidos fúlvicos ligados ao pirofosfato livres e ácidos húmicos ligados a pirofosfato.

#### 4.2.1.7 Teores relativos da fração soda

Os teores relativos de carbono obtidos nesta fração para os tratamentos foi de 34,78% para a A4T e 7,51% para a AB4. A variação na composição das fração soda em relação ao total do solo, considerando os teores relativos obtidos nos tratamentos, representaram em mudanças na composição da fração soda, e/ou ácidos húmicos ligados a soda mais ácidos fúlvicos ligados a soda, apresentando diminuição do percentual relativo nos teores de carbono da matéria orgânica da AB4, figura 15. Características estas que podem estar relacionadas com as transformações realizadas pelos microrganismos do solo, ou a composição e características químicas das frações do óleo adicionado ao solo e seu grau de polimerização. Esta é apenas uma consideração que poderá ser melhor avaliada pelos métodos de extração com solventes orgânicos e com a espectroscopia .

FIGURA 15 -TEORES RELATIVOS DE CARBONO DA FRAÇÃO PIROFOSFATO E FRAÇÃO SODA



### 4.3 ANÁLISE COMPARATIVA DA COMPOSIÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA

#### 4.3.1 Relação das Diferentes Frações em Relação a Ácidos Húmicos Totais na Área A4t E Ab4

A relação ácidos fúlvicos totais - ácidos húmicos totais obtidos nos diferentes tratamentos, solo contaminado AB4 e área de biorremediação A4T, mostrou uma relação maior de ácidos fúlvicos para o tratamento A4T, como pode ser observado na tabela 7.

Na relação ácidos fúlvicos livres - ácidos húmicos totais verifica-se que também houve relação maior de ácidos fúlvicos livres para A4T. Entretanto quando se obteve a relação ácidos fulvicos ligados a pirofosfato - ácidos húmicos totais observou-se que os ácidos fúlvicos ligados a pirofosfato encontram-se em maior quantidade na área de biorremediação AB4.

Para a relação de ácidos fúlvicos ligados a soda - ácidos húmicos totais, observada no tratamento A4T e AB4, foi obtida maior relação da fração ácidos húmicos ligados a soda para a área A4T.

Quando se obteve a relação ácidos húmicos ligados a pirofosfato - ácidos húmicos totais, nos dois tratamentos, observou-se maior relação da fração ácidos húmicos ligados a pirofosfato para o solo do tratamento AB4, no entanto quando se faz a relação ácidos húmicos ligados a soda - ácidos húmicos totais a relação maior da fração ácidos húmicos ligados a soda a relação maior é para Área testemunha.

TABELA 7 - RELAÇÃO DAS DIFERENTES FRAÇÕES EM RELAÇÃO AOS ÁCIDOS HÚMICOS TOTAIS

RELAÇÃO	ÁREA	
	A4T	AB4
AF/AH	0,75	0,53
AFL/AH	0,33	0,17
AFP/AHT	0,11	0,18
AFS/AHT	0,31	0,18
AHP/AHT	0,25	0,38
AHS/AHT	0,75	0,62
HUM/AHT	0,37	6,65

É possível constatar, que as frações da AB4 que obtiveram maior relação com os ácidos húmicos totais em comparação com àquelas encontradas para a A4T, foram as frações ácidos fúlvicos ligados a pirofosfato, ácidos húmicos ligados ao pirofosfato e huminas, talvez pela afinidade das moléculas das substâncias húmicas que pela adição do óleo puderam interferir nas transformações que ocorreram nas frações do solo da AB4 em relação aos ácidos húmicos totais.

DABIN, 1976 menciona que em solos naturais, a relação C orgânico ácido fulvico/C orgânico ácido húmico é muito variável, seja em função da química do solo, seja devido a estação do ano, podendo ser invertida ao passar da estação seca para a chuvosa. Em solos em via de degradação, a relação ácido fúlvico/ácido húmico aumenta à medida que a estabilidade estrutural diminui. Assim pode-se inferir que as substâncias húmicas da A4 estão estabilizadas.

