

RAFAELA GHELLERE DAL FORNO

**AVALIAÇÃO DA POLUIÇÃO DO SOLO POR DERIVADOS DE
PETRÓLEO E SUA REMEDIAÇÃO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.
Curso de Pós Graduação em Ciência do Solo,
Setor de Ciências Agrárias, Universidade
Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Pereira
de Campos Carvalho
Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Felda Gobbi

CURITIBA
2006

Dedico a duas vidas: minha mãe por sua chama intensa até o fim da guerra; e para o meu novo filho cujo coração bate fortemente e aguarda para vir ao mundo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, Fabiano, e minha filha maravilhosa, Maria Claudia, pessoas que eu amo, por sua paciência e apoio.

Aos meus pais, pela determinação, confiança e carinho.

Aos meus amigos, pelo incentivo.

Aos meus colegas pela ajuda.

Aos técnicos pelo trabalho.

Ao Prof. Francisco José Pereira de Campos Carvalho pela oportunidade de desenvolver o meu trabalho e pela confiança dispensada a minha pessoa.

À minha equipe de trabalho: Dimitri, Cíntia, Rodrigo, Michele, Andressa, Rafael, Claudia, Chiquinho, Maricelma, Adriano, pelas alegrias, conquistas e pelo trabalho brilhante que nossa equipe desenvolve.

À PETROBRAS S/A, nas pessoas de Ernani Zamberlan e Nilton Nishigushi pela autorização para a realização do presente estudo na Refinaria de Petróleo Presidente Getúlio Vargas, Araucária, Paraná.

Em especial à ANTROPOSPHERA Instituto para o Desenvolvimento do Meio Ambiente pela estrutura disponível para a realização deste presente estudo.

À ALLDelara, em especial a pessoa de Durval do Nascimento Neto pela autorização para a coleta de solo nos arredores dos trilhos de trem.

À todos aqueles que de alguma forma participaram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste estudo.

*Ainda pior que a convicção do não
e a incerteza do talvez
é a desilusão de um quase.*

(Luis Fernando Veríssimo)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 PETRÓLEO, UM COTAMINANTE DO SOLO	4
3.1.1 ÓLEO DIESEL	6
3.2 BIORREMEDIAÇÃO, UMA TECNOLOGIA INTERESSANTE.....	6
3.3 O EMPREGO DE MICROORGANISMOS PARA A DEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO E SEUS DERIVADOS.....	10
3.4 ACEPTORES DE ELÉTRONS NA BIORREMEDIAÇÃO ANÓXICA.....	16
3.4.1 UTILIZAÇÃO DE NITRATO COMO ACEPTOR DE ELÉTRONS	17
3.4.2 UTILIZAÇÃO DE PERÓXIDO COMO ACEPTOR DE ELÉTRONS	19
3.5 MONITORAMENTO.....	20
3.5.1 RESPIRAÇÃO DO SOLO	20
3.5.2 HIDROCARBONETOS TOTAIS DE PETRÓLEO.....	21
3.5.3 MATÉRIA ORGÂNICA.....	22
3.5.4 POTENCIAL DE HIDROGÊNIO.....	22
3.5.5 UMIDADE	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 LOCALIZAÇÃO.....	24
4.2 TRATAMENTOS.....	24
4.3 MÉTODOS DE ANÁLISE.....	27
4.3.1 AMOSTRAGEM.....	27
4.3.2 pH.....	27
4.3.3 MATÉRIA ORGÂNICA TOTAL.....	27
4.3.4 RESPIRAÇÃO DO SOLO	28
4.3.5 THP-TOTAL DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO.....	28
4.3.5.1 Determinação da área de compostos não definidos.....	29
4.3.5.2 Cálculo do índice referente aos compostos não definidos.....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6 CONCLUSÃO	53

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
ANEXO I – CÁLCULO DAS DOSES APLICADAS NO SOLO	
ANEXO II – RESPIRAÇÃO DO SOLO	
ANEXO III – ÁREAS DOS COMPOSTOS EM DEGRADAÇÃO	
ANEXO IV – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ACONDICIONAMENTO DO SOLO DO EXPERIMENTO.....	30
FIGURA 2 -	RESPIRAÇÃO DO SOLO CONTAMINADO COM INÓCULO	33
FIGURA 3 -	RESPIRAÇÃO DO SOLO CONTAMINADO COM INÓCULO E NITRATO.....	34
FIGURA 4 -	RESPIRAÇÃO DO SOLO CONTAMINADO COM INÓCULO E PERÓXIDO	35
FIGURA 5 -	RESPIRAÇÃO DO SOLO CONTAMINADO COM INÓCULO COM BACTERICIDA E ANTIMICÓTICO	36
FIGURA 6 -	RESPIRAÇÃO DO SOLO CONTAMINADO COM INÓCULO, NITRATO, BACTERICIDA E ANTIMICÓTICO	37
FIGURA 7 -	RESPIRAÇÃO DO SOLO CONTAMINADO COM INÓCULO, PERÓXIDO, BACTERICIDA E ANTIMICÓTICO	38
FIGURA 8 -	RESPIRAÇÃO DO SOLO CONTAMINADO COM OS SEIS TRATAMENTOS.....	38
FIGURA 9 -	RESPIRAÇÃO DO SOLO CONTAMINADO COM OS TRATAMENTOS COM INÓCULO: SOLO + INÓCULO E SOLO + INÓCULO + BACTERICIDA E ANTIMICÓTICO	39
FIGURA 10 -	RESPIRAÇÃO DO SOLO CONTAMINADO COM OS TRATAMENTOS COM INÓCULO E NITRATO	40
FIGURA 11 -	RESPIRAÇÃO DO SOLO CONTAMINADO COM OS TRATAMENTOS COM INÓCULO E PERÓXIDO: SOLO + INÓCULO + PERÓXIDO E SOLO + INÓCULO + PERÓXIDO + BACTERICIDA E ANTIMICÓTICO.....	40
FIGURA 12 -	RESPIRAÇÃO DO SOLO CONTAMINADO COM OS SEIS TRATAMENTOS NA PRIMEIRA SEMANA	41
FIGURA 13 -	RESPIRAÇÃO DO SOLO CONTAMINADO COM OS SEIS TRATAMENTOS NA SEGUNDA SEMANA	41
FIGURA 14 -	RESPIRAÇÃO DO SOLO CONTAMINADO COM OS SEIS TRATAMENTOS NA TERCEIRA SEMANA.....	42
FIGURA 15 -	RESPIRAÇÃO DO SOLO CONTAMINADO COM OS SEIS TRATAMENTOS NA TERCEIRA SEMANA.....	42
FIGURA 16 -	PERFIL CROMATOGRÁFICO DO SOLO CONTAMINADO AREIA NO TEMPO INICIAL	44
FIGURA 17 -	PERFIL CROMATOGRÁFICO DO SOLO CONTAMINADO AREIA COM INÓCULO NO TEMPO 1	44
FIGURA 18 -	PERFIL CROMATOGRÁFICO DO SOLO CONTAMINADO AREIA COM INÓCULO, BACTERICIDA E ANTIMICÓTICO NO TEMPO 1.....	45
FIGURA 19 -	PERFIL CROMATOGRÁFICO DO SOLO CONTAMINADO AREIA COM INÓCULO E NITRATO NO TEMPO 1.....	45
FIGURA 20 -	PERFIL CROMATOGRÁFICO DO SOLO CONTAMINADO AREIA COM INÓCULO, NITRATO, BACTERICIDA E ANTIMICÓTICO NO TEMPO 1	45
FIGURA 21 -	PERFIL CROMATOGRÁFICO DO SOLO CONTAMINADO AREIA COM INÓCULO E PERÓXIDO NO TEMPO 1	46
FIGURA 22 -	PERFIL CROMATOGRÁFICO DO SOLO CONTAMINADO AREIA COM INÓCULO, PERÓXIDO, BACTERICIDA E ANTIMICÓTICO NO TEMPO 1	46
FIGURA 23 -	PERFIL CROMATOGRÁFICO DO SOLO CONTAMINADO AREIA COM INÓCULO NO TEMPO 3	47
FIGURA 24 -	PERFIL CROMATOGRÁFICO DO SOLO CONTAMINADO AREIA COM INÓCULO, BACTERICIDA E ANTIMICÓTICO NO TEMPO 3.....	47
FIGURA 25 -	PERFIL CROMATOGRÁFICO DO SOLO CONTAMINADO AREIA COM INÓCULO E NITRATO NO TEMPO 3.....	47

FIGURA 26 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO SOLO CONTAMINADO AREIA COM INÓCULO, NITRATO, BACTERICIDA E ANTIMICÓTICO NO TEMPO 3	48
FIGURA 27 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO SOLO CONTAMINADO AREIA COM INÓCULO E PERÓXIDO NO TEMPO 3	48
FIGURA 28 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO SOLO CONTAMINADO AREIA COM INÓCULO, PERÓXIDO, BACTERICIDA E ANTIMICÓTICO NO TEMPO 3	48
FIGURA 29 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO SOLO CONTAMINADO AREIA COM INÓCULO NO TEMPO 6	49
FIGURA 30 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO SOLO CONTAMINADO AREIA COM INÓCULO, BACTERICIDA E ANTIMICÓTICO NO TEMPO 6.....	49
FIGURA 31 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO SOLO CONTAMINADO AREIA COM INÓCULO E NITRATO NO TEMPO 6.....	50
FIGURA 32 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO SOLO CONTAMINADO AREIA COM INÓCULO, NITRATO, BACTERICIDA E ANTIMICÓTICO NO TEMPO 6	50
FIGURA 33 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO SOLO CONTAMINADO AREIA COM INÓCULO E PERÓXIDO NO TEMPO 6	50
FIGURA 34 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO SOLO CONTAMINADO AREIA COM INÓCULO, PERÓXIDO, BACTERICIDA E ANTIMICÓTICO NO TEMPO 6	51
FIGURA 35 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO SOLO CONTAMINADO AREIA SEM TRATAMENTO NO TEMPO 6	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SOLO COM OS TRATAMENTOS	24
TABELA 2 - SOLO TESTEMUNHA COM OS TRATAMENTOS	25
TABELA 3 - DOSES APLICADAS NOS SOLOS TRATADOS	26
TABELA 4 - ANÁLISE DE FERTILIDADE DO SOLO AVALIADO.....	29
TABELA 5 - TEORES DE pH EM ÁGUA	30
TABELA 6 - TEORES DE pH EM CLORETO DE CÁLCIO	31
TABELA 7 - TEORES DE MATÉRIA ORGÂNICA TOTAL.....	31
TABELA 8 - RESPIRAÇÃO DO SOLO CONTAMINADO SEM TRATAMENTO NO TEMPO INICIAL	32
TABELA 9 - TEORES DE THP NO SOLO.....	43
TABELA 10 - ÍNDICE DA ÁREA DE COMPOSTOS EM DEGRADAÇÃO.....	52

LISTA DE SÍMBOLOS

- C_n – cadeia carbônica com n carbonos
- PAH – Hidrocarbonetos Poliaromáticos
- TPH – Total de Hidrocarbonetos de Petróleo
- PCP – Pentaclorofenol
- BTEX – Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno
- PCB – Bifenilas policloradas
- TNT – Trinitrotolueno

RESUMO

Grandes vazamentos, responsáveis por grandes contaminações de solos e água, são decorrentes das indústrias. A biorremediação como tratamento de áreas contaminadas têm sido bastante estudada, sendo indicada com viabilidade econômica. Porém para o tratamento de áreas onde o solo não pode ser removido, as soluções para a sub-superfície ainda são poucas. Nesta região a biorremediação não é eficiente devido a falta de oxigênio nas reações de degradação aeróbica. Este estudo avaliou o efeito dos aceptores de elétrons peróxido de hidrogênio e nitrato de potássio para a população microbiana como promotores de biorremediação nesta região do solo onde a população aeróbia é pequena, pela falta de oxigênio. Uma condição anaeróbia foi simulada para avaliar os ganhos da adição destes aceptores. Um índice de degradação foi determinado através da análise dos cromatogramas de Totais de Hidrocarbonetos de Petróleo. O maior índice de degradação foi encontrado no solo tratado com peróxido, apesar de que nos primeiros meses esta resposta não foi significativa. Em relação aos resultados obtidos de respiração microbiana, pH e matéria orgânica, não foi encontrado diferença estatisticamente significativa.

Palavras-chave: solo contaminado com petróleo, região anaeróbia, microorganismos, aceptores de elétrons, índice de degradação.

ABSTRACT

Great spills, responsible for great contaminations of ground and water, are decurrent of the industries. The biorremediation as treatment of areas the contaminated ones have been sufficiently studied, being indicated with economic viability. However for the treatment of areas where the soil cannot be removed, the solutions for the subsurface still are few. At this region the biorremediation is not efficient enough due to low presence of oxygen in the reactions of aerobic degradation. This study it evaluated the effect of the acceptors of electrons peroxide of hydrogen and potassium nitrate for the microbial population as promotional of biorremediation in these regions of the ground where the aerobic population is small, for the oxygen lack. An anaerobic condition was simulated to evaluate the profits of these acceptors addition. A degradation index was determined through the analysis of the chromatograms of Totals of Petroleum Hydro-carbons. The biggest degradation index was found in the soil treated with peroxide, although this conclusion was not relevant on the first months. Considering the obtained results of microbial respiration, pH and organic material, a significant difference on statistics was not found.

1. INTRODUÇÃO

A atividade industrial cresce em escala logarítmica nos dias de hoje, e este crescimento traz consigo alguns riscos, sendo os acidentes ambientais um dos mais preocupantes. Estes podem ser responsáveis por grandes contaminações de solo e água, que causam problemas sociais e de saúde pública. A indústria de petróleo, em suas diversas atividades, apresenta um risco ambiental inerente, que precisa ser constantemente gerenciado.

Hoje, com o conceito de desenvolvimento sustentável, não é aceitável a contaminação de áreas com acidentes e vazamentos. Havendo a contaminação, esta deve ser remediada e uma tecnologia bastante estudada e utilizada é o tratamento com microorganismos.

Analisando dados da indústria de petróleo, podemos dizer que muitas tecnologias são estudadas e aplicadas em escalas pequenas e somente poucas são economicamente e ambientalmente viáveis. Dentre as tecnologias viáveis está a biodegradação por microorganismos do solo. Esta técnica, onde os microorganismos reduzem ou eliminam os compostos perigosos ao meio ambiente, atua em ambientes multifásicos e heterogêneos, como os solos.

O tratamento de áreas onde a sub-superfície do solo é contaminada por acidentes ambientais é complexo e oneroso. A estimulação deste solo com reagentes capazes de disponibilizar oxigênio para promover biorremediação é uma tecnologia pouco difundida e que requer estudos.

Os microorganismos degradam os hidrocarbonetos de contaminações acidentais de petróleo, utilizando-os como fonte de energia e carbono (ATLAS & BARTHA, 1981). A biodegradação é uma linha estudada na biotecnologia que prevê a minimização ou anulação da toxicidade dos compostos de petróleo. O solo após o tratamento pode ser devolvido ao ambiente e ser cultivado.

Segundo MACEDO et alli (2001), a biorremediação é uma técnica que vem alcançando importância mundial, uma vez que o aumento da atividade industrial está degradando, cada vez mais, os ecossistemas naturais. O emprego de microrganismos conhecidos no tratamento de rejeitos potencialmente tóxicos, incluindo hidrocarbonetos de petróleo, é uma prática habitual em alguns países desenvolvidos. Os sistemas biológicos geralmente utilizados são microorganismos e

plantas. No entanto, a biodegradação com microrganismos é a opção mais freqüentemente empregada.

Na biorremediação os organismos usam as substâncias contaminadoras como alimento para seu desenvolvimento (CUTRIGHT & LEE, 1994).

O sucesso total por tratamentos de biorremediação depende de inúmeros fatores, tais como: característica do resíduo, presença de condições microbiológicas ótimas, a seleção correta da tecnologia de biorremediação, o uso de métodos analíticos apropriados para determinar o tipo e a extensão da contaminação (HUESEMANN, 1994).

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, 1983).

O presente trabalho apresenta o estudo realizado a partir da biorremediação de solo de sub-superfície contaminado com óleo diesel e o aumento de oxigenação do meio promovido pelos aceptores de elétrons nitrato de potássio e peróxido de hidrogênio.

Na revisão de bibliografia podem ser encontrados os textos referentes à contaminação do solo com petróleo e seus derivados, biorremediação do solo utilizando microorganismos inerentes à ele e o emprego de aceptores como auxiliares no tratamento de sub-superfície.

O método aplicado na pesquisa está descrito no item Materiais e Métodos que corresponde aos passos do experimento, como a coleta, o armazenamento e as análises realizadas para atingir o objetivo desta pesquisa.

Os resultados estão apresentados na forma de gráficos e tabelas comentadas.

A partir deste experimento foi possível determinar o índice de degradação, um resultado adimensional obtido a partir da área do cromatograma de cada amostra, como pode ser conferido nos resultados. Este índice reflete a taxa de biodegradação do solo através das áreas dos picos não definidos no cromatograma.

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito dos aceptores de elétrons peróxido de hidrogênio e nitrato de potássio para a população microbiana como promotores de biorremediação da sub-superfície do solo e estabelecer o índice adimensional de degradação dos solos avaliados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PETRÓLEO, UM CONTAMINANTE DO SOLO

O óleo cru corresponde à fração líquida do petróleo, cuja composição é de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, compostos sulfidrilados, oxigenados e nitrogenados, e alguns metais dissolvidos em água (OLIVEIRA, 2001 citado por MACEDO et al, 2003). De acordo com a origem do petróleo, a composição química e as propriedades físicas do óleo cru podem variar demasiadamente, e é devido a esses fatores (composição complexa e variabilidade na composição) que se encontram dificuldades para o tratamento de áreas contaminadas por tal substância (MACEDO et al., 2003).

O petróleo pode ser dividido em frações saturadas, aromáticas e polares (compostos com nitrogênio, enxofre e oxigênio). Adicionalmente, além da fração saturada, possuem frações insaturadas com ligações duplas e triplas entre os átomos de carbono (MAHAN, 1972).

As contaminações por hidrocarbonetos derivados de petróleo em solo têm sido alvo de inúmeras pesquisas e constitui um desafio para os profissionais que atuam na geotecnia, em função da complexidade dos fenômenos geoquímicos e bioquímicos que são catalisados a partir de sua inserção no subsolo (AZAMBUJA, 2000).

A suscetibilidade dos produtos de petróleo a biodegradação varia com o tipo e estrutura dos componentes (ENGLERT et al., 1993). Alcanos de cadeia ramificada, alcenos e cicloalcanos são atacados por uma limitada faixa de organismos. Compostos aromáticos são parcialmente oxidados por muitos, mas são assimilados por poucos organismos. Aromáticos polinucleares são menos tóxicos que aromáticos simples e são metabolizados por poucos organismos a baixas taxas de degradação. Cicloalcanos são bem tóxicos e a degradação inicial é geralmente acompanhada de cometabolismo. As classes mais resistentes são os poliaromáticos, substâncias alicíclicas (como os tripentacíclicos, hopanos) e os alifáticos de cadeia muito longa (ATLAS, 1981).

A contaminação do solo com petróleo cru e seus derivados tem se tornando um problema mundial. O óleo cru é física, química e biologicamente prejudicial ao solo devido aos seus compostos tóxicos, presentes em concentração elevadas. (FRANCO, et al., 2002).

Um grupo particular de contaminantes do meio ambiente que é crítica e preocupante são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH). Os PAHs, são poluentes que mais preocupam tratando-se de poluição ambiental. Esta preocupação origina-se do fato que os PAHs, são conhecidos como potentes cancerígenos. O benzo(a)pireno, o mais extensivamente PAH estudado, têm sido demonstrado que produz metabólitos cancerígenos quando agem nas enzimas do corpo. Outra preocupação crescente é a contaminação do solo por PAH, que segue para águas subterrâneas, cuja contaminação é associada a uma grande gama de locais contaminados por substâncias perigosas (HAIMANN, 1995).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, ainda são produzidos hoje por processos industriais da refinação de petróleo, produção de coque e estação de tratamento de esgotos na indústria petrolífera. (CUTRIGHT & LEE 1994).

CASARINI et al. (1988) relatam na introdução de seu trabalho que o tratamento de resíduos oleosos de petróleo está sujeito a vários mecanismos que promovem a degradação. Muitas das substâncias do petróleo são voláteis e instáveis sob condições normais. O óleo está sujeito à evaporação, fotoevaporação, adsorção, percolação e biodegradação. Citam ainda que aproximadamente 50% do carbono presente no teor de óleos e graxas de um lodo oleoso é convertido para biomassa e húmus no solo.

A seqüência de degradação de hidrocarbonetos no solo é determinada por uma sucessão de microorganismos. Microorganismos degradadores de alcanos, com rápidas taxas de crescimento, competem com os decompositores de lento crescimento de hidrocarbonetos mais recalcitrantes pelos recursos nutricionais até a exaustão dos primeiros. Estes organismos serão substituídos por micróbios com lenta taxa de crescimento, mas grande flexibilidade metabólica para degradar os hidrocarbonetos mais recalcitrantes. A relativa biodegradabilidade dos hidrocarbonetos tem sido reportada (em ordem de decréscimo de degradabilidade): alcanos lineares (C_{10} a C_{19}), gases (C_2 a C_4), alcanos (C_5 a C_9), alcanos ramificados com até 12 carbonos, alcenos (C_3 a C_{11}), alcenos ramificados, aromáticos e

cicloalcanos. A tendência é encontrar menos microorganismos com o aumento da dificuldade de degradação (HEELY et al., 1992).

3.1.1 ÓLEO DIESEL

O diesel é um combustível derivado do petróleo constituído por, predominantemente, hidrocarbonetos alifáticos contendo de 9 a 28 átomos de carbono na cadeia. Durante o processo de produção, o diesel é destilado em temperaturas na faixa de 433 a 683 K, enquanto que a gasolina destila na faixa de 353 a 393 K. O diesel contém ainda outros compostos que porventura destilam na mesma faixa de temperatura, tais como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e seus derivados alquílicos. Outra característica importante do diesel é o alto teor de enxofre, que varia de 0,1 a 0,5 (BRAUN et al., 2004).

O óleo diesel é produzido por compostos destilados de petróleo e produtos do craqueamento de gasóleo. O número de carbonos no óleo diesel está entre C8 a C26 (TPH Criteria Working Group, 1998).

3.2 BIORREMEDIAÇÃO, UMA TECNOLOGIA INTERESSANTE

Biorremediação pode ser definido como o uso de microorganismo para degradar poluentes (ATLAS & BARTHA, 1981).

A biorremediação de materiais sub-superficiais contaminados com compostos orgânicos vem sendo avaliada mundialmente como uma das técnicas mais promissoras no controle de resíduos perigosos. O processo normalmente envolve a estimulação de microorganismos presentes no sub-solo para degradar os contaminantes no próprio local, embora em alguns casos sejam utilizados microorganismos com capacidades metabólicas específicas (CORSEUIL e WEBER, 1993 *apud* CORSEUIL, 1994). CORSEUIL (1994) cita também que a meta final para biorremediação é a conversão de resíduos orgânicos em biomassa e sub-produtos inerte inócuos do metabolismo microbiano como o CO₂, CH₄ e sais orgânicos.

As técnicas de biorremediação podem ser executadas tanto *in situ* como *ex situ*. Nos processos *in situ*, a remediação biológica é feita no próprio local de

contaminação, sem a extração do meio contaminado. Já nos processos *ex situ*, o meio extraído é tratado em instalação de depuração específica, no local ou fora (*on-site* ou *off-site*) (SEABRA, 2001).

A biorremediação pode ser realizada com a adição de nutrientes e a otimização de condições ambientais do solo (pH, temperatura, umidade, etc.), chamada de bioestimulação, ou pela adição de microorganismos com a capacidade de degradar contaminantes específicos rapidamente, conhecida como bioaugmentação (SEABRA, 2001).

SKLADANY & METTING (1992) *apud* METTING (1993), afirmam que:

“Biorremediação 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 (1993) cita que embora alguns relatos tenham exagerado sobre a potencialidade da biorremediação para aliviar problemas de poluição, ela oferece uma variedade de processos que tem sido usado com bastante sucesso. Portanto, com possibilidades da aplicação da biorremediação em locais contaminados por:

- A) Derramamento de petróleo bruto e hidrocarbonetos derivados da refinação (benzeno, xileno, tolueno, diesel, etc...);
- B) Preservantes de madeira (pentaclorofenol, creosoto);
- C) Solventes diversos (acetona, butanol, etileno-glicol, cloreto de metileno);
- D) Outros (agroquímicos, T.N.T., halogeneos).

Conforme CUTRIGHT & LEE (1994) a maneira mais simples de tratamento de grandes locais contaminados é a biorremediação. Na biorremediação os organismos usam as substâncias contaminadoras como alimento para seu desenvolvimento

A biodegradação tem enormes vantagens. Em primeiro lugar, como os microorganismos estão presentes em todos os ambientes, muitas vezes, o processo pode ser realizado no próprio local, é impossível incinerar-se um solo de milhões de hectares contaminados, mas a biodegradação está em curso em todos os hectares. Em segundo lugar, é um processo que permite grande desenvolvimento:

- 1) Pela seleção de mutantes capazes de degradação mais eficiente;

- 2) Pela engenharia genética, que permite a transferência de genes, responsáveis pelas enzimas de degradação a microrganismos já ambientados no local;
- 3) Pela versatilidade nas estações de tratamento.

Finalmente seus custos são muito mais baixos que aqueles processos de incineração e, por isso, a biodegradação se torna o único método viável (LANGENBACH, 1994).

SKLADANY & METTING (1993) *apud* METTING (1993), citam que:

“Os métodos de biorremediação são classificados em duas categorias principais: os tratamentos feitos na superfície do solo em algum tipo de ambiente engenheirado e a biorremediação *in situ*. Sendo que a categoria de tratamento feito na superfície do solo utiliza-se de processos de cultivo da terra, biorreatores, lavagem do solo e compostagem, e, pode ser aplicado na biorremediação de contaminações por petróleo, carvão betuminoso, B.T.E.X., clorobenzeno, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, creosoto e T.N.T.. Já a categoria do tratamento feito *in situ*, utiliza-se de processos de manipulação de constituintes aquosos e bioventilação, podendo ser aplicado na biorremediação de contaminações por PCB's, petróleo cremoso, B.T.E.X., hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, zinco e fenol”.

CATALLO & PORTIER (1992) *apud* METTING (1993), enunciam que:

“A força geradora do processo de biorremediação é a atividade biológica capaz de promover a dextoxificação do solo contaminado, sendo muitas vezes necessário aumentar a população de microrganismos responsáveis pelas transformações específicas dos elementos poluentes”.

A biorremediação pode ser maximizada por fatores diversos, como manipulação do solo, aplicação de substratos orgânicos e nutrientes inorgânicos, e a presença de raízes. Similarmente, a presença de plantas exerce enorme efeito na biorremediação. Além do aumento na absorção e transformação de compostos orgânicos, as plantas podem acumular metais e radionucleotídeos. A hiperacumulação de metais pesados, a alteração das moléculas orgânicas

(pesticidas) e das populações microbianas rizosféricas tornam as plantas importantes componentes dos processos de biorremediação (METTING, 1993). Durante o processo de tratamento no solo, os hidrocarbonetos são convertidos pela ocorrência natural ou pelos microrganismos nativos do solo a CO₂, água, biomassa e materiais húmicos, também citados em GROVE (1978), THOMAS & WARD (1989) e DINEEN et alli (1992) que acrescentam a produção de CH₄ e sais inorgânicos.

Nas áreas de biorremediação, pretende-se manter o solo com qualidade agrícola em relação ao teor de metais após o encerramento da etapa de aplicação. Logo, a quantidade total de um resíduo a ser aplicado nas áreas de biorremediação é limitada pela quantidade de metais pesados equivalentes a ser incorporados ao solo. Esta quantidade total é disposta em várias dosagens, que são calculadas conforme a toxicidade de cada resíduo e aplicadas conforme as condições operacionais da área de biorremediação. É importante notar que, para as áreas de biorremediação, o critério de toxicidade necessita também ser observado para se evitar a esterelização da camada superficial do solo e possibilitar a manutenção da atividade de decomposição da população microbiana no solo (ALMEIDA & CARVALHO, 1995).

Uma vez atingido o limite máximo para qualquer dos metais controlados, a área de biorremediação é fechada (vedada a aplicação de mais resíduos) e monitorada quanto à biodegradação das borras aplicadas. No *landfarming*, a quantidade de resíduo a ser aplicada é determinada pelo índice de toxicidade, e desde que uma taxa desejável de atividade da camada reativa do solo esteja sendo mantida, o teor de metais só é controlado porque ele próprio pode interferir nesta atividade (ALMEIDA & CARVALHO, 1995).

De todos os processos o *landfarming*, em tratamentos de solos contaminados, é o mais intensivo. *Landfarming* considera o solo como um reator biológico. Os resíduos tratáveis são incorporados na camada reativa de aproximadamente 50 cm, onde sofrerão ataque microbiano e degradação (METTING, 1993).

3.3 O EMPREGO DE MICRORGANISMOS PARA A DEGRADAÇÃO DO PETRÓLEO E SEUS DERIVADOS

Os microrganismos são encontrados em todos os ambientes, desde o solo superficial até camadas a centenas de metros de profundidade, em regiões úmidas ou desérticas, em água doce ou salgada de qualquer profundidade, no ar, em ambientes domésticos ou industriais, em altas ou baixas temperaturas e em ambientes poluídos ou não. Assim a biodegradação pode ocorrer em toda esta gama de ambientes. Animais e plantas sobrevivem em ambientes muito mais restritos. Os microrganismos têm vias metabólicas muito diversificadas, algumas inexistentes em animais e vegetais, como a fermentação, alguns tipos de metabolismo anaeróbico, metabolismo quimioautotrófico, e o metabolismo através de isoenzimas (LANGENBACH, 1994).

WALKER et al. (1976) pesquisaram as taxas de biodegradação de componentes do petróleo e concluíram que a degradação microbiana dos componentes do óleo cru é um processo dinâmico caracterizado pela biodegradação das várias frações e diferentes taxas.

Um número considerável de microrganismos existentes no solo são capazes de degradar hidrocarbonetos provenientes de resíduos de petróleo (CONCAWE, 1980; ENGLERT et alii 1993; API, 1995). CONCAWE (1980) & DINEEN et alii (1993) citam também o estímulo da população microbiana com a adição de nutrientes que são limitantes na degradação de hidrocarbonetos do petróleo.

Os principais mecanismos de transformação biológica de compostos orgânicos são a oxidação, hidrogenação, hidrólise, hidratação, clivagem e substituição, sendo o primeiro o mais freqüente. Estas reações são catalisadas por sistemas enzimáticos existentes no solo, cuja atividade catalítica deve ser induzida pelo composto orgânico. Como metabólitos podem ser encontrados o ácido succínico, fumárico, pirúvico, acético e o acetaldeído que são facilmente utilizados pelas células (ALEXANDER, 1967).

AELION & BRADLEY (1991), embora trabalhando com aquíferos, notaram a presença de uma população microbiana, 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.

A capacidade dos microorganismos de transformar elementos metálicos e a existência de consórcio microbiano no solo capaz de transformar ou metabolizar misturas de poluentes orgânicos, cujos componentes apresentam características químicas relacionadas àquelas de precursores ou intermediários bioquímicos (alcanos, piridinas, quinonas, e hidrocarbonetos aromáticos), oferecem grande oportunidade na remediação de áreas contaminadas (McGILL et al. 1981).

Diferentes microorganismos utilizam diferentes processos metabólicos para obter energia. Heterotróficos aeróbicos empregam a respiração para oxidar compostos orgânicos como fonte de carbono e energia. Os heterotróficos são os mais importantes para degradação de contaminantes orgânicos e podem obter energia da fermentação, respiração aeróbica e anaeróbica (ALEXANDER, 1967).

KOCK (1993) *apud* LANGENBACH (1994), cita que:

“É interessante notar que, quando o ambiente é muito adverso, parece que a taxa de mutagenicidade aumenta entre os microorganismos sob intenso estresse, os microorganismos não têm mais a possibilidade de atender à grande demanda energética para realizar o reparo de seu DNA, persistindo todos os tipos de defeitos genéticos, o que aumenta a taxa de mutação. Conseqüentemente, a probabilidade de aparecimento de um mutante adaptado àquelas condições inicialmente adversas é maior, e com isso, as possibilidades de sobrevivência da população aumentam”. Com isto formam biomassas muito superiores àquelas formadas por animais ou plantas no mesmo período.

Apesar da ocorrência generalizada de microorganismos capazes de degradar compostos orgânicos, existem fatores limitantes da biorremediação, devendo a biotratabilidade (refere-se a medida do potencial de efetividade da biorremediação) do resíduo ou do solo ser avaliada (METTING, 1993).

A população microbiana da camada reativa de solo é resultado da seleção e aclimação de microorganismos capazes de degradar os resíduos adicionados e seus subprodutos de ressíntese e intermediários resultantes da degradação (população ativa), e de microorganismos que convivem neste ecossistema sem necessariamente estarem envolvidos diretamente na degradação (população

associada). Conforme as condições do solo (aeração, pH, temperatura, salinidade, atividade aquosa, nutrientes, presença de compostos tóxicos, etc.), pode haver variações na relação população ativa e população associada e, também na biomassa microbiana de camada reativa do solo (ALMEIDA & CARVALHO, 1995).

A taxa de decomposição de compostos orgânicos depende da própria composição química e dos fatores do solo como a textura, infiltração e permeabilidade, capacidade de retenção da água, densidade, conteúdo de matéria orgânica, capacidade de troca de cátions, conteúdo de macronutrientes, salinidade e micronutrientes (ATLAS, 1981).

HARRIS (1976), CONCAWE (1980) e SKLADANY & METTING (1993), citam a existência de microrganismos do solo capazes de degradar hidrocarbonetos e, particularmente, o segundo autor, cita que, a população de microrganismos do solo pode tornar-se especializada na degradação de hidrocarbonetos, quando estes são adicionados ao solo.

DOBSON & WILSON (1964) trabalharam com amostras de solo impregnadas de óleo e não impregnadas. O número de microrganismos nas amostras eram tão variáveis que somente um fato era evidente: as bactérias aeróbicas eram mais numerosas que as anaeróbicas. Os solos impregnados de óleo com estrutura que sofreram distúrbio apresentaram consumo de O_2 bem maior que solos livres de óleo e do que solos com óleo e que não sofreram distúrbio. O maior consumo de O_2 para amostras que sofreram distúrbio foi atribuído a uma melhor aeração devido à mistura, que também proporciona uma distribuição mais uniforme dos microrganismos do solo. Os dados indicaram que existem microrganismos do solo capazes de atacar não somente petróleo cru, mas também frações mais refinadas.

Além das características do solo e do resíduo aplicado, fatores ambientais afetam a comunidade microbiana e sua ação sobre os hidrocarbonetos aplicados no solo. MARSHALL & DEVINNY (1988) trabalharam com o ecossistema microbiano em um sistema de tratamento de resíduos do petróleo aplicados no solo e notaram que em estações frias a quantidade, a diversidade e a atividade eram menores tanto para bactérias quanto para fungos. O contrário ocorreu em estações quentes como também demonstrado por BORDONADO & HUERTAS (1982). De maneira geral, a atividade das espécies pode dobrar para cada aumento de 10^0C na temperatura até

que o nível ótimo para um microrganismo particular seja alcançado (STEWART & WEBBER, 1976).

O maior estímulo para estudar o crescimento microbiano sobre hidrocarbonetos de petróleo é devido a possibilidade de usar hidrocarbonetos como nutrientes para a produção de proteína celular e o uso de microrganismos para o tratamento da poluição com hidrocarbonetos (ROSEMBERG, 1993). O mesmo autor cita que um típico solo contém cerca de 10^4 a 10^6 microrganismos que degradam hidrocarbonetos por grama. Isto representa aproximadamente 1 % da população microbiana, sendo que estes valores são mais altos em meios poluídos com óleo.

Os organismos decompositores do petróleo estão presentes nos solos e a efetividade deles na degradação de hidrocarbonetos depende da multiplicação dos mesmos (ODU, 1972). SONG & BARTHA (1990) demonstraram que hidrocarbonetos podem ser rapidamente degradados quando aplicados a uma superfície de solo aerada, previamente exposta aos hidrocarbonetos.

JOBSON et al. (1974) trabalharam com a adição de óleo, de fertilizantes e de bactérias inoculadas em um solo, montando os tratamentos de forma isolada ou combinada. Notaram aumentos significativos 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.

Além dos PAHs, BARTHA & BOSSERT(1984) observaram que em muitos casos, níveis altos de hidrocarbonetos maiores que 10 % são associados com vários efeitos inibitórios sobre os micróbios do solo. Estes autores constataram que a evolução de CO_2 de resíduo oleoso petroquímico aplicado no solo aumentou quase linearmente entre 0,1 e 5 % de hidrocarbonetos, havendo pequeno aumento com a adição de 10 % de hidrocarbonetos. É bem sabido que muitos alcanos policíclicos e aromáticos, resinas e asfaltenos, são extremamente resistentes a atividade microbiana, constituindo formas estáveis da matéria orgânica do solo.

Quando é utilizada a população autótone do solo, os microrganismos contidos, em sua maioria, na camada superior (camada reativa do solo até 25 cm de profundidade), após um período de aclimatação, passam a consumir como substrato, a matéria orgânica presente no resíduo, transformando as cadeias carbônicas em compostos mais simples (basicamente, gás carbônico, água, ácidos carboxílicos de cadeias carbônicas curtas que lhes dão características de solubilidade em água, e compostos vários de ressíntese) (METTING, 1993).

BOSSERT et alli (1984) estudaram o destino dos hidrocarbonetos durante a disposição de lodo oleoso no solo. Concluíram que a aplicação de lodo oleoso é rapidamente seguida por um aumento na atividade de biodegradação dos hidrocarbonetos e que a mineralização é o mecanismo predominante durante a fase ativa do processo de *landfarming*. Durante o período de encerramento, a mineralização declina fortemente, mas a remoção de hidrocarbonetos continua a taxas relativamente altas por processos de humidificação.

CANSFIELD et alli (1978) trabalharam com resíduos de hidrocarbonetos proveniente de tanques de armazenamento de óleo cru incorporados ao solo. O conteúdo de óleo no solo após a contaminação era 1,45 %. Foram analisadas as frações saturadas, monoaromáticas, diaromáticas, poliaromáticas e compostos polares e material de alto peso molecular, tais como asfaltenos. No final do experimento a degradação destas frações era respectivamente: 54,6 %, 50,0 %, 57,1 %, 44,4 % e 11,1 %, mostrando que a degradação de frações mais pesadas se processam com mais morosidade.

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 alli (1991) demonstraram que a dispersão física aumenta a disponibilidade dos resíduos oleosos orgânicos estabilizados para a biodegradação pelos organismos do solo.

DIEHL (1997) trabalhou com solos contaminados com PCP(pentaclorofenol) e TPH(totais de hidrocarbonetos de petróleo), sendo os mesmos submetidos a vários tratamentos entre eles a adição de esterco de galinha, e esterco de galinha e microrganismos juntos. Não encontrou diferenças na degradação para estes dois tratamentos (esterco de galinha com e sem microrganismos) e os valores de

degradação de pentaclorofenol e hidrocarbonetos de petróleo para estes mesmos tratamentos foram os mais altos de todo o experimento. Aos 60 dias, as células tratadas com esterco tiveram um decréscimo de 87 % de PCP e 75 % de TPH, ao invés do controle que obteve 16 % de redução do PCP e 28 % de redução do TPH. Aos 360 dias, as células tratadas com esterco tiveram redução de 97 % de PCP e 93 % de TPH e o controle teve 91 % de redução de PCP e 79 % para TPH. As células onde não houve a adição de esterco demoraram 250 dias a mais para atingir o mesmo nível de degradação do PCP do que em células em que houve a adição de esterco.

A degradação de compostos poluentes com estruturas químicas não relacionadas aos substratos típicos, como hidrocarbonetos clorados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e PCB's (bifenil policlorado), requer aclimação e adaptação das populações existentes no solo (BOLLAG et al., 1994).

A aclimação é o tempo conhecido como fase *lag* durante o qual os microorganismos indígenas, ou autóctones, adquirem a habilidade para degradar novos compostos e a adaptação é a modificação das características dos organismos para facilitar e aumentar a habilidade para sobreviver e reproduzir em um meio particular (HERBES e SCHWALL, 1978).

SIMON et al. (1999) não notaram diferenças nas taxas de degradação de PAH's entre solo controle e tratamento com bioaugmentação devido ao desenvolvimento de uma população aclimatada aos hidrocarbonetos de petróleo em um sítio com histórico de exposição pelo produto. MUELLER et al. (1999) obtiveram um rápido decréscimo na toxicidade, associado com um rápido decréscimo nos níveis de óleo sugerindo que a recuperação intrínseca do sítio foi devido à aclimação da população de microorganismos que degradam petróleo. GHAEMGHAMI et al. (1998) trabalharam com solos contaminados com solventes e notaram que as taxas de mineralização são mais elevadas nas primeiras semanas de incubação, sugerindo a existência de uma comunidade adaptada a biodegradação e também a existência de compostos mais facilmente degradados.

AL-AWADHI et al. (1996) estudaram a biorremediação de solos contaminados com óleo do Kuwait. Estudaram o efeito da fertilização, irrigação e inoculação sobre a degradação do óleo. Confirmaram que a adição dos solos contaminados com bactérias que utilizam hidrocarbonetos, resultam após três

meses de tratamento, num aparente efeito positivo sobre a biodegradação do óleo. No entanto, este efeito positivo da inoculação não foi verificado após seis meses de tratamento quando comparado com a biodegradação em solos não inoculados. Este fato pode ser atribuído à capacidade de adaptação dos microorganismos autóctones.

HEELY et al. (1992) notaram decréscimos nas taxas de biodegradação em solos contaminados com óleo combustível, sugerindo que os componentes solúveis e mais facilmente degradados eram preferencialmente escolhidos. Citam ainda que o decréscimo observado na produção de CO₂ é de responsabilidade quase que total da atividade biológica.

3.4 ACEPTORES DE ELÉTRONS NA BIORREMEDIAÇÃO ANÓXICA

Um grande número de compostos orgânicos, incluindo o tolueno, são rapidamente degradados sob condições aeróbicas onde o oxigênio serve como aceptor de elétron durante a biodegradação (MESTER, 1995). No entanto, em muitos sítios contaminados a difusão de oxigênio dentro dos solos é insuficiente para manter os níveis necessários da atividade aeróbica para a efetiva remediação. Na ausência de oxigênio, a biodegradação pode ocorrer numa variedade de meios anaeróbicos que incluem a desnitrificação, redutores de sulfato, metanogênicos, redutores do ferro (ALEXANDER, 1999).

A biorremediação *in situ* considera a importância da criação de uma biomassa que degrada o contaminante em solos de superfície. Injeções de doadores e aceptores de elétron tem sido sugerido como um método para distribuir a biomassa com mais efetividade (PEYTON, 1996).