## 5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir:

- Os teores de carbono no solo obtidos através do fracionamento da matéria orgânica, dois anos após complementação da área, indicaram aumento nas frações da matéria orgânica do solo da área de biorremediação 4 em comparação com o solo testemunha.
- A fração que mais sofreu alteração foi humina. O incremento da fração humina na área de biorremediação 4 foi de 4.111% em relação a fração humina da área testemunha.
- As frações obtidas, matéria orgânica leve, hidrossolúvel, ácidos fúlvicos livres, ácido fúlvicos ligados a pirofosfato, ácidos fúlvicos ligados a soda, ácidos fúlvicos totais, ácidos húmicos ligados a soda, ácidos húmicos totais, apresentaram decréscimo dos teores relativos da área de biorremediação 4 em relação a área testemunha, indicando mudanças da qualidade da matéria orgânica do solo.
- A diferença na composição da matéria orgânica obtida através dos percentuais relativos dos solos da área testemunha em relação a o solo contaminado da área de biorremediação 4, indicou aumento para a fração humina no solo da área de biorremediação que pode representar as frações do óleo não biodegradado ou transformado pelos microrganismos em frações intermediárias.
- O mecanismo de estabilização ocorreu de forma acelerada no solo, e as características das extrações da matéria orgânica de Dabin revelaram que a influência em relação a fertilidade do solo não foi negativa. Pois as frações se concentraram na humina. Indicando que, independente da origem, pode-se considerar inicialmente que esta fração que não está tendo efeitos ambientais negativos.
- A relação das diferentes frações em relação aos ácidos húmicos totais mostrou que as frações que apresentaram relação aumentaram no solo da área de biorremediação 4 em relação a área testemunha, a fração ácidos fúlvicos ligados a pirofosfato que passou de 0,11 para 0,18, a fração áci-

dos húmicos ligados a pirofosfato passou de 0,25 para 0,38, e principalmente a humina que passou de 0,37 para 6,65.

- Os resultados obtidos indicam a possibilidade de uso do fracionamento da matéria orgânica como critério de biorremediação e fornecem possibilidades para futuras caracterizações das mudanças das substâncias húmicas decorrentes da aplicação de resíduos oleosos no solo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. 4. ed., New York: John Wiley, 1967, 472 p.

ALEXANDER, M. **Introducción a la microbiología del suelo**. 2. Edición, Planta Alta, México: libros y editoriales, 1980.

ALEXANDER, M. **Biodegradation of chemicals of environmental science**. p.132-138, 1981.

ANDREUX, F.; BECERRA, S. P. **Fraccionamiento y caracterización del material úmico de algunos suelos de sabana de la Orinoquia Colombiana**. Turrialba, 25 191-8, 1975.

ANDERSON, D. W.. Processes of humus formation and transformation in **soils** of the canadian great plains. **J. Soil Sci.**, 30: 77-84, 1979

ANDERSON, T. A.; KRUGER, E.L.; COATS, J.R.; SCHEPART, B.S. **Rhizosphere microbial communities of herbicide tolerant plants as potential bioremediants of soils contaminated with agrochemicals**. Bioremediation of pollutants in soil and water, American Society for Testing and Materials (ASTM). Philadelphia USA. p. 149-157, 1995.

AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE, **Land treatment in the petroleum industry**. Washington - DC, June, 1993.

ATLAS, R. M. ; BARTHA, R. **Microbial ecology : Fundamentals and applications**. Addison-Weslwy, Reading, Mass, 1981

ASSOCIACAO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Resíduos Sólidos**. NBR 10004, Rio de Janeiro, 1987.

BAYER, C.; MARTIN-NETO L.; SAAB, S. C. *et al.* Interferência da fração mineral na estimativa do grau de humificação da matéria orgânica em agregados organominerais por ressonância paramagnética eletrônica. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, 24:11-17p., 2000.

BASTARDO, H. *et al.* **Decomposición de gramíneas tropicales em sabanas inundables de los llanos venezolanos**. In: COLÓQUIO REGIONAL SOBRE MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO, Piracicaba, p.35-43, 1982.

BARBOSA, T. S.; OLIVEIRA, W. B. **A terra em transformação**. Rio de Janeiro: Qualitymark, p.120-121, 1992.

BARTHA, R. *et al.* **New. Land Treatment: Biodegradative**. UNESCO-PNDU-CETESB, São Paulo, nov. 1986.

BAYER, C. ; BERTOL Características químicas de um cambissolo húmico afetadas por sistemas de preparo, com ênfase à matéria orgânica. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, 23:687-694,1999.