CHAYABUTRA & JU (2000) propuseram uma estratégia para a biorremediação seqüencial de hidrocarbonetos. Citam que existe uma necessidade inicial do oxigênio para o início da biorremediação e que os metabólitos podem então ser degradados sob condições anaeróbicas quando suplementados com aceptores alternativos de elétron e altamente solúveis em água.

BALL & REINHARD (1996) também concluíram que o excesso de utilização de aceptores é uma importante observação já que o requerimento total de acceptor de elétron pode ser muitas vezes maior que a estequiometria teórica.

Em estudos de biorremediação de áreas contaminadas por derramamentos de gasolina um dos fatores limitantes na transformação dos contaminantes é a disponibilidade do receptor terminal de elétrons (BARKER et al., 1987 *apud* CORSEUIL, 1994)

3.4.1 UTILIZAÇÃO DE NITRATO COMO ACCEPTOR DE ELÉTRONS

A desnitrificação é uma opção atrativa para a biorremediação *in situ* de solos. Bactérias desnitrificantes são presentes nos solos e geralmente exibem extensa capacidade metabólica. Nitrato (NO_3^-) é um ânion altamente solúvel em água, que dispersa rapidamente em solos úmidos e serve como acceptor de elétron para biodegradação. Durante a biodegradação do contaminante, o nitrato é reduzido através de uma série de passos para nitrito, óxido nítrico e então gás dinitrogênio, com a oxidação concomitante do substrato carbonado (ALEXANDER, 1999) .

O nitrato tem sido investigado e indicado para ser uma fonte efetiva de energia para a degradação dos hidrocarbonetos aromáticos (DOLFING *et al.*, 1990). O seu uso é conveniente porque o nitrato é altamente solúvel em água e portanto pode ser facilmente misturado com a pluma (CORSEUIL, 1994)

BALL & REINHARD (1996) estudaram a biotransformação anaeróbica de muitos hidrocarbonetos aromáticos encontrados na gasolina, incluindo benzeno, tolueno, etilbenzeno, m-xileno, p-xileno e o-xileno (BTEX) em experimentos anaeróbicos de bancada em laboratório. Foram utilizados os aceptores de elétrons sulfato e nitrato e foram definidos vários meios anaeróbicos para estimar as taxas de biodegradação e para sugerir as condições sob as quais a biorremediação anaeróbica poderia aumentar. A adição de nitrato estimulou as condições redutoras de nitrato e incrementou as taxas de biotransformação do tolueno anaeróbica de BTEX.

BREGNARD et al. (1997), estudaram um aquífero contaminado com óleo diesel pela adição de O_2 , NO_3^- , PO_4 e NH_4 através de poços de infiltração. Os

autores trabalharam com a concentração de KNO_3 de 1.020M ou 103 mg/L. Foram incubadas amostras deste material por 470 dias em meios aeróbicos e anaeróbicos. Em meios aeróbicos, todos os alcanos isoprenóides foram biodegradados na presença de nitrogênio. Em meios anaeróbicos com KNO_3 , o nitrato foi consumido e carbono inorgânico foi produzido e os alcanos isoprenóides foram parcialmente metabolizados. Em muitos meios a taxa de consumo de nitrato foi estimulada pela adição externa de substratos tais como tolueno, o-xileno, m-xileno, p-xileno, n-alcanos ou ácidos graxos. A mineralização de tolueno, naftaleno e hexadecano para CO_2 sob condições de desnitrificação foi confirmada pelo uso de substratos marcados (carbono marcado).

CORSEUIL & MARIS (1997) fizeram um estudo sobre a biorremediação em contaminações de solo e água com gasolina e citam que:

“A biodegradação dos compostos BTEX pode ser representada por uma reação química onde os hidrocarbonetos, em presença de um aceptor de elétrons, nutrientes e microorganismos são transformados em água, dióxido de carbono, e mais microorganismos. Os aceptores de elétrons, compostos que recebem elétrons e são portanto reduzidos, são principalmente o oxigênio, nitrato, ferro férrico e sulfato.”

BARBARO e BARKER avaliaram a biotransformação dos hidrocarbonetos aromáticos solúveis (BTEX, naftaleno e isômeros de trimetilbenzeno) com nitrato e oxigênio como aceptores de elétrons, utilizando doses sucessivas de gasolina como contaminante.

CHAYABUTRA & JU (2000) concluíram que sob condições microaeróbicas a taxa de desnitrificação decresceu com a redução da concentração do oxigênio dissolvido, implicando que as reações que requerem oxigênio são limitantes para a continuidade da biodegradação.

A taxa de degradação dos hidrocarbonetos monoaromáticos em condições anóxicas (onde o receptor de elétrons é o nitrato) é muito mais lenta que em condições aeróbicas (DOLFING et al.,1990).

3.4.2 UTILIZAÇÃO DE PERÓXIDO COMO ACCEPTOR DE ELÉTRONS

O peróxido de hidrogênio é usado como fonte de oxigênio para aumentar a biorremediação de meios com superfícies contaminadas e como um oxidante em sistemas engenheirados (MILLER & VALENTINI, 2000).

BARENSCHEE et al. (1991) compararam a efetividade do peróxido de hidrogênio e nitrato como aceptores de elétron para a bioremediação *in situ* de hidrocarbonetos de petróleo em um sítio com contaminação de 3,8 mg/L de óleo diesel. A extração do solo com solvente ao final do experimento indicou que 68,8% dos hidrocarbonetos tinham sido biodegradados na coluna de peróxido comparado com 7,8% na coluna de nitrato. Usando um balanço de massa aproximado, a razão do acceptor de elétron utilizado com o hidrocarboneto degradado (massa/massa) era 5,7 para H₂O₂ e 4,7 para NO₃.

FOGEL et al. (1989) usaram peróxido para avaliar por 10 meses o decréscimo no teor de TPH em uma área contaminada. Durante os primeiros seis meses a média de TPH era 15 ppm. O nível caiu para 0,1 ppm no sétimo mês e abaixo dos limites de detecção ao fim do experimento.

O peróxido de hidrogênio pode ser usado em concentrações que variam de 100 a 500 mg/L de acordo com o tipo de solo, utilizando-se de doses maiores para solos arenosos. Concentrações acima de 1200 a 2000 mg/L são consideradas tóxicas (COOKSON, 1995). A toxicidade pode ser minimizada aplicando-se doses reduzidas de peróxido, possivelmente 50 mg/L, e então aplicar de modo gradativo até atingir doses mais elevadas em torno de 1000 mg/l (ALEXANDER, 1999). API (1995) cita quantidades de uso de peróxido em torno de 100 mg/L (30%).

BARKER et al. (1987) *apud* CORSEUIL(1994), descreve que o oxigênio tem sido usado como receptor de elétrons na maioria dos locais contaminados. Mas, SPAIN et al. (1989) *apud* CORSEUIL(1994), cita que a solubilidade do oxigênio na água dificulta a sua transferência. Maiores concentrações podem ser obtidas com o uso de oxigênio puro ou peróxido de oxigênio, mas o uso destes compostos pode causar problemas de colmatação próximos ao poço de injeção em função do rápido crescimento microbiano e da oxidação de ferro e manganês.

3.5 MONITORAMENTO

3.5.1 RESPIRAÇÃO DO SOLO

A respiração da comunidade do solo tem sido usada como um indicador da atividade biológica no perfil do solo e nos dá uma melhor estimativa da relativa atividade microbiana entre solos do que a contagem de populações (SOPPER, 1993).

O parâmetro respiração do solo é de fácil determinação e apresenta correlação com a atividade microbiana do solo tendo sido amplamente utilizado para estudos relativos à biomassa microbiana e à biodegradação, inclusive para resíduos petroquímicos (BROWN *et al*, 1991; MIELNICZUK, 1991).

A biodegradação dos resíduos pode ser medida indiretamente através da respirometria da camada reativa do solo, que tem valor prático, principalmente para avaliação da atividade de degradação em um determinado momento, fornecendo dados que refletem a biodegradação de todas as frações que estiverem sendo metabolizadas (não somente o óleo, mas também os demais componentes do resíduo e das frações transformadas) (ALMEIDA & CARVALHO, 1995).

WATTS *et al.* (1982), trabalhando com aplicação de resíduos oleosos no solo, medindo a atividade microbiana pela evolução do CO₂, encontraram índices de respiração 6 vezes maior em sítios que tiveram a aplicação de resíduo oleoso em comparação com aqueles sem aplicação.

SWANNEL *et al.* (1997) trabalharam com a avaliação em campo da biorremediação de óleo cru. Os resultados do trabalho mostraram claramente que as medidas da evolução do CO₂, feitas *in situ*, podem ser usadas como orientação acurada que permitam o sucesso da biorremediação no campo.

McGILL *et al.* (1981) relatam o incremento da atividade respiratória e do número de bactérias (adaptadas na degradação de hidrocarbonetos) quando da adição de óleo ao solo. Neste mesmo experimento, notaram subsequente declínio na respiração após alguns dias de incubação, devido a completa decomposição de frações mais lábeis ou à disponibilidade limitada de nutrientes, como nitrogênio e fósforo.

3.5.2 HIDROCARBONETOS TOTAIS DE PETRÓLEO

Os hidrocarbonetos são compostos constituídos apenas por hidrogênio e carbono (RUSSELL, 1994). Os termos hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) são usados para descrever uma grande família de várias centenas de compostos químicos originados do refino do petróleo cru (PATNAIK, 1996).

Entre os compostos deste grupo estão os aromáticos e poliaromáticos assim como também muitos outros derivados de petróleo (RUSSELL, 1994).

Os hidrocarbonetos de petróleo são poluentes hidrofóbicos e tendem a ficar fortemente retidos na matriz do solo, diminuindo assim sua disponibilidade à remediação (RAIMUNDO & RIZZO, 2000).

Para o diagnóstico das contaminações, as investigações têm sido conduzidas por métodos diretos e indiretos de prospecção, ou seja, pela execução de uma malha de sondagens mecânicas e coleta de amostras para análise geoquímica ou por métodos geofísicos. Pelas técnicas diretas, há a possibilidade de avaliação pela análise em amostras de solo ou de água. Os parâmetros comumente utilizados para a análise de solos são o TPH (hidrocarbonetos totais de petróleo) e as colunas de BTEX (benzeno, tolueno, xileno e etilbenzeno), estes em virtude da maior toxicidade (AZAMBUJA, 2000).

A análise de TPH pode ser feita por cromatógrafo gasoso, infravermelho e gravimetria. O resultado apresenta um único valor que indica a quantidade de compostos de petróleo. O método gasoso (GC) é o método preferido pois detecta uma larga escala de hidrocarbonetos, com maior sensibilidade e seletividade. Sua principal vantagem é fornecer a informação do tipo de petróleo, além da quantidade (TPH Criteria Working Group, 1998).

O método de GC pode ser amplamente utilizado para tipos diferentes de liberações de petróleo mas são os mais apropriados para detectar hidrocarbonetos apolares com números de carbono entre o C6 e C25 (TPH Criteria Working Group, 1998).

A cromatografia é uma técnica que separa os componentes de uma mistura, através de uma combinação de fatores que incluem o ponto de ebulição e

polaridade. O tempo onde uma coluna gasta em uma coluna específica é chamado de tempo de retenção (TPH Criteria Working Group, 1998).

3.5.3 MATÉRIA ORGÂNICA

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 e enzimáticas e ressíntese (ALEXANDER, 1967)

O acúmulo de certas substâncias concentra-se sobretudo na matéria orgânica do solo como os sedimentos, plantas, algas e animais (LAGENBACH, 1994).

3.5.4 POTENCIAL DE HIDROGÊNIO

No processo de biorremediação, é necessário que o pH seja compatível com os microrganismos. Bactérias desenvolvem-se com um pH ótimo entre 5 e 9, enquanto que os fungos que degradam compostos complexos tem o pH ótimo de 5 ou menos (SKALADANY & METTING, 1992).

Muitas espécies de fungos desenvolvem-se em grandes intervalos de pH, desde o extremo de 9 até 3 a 4. Mas pelo fato das bactérias e actinomicetos dominarem em solo de pH próximo ao neutro, os fungos geralmente dominam as áreas com baixo pH (ALEXANDER, 1980).

3.5.5 UMIDADE

A presença da água é fundamental para a comunidade microbiana. Entretanto a presença de oxigênio é o maior limitante para microrganismos aeróbios. A falta de oxigênio é causada principalmente pelo excesso de água no solo (SKLADANY & METTING, 1993).

Um teor de água anormal no solo pode levar a uma queda na atividade da população microbiana da camada reativa do solo. Esta queda na atividade é devida

a alterações na população microbiana de forma qualitativa e quantitativa (ALMEIDA & CARVALHO, 1995).

Na condição de inundação, a população microbiana aeróbia se reduz, incentivando o desenvolvimento de microrganismos anaeróbios ou resistentes aos baixos níveis de oxigênio. A quantidade ótima de umidade para a população microbiana está em torno de 50 a 60% da capacidade de retenção de umidade do solo (ALEXANDER, 1980).

O principal problema do encharcamento do solo é a mudança de um ambiente aeróbico para outro anaeróbico. Em condição de anaerobiose, o metabolismo é drasticamente reduzido devido à própria falta de oxigênio e/ou a produção, nesta condição, de toxinas de origem microbiológica. Além disso, a mudança do sistema aeróbico para anaeróbico, normalmente acarreta alterações na relação número de células de fungos por números de células de bactérias, geralmente prejudicando o processo de biodegradação (ALMEIDA & CARVALHO, 1995).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCALIZAÇÃO

No dia 14 de setembro de 2004 ocorreu, no município de Mafra, Estado de Santa Catarina, um acidente com o trem da empresa ALL-Delara (América Latina Logística). No local houve um vazamento de 20.000L de contaminantes, em maior quantidade de óleo diesel.

O solo encontrado na região do município de Mafra é do tipo PO74- Podzólico Bruno-Acinzentado álico Ta A moderado, textura argilosa e moderadamente bem drenado. A cobertura florestal é subtropical perenifólia, o relevo é suave a ondulado (EMBRAPA,2005).

O solo em estudo foi coletado em 31 de janeiro de 2005. As amostras foram retiradas de uma área de várzea onde houve a maior concentração dos contaminantes. Foram coletados em torno de 200kg de solo úmido. O solo foi homogeneizado, seco ao ar e peneirado em peneira Granutest de malha de 2mm. Foram separadas 6 amostras de 10kg cada para receberem o tratamento.

4.2 TRATAMENTOS

O solo contaminado recebeu diferentes tratamentos, conforme descritos na **Tabela 1** a seguir:

TABELA 1: “Solo com os tratamentos”

Amostra	Tratamento
SCA+I	Solo contaminado com inóculo
SCA+I+N	Solo contaminado com inóculo e nitrato de potássio
SCA+I+P	Solo contaminado com inóculo e peróxido de hidrogênio

Como testemunha, parte da amostra foi esterilizada com medicamentos antibactericida e antifúngico. A amostra esterilizada recebeu os mesmos tratamentos, como está citado abaixo na **Tabela 2**.

TABELA 2: “Solo testemunha com os tratamentos”

Amostra	Tratamento
SCA+I+B+F	Solo contaminado com inóculo esterilizado
SCA+I+N+B+F	Solo contaminado com inóculo e nitrato de potássio esterilizado
SCA+I+P+B+F	Solo contaminado com inóculo e peróxido de hidrogênio esterilizado

O inóculo seco foi obtido através de amostras das células do *landfarming* da RPBC-Refinaria Presidente Bernardes, Cubatão-SP, seca ao ar e peneirada em peneira Granutest de malha de 2mm.

A capacidade de campo do solo, determinada em laboratório, é de 37,1%. Após determinar a capacidade de campo do solo foi calculada a quantidade de solução a ser aplicada nos tratamentos. A umidade foi mantida em torno de 75% da capacidade de campo. Na aplicação inicial as concentrações das soluções utilizadas foram de 100ppm para o Nitrato e 200ppm para o Peróxido. Para os esterilizantes, a concentração utilizada foi de 1% em peso para o cicloheximida e 5% em peso para a estreptomicina. Na **Tabela 3** abaixo estão descritas as doses aplicadas. O cálculo das doses está apresentado no ANEXO I.

Em todas as amostras, de 10kg cada, foi aplicado 1,5% do inóculo seco e peneirado. As amostras foram então umidificadas e as doses de reagentes foram aplicadas. Todo solo foi homogeneizado e as amostras foram mantidas em local fechado sem oxigenação e sem iluminação em caixas fechadas, para simular condições anaeróbicas da sub-superfície do solo.

Semanalmente foi aplicado a mesma dose de reagentes em quantidades de água suficiente para manter a umidade.

TABELA 3: “Doses aplicadas nos solos tratados”

	SCA- I	SCA- IN	SCA- IP	SCA- IAB	SCA- INAB	SCA- IPAB
INÓCULO (g)	150	150	150	150	150	150
ÁGUA (L)	2,78	2,78	2,78	2,78	2,78	2,78
NITRATO (mL)	-	0,13	-	-	0,13	-
PERÓXIDO (mL)	-	-	1,59	-	-	1,59
CICLOHEXIMIDA (g)	-	-	-	1	1	1
ESTREPTOMICINA (g)	-	-	-	5	5	5

Para avaliar a biorremediação do solo tratado foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Respiração do solo - JENKINSON e POWLSON (1974) adaptado por CARVALHO (1983);
- TPH – Total de hidrocarbonetos de petróleo - metodologia EPA 3550 e 3550B;
- pH - metodologia REPAR PL-6360-024 (1996);
- Matéria Orgânica Total – metodologia REPAR PL-6360-0033 (1997);

A cada 28 dias era retirada uma alíquota de cada amostra para a realização do monitoramento. A respiração do solo foi medida por 6 meses, sendo seis amostragens com a quantificação da respiração de cada amostra por 4 semanas. As análises de pH e cinzas foram realizada por seis meses, com seis amostragens e a análise de TPH foi realizada no primeiro, terceiro e sexto mês.

4.3 MÉTODOS DE ANÁLISES

4.3.1 Amostragem

O solo foi amostrado isolando-se trincheiras de 0,50x0,50m e profundidade de 40 cm da camada reativa do solo. As amostras de solo foram armazenadas em sacos plásticos de 5 litros e etiquetados. Todo solo foi homogeneizado, seco ao ar a peneirado em peneira Granutest de malha de 2mm. Após este preparo, as alíquotas receberam tratamento.

4.3.2 pH

A determinação do potencial de hidrogênio através da dissociação dos íons em solução de acordo com o método de ensaio PL-6360-024 (1996).

O solo após estar seco ao ar foi triturado e peneirado entre as peneiras de 2mm (9 mesh) e 1mm (16 mesh). Pesou-se 20g deste solo em balança de precisão em recipientes plásticos, em duplicata. Foi adicionado 50mL de água deionizada em um dos copos e 50mL de solução de CaCl_2 0,01Mol/L no outro. Agitou-se a mistura e as amostras ficaram em repouso por 1hora. Enquanto isso o pHmetro foi ligado e ficou em repouso por no mínimo 30min para atingir equilíbrio.

O equipamento de leitura de pH, o pHmetro, foi tarado com as soluções de pH 4.0 e 7.0. A leitura foi feita em seguida e o resultado é indicado no visor analógico do aparelho.

4.3.3 Matéria Orgânica Total

A determinação da degradação através da matéria orgânica total foi realizada de acordo com o método de ensaio PL-6360-033 (1997).

O solo após estar seco ao ar foi triturado e peneirado em peneira de 0,5mm (32 mesh). Pesou-se 2g deste solo em balança de precisão em cadinhos tarados. Os cadinhos foram colocados em mufla a 800°C por duas horas.

O resultado foi obtido através do cálculo da massa volatilizada.

4.3.4 Respiração do solo

O método utilizado para determinação da respiração do solo consiste da microdestilação do CO₂ com NaOH 0,5 N.

O CO₂ atmosférico (branco) é capturado em frascos utilizados na incubação, inserindo-se dentro dos mesmos, tubos com hidróxido de sódio 0,5 N ausente de solo nos frascos.

Pesou-se uma massa conhecida da mistura (solo + tratamento) em vidro âmbar *Merck* de 1L. Introduziu-se no interior de vidro um tubo de ensaio com 5mL de solução de NaOH 0,5 N. Após 7 dias foi feita a titulação do NaOH residual com H₂SO₄ 0,025 N, conforme metodologia de CARVALHO et al. (1994a e b), ALMEIDA e CARVALHO (1994a e b) e PETROBRAS (1997b). Este solo foi reincubado, ou seja, reintroduziu-se o tubo de ensaio com a solução por mais três vezes a cada 7 dias, totalizando 28 dias de respiração desta mistura.

Os resultados são apresentados em mg de CO₂/100 g de solo x 7 dias.

4.3.5 TPH – Total de hidrocarbonetos de petróleo

Pesou-se 1,00g de solo úmido e com sulfato de sódio anidro ativado a amostra foi desidratada. A extração foi realizada com diclorometano em aparelho de ultrassom por cinco minutos em temperatura ambiente. O extrato foi reduzido a 1mL e a leitura feita em cromatógrafo gasoso, com coluna delgada.

O resultado é apresentado em µg de TPH/g de solo seco.

4.3.5.1 Determinação da área de compostos não definidos

A área entre a linha de base e o início dos picos representa os compostos em degradação. Para a determinação desta área foi utilizado o método da massa da área: a área de cada cromatograma foi recortada e pesada.

4.3.5.2 Cálculo do índice referente aos compostos não definidos

O índice de área foi calculado a partir do peso da área do solo contaminado sem tratamento no tempo 0, cujo índice foi considerado igual a 1. Os outros índices foram obtidos pela divisão das massas das áreas dos solos com tratamentos nos tempo 1, 3 e 6 pelo peso daquele considerado como índice 1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O solo foi inicialmente caracterizado através da análise de fertilidade, conforme **Tabela 4** abaixo. O solo utilizado no experimento exalava odor característico de degradação do diesel. A umidificação do solo apresentou dificuldade devido ao alto teor de contaminantes oleosos.