BENITES, V. M.; MENDONÇA E. S.; SCHAEFER, C. E. R. *et al.* Caracterização dos ácidos húmicos extraídos de um latossolo vermelho-amarelo e de um podzol por análise termodiferencial e pela espectroscopia de absorção no infravermelho. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, 1999 23:543-551p.

BOLLAG. J. M. **Role of microorganisms in soil bioremediation**. American Chemical Society, American Chemical Society, 10p,1994.

BOLLAG. J. M. **Bioremediation of contaminated environmental sites**. WORKSHOP SOBRE BIODEGRADAÇÃO, EMBRAPA - CNPMA., p.40-51, 1996.

BRADY, N. C. **Matéria orgânica dos solos minerais: Natureza e propriedades do solos**. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 647p, 1983.

BURLE, M. L. **Efeito de sistemas de cultura em características químicas do solo**. Dissertação (Tese Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.

CAMARGO, O. A. Complexos de metais pesados com substâncias húmicas e matéria orgânica: estabilidade das ligações. **Anais do 2º Encontro Brasileiro sobre Substâncias Húmicas**, São Carlos - São Paulo, p. 72-73, 1997.

CANTARELLA, H.; ABREU, C. A.; BERTON, R. S. **Fornecimento de nutrientes pela matéria orgânica do solo**. Matéria Orgânica do Solo - Problemas e Soluções, Botucatu - São Paulo, p. 63-119, 1992.

CARDOSO, E. J. B. N. **Efeito da matéria orgânica na biologia do solo**. Matéria Orgânica do Solo - Problemas e Soluções, Botucatu - São Paulo, p.37-61, 1992.

CARVALHO, F. J. P. C. *et al.* **Desenvolvimento de tecnologia para tratamento de resíduos de toxicidade variável no sistema Landfarming**, PETROBRAS - REPAR, s/v., p.607-616, 1995.

CARVALHO, F. J. P. C. ; ALMEIDA, M. H. . **Petrobras' high efficiency landfarming sistem: "new for biodegradable toxic industrial wastes"** : in Biodeterioratio an Biodegradation, DECHEMA Monographs, v.133, Hamburg, p.535-542, Sep, 1996.

CARVALHO, F. J. P. C.; ALMEIDA, M. H. . **Manual de Operação do Landfarming da REPAR**. 103p, 1995.

CASAGRANDE J. C. Influência da matéria orgânica e do ph sobre a disponibilidade de chumbo em solo ácrico. **Anais do 2º Encontro Brasileiro sobre Substâncias Húmicas**, São Carlos - São Paulo, 157p.,1997.

CASARINI. D. C. P. **Padrões de qualidade de solos e águas subterrâneas**. WORKSHOP SOBRE BIODEGRADAÇÃO, EMBRAPA- CNPMA., 1996.

CASTRO, R. A. **Tratamento de lodo de esgoto urbano no solo com microrganismos de Landfarming de substrato oleoso**. Dissertação (Tese Mestrado), Universidade Federal do Paraná, 2000.

CERRI, C. C.; MORAES, J. F. L. **Consequências do uso e manejo do solo no teor da matéria orgânica**. Matéria Orgânica do Solo - Problemas e Soluções, Botucatu - São Paulo, 1992.

CERRI, C. C.; ANDREUX, *et al.* **O ciclo do carbono no solo**. CENA/USP, Piracicaba São Paulo cap 6: 73-89p, 1987.

CETESB Trabalho elaborado pelo corpo técnico da CETESB, **Resíduos sólidos industriais**.p.135-226, São Paulo, 1992.

CONDON, L. M ; NEWMAN R. H. **Chemical nature of soil organic matter under grassland and recently established forest**. Blackel Science Ltda. 597 a 603p

CONCAWE **Sludge farming: a technique for disposal of oily refinery wastes**. 94p., 1980.

CUTRIGHT, T. J. LEE, S. **In situ Soil Remediation: Bacteria ou Fungi?** Department of Chemical Engineering, University of Akron. Akron Ohio - USA, s/v. p. 414-419, 1994.

DABIN, B. **Etude d'une méthode d'extraction des matières humiques du sol**. Sci. Du Sol, 1: 47-63, 1971.

DABIN, B. **Application d'une méthode de fractionnement des matières humiques du sol à quelques études pédologiques et agronomiques dans les sols ferrallitiques**. Multigraphie, 24p., 1975.