TABELA 4: “Análise de fertilidade do solo avaliado”

pH		Al ⁺³	H ⁺ + Al ⁺³	Ca ⁺²	Mg ⁺²	K ⁺	SB	T
CaCl ₂	SMP	cmol/dm ³						
3,80	5,20	2,60	9,00	0,90	0,80	0,15	1,85	10,85
P	S	C	V	m	Ca/Mg	Argila	N	
mg/dm ³		g/dm ³		%		g/kg		
3,70	-	16,0	17	58	1,1	400,0	-	

Com a quantidade de água adicionada, ou seja 75% da capacidade de campo, o solo ficou aparentemente encharcado. Isto permaneceu por todo o tempo do experimento.



FIGURA 1: “Acondicionamento do Solo do Experimento”

O pH do solo foi analisado todos os meses e os teores estão apresentados nas **Tabelas 5 e 6** abaixo.

TABELA 5: “Teores de pH em água”

TRATAMENTO	AMOSTRAGEM					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
SCA I	4,80	4,72	5,07	4,94	5,08	4,50
SCA N	4,89	4,80	5,10	5,07	5,06	5,01
SCA P	4,87	4,74	4,85	4,97	4,97	5,03
SCA I BF	4,68	4,58	4,73	5,62	4,88	4,99
SCA N BF	4,72	4,63	4,82	4,92	4,99	4,82
SCA P BF	4,61	4,48	4,76	4,72	4,76	5,12

TABELA 6: “Teores de pH em cloreto de cálcio”

AMOSTRAGEM						
TRATAMENTO	T1	T2	T3	T4	T5	T6
SCA I	4,75	4,00	4,83	4,51	4,41	4,50
SCA N	4,60	4,06	4,88	4,52	4,49	5,01
SCA P	4,42	4,08	4,57	4,47	4,50	5,03
SCA I BF	4,44	4,08	4,51	5,35	4,42	4,99
SCA N BF	4,66	4,02	4,70	4,63	4,54	4,82
SCA P BF	4,48	4,04	4,52	4,51	4,48	5,12

Pode ser observado um decréscimo na acidez do solo. O solo contaminado areia no tempo T0 apresentou pH em água de 4,40 e em cloreto de cálcio de 4,01. Todas a amostras obtiveram este ganho, porém nas amostras sem esterilização o ganho foi maior.

O pH manteve-se entre 4 e 5, faixa muito boa para o crescimento tanto de fungos quanto de bactérias, como citado por SKALADANY & MEETING, 1992. O solo esteve sob ótimas condições de pH para o desenvolvimento de ambos.

TABELA 7: “Teores de matéria orgânica total”

AMOSTRAGEM			
TRATAMENTO	T1	T3	T6
SCA I	7,2463	7,5128	7,7110
SCA N	7,2717	7,6539	8,0126
SCA P	7,5446	7,8452	8,1266
SCA I BF	7,5738	7,9033	8,5058
SCA N BF	7,1253	7,6186	7,7803
SCA P BF	7,4785	7,5243	7,6644

A matéria orgânica total do solo reflete a contaminação de hidrocarbonetos. O teor de matéria orgânica total, que aumentou em todas as amostras, pode ser observado na **Tabela 7**. O teor de matéria orgânica do solo contaminado areia no tempo T_0 é de 7,5622.

A **Tabela 8** abaixo apresenta a taxa de respiração do solo contaminado no tempo inicial do experimento, sem tratamento.

TABELA 8: “Respiração do solo contaminado sem tratamento no tempo inicial”

	SCA SEM TRATAMENTO			
	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS	28 DIAS
TEMPO INICIAL	163,34	84,05	66,30	-

A respiração do solo, medida através da liberação de CO_2 , no tempo inicial apresentou taxas mais altas que os tratamentos. Isto se deve ao fato de que a contaminação do solo ocorreu 4 meses antes do início do tratamento e provavelmente os microorganismos indígenas já estavam aclimatados, como pode ser observado também por AL-AWADHI (1996). HARRIS (1976) cita que a população de microorganismos do solo pode tornar-se especializada na degradação de hidrocarbonetos, conforme descrito anteriormente.

Um fator observado no período foi a de baixas temperaturas, em média de $10^\circ C$. Segundo alguns autores, a temperatura baixa é um fator evidente na redução da respiração microbiana, com citado anteriormente por MARSHALL & DEVINNY (1988) e BORDONADO & HUERTAS (1982). As amostras foram coletadas no verão e o experimento foi realizado no outono e inverno. Este foi provavelmente um fator negativo no experimento.

Na **Figura 2** estão apresentados as respirações do solo tratado com inóculo nas seis amostragens seqüenciais (tempos de 1 a 6).

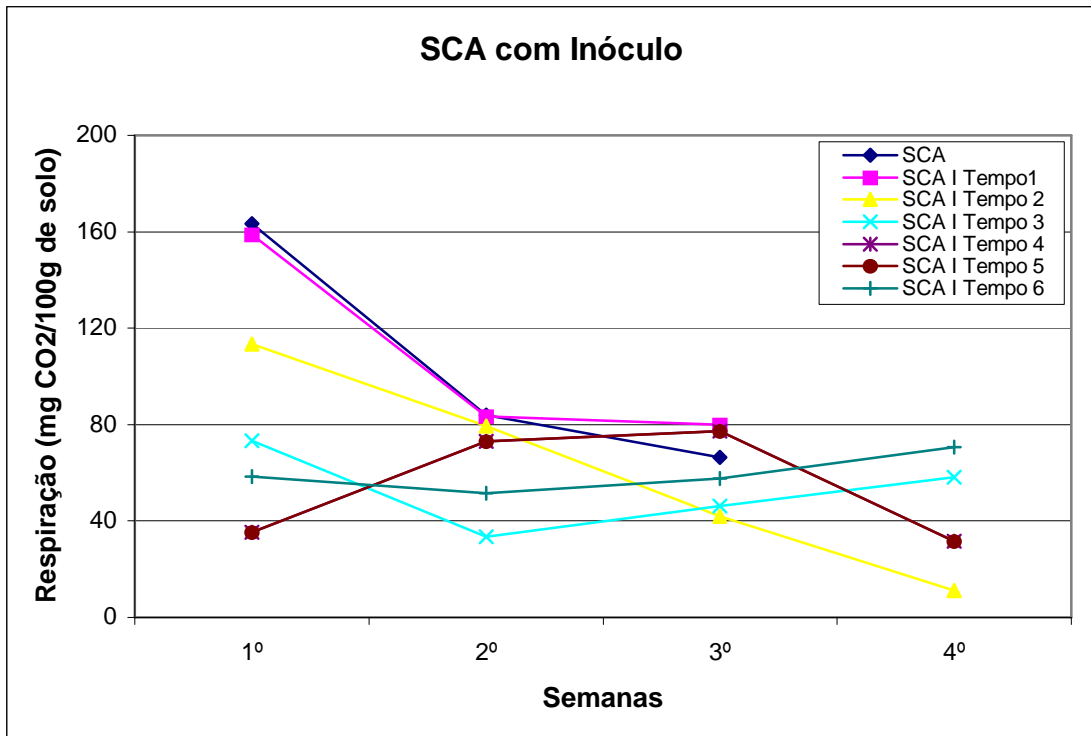


FIGURA 2: “Respiração do solo contaminado com inóculo”

Os valores de respiração do solo diminuíram ao longo do período do experimento. Este comportamento foi observado em todas os seis tratamentos. Para ambos os tratamentos, a característica da curva de respiração é muito próxima, com queda nas taxas de respiração na segunda amostragem, quando as amostras ficaram sob condições de anaerobiose.

Houve a promoção do crescimento dos microorganismos anaeróbios no tratamento, simulando as condições de sub-superfície e a população microbiana anaeróbia é muito menor se comparada à população aeróbia, como citado anteriormente por DOBSON & WILSON (1964).

Outro fator importante é a hipótese de que as frações com maior biodisponibilidade já haviam sido degradadas por microorganismos indígenas, onde HELLY et. al. (1992) também observou em seu trabalho.

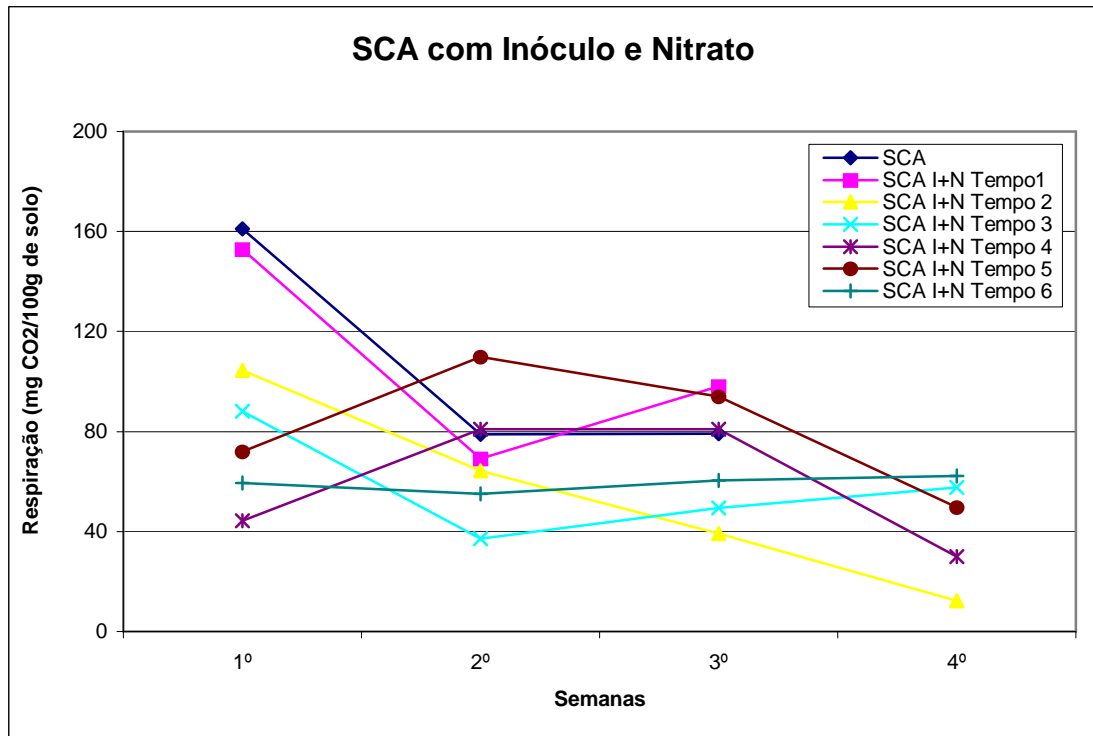


FIGURA 3: “Respiração do solo contaminado com inóculo e nitrato”

Como pode ser verificado na **Figura 3** a respiração do solo contaminado tratado com inóculo e nitrato de potássio também decresceu ao longo do experimento.

As amostras ficaram em condições anaeróbias. A análise de respiração do solo era realizada logo após a aplicação da solução. Isto explica porque a respiração na primeira semana, em geral, é maior.

A falta de oxigênio nas reações de biorremediação é um fator impeditivo, como CHAYABUTRA & JU(2000) observaram em seu experimento. A concentração de nitrato utilizada foi uma dose intermediária, conforme citado na revisão bibliográfica, e que não disponibilizou a quantidade suficiente de oxigênio nas reações químicas.

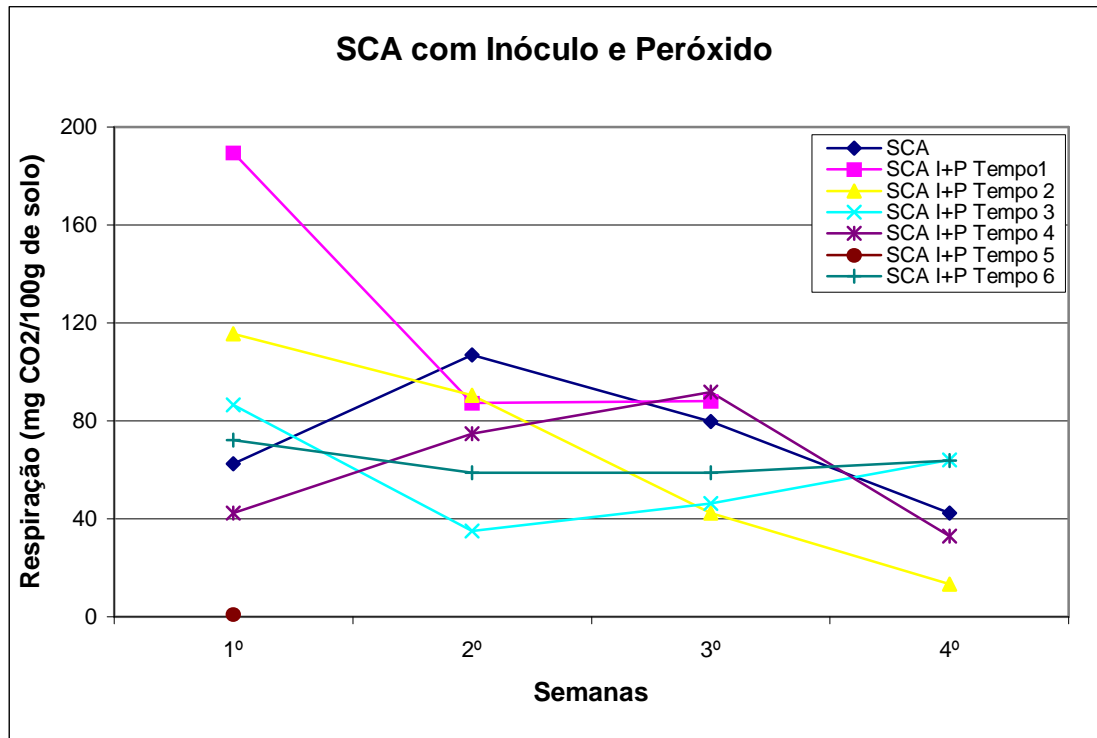


FIGURA 4: "Respiração do solo contaminado com inóculo e peróxido"

Na respiração do solo contaminado tratado com inóculo e peróxido também foi observado uma maior liberação de CO_2 na primeira semana, como pode ser visto na **Figura 4**.

As doses aplicadas de peróxido com concentrações de 200ppm estavam abaixo dos níveis de concentração, citados para solos arenosos, necessária para as reações de oxidação do material orgânico. O solo em estudo é arenoso, onde COOKSON (1995) já indicava em seu trabalho uma maior necessidade de reagente.

A esterilização do solo com estreptomicina e cicloheximida não foi eficiente. As amostras esterilizadas apresentaram níveis de respiração microbiana equivalentes às amostras de solo sem esterilização. A esterilização foi realizada com o intuito de comparar a oxidação química somente e a degradação combinada dos microorganismos com os aceptores de eletros. Vários autores, como CORSEUIL(1994) e FOGEL et al.(1989), estudaram somente a degradação combinada.

Nas **Figuras 5, 6 e 7** estão apresentados os resultados de respiração das três amostras de solo esterilizado após receber os seguintes tratamentos: inóculo, inóculo e nitrato de potássio, inóculo e peróxido de hidrogênio.

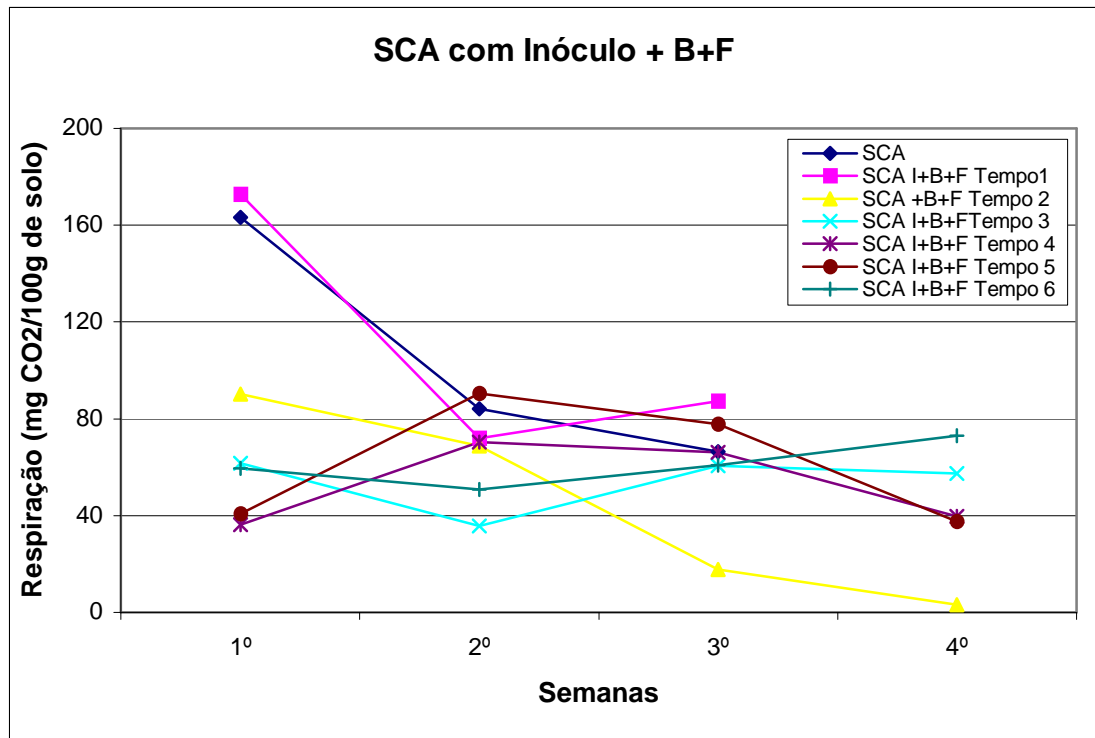


FIGURA 5: “Respiração do solo contaminado com inóculo com bactericida e antimicótico”

Ao analisarmos os gráficos de respiração dos solos que foram tratados com doses de esterilizantes, observa-se que houveram taxas elevadas de respiração, o que caracteriza que a quantidade aplicada não foi suficiente para esterilizar totalmente o solo.

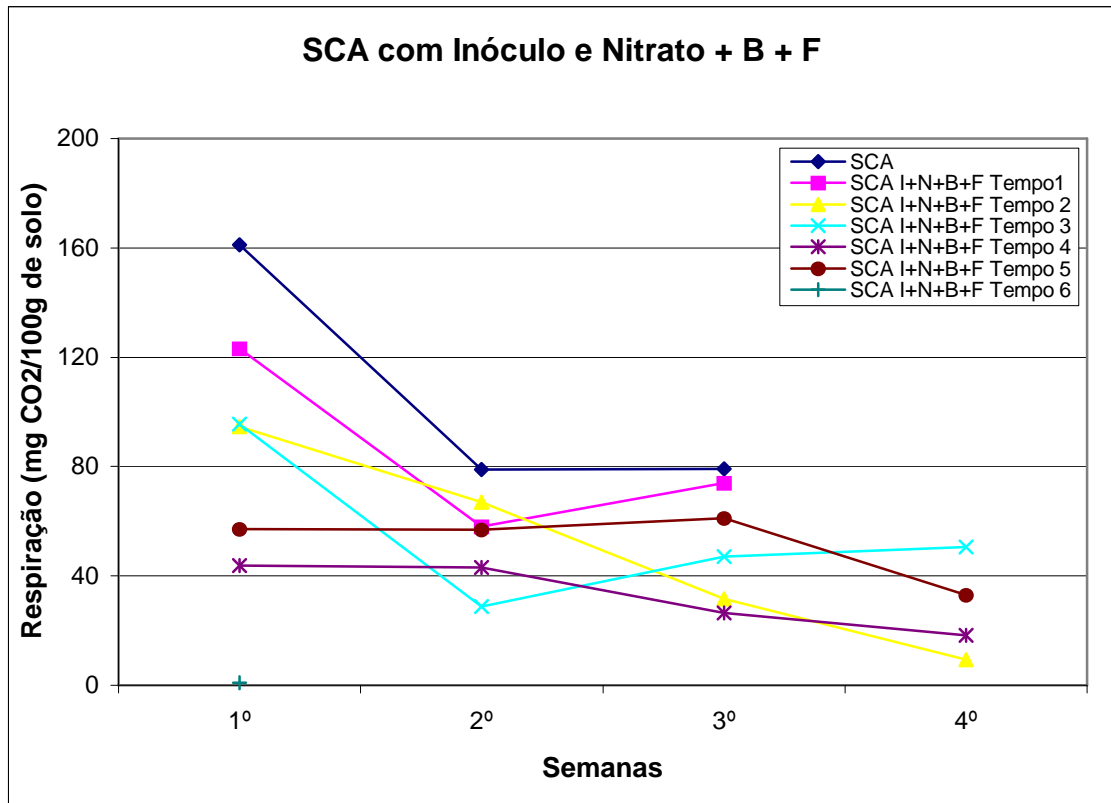


FIGURA 6: “Respiração do solo contaminado com inóculo, nitrato, bactericida e antimicótico”

As curvas de respiração microbiana dos solos com tratamento com peróxido e nitrato com antibactericida e antifúngico tiveram características muito próximas ao solo sem esterilizante, como aconteceu com o solo tratado somente com inóculo.