DABIN, B. **Méthode d'extraction et de fractionnement des matières humiques du sol application à quelques études pédologiques et agronomiques dans les sols tropicaux**. Cah. Orston. Ser. Pédol., 14 (4) : 287-297, 1976.

DOBSON, A.L., WILSON, H.A. **Respiration studies on soil treated with some hidrocarbons**. Proceedings Soil Science America. 28: 536 - 539, 1964.

DUCHAUFOR, P. ; JAQUIN, F. **Nouvelles recherches sur l'extraction et le fractionnement des composés humiques**. **Bulletin d'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Nancy** 8(1), 1966.

DUXBERRY, J. M.; SMITH, M.S. e DORAN, J.M. , **Soil organic matter as a source and a sink of plant nutrients**. In: 1989 : COLEMAN, D.C; OADES.J. M. & UEHARA, G. **Dynamics of soil organic matter in tropical ecossistems**. Honolulu, University of Hawai. Cap 2. p.263-270.

ENGLERT, C. J. et al **Bioremediation of petroleum products in soil**. Biorremediation of Soils. Michigan, p.11-129, 1993.

EPA Organismo para a Proteção do Meio Ambiente **Desechos sólidos y respuesta en situaciones de Emergência: Medidas biocorretivas**. 542-f-023, p.1-6, 1996.

FAHAD, A. A.; MELKE, L.N.; FLOWERDAY, A. D. **Swatzenruber, D. Soil physical properties as affected by soybean other cropping sequences**. SoilSci Soc. Am. J, 46:377-81,1982.

FASSBENDER, H. W. **Química del suelos, com énfasis em suelos de América Latina**. 3.Ed., 398p., Costa Rica, IICA, 1982.

FELBEK, G.T. **Chemical and biological characterization of humic matter**. In: MACHAREN, A.D. & SKUJINS, J. , eds. Soil biochemistry. New York, Marcell Dekker, v.2, p.36-59, 1971.

FISHER, P. J. *et al.* **Bacterial Survival and n - Alkame Degradation Within Omani Crude Oil and a Mousse**. Departament of Biological Sciences, University of Exeter. s/v. p. 403-407, 1995.

FLAIG, W. ; BEUTELSPACHER, H. ; RIETZ, E. . **Chemical composition nd physical properties of humic substances**. In: GIESELING, J. E. ed. Soil components. New York, Springer, 1975.

FREIXO, A. A.; CUNHA, T. J. F. ; MACHADO P. L. de O. *et al.* Estudo comparativo de extratores químicos de substâncias húmicas em um latossolo roxo sob floresta tropical. **Anais do 2º Encontro Brasileiro Sobre Substâncias Húmicas**, 125p., São Carlos - São Paulo, 1997.

GLÓRIA, N. A. **Resíduos industriais como fonte de matéria orgânica**. Matéria Orgânica do Solo - Problemas e Soluções, p.129-147, Botucatu - São Paulo, 1992.

GONÇALVES, C. M. **Avaliação do uso de microrganismos da camada reativa do landfarming para acelerar o processo de biodegradação em áreas de biorremediação**. Monografia Apresentada ao Curso de Biologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 1996.

GREGORICH, E.G., VORONEY, R. P., KACHANOSKI, R.G. Carbon mineralization in soil size fractions after various amounts of aggregate disruption. **Journal of Soil Science**, 40: 649 - 659, 1989.

GRUIZ, K. & KRISTON E. In Situ Bioremediation of Hidrocarbon in Soil. **Journal of Soil Contamination**, Budapest, v.4, n. 2, p163-173,1995.

HAIMANN, R. A. **Fungal technologies for the treatment of hazordous waste**. Environmental Progress, Santa Ana - Califórnia, v. 14, n. 3, p. 201-203, Aug, 1995.

HALLGARTH, M. R., JANKOWSKI, M. D., AUTENRIETH, R. L. **Biodegradation of RDX and HMX**. p. 17-22. In: Alleman, B.C. e Leeson, A. (ed.) In Situ and On-Site Bioremediation: Vol. 2. Papers from the fourth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium. New Orleans, April 28-may 1. 647p., 1997.

HUESEMANN, M. H. . Guidelines for land-treating petroleum hydrocarbon - contaminated soils - **Journal of Contamination**, s/l, v.3 n. 3, p. 299-318, 1994.

JOBSON, A. M. *et al* **Effects of amendments of microbial utilization of oil applied to soil**. Appl. Microbiol. 27, 166-171.

KAHIL, A. L. K. **Análise das alterações na matéria orgânica do solo causada pelo florestamento com *Pinus elliotii* na região da Lapa - PR**. Dissertação (Tese Mestrado) Universidade Federal do Paraná, 1986.

KONONOVA, M. M. **Soil Organic Matter**. New York, Pergamon, 544 p., 1966.

KONONOVA, M.; BELCHIKOVA, N. P. Rapid methods of determining the humus composition of mineral soils. : FLAIG, W. Contribution à la connaissance de la constitution et la synthèse des acides humiques. **Sci du Sol**, 2: 39-72, 1970.

KRENCZYNSKI, M. C. **Avaliação da capacidade de diferentes substratos oleosos para microrganismos da camada reativa do *Landfarming***. Monografia apresentada ao Curso de Biologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 1996.

LA BELLE, B. E. & HADLEY, P. W. Bio beware!! Constraints and considerations when demonstrating bioremediation technologies in the field. **Journal of Soil Contamination**, 3(2): p.119-126, 1994.

LANGENBACH, T. **Biodegradação de xenobiontes: Potencialidades e Limites**. Microrganismos de Importância Agrícola - EMBRAPA, Brasília, p. 217-228, 1994.

LANGENBACH, T. **Distribuição de triazinas em diferentes solos brasileiros**. WORKSHOP SOBRE BIODEGRADAÇÃO. EMBRAPA- CNPMA., 1996.

LAVORENTI, A. **Comportamento dos herbicidas no meio ambiente**. WORKSHOP SOBRE BIODEGRADAÇÃO. EMBRAPA- CNPMA., 1996.

LARRABE, L.; MACKEPFRANG, O. **Como se controla um derrame de cruído.**, p.71-86, Junho, 1993.

LYNCH, J. M. **The terrestrial environment In microorganisms in action: Concepts and applications in microbial ecology**. J. M. Lynch and J.E. Hobbie eds. Blackwell Scientific, Oxford, pp.103-131, 1988.

LYNCH, J. Land treatment of hydrocarbon contaminated soils. In: KOSTECKI P. T.; CALABRESE, E. J. **Petroleum Contaminated Soils**. Chelsea USA: Lewis Publishers, v.1, p.163-174, 1989.

LONGO, J. V. **Fracionamento e caracterização de substâncias húmicas em materiais de solos**. Dissertação (Tese Mestrado) Universidade Federal de Viçosa, 1982.

MAGDOF, FRED **Building soils for better crops**. University of Nebraska Press Lincoln and London, v. 2, 168p., 1986.

McGILL, W. B.; ROWELLI, M. J. and WESTLAKE, D. W. S. **Biochemistry, ecology, and microbiology of petroleum components in soil** In: Soil Biochemistry, Paul, E.A. and Ladd, J. N., v.5, cap.6, New York, Marcel Dekker, 1981.

MARTIN NETO, L.; NASCIMENTO, O. R.; TALAMONI E POPPI, N. R. **EPR of micronutrients-humic substances complexes extracted from a Brazilian soil**. Soil Sci. 151: 369-376, 1991.

MARTIN NETO, L. **Mecanismos de sorção e degradação de herbicidas em solos e água**. WORKSHOP SOBRE BIODEGRADAÇÃO. EMBRAPA- CNPMA., 116 p, 1996.

MEETING, J. B. **Soil microbial e ecology applications in agricultural an environmental manegement**. Environmental Sciencies Department Battele Pacific Northwest Laboratórios, Richland, Washington, Cap.01 e 17, p.132-138, 1992.

MELO, J.W. *et al.* Efeito de doses crescentes de lodo de esgoto sobre frações da matéria orgânica e CTC de um latossolo cultivado com cana de açúcar. **Rev. Brasileira Ciência do Solo Campinas**, 18: p.449-455, 1994.

MIELNICZUK, C. **A população microbiana e a degradação de resíduo petroquímico no solo**. Dissertação (Tese Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1991.