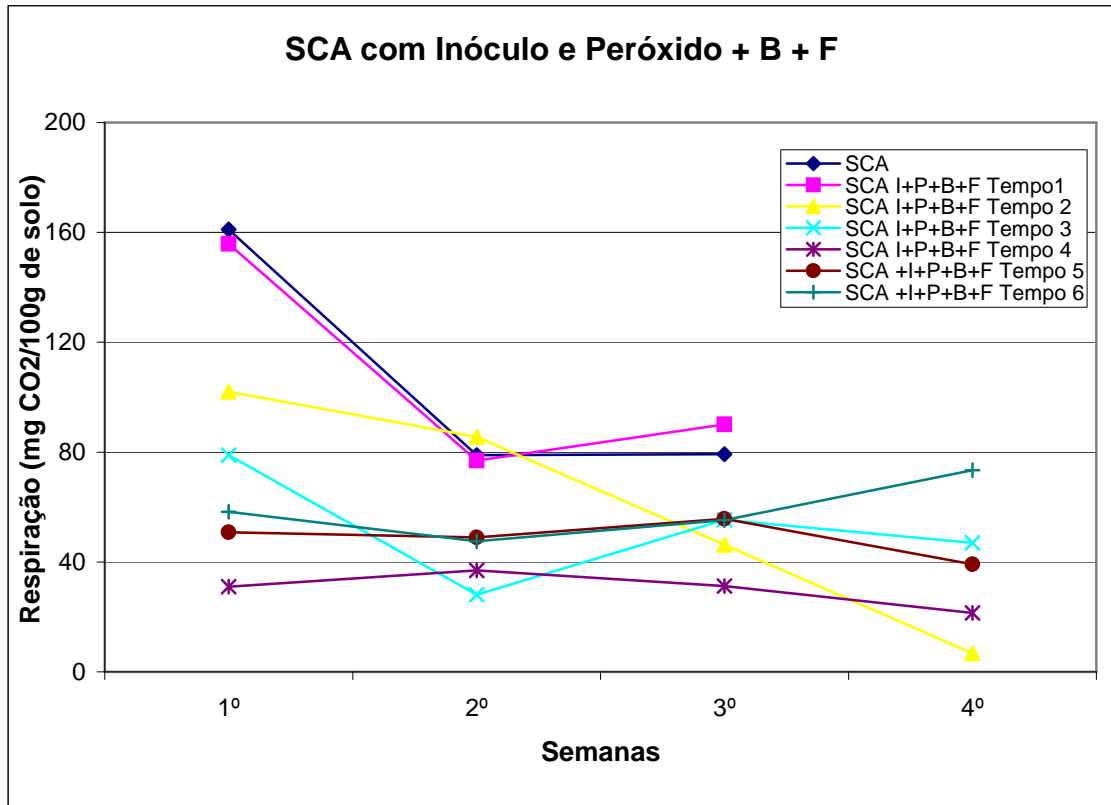


FIGURA 7: “Respiração do solo contaminado com inóculo, peróxido, bactericida e antimicótico”

Na **Figura 8**, apresentado abaixo, estão plotados os teores de respiração das seis amostras nos seis meses de monitoramento.

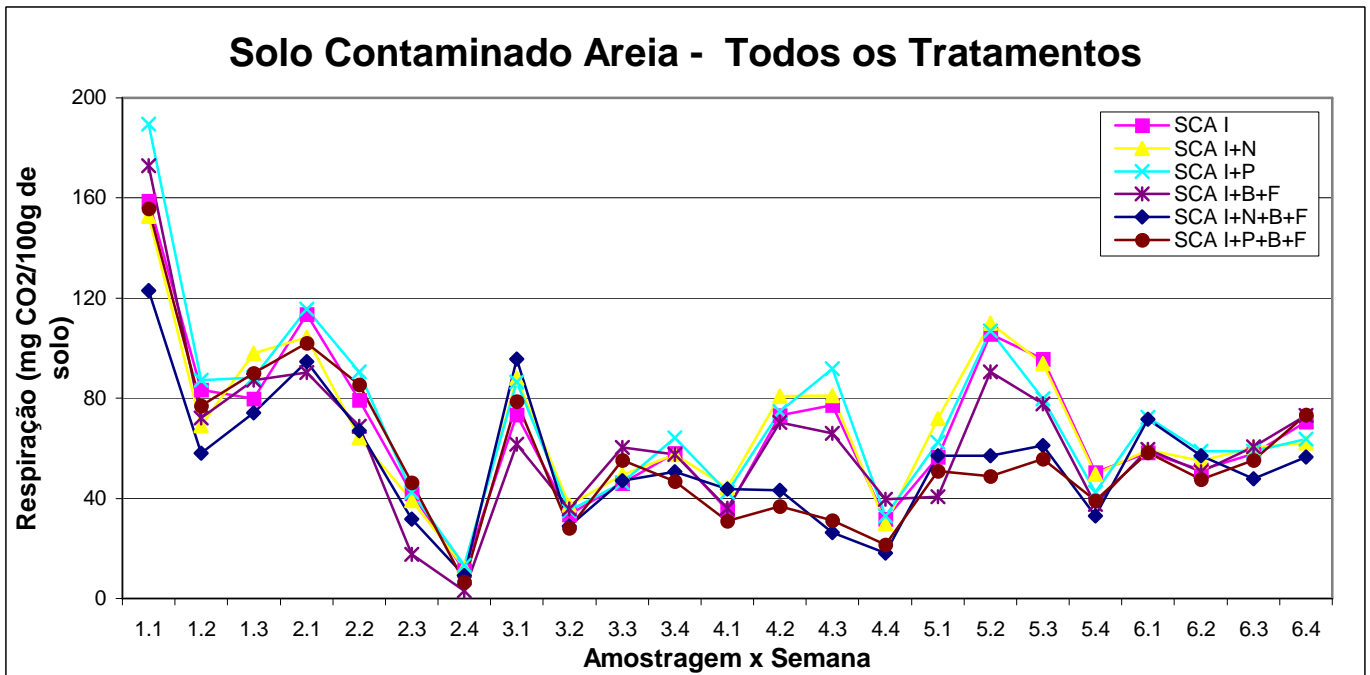


FIGURA 8: “Respiração do solo contaminado com os seis tratamentos”

Nota-se que a respiração microbiana decresce em ambas as amostras em torno de 50% desde a primeira semana até a última semana e comprova porque que a degradação anaeróbica é mais lenta que a aeróbica.

HEELY et. al.(1992) também cita no seu trabalho que a taxa de microorganismos diminui com o aumento da dificuldade de degradação, como citado anteriormente.

Nas **Figuras 9, 10 e 11** as respirações foram separadas da figura anterior por tipos de tratamento: inóculo, inóculo e nitrato, inóculo e peróxido; relacionando as amostras com e sem esterilização.

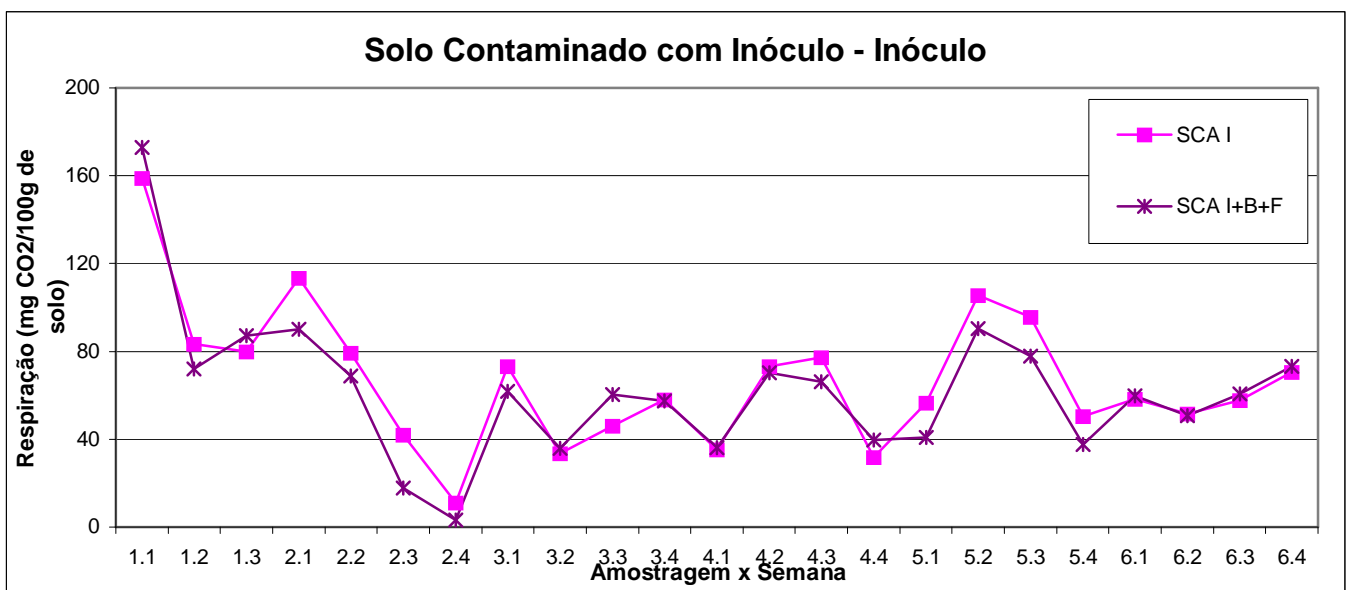


FIGURA 9: “Respiração do solo contaminado com os tratamentos com inóculo: solo + inóculo e solo + inóculo + bactericida e antimicótico”

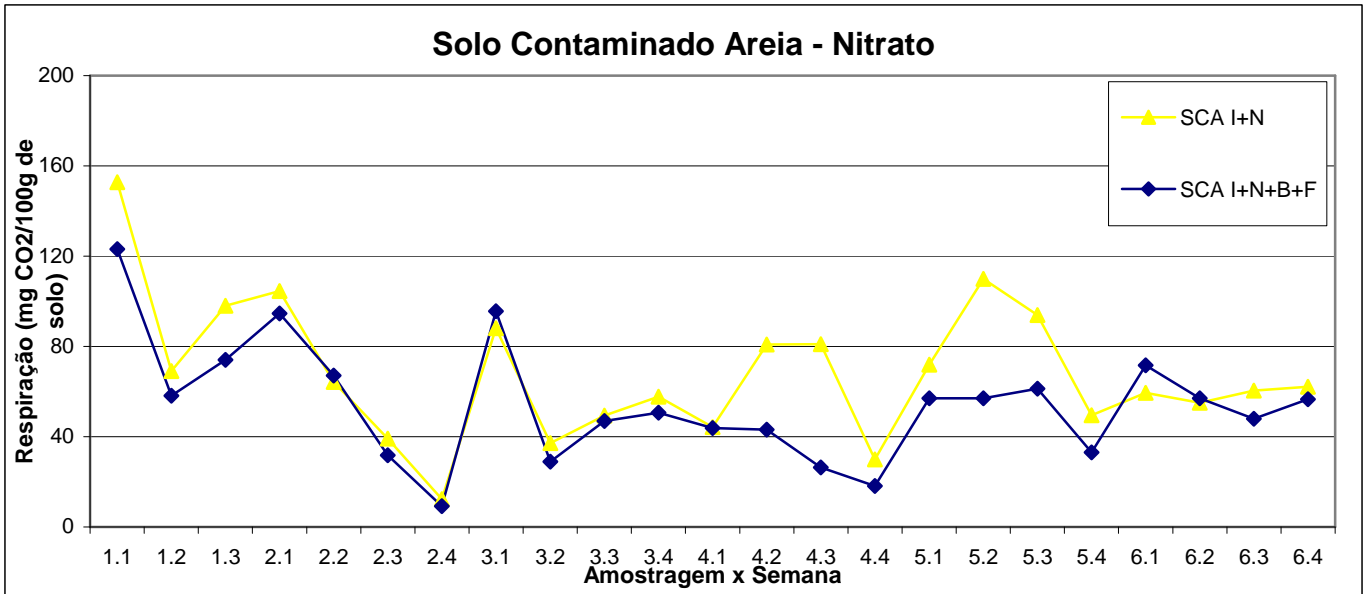


FIGURA 10: “Respiração do solo contaminado com os tratamentos com inóculo e nitrato: solo + inóculo + nitrato e solo + inóculo + nitrato + bactericida e antimicótico”

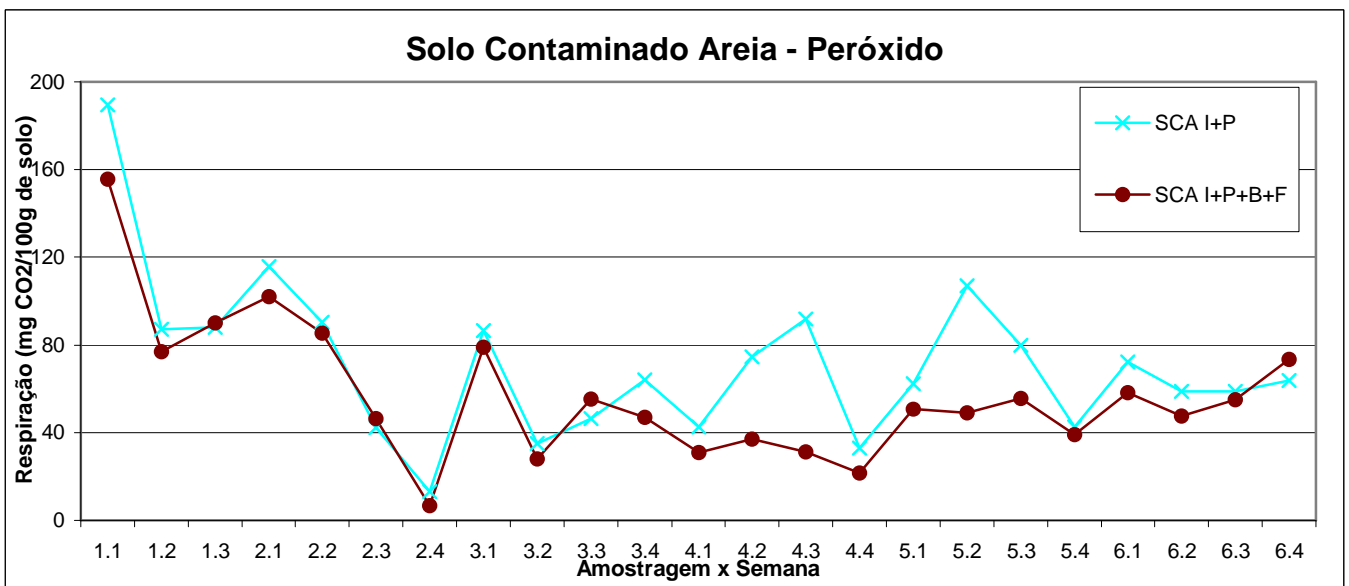


FIGURA 11: “Respiração do solo contaminado com os tratamentos com inóculo: solo + inóculo + peróxido e solo + inóculo + peróxido + bactericida e antimicótico”

Há uma queda muito pequena na respiração do solo com esterilizante e não pode ser considerada com algo representativo. Somente nos meses 4 e 5 houve uma resposta maior dos microorganismos nos solos sem esterilização.

A respiração das amostras de solo analisadas foram separadas por semana de análise, como pode ser observado nas **Figuras 12, 13, 14 e 15** a seguir.

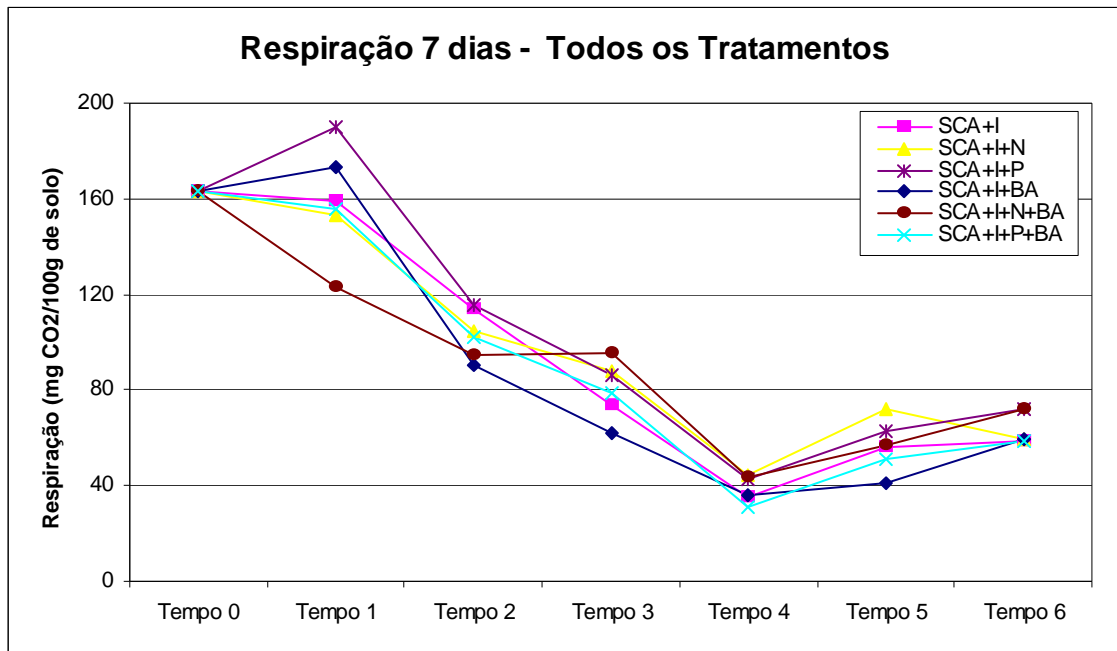


FIGURA 12: “Respiração do solo contaminado com os seis tratamentos na primeira semana”

O comportamento das curvas de respiração por semanas, ou seja, a primeira semana, a segunda semana, a terceira e a quarta semana de cada uma das seis amostragens, foi bastante semelhante.

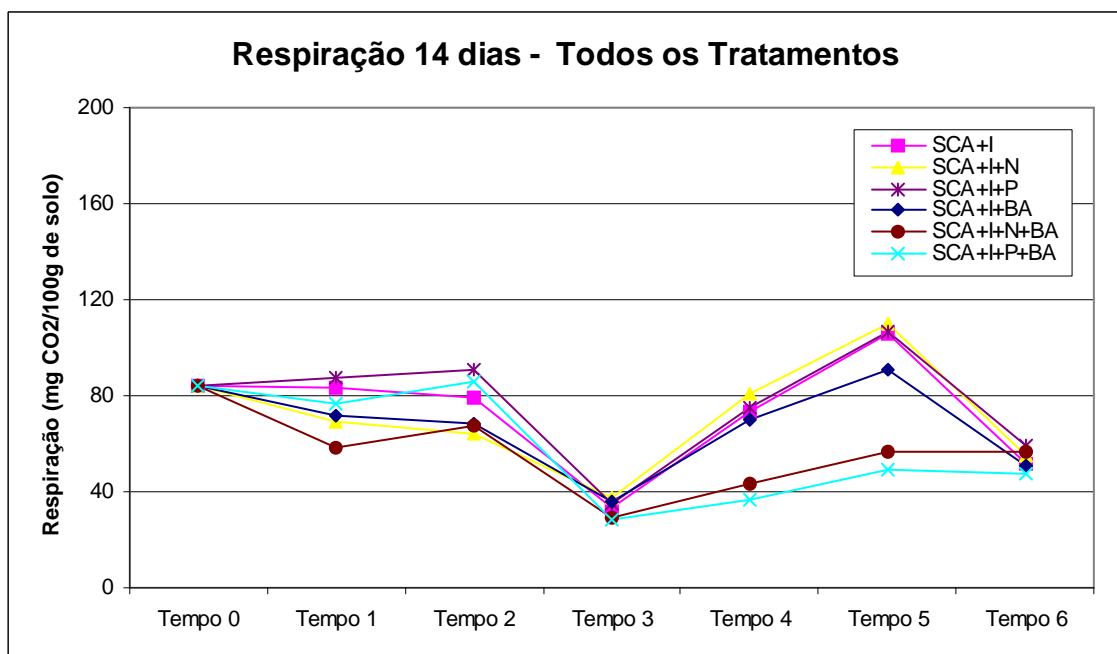


FIGURA 13: “Respiração do solo contaminado com os seis tratamentos na segunda semana”

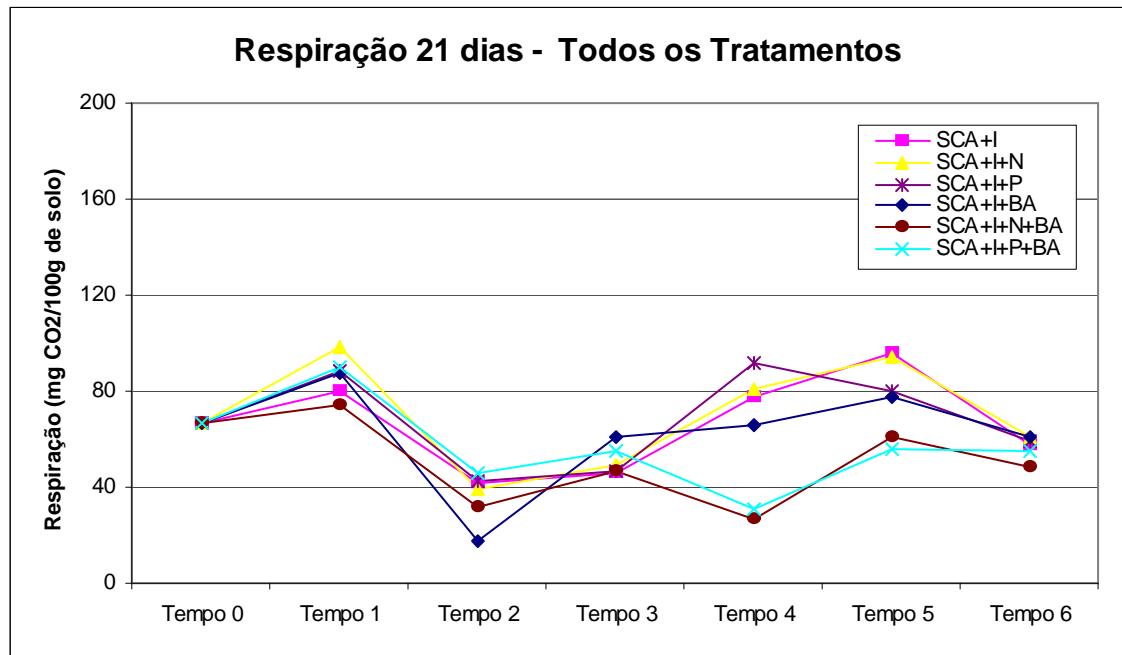


FIGURA 14: “Respiração do solo contaminado com os seis tratamentos na terceira semana”