NASCIMENTO, E. J. **Dinâmica da matéria orgânica de um latossolo vermelho distrófico, fase cerrado, submetido a diferentes sistemas de preparo de solo e rotações de milho e soja**. Dissertação (Tese Mestrado) Universidade de Viçosa, 1989.

NASCIMENTO NETO, DURVAL Metodologia para bioindicadores de biorremediação do solo com resíduos de atividades petrolíferas. In: 4º EVINCI Evento de Iniciação científica da UFPR (1996: Curitiba). **Anais Curitiba: UFPR**, p.371, 1996.

NELSON, W. L. **Petroleum Refinery e Engineering**. McGraw-Hill Book Company, Inc New York Toronto e London, 1949.

OSAKI, F. **Efeito da cobertura morta de acículas de *Pinus* spp. na matéria orgânica do solo sob cultivo de macieira *Malus xdomestica borkh***. Dissertação (Tese Mestrado) Universidade Federal do Paraná, 1988.

PARFITT, R. L.; MORTLAND, M. M. **Ketone adsorption on montmorillonite**. Soil Science Society American Proceedings. 32: 355 - 363, 1968.

RASIAH, V.; VORONEY, R. P.; KACHANOSKI, R. G. **Bioavailability of stabilized oily waste organics in ultrasonified soil aggregates**. Water, Air and Soil Pollution. 63: 179 - 186, 1991.

RAMAM, K. V.; MORTLAND, M. M. **Proton transfer reactions at clay mineral surfaces**. Soil Science Society American Proceedings. 33: 313 - 317, 1969.

RAYMOND, R. L. ; LIBERATI, M. A. ; ZANIKOS *et al.* **National Petroleum Association** Publicação NAM-9047, 1990.

RIIS, V.; MIETHE, D.; BABEL, W. **Degradation of refinery products and oils from polluted sites by the autochthonous microorganisms of contaminated and pristine soils**. Microbiological Research. 150(3): 323 - 330, 1995.

REPAR **ME-6360-019 - Determinação do índice de toxicidade de resíduos oleosos**. 12 p., Araucária, 1997.

REPAR **ME-6360-026 - Determinação dos teores de água, de solúveis em n-heptano e tolueno, em solos e em resíduos oleosos**. 16 p., Araucária, 1997.

REPAR **ME-6360-036 - Determinação da biodegradabilidade atual de resíduos oleosos**. 16 p., Araucária, 1997.

RESCK, D. V. S. **Matéria orgânica como fator preponderante no manejo e conservação do solo e da água na região dos cerrados**. Anais do 2º Encontro Brasileiro sobre Substâncias Húmicas, 50p., São Carlos - São Paulo, 1997.

SCHNITZER, M.; KHAN, S. U. **Humic substances in the environment**. New York, Dekker, 327p., 1972.

SCHNITZER, M.; KHAN, S. U. **Soil organic matter**. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam Oxford New York, p.1-61, 1978.

SEMA PR **Coletânea de Legislação Ambiental - Secretaria do Estado do Desenvolvimento Urbano e do Meio Ambiente**. Curitiba, 1990.

SIERRA, M. M. S.; GIOVANELA M. **Propriedades de fluorescência de compostos húmicos sedimentares e das águas intersticiais adjacentes**. Anais do 2º Encontro Brasileiro sobre Substâncias Húmicas, 171p, São Carlos - São Paulo, 1997.

SIQUEIRA, C. **Eletroquímica de solos tropicais de carga variável: Efeitos da matéria orgânica**. Tese (Doutorado em Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Itaguaí, Rio de Janeiro, 1985.

SIQUEIRA, J. O. *et al.* **Microrganismos e processos biológicos do solo: Perspectiva ambiental**. EMBRAPA - SPI, Brasília-DF, p.116-122, 1994.

SKLADANY, G. J.; METTING JR, F. BLAINE. **Bioremediation of contaminated soil. Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management**. Books in Soils, Plants, and The Environment. New York, USA. p.483-513, 1992.

SOUZA, S. L. **Estudo de vegetalização em áreas contaminadas com resíduos da atividade petrolífera.** Proposta para Trabalho de Tese de Mestrado, 1994.

SOUZA, S. L.. **Revegetação de área de biorremediação contaminada por resíduos oleosos de petróleo.** Dissertação (Tese Mestrado) Universidade Federal do Paraná, 1999.

SPOSITO, G. **The Chemistry of Soil: Soil Organic Matter**, Oxford University Press, Oxford - New York, p. 42-63, 1989.