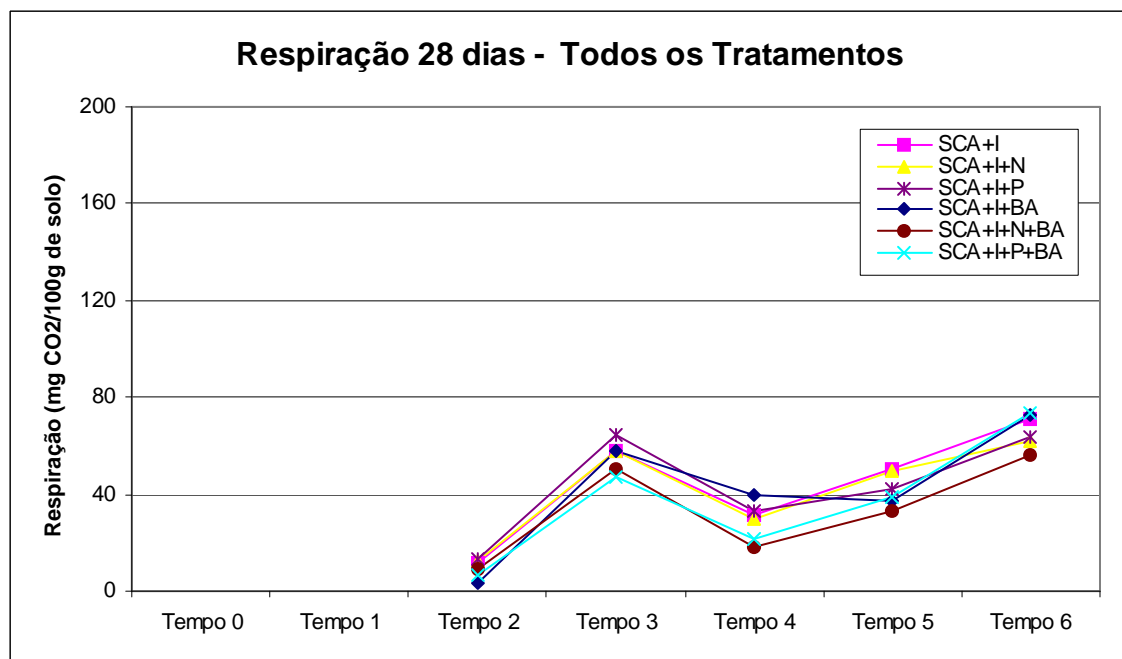


FIGURA 15: “Respiração do solo contaminado com os seis tratamentos na quarta semana”

Na primeira semana a liberação de CO_2 foi maior em todas as amostras, como já foi citado anteriormente.

No tempo quatro e cinco, ou seja no quarto e quinto mês de amostragem, os solos tratados com inóculo, nitrato e peróxido tiveram maiores taxas de respiração

se comparados com os solos esterilizados, como é observado em vários gráficos apresentados anteriormente.

Os valores de respiração do solo estão apresentados no ANEXO I.

As concentrações de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo estão apresentadas na **Tabela 9**.

TABELA 9: "Teores de THP no solo"

THP (MG/KG)	T0	T1	T3	T6
SCA	5300	-	-	2372
SCA I	-	4882	4604	5566
SCA N	-	4352	2932	4861
SCA P	-	2636	4269	4463
SCA I BF	-	2149	3699	4807
SCA N BF	-	3695	3142	4113
SCA P BF	-	6016	4420	4500

O solo contaminado areia, que ficou exposto à oxigenação e luz e não recebeu tratamento nenhum, teve sua concentração bastante reduzida após os seis meses do experimento. Para as outras amostras, que receberam tratamento e ficaram em caixas fechadas isoladas de ventilação e iluminação, a concentração aumentou.

As amostras dos tempos três e seis apresentaram coloração mais clara, característica das moléculas menores.

Nas figuras 16 a 34 estão apresentados os perfis cromatográficos de todas as amostras analisadas.

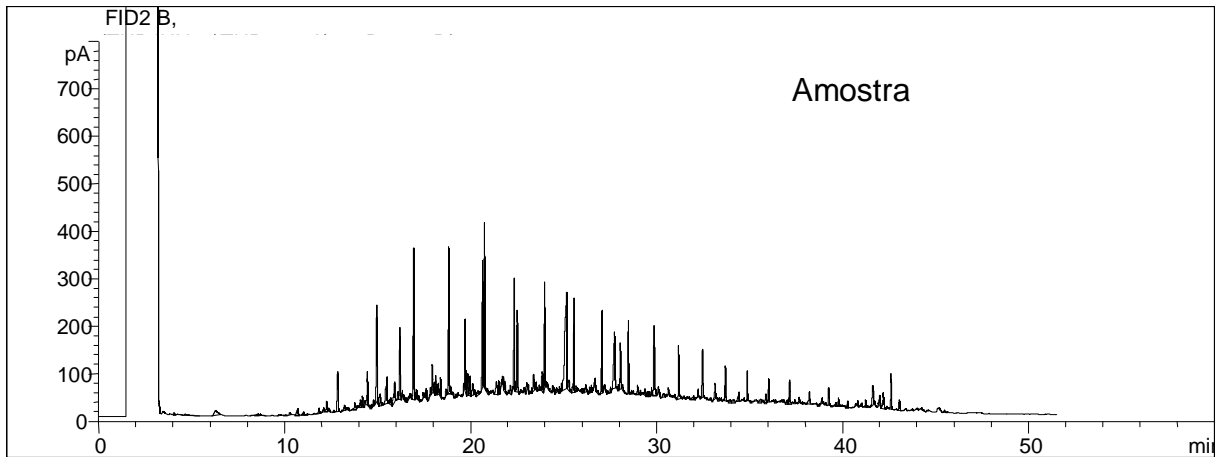


FIGURA 16: “Perfil cromatográfico do solo contaminado areia no tempo inicial”

A amostra inicial apresentou um perfil mais homogêneo, com base mais definida. As amostras que receberam tratamento apresentaram picos com bases heterogêneas, caracterizando a degradação dos compostos de hidrocarbonetos presentes no solo.

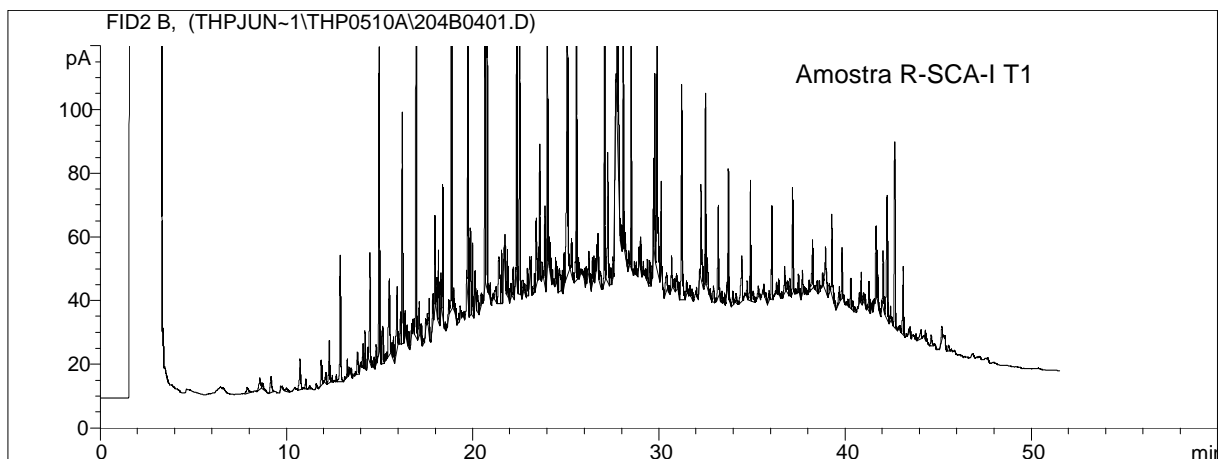


FIGURA 17: “Perfil cromatográfico do solo contaminado areia com inóculo no tempo 1”

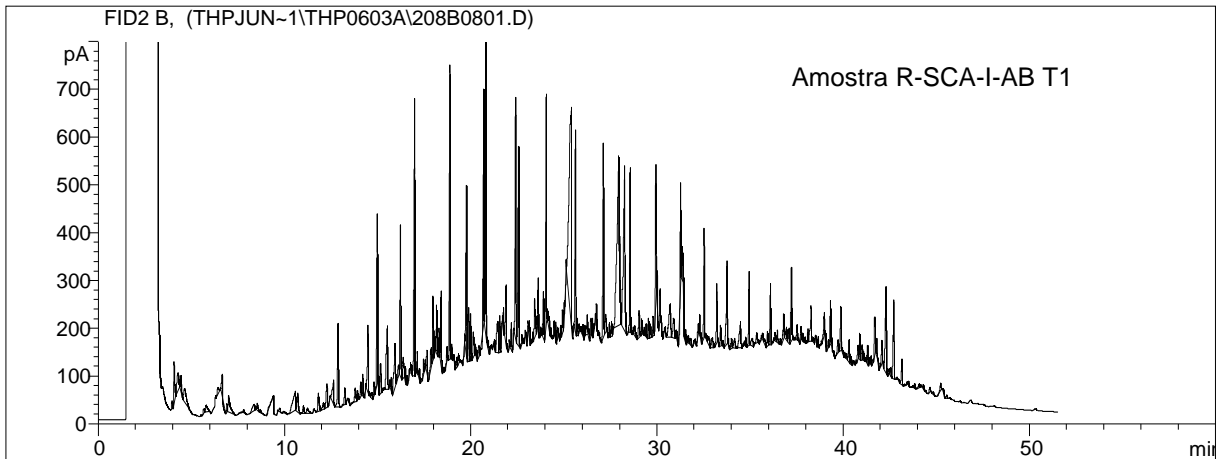


FIGURA 18: “Perfil cromatográfico do solo contaminado areia com inóculo, bactericida e antimicótico no tempo 1”

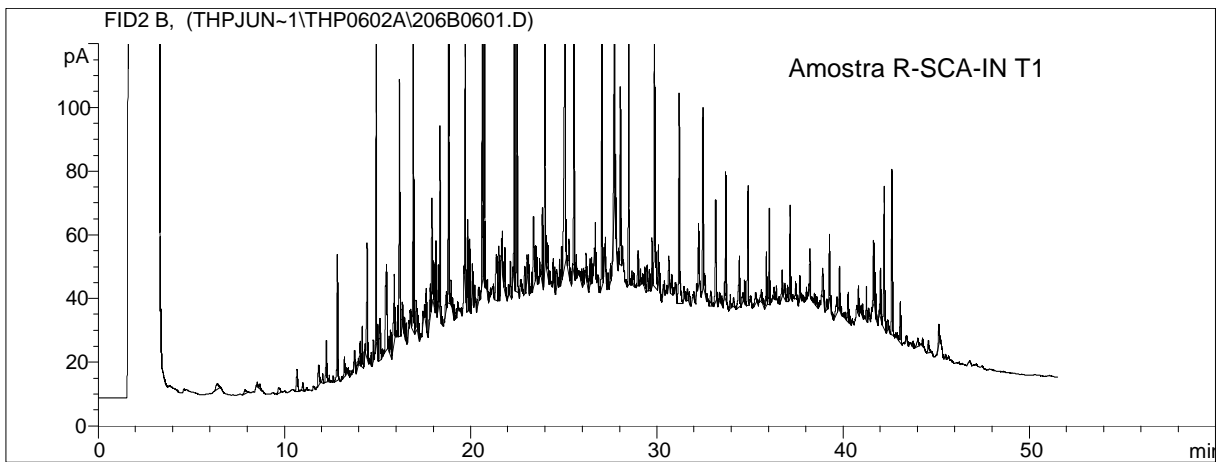


FIGURA 19: “Perfil cromatográfico do solo contaminado areia com inóculo e nitrato no tempo 1”

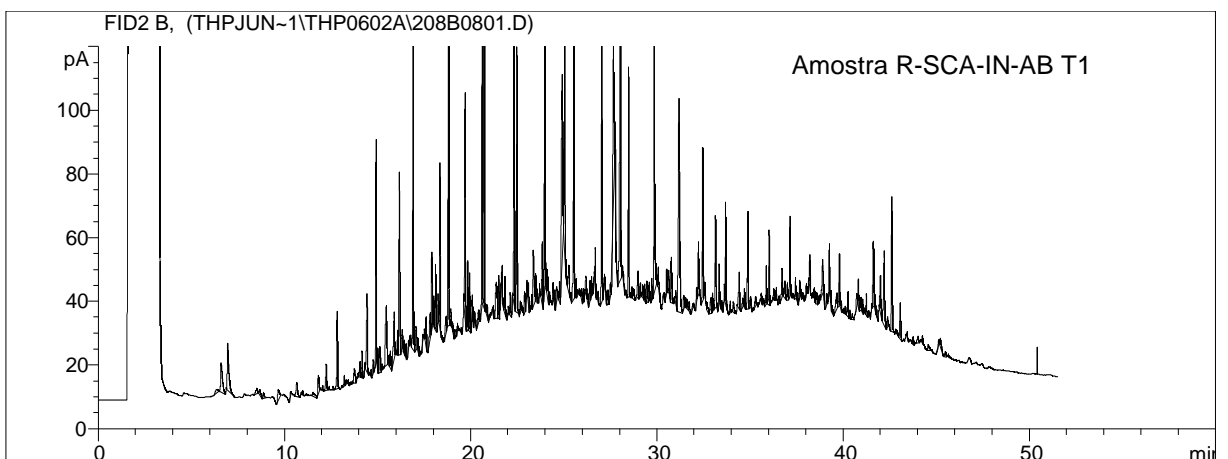


FIGURA 20: “Perfil cromatográfico do solo contaminado areia com inóculo, nitrato, bactericida e antimicótico no tempo 1”

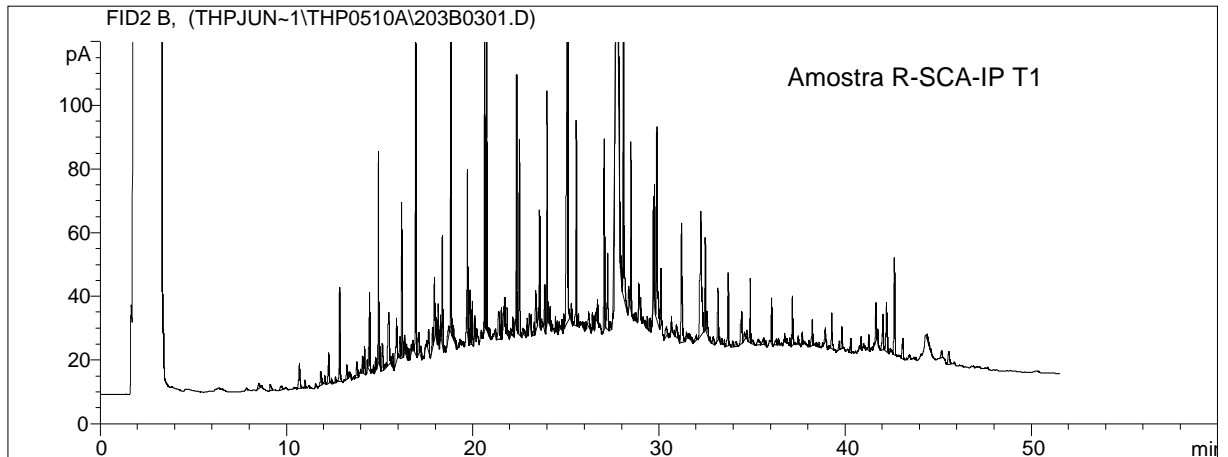


FIGURA 21: “Perfil cromatográfico do solo contaminado areia com inóculo e peróxido no tempo 1”

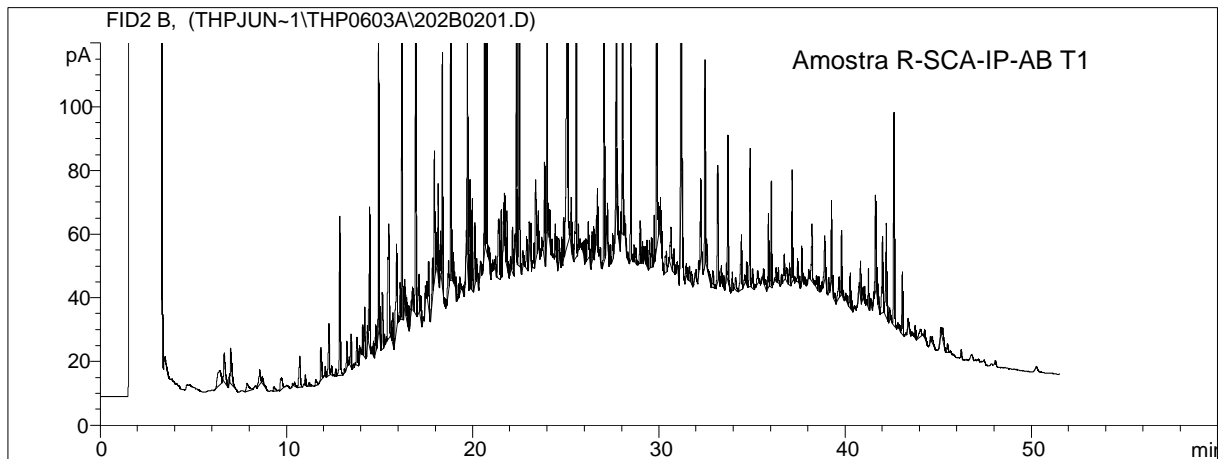


FIGURA 22: “Perfil cromatográfico do solo contaminado areia com inóculo, peróxido, bactericida e antimicótico no tempo 1”

As amostras analisadas no terceiro mês após o início do tratamento apresentaram picos com maior concentração em compostos intermediários, visto que picos ficam menores no final da corrida cromatográfica.

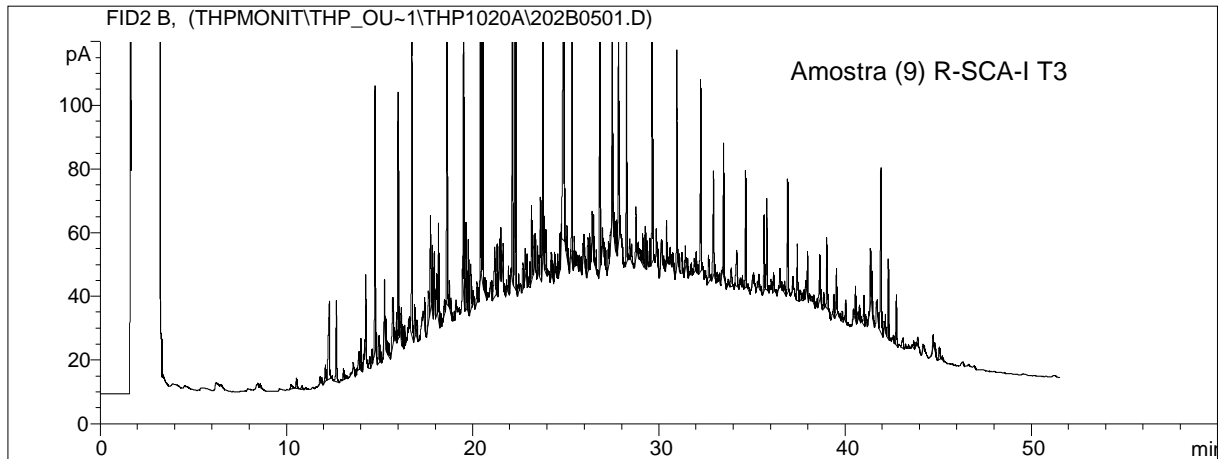


FIGURA 23: "Perfil cromatográfico do solo contaminado areia com inóculo no tempo 3"

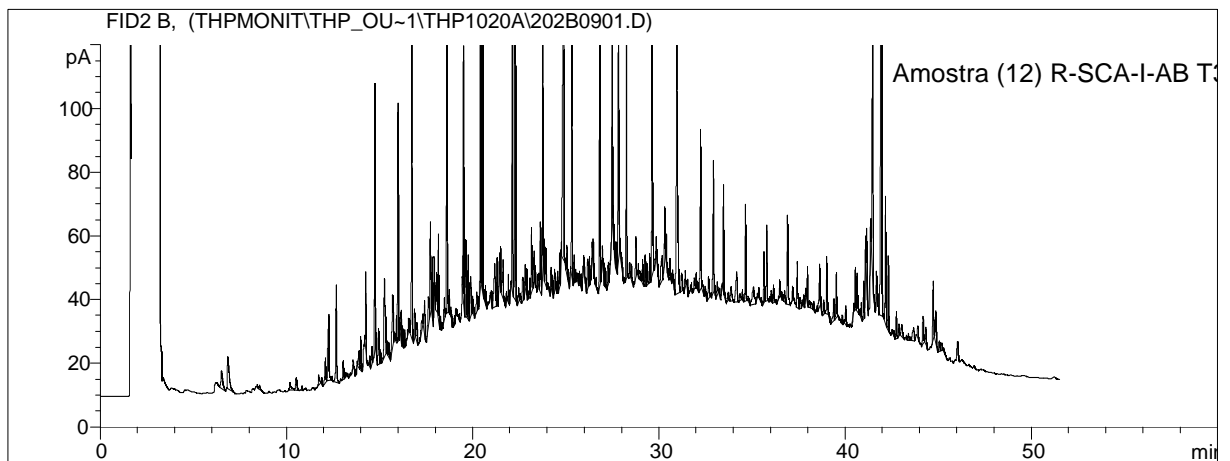


FIGURA 24: "Perfil cromatográfico do solo contaminado areia com inóculo, bactericida e antimicótico no tempo 3"

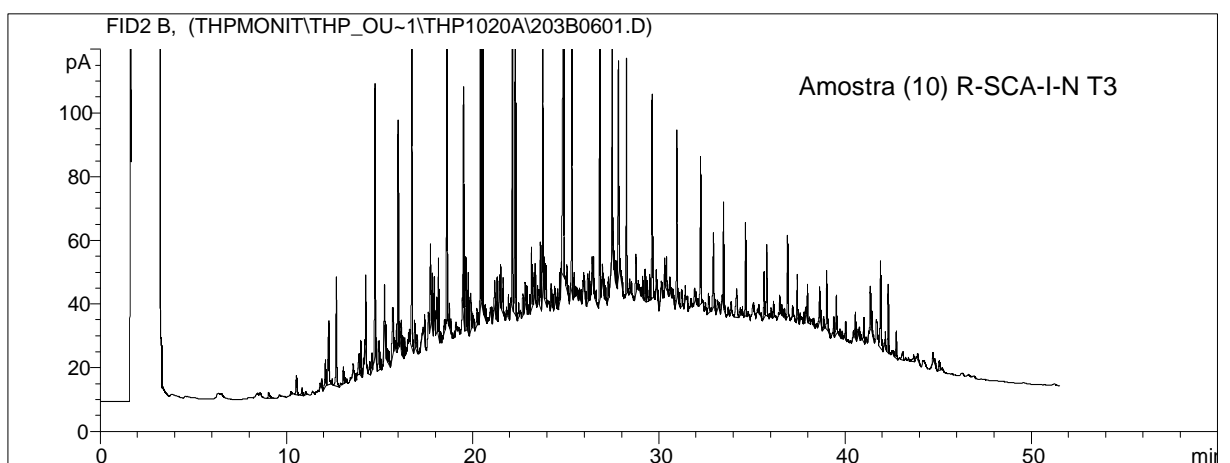


FIGURA 25: "Perfil cromatográfico do solo contaminado areia com inóculo e nitrato no tempo 3"

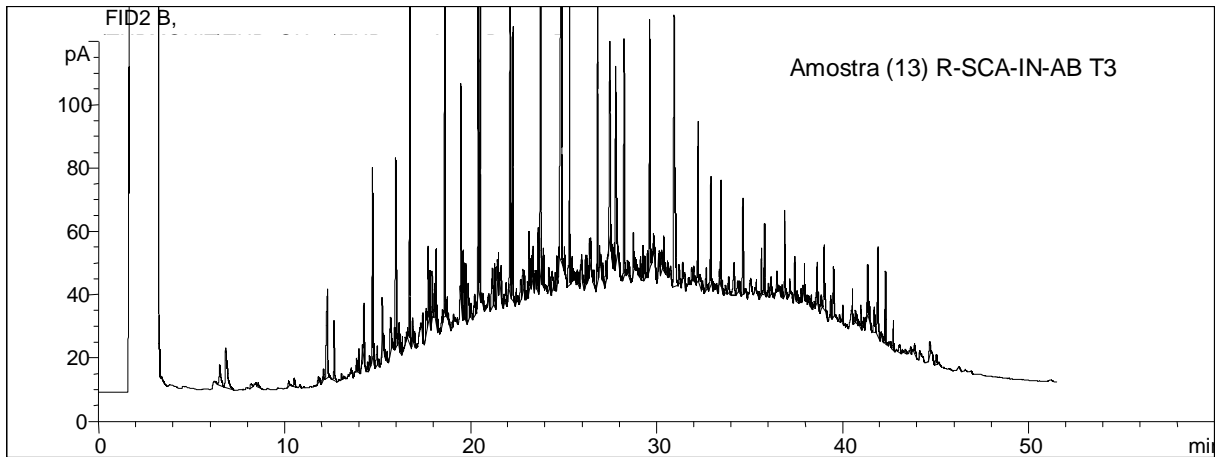


FIGURA 26: “Perfil cromatográfico do solo contaminado areia com inóculo, nitrato, bactericida e antimicótico no tempo 3”

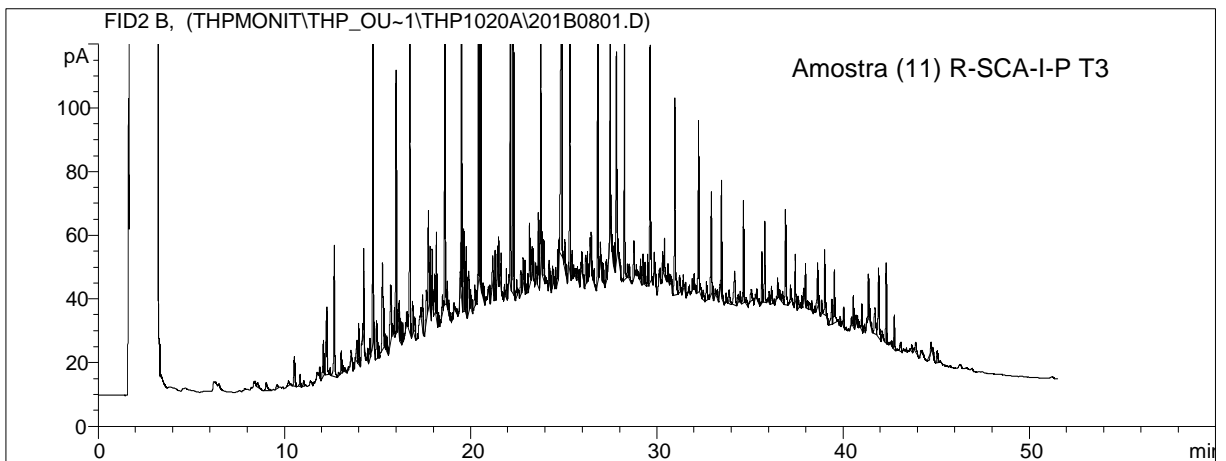


FIGURA 27: “Perfil cromatográfico do solo contaminado areia com inóculo e peróxido no tempo 3”

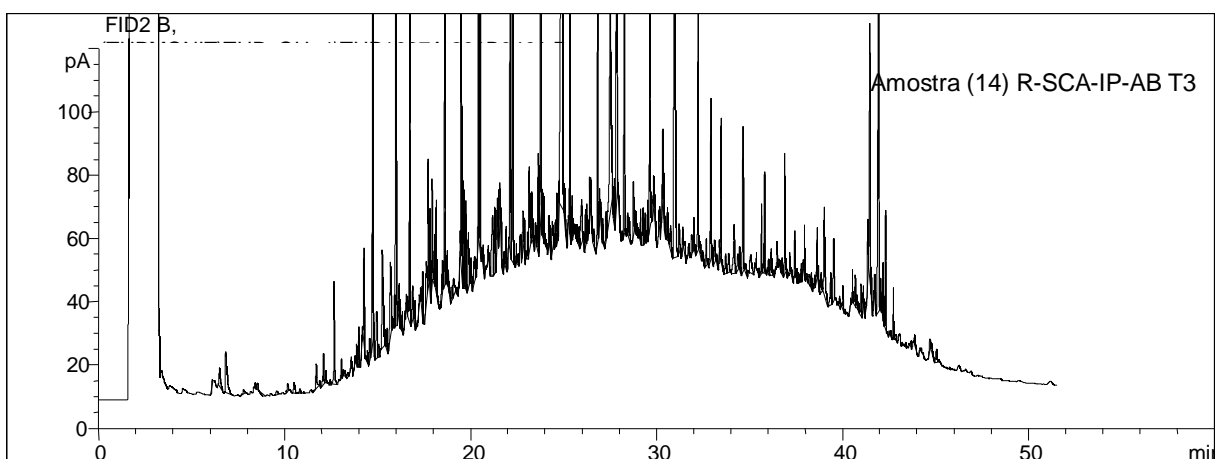


FIGURA 28: “Perfil cromatográfico do solo contaminado areia com inóculo, peróxido, bactericida e antimicótico no tempo 3”

As amostras analisadas no sexto mês após o início do tratamento apresentaram picos com maior concentração em compostos mais leves, caracterizada pelos picos maiores até o 50% da corrida cromatográfica, e picos bem menores no restante da análise. O extrato desta amostras apresentaram coloração mais clara, se comparada às primeiras amostragens, características de compostos orgânicos mais leves.

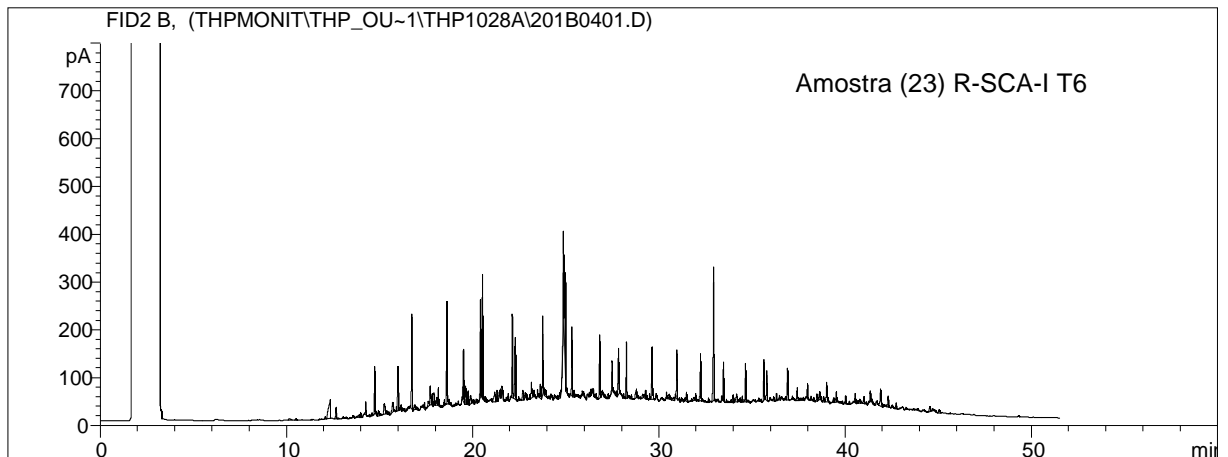


FIGURA 29: "Perfil cromatográfico do solo contaminado areia com inóculo no tempo 6"

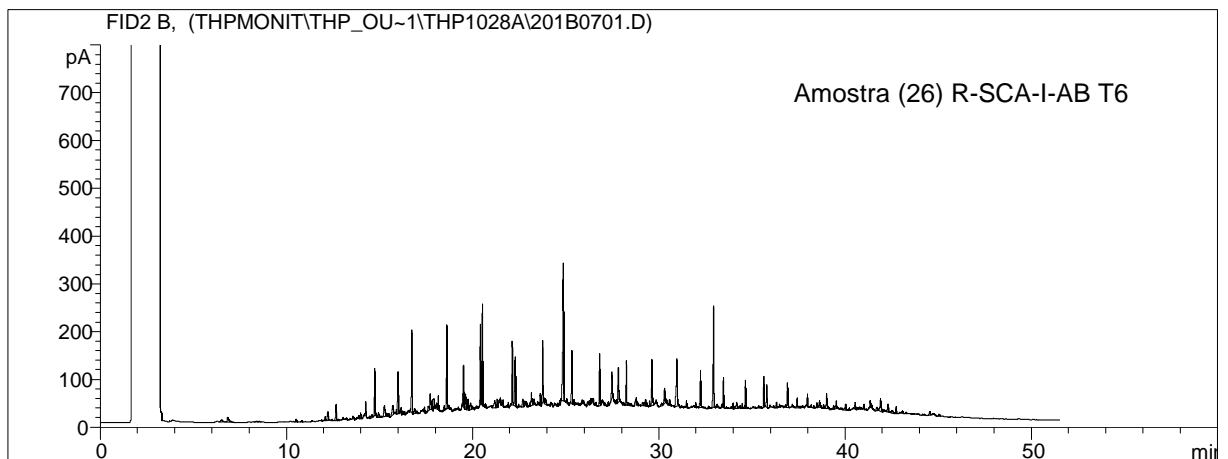


FIGURA 30: "Perfil cromatográfico do solo contaminado areia com inóculo, bactericida e antimicótico no tempo 6"

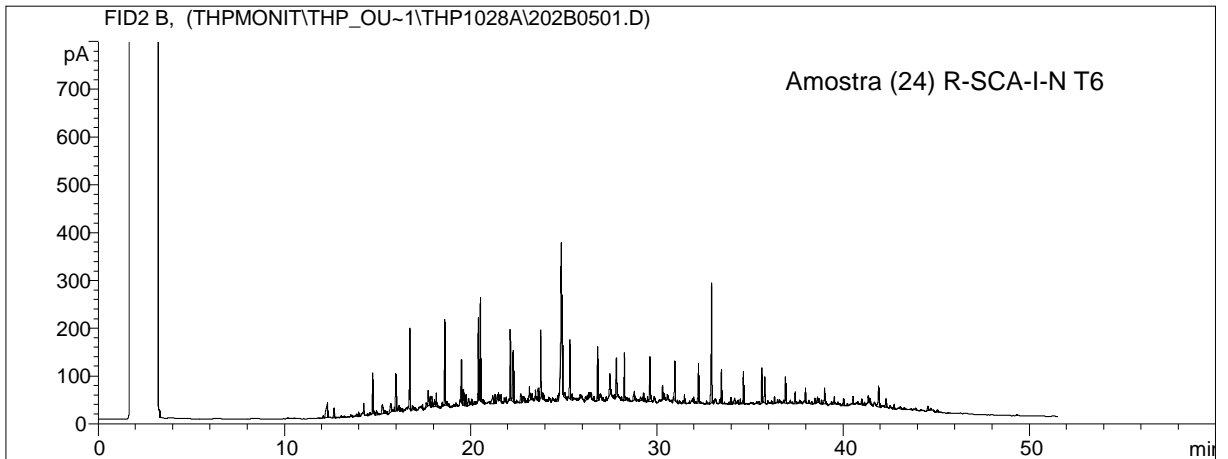


FIGURA 31: “Perfil cromatográfico do solo contaminado areia com inóculo e nitrato no tempo 6”

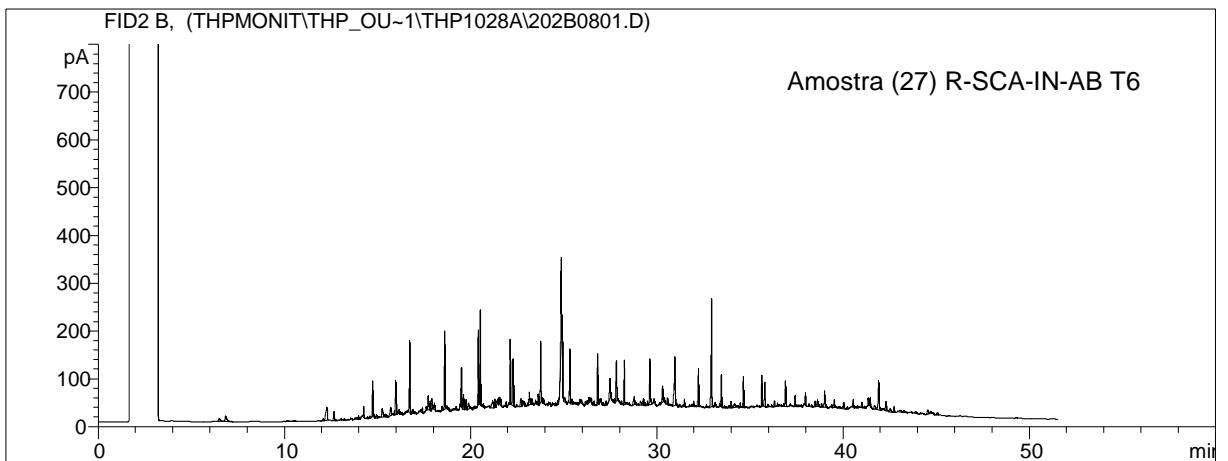


FIGURA 32: “Perfil cromatográfico do solo contaminado areia com inóculo, nitrato, bactericida e antimicótico no tempo 6”

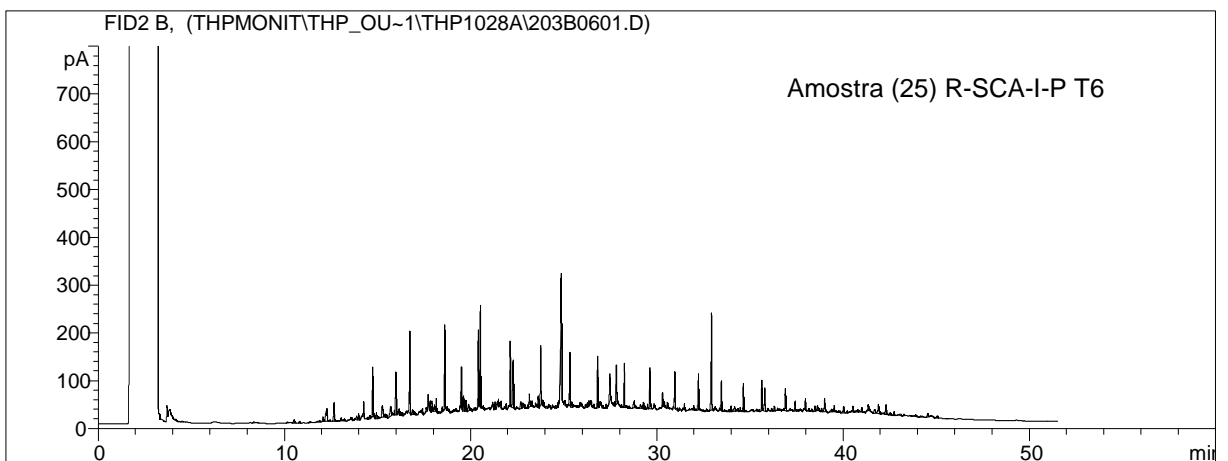


FIGURA 33: “Perfil cromatográfico do solo contaminado areia com inóculo e peróxido no tempo 6”

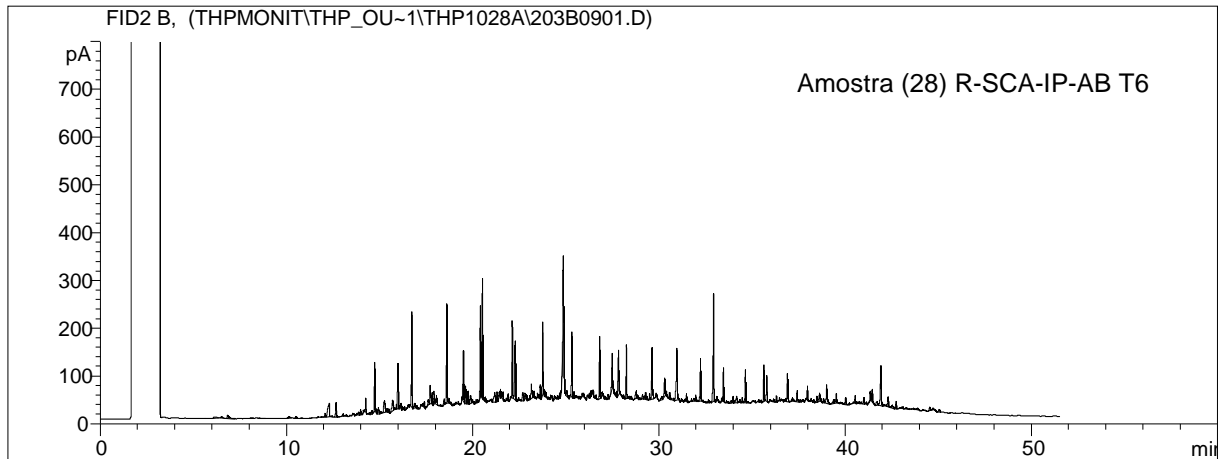


FIGURA 34: “Perfil cromatográfico do solo contaminado areia com inóculo, peróxido, bactericida e antimicótico no tempo 6”

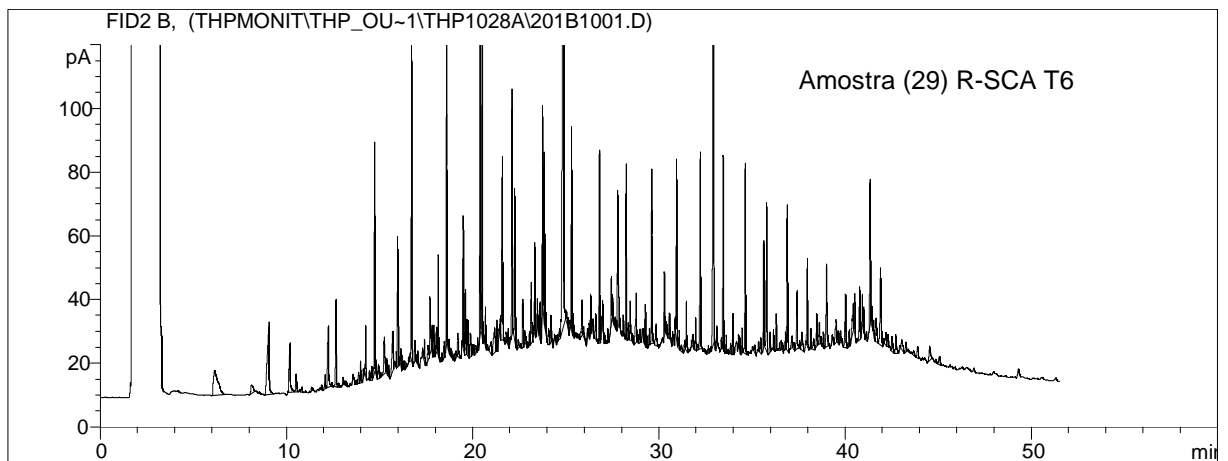


FIGURA 35: “Perfil cromatográfico do solo contaminado areia sem tratamento no tempo 6”

A partir dos gráficos dos cromatogramas, foi avaliado a área entre a linha de base e o início dos picos. As áreas foram quantificadas e com estes valores foi instituído um índice. Este índice relaciona a área dos compostos em degradação, os quais são quantificados no resultado de TPH, no entanto não indicam a contaminação e sim a biodegradação. Na **Tabela 10** abaixo estão relacionados estes índices.