STEVENSON, J. F. **Humus chemistry, genesis, composition, reations.** John Wiley &, Sons, 443p., 1982.

STEVENSON, J. F. **Cycles of soil. Carbon, nitrogen, phosphorus, sulphur, micronutrients.** New York. John Wiley &, Sons, 380p., 1985.

STOTT, D. E.; MARTIN, J. P. **Synthesis and degradation of natural and synthetic humic material in soil.** : MACCARTHY, P. *et al.* **Humic substances in soil and crop sciences** : selected readings. Madison, Wisconsin, USA : American Society of Agronomy, Inc., p.37- 63, 1990.

TATE, K. R. & THENG, B. K. G. **Organica matter and its interactions with inorganic soil constituents.** In: THENG B. K. G. **Soils with variable charge.** New Zealand Soc. Soil Sci. Soil Bureau, Lower Hutt, p.225-244, 1980.

TAUK -TORNISIELO, S. M. Substâncias húmicas e atividades microbianas no solo. **Anais do 2º Encontro Brasileiro sobre Substâncias Húmicas**, São Carlos - São Paulo, p.32-35, 1997.

TIPPING, E.; COOKE, D. **The effects of adsorbed humic substances on the surface charge of goethite ( $\alpha$  - FeOOH) in fresheaters.** Geochim. Cosmochim. Acta., 46: 75-80,1982.

WAKSMAN, S. A . **Soil microbiology.** Copyright, 1952 by Wiley & SONS, Inc, New York, 1961.

WALKLEY, A. and BLACK, Y. A. **Na examination of the detjareff method for determining soil organic matter and proposed modification on the chromic acid titration methods.** Soil Sci, 37:29-38, 1934.

VIEIRA & COSTA **Caracterização química das substâncias húmicas e estirpe de açazeiro (*Euterpe oleacea, Mart*) em decomposição.**

VOLKOFF, B. & ANDRADE, M. J. Caracterização da matéria orgânica de alguns solos ferralíticos do estado da Bahia: aplicação de um método de fracionamento das substâncias húmicas. In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Anais, Campinas, SBCS, p. 119-126, 1976.

## APÊNDICES

### APÊNDICE 1 - CARBONO ADICIONADO PELAS BORRAS OLEOSAS NO SOLO

Resíduo	Carbono adicionado pelas borras oleosas (%)
TQ – 63209	1,12
TQ – 63201	7,79
Buraco 2	0,09
TQ – 63210	1,96
TQ – 4242	0,13
Buraco 3	17,30
Tambores	0,13
Total	28,52

### APÊNDICE 2 - TEOR DE CARBONO NO SOLO

ANO	AB4 (%)
1996	28,52*
1997	15,20
1998	15,24
1999	13,41
2000	15,49

\* tempo 0

APÊNDICE 3 - REFERENTE AOS TEORES DE CARBONO NAS DIFERENTES  
REPETIÇÕES DA ÁREA A4T

Fração	A4T1 (%)	A4T2 (%)	A4T3 (%)	A4T4 (%)
Carbono Total nas Frações	1,93	1,76	1,93	1,98
Matéria orgânica leve	0,02	0,03	0,00	0,01
Hidrossolúveis	0,02	0,01	0,00	0,00
Ácidos fúlvicos livres	0,32	0,37	0,22	0,27
Ácidos fúlvicos ligados a pirofosfato	0,17	0,05	0,09	0,06
Ácidos fúlvicos ligados a soda	0,27	0,24	0,29	0,31
Ácidos fúlvicos totais	0,75	0,67	0,60	0,64
Ácidos húmicos ligados a pirofosfato	0,27	0,26	0,15	0,22
Ácidos húmicos ligados a soda	0,46	0,51	0,86	0,83
Ácidos húmicos totais	0,72	0,77	1,01	1,05
Fração humina	0,42	0,29	0,32	0,29

APÊNDICE 4 - REFERENTE AOS TEORES DE CARBONO NAS DIFERENTES  
REPETIÇÕES DA AB4

Fração	AB41 (%)	AB42 (%)	AB43 (%)	AB44 (%)
Carbono Total nas Frações	16,90	16,45	17,11	17,95
Matéria orgânica leve	0,04	0,04	0,02	0,03
Hidrossolúveis	0,03	0,03	0,01	0,01
Ácidos fúlvicos livres	0,36	0,34	0,21	0,49
Ácidos fúlvicos ligados a pirofosfato	0,29	0,37	0,49	0,39
Ácidos fúlvicos ligados a soda	0,29	0,28	0,48	0,47
Ácidos fúlvicos totais	0,94	0,98	1,17	1,36
Ácidos húmicos ligados a pirofosfato	1,14	1,17	0,33	0,52
Ácidos húmicos ligados a soda	0,94	1,01	1,73	1,47
Ácidos húmicos totais	2,08	2,18	2,06	1,99
Fração humina	13,80	13,22	13,84	14,57

## APÊNDICE 5 - TEOR MÉDIO DE CARBONO NO SOLO

Fração	A4T1 (%)	A4T4 (%)
Carbono Total nas Frações	1,902	17,101
Matéria orgânica leve	0,013	0,032
Hidrossolúveis	0,007	0,020
Ácidos fúlvicos livres	0,293	0,349
Ácidos fúlvicos ligados a pirofosfato	0,094	0,385
Ácidos fúlvicos ligados a soda	0,278	0,379
Ácidos fúlvicos totais	0,665	1,113
Ácidos húmicos ligados a pirofosfato	0,224	0,790
Ácidos húmicos ligados a soda	0,665	1,288
Ácidos húmicos totais	0,889	2,078
Fração humina	0,329	13,858

APÊNDICE 6 - PORCENTAGEM RELATIVA DE CARBONO NAS FRAÇÕES DA  
ÁREA A4T

Fração	A4T1 (%)	A4T2 (%)	A4T3 (%)	A4T4 (%)
Carbono Total nas Frações	100	100	100	100
Matéria orgânica leve	0,81	1,49	0,20	0,28
Hidrossolúveis	0,81	0,29	0,23	0,09
Ácidos fúlvicos livres	16,42	21,06	11,28	13,37
Ácidos fúlvicos ligados a pirofosfato	8,78	3,12	4,61	3,07
Ácidos fúlvicos ligados a soda	13,79	13,90	15,15	15,60
Ácidos fúlvicos totais	38,99	38,08	31,04	32,04
Ácidos húmicos ligados a pirofosfato	13,75	14,72	7,78	11,07
Ácidos húmicos ligados a soda	23,77	29,11	44,31	41,91
Ácidos húmicos totais	37,53	43,83	52,10	52,99
Fração humina	21,87	16,30	16,43	14,61

APÊNDICE 7 - PORCENTAGEM RELATIVA DE CARBONO NAS FRAÇÕES DA  
ÁREA AB4

Fração	AB41 (%)	AB42 (%)	AB43 (%)	AB44 (%)
Carbono Total nas Frações	100	100	100	100
Matéria orgânica leve	0,25	0,22	0,13	0,15
Hidrossolúveis	0,19	0,19	0,05	0,05
Ácidos fúlvicos livres	2,10	2,05	1,21	2,76
Ácidos fúlvicos ligados a pirofosfato	1,70	2,23	2,86	2,20
Ácidos fúlvicos ligados a soda	1,73	1,69	2,79	2,61
Ácidos fúlvicos totais	5,54	5,98	6,87	7,56
Ácidos húmicos ligados a pirofosfato	6,74	7,09	1,95	2,89
Ácidos húmicos ligados a soda	5,58	6,16	10,11	8,18
Ácidos húmicos totais	12,33	13,25	12,06	11,07
Fração humina	81,69	80,37	80,89	81,17

APÊNDICE 8 -PORCENTAGEM MÉDIA RELATIVA DE CARBONO NAS FRAÇÕES

Fração	A4T1 (%)	A4T4 (%)
Carbono Total nas Frações	100	100
Matéria orgânica leve	0,70	0,19
Hidrossolúveis	0,35	0,12
Ácidos fúlvicos livres	15,53	2,03
Ácidos fúlvicos ligados a pirofosfato	4,90	2,25
Ácidos fúlvicos ligados a soda	14,61	2,21
Ácidos fúlvicos totais	35,04	6,49
Ácidos húmicos ligados a pirofosfato	11,83	4,67
Ácidos húmicos ligados a soda	34,78	7,51
Ácidos húmicos totais	46,61	12,18
Fração humina	17,30	81,03