TABELA 10. “Índice da área de compostos em degradação”

THP (MG/KG)	T1	T3	T6
SCA I	1,57	1,43	2,00
SCA N	1,57	1,57	2,14
SCA P	0,71	1,29	4,00
SCA I BF	0,86	2,14	3,00
SCA N BF	1,00	0,86	1,86
SCA P BF	2,60	1,71	4,86

Após análises dos cromatogramas foi possível observar um aumento na área entre a linha de base o início dos picos. Esta área indica a existência de compostos indefinidos, em decomposição, onde a concentração não é subtraída do resultado total de hidrocarbonetos de petróleo (TPH), o que justifica o aumento nos valores de TPH anteriormente apresentados na Tabela 9. As áreas aumentam gradativamente em relação aos tempos, sendo os maiores valores no tempo 6. As massas encontradas das áreas indefinidas estão apresentadas no ANEXO III.

A resposta à degradação do contaminante em relação ao peróxido leva é lenta, mas o resultado final é melhor. No tratamento com peróxido FOGEL (1989) cita em seu trabalho que somente após seis meses de aplicações de peróxido foi possível notar decréscimo expressivo nos índices de contaminações.

O nitrato apresentou melhor resposta em relação ao inóculo.

O solo contaminado que não recebeu tratamento teve uma redução significativa no THP e sua área de compostos indefinidos também reduziu, o que indica que o solo já está em grande parte biorremediado.

6. CONCLUSÃO

Com a análise dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- A análise de THP para avaliar a contaminação do solo, indicou a biodegradação do óleo diesel no solo. Porém é uma análise com alto custo e de difícil interpretação;
- O tratamento com a melhor resposta à biodegradação foi com peróxido de hidrogênio e inóculo, apesar de as respostas iniciais serem mais lentas. O solo tratado com nitrato de potássio e inóculo apresentou melhor biodegradação do contaminante que o solo tratado somente com inóculo. Estes resultados foram obtidos com o índice de biodegradação, uma vez que as diferenças encontradas na respiração microbiana e no TPH não foram estatisticamente significativos;
- A utilização do indicador de biodegradação mostrou-se como uma técnica simples para acompanhamento da biodegradação do óleo diesel;
- Não houve resposta em relação à esterilização dos fungos e bactérias do solo com 1% de cicloheximida e de 5% de estreptomicina, ambos em massa.

Este estudo pode ser aprofundado utilizando outros compostos que atuam com aceptores de elétrons, que são o ferro e o sulfato. Também pode ser ampliado se repetido para outros tipo de solo.

Uma melhor avaliação dos resultados, utilizando os mesmos métodos de ensaio, pode ser obtida inserindo no escopo de trabalho a contagem de microorganismos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AELION, C.M., BRADLEY, P.M.M. (1991) **Aerobic biodegradation potential of subsurface microorganisms from a jet fuel-contaminated aquifer.** Applied and Environmental Microbiology. 57(1): 57 – 63.
- AL-AWADI, N.; AL-DAHER, R.; ELNAWAWY, A.; BALBA, T. (1996) **Biorremediation of oil-contaminated soil in Kuwait.** Journal of Soil Contamination V5, p.243-260.
- ALEXANDER, M (1967) **Introdução to Soil Microbiology.** 4º Ed., John Wiley, New York, 472p.
- ALEXANDER, M. (1980) **Introducción a la microbiología del suelo.** 2º. Ed. Planta Alta, México: libros y editoriales.
- ALEXANDER, M (1999) **Biodegradation and Biorremediation.** Academic Press. 2º Ed., New York, 453p.
- ALMEIDA, M. H.; CARVALHO, F. P. (1995) **Manual de Operação do Landfarming.** PETROBRAS - REPAR, Araucária.
- ANDERSON, D.W. (1979) **Processes of humus formation and transformation in soils of the canadian great plains.** J. Soil Sci. 30: 77 – 84.
- API (1995) **Publication Nº 4627,** Health and Env.Sciences Dept. 139p.
- ATLAS, R. M. (1981) **Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: na Environmental Perspective.** Microbiological Reviews.Vol 45, p.180-209.
- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. (1981) **Microbial Ecology. Fundamentals and Applications.** Addison-Weslwy, Reading, Mass.
- AZAMBUJA, E.; CANCELIER, D.B.; NANNI, A.S (2000) **Contaminação dos solos por LNAPL: discussão sobre diagnóstico e remediação.** Anais do II Simpósio de Prática de Engenharia Geotécnica da Região Sul, Porto Alegre, p. 185 – 202.
- BARBARO,J.R.; BARKERJ.F. (2000) **Controlled field study on the use of nitrate and oxygen for biorremediation of a gasoline source zone.** Biorremediation Journal, Vol 4, p.259-270.

- BALL, H.A., REINHARD, M. (1996) **Monoaromatic Hydrocarbon Transformation Under Anaerobic Conditions at Seal Beach.** Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 15, p.114-122.
- BARENSCHEE, E.R., BOCHEM, P., HELMLING, O. E WEPPE, P. (1991) **Effectiveness And Kinetics Of Hydrogen Peroxide And Nitrate-Enhanced Biodegradation Of Hydrocarbons.** In Situ Bioreclamation Applications And Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation. Butterworth-Heinmann, Boston, Ma, p.103-124.
- BARKER, J.F., G.C. PATRICK, D.MAJOR (1987) **Natural Attenuation of Aromatic Hydrocarbons in a Shallow Sand Aquifer.** Groundwater Monitoring Review, Winter, 64p.
- BARTHA, R., BOSSERT, I. (1984) **The treatment and disposal of petroleum wastes.** p. 553 – 578. In: Petroleum Microbiology (Atlas, R.M., ed.) New York, Macmillan.
- BOLLAG, J.M, MERTZ,T., OTJEN,L. (1994) **Role of Microorganisms in Soil Biorremediation.** Birremediation Through Rhizosphere Technology. American Chemical Society. p.2-10.
- BORDONADO, I.G., HUERTAS, J.A. (1982) **Disposicion de lodos aceitosos de refinarias de petroleo mediante “landfarming”.** Ingenieria Quimica, p.65- 72.
- BOSSERT, I., KACHEL, W.M., BARTHA, R. (1984) **Fate of hydrocarbons during oily sludge disposal in soil.** Applied and Environmental Microbiology. 47(4), p.763-767.
- BREGNARD, T.P.A, HOHENER, P., HANER, A., ZEYER, J.(1997) **Degradation of Weathered Diesel Fuel by Microorganisms from a Contaminated Aquifer in Aebobic and Anaerobic Microcosms.** Environmental Toxicology and Chemistry.
- BROWN, E.J.; PIGNATELLO, J.J.; MARTINSON, M.M.; CRAWFORD, R.L. (1986) **Pentachlorophenol Degradation: A Pure Culture and an Epilithic Microbial Consortium.** Applied and Anvironmental Microbiology. Vol. 52, p.92-97.
- CANSFIELD, P.E., RACZ, G.J. (1978) **Degradation of hydrocarbon sludges in the soil.** Canadian Journal of Soil Science. Vol. 58, p. 339- 345.

- CARVALHO, F.J.P.C.; ALMEIDA, M. H. (1996) **Petrobras High Efficiency Landfarming Sistem: “New for Biodegradable Toxic Industrial Wastes”** in Biodeterioratio an Biodegradation, DECHEMA Monographs, Vol 133, Hamburg, p.535-542.
- CARVALHO, F.J.P.C. (2005) **Citações de campo não publicados.**
- CHAYABUTRA, C.; JU, L. (2000) **Degradation of n-hexadecane and is metabolites by Pseudomonas aeruginosa under microaerobic denitrifying conditions.** Applied and Environmental Microbiology. Vol 66, p.493-498.
- CONCAWE. (1980) **Sludge Farming: a technique for the disposal of oily refinery wastes.** Concawe Report 3: 80, The Hague, 95p.
- COOKSON, J.T. (1995) **Bioremediation Engineering: Design and Application.** MCGRAW-HILL, INC. 525 P.
- CORSEUIL,H.X., WEBER, W.J.Jr. (1993) **Enhanced Degradation of Monoaromatic Hydrocarbons in Sandy Aquifer Materials.** In: Proceedings da Third International Conference on Waste Management in the Chemical and Petrochemical Industries (IAWQ), Salvador.
- CORSEUIL,H.X. (1994) **Influência do Receptor de Elétrons na Biorremediação de Águas Subterrâneas Contaminadas por Derramamentos de Gasolina.** VI Simpósio Luso Brasileiro de /engenharia Sanitária e Ambiental, Vol. I, p.68-75, Florianópolis.
- CORSEUIL,H.X.; MARINS, M.D.M. (1997) **Contaminação de águas subterrâneas por derramamentos de gasolina: o problema é grave?** Revista Eng. Ambiental, Vol 2, p.50-54.
- CUTRIGHT, T. J. LEE, S. (1994) **In Situ Soil Remediation: Bacteria or Fungi?** Departament of Chemical Engineering, University of Akron. Akron - Ohio - USA. s/v. p. 413-419.
- DABIN, B. (1976) **Méthode d’extracion et de fractionnement des matières humiques du sol application à quelques études pédologiques et agronomiques dans les sols tropicaux.** Cah. Orston. Ser. Pédol., p.287-297.
- DIEHL, S.V. (1997) **Bioremediation of PCP and TPH contaminated soil in a pilot-scale field study.** p. 97-102. 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.
- DINEEN, D, SLATER, J.P., HICKS, P., HOLLAND, J., CLENDENING, L.D. (1992) **In situ biological remediation of petroleum hydrocarbons in unsaturated soils.** p 453 – 463. In: Principles and Practices for Petroleum Contaminated Soils (Calabrese, E.J., KostECKI, P.T. – ed.). Boca Raton: Lewis Publishers. 658p.
 - DOBSON, A.L., WILSON, H.A. (1964) **Respiration studies on soil treated with some hidrocarbons.** Proceedings Soil Science America. Vol. 28, p.536-539.
 - DOLFING, J., J. ZEYER, P. BINDER-EICHER, R.P. SCHWARZENBACH (1990) **Isolation and Characterization of a Bacterium that Mineralizes Toluene in the Absence of Molecular Oxigen.** Arch Microbiol, p.336-341.
 - ENGLERT, C.J., KENZIE, E.J., DRAGUN, J. (1993) **Bioremediation of petroleum products in soil.** Principles and Practices for Petroleum Contaminated Soils (Calabrese, E.J., KostECKI, P.T. – ed.). p.111–129. Boca Raton: Lewis Publishers.
 - FOGEL, S., FINDLAY, M. E MOORE, A. (1989) **Enhanced Bioremediation Techniques for in Situ and on Site Treatment of Petroleum Contaminated Soils and Groundwater.** Petroleum contaminated soils. Vol.2: remediation techniques, environmental fate, risk assessment, analytical methodologies. Lewis publishers, Chelsea, mi. p.201-209.
 - FRANCO,I.,CONTIN,M.,BRAGATO,G., DE NOBILI, M. (2003) **Microbiological resilience of Soils Contaminated with crude oil.** Published by Geoderma, 14p.
 - GHAEMGHAMI, J.; BAKER, R.S.; SIMKINS, S. (1998) **Outgassing losses of Toluene and M-xylene Evaluated by 14C-based Mass Balances for Laboratory Bioventing Simulations.** Journal of Soil Contamination. Vol. 7, p.697-708.
 - GROVE, G.W. (1978) **Use landfarming for oily waste disposal.** Hydrocarbon Processing. Vol. 5,p.138-140.
 - HAIMANN, R. A. (1995) **Fungal Technologies for the Treatment of Hazordous Waste.** Environmental Progress, Santa Ana - Califórnia, Vol. 14, n. 3, p.201-203.

- HARRIS, J. O. (1976) **Petroleum Wastes in the Soil in Land Application of Waste Materials**. Published by the Soil Conservation Society of America, Ankeny, Iowa. 313p.
- HEELY, D.A.; WERK, E.S.; KOWALSKI, R.G. (1992) **Bioremediation and Reuse of Soils Containing nº5 Fuel Oil in New England Using an Aboveground Treatment Cell: a Case Study**. Hydrocarbon Contaminated Soils VII. Lewis Publishers, Chelsea.
- HERBES, S.E.; SHAWALL, L.R. (1977) **Microbial Transformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Pristane and Petroleum contaminated Sediments**. *Applies and Environmental Microbiology*. Vol. 35, p.306-316.
- HUESEMANN, M. H. (1994) **Guidelines for Land-Treating Petroleum Hydrocarbon - Contaminated Soils** - *Journal of Contamination, s/l*, Vol. 3 n. 3, p. 299-318.
- JENKINSON, D. S. & POLWSON, D.S. (1974) **The effects of biocidal treatments on metabolism in soil V. A method for measuring soil biomass**. *Soil Biol and Biochem* Vol. 8, p209.
- JOBSON, A., MCLAUGHLIN, M., COOK, F.D., WESTLAKE, D.W.S. (1974) **Effect of amendments on the microbial utilization of oil applied to soil**. *Applied Microbiology*. Vol. 27, p.166-171.
- LANGENBACH, T. *et alli* (1994) **Microrganismos de Importância Agrícola**. EMBRAPA, s/v., p.217-228. Rio de Janeiro.
- LANGENBACH, T. (1994) **Biodegradação de Xenobiontes: Potencialidades e Limites**. *Microrganismos de Importância Agrícola - EMBRAPA, Brasília*, p.217-228.
- MACEDO et alli. (2001) **Biorremediação de Solos Impactados por Óleo Cru Utilizando Fungos Filamentosos**. Acessado no site: http://www.cetem.gov.br/publicacao/serie_anais_IX_jic_2001/Rosana.pdf em 07/08/2003.
- MAHAN, B.H. (1972) **Química: um curso universitário**. Departamento de química, Universidade da Califórnia, Berkeley. Ed. Edgard Blücher Ltda. 654p.

- MARSHALL, T.R., DEVINNY, J.S. (1988) **The microbial ecosystem in petroleum waste land treatment.** Water Science and Technology. Vol. 20, p.285-291.
- MCGILL, W.B., ROWELL, M.J., WESTLAKE, D.W.S. (1981) **Biochemistry, Ecology and Microbiology of Petroleum Components in Soil.** Soil Biochemistry Ed. E.A . Paul and J.N. Ladd, Marcel Dekker, New York,. Vol. 5. 229p.
- METTING, F.B. (1993) **Soil Microbial Ecology.** Environmental Sciences Departement Bettelle Pacific Northwest Laboratories. Richland, Washington.
- MEETING, J. B. (1983) **Soil microbial e Ecology Applications in Agricultural an Environmental Nangment.** Environmental Sciencies Department Battele Pacific Notwest Laboratóries, Richland, Washington, Cap.01 e 17 p.132-138.
- MESTER, K.G. **Field evaluation of in situ denitrification for biorremediation of contaminates soils and groundwater.** New Brunswick, 155p., New Jersey, 1995.
- MIELNICZUK, C. (1991) **A População Microbiana e a degradação de resíduo Petroquímico no Solo.,** UFRGS, Tese de M.Sc.
- MILLER, C.M.; VALENTINI,R.L. (2000) **Hydrogen peroxide decomposition and quinoline degradation in the presence of aquifer material.** Water research, Vol 29, p.2353-2359.
- MUELLER et alli (1999) **Acute Toxicity of Estuarine Wetland Sediments Contaminated by Petroleum.** Environmental Technology. Vol. 20, p.875-882.
- ODU, C.T.I. (1972) **Microbiology of soils contaminated with petroleum hydrocarbons.** I. Extent of contamination and some soil and microbial properties after contamination. J. Inst. Petrol. Vol. 58, p.201-208.
- PATNAIK P. (1996) **Handbook of Environmental Analysis: Chemical Pollutants in Air, Water, solil, and Solid Wastes.** 604p
- PEYTON,B.M. (1996) Improved biomass distribution using pulsed injections of electron donor and acceptor. Water research, Vol 30, p. 756-758.
- RAIMUNDO, R. S.; RIZZO, A. C. L. (2000) **Efeito Da Adição De Sulfatantes Na Biodegradação De Hidrocarbonetos De Petróleo Em Solo.** Rio de Janeiro.

- RUSSELL, J. B. (1994) **Química Geral**. Tradução: M. Guekezian, 2. ed., v. I, São Paulo: Makron Books.
- RASIAH, V., VORONEY, R.P., KACHANOSKI, R.G. (1991) **Bioavailability of stabilized oily waste organics in ultrasonified soil aggregates**. Water, Air and Soil Pollution. Vol.63, p.179-186.
- REPAR (1997) **ME-6360-033 - Determinação do Índice de Matéria Orgânica Total**. 21 p., Araucária.
- REPAR (1997) **ME-6360-024 - Determinação do pH do Solo do Landfarming**. 10 p., Araucária.
- ROSENBERG, E. (1993) **Exploiting microbial growth on hydrocarbons – new markets**. Trends in Biotechnology. Vol. 11, p.419-424.
- SEABRA, P.N.C. (1997) **Uso de tensoativos na mobilização e biodegradação de óleo diesel em solos impactados**. Rio de Janeiro, COPPE/UFRJ, Tese M.Sc.
- SEABRA, P.N. (2001) **Uso da biorremediação em áreas impactadas pela indústria de petróleo**. Rio de Janeiro, CENPES.
- SIMON et alli (1999) **Bioaugmentation for the Enhanced Bioremediation of Petroleum in a Wetland**. Polycyclic Aromatic Compounds, Vol.14&15, p.231-239.
- SKLADANY, G.J., METTING JR., F.B. (1993) **Bioremediation of contaminated soil**. p. 483 – 513. In: Metting Jr, F.B. (ed.) Soil Microbial Ecology. Applications in Agricultural and Environmental Management. Marcel Dekker, Inc. New York. 646 p.
- SONG, H., BARTHA, R. (1990) **Effects of jet fuel spills on the microbial community of soil**. Applied and Environmental Microbiology. Vol.56, p.646-651.
- SOOPPER, W.E. (1993) **Municipal Sludge use in Land Reclamation**. Boca Raton, CRC Press. 163p.
- SPAIN, J.C.; MILLIGAN, D.; DOWNEY, D.C.; SLAUGHTER, J.K. (1989) **Excessive Bacterial Decomposition of H₂O₂ During Enhanced Biodegradation**. Ground Water, Vol. 27, 163p.

- STEWART, B.A., WEBBER, L.R. (1976) **Consideration of soils for accepting wastes**. In: Land application of wastes materials (ed.: Soil Conservation of Society of America). Ankeny, Iowa.
- SWANNEL, R.P.J. et alli (1997) **Field Evaluation of Bioremediation to Treat Oil on a Mudflat**. In Situ and On Site Bioremediation, Vol. 4, p. 401-406.
- THOMAS, J.M., WARD, C.H. (1989) **In situ bioremediation of organic contaminants in the subsurface**. Environmental Science Technology. Vol. 23, p.760-766.
- TPH CRITERIA WORKING GROUP (1998) **Analysis of Petroleum Hydrocarbons in Environmental Media**. Amherst Scientific Publishers. Vol 1, 98p.
- WALKER, J.D.; COLWELL, R.R. (1976) **Measuring the Potencial Activity of Hidrocarbon-degrading Bacteria**. Applied Microbiology. Vol. 31, p.189-197.
- WATTS, J.R.; COREY, J.C.; McLEOD, K.W. (1982) **Land Application Studies of Industrial Waste Oils**. Environmental Pollution. Vol.28, p.165-175.

ANEXO I

CÁLCULO DAS DOSES APLICADAS NO SOLO

Cálculo da capacidade de campo

Em 50g de solo foram necessários 18,55mL de água para saturar o solo.

$$cc = 18,55\text{mL}/50\text{mL}$$

$$cc = 37,1\%$$

Cálculo da quantidade de água adicionada para manter teor de umidade igual a 75%cc.

Para 10kg de solo são necessários:

$$q_{\text{H}_2\text{O}} = 10\text{L} \cdot (37,1/100) \cdot (75/100)$$

$$q_{\text{H}_2\text{O}} = 2,78 \text{ L}$$

Cálculo da concentração de KNO_3 (nitrato de potássio)

A concentração da solução é de 100mg/L.

1L de solução de nitrato equivalem a 2,1kg (densidade 2,1g/mL).

$$X = 0,1 \text{ g} \cdot 1000\text{mL} / 2100\text{g}$$

$$X = 0,0476 \text{ mL de nitrato para 1L de solução}$$

Para 2,78mL de solução será necessário 0,13mL de nitrato

Cálculo da concentração de H_2O_2 (peróxido de hidrogênio)

A concentração da solução é de 200mg/L.

1L de solução de peróxido equivalem a 0,35kg (densidade 1,1g/mL e concentração de 35% máxima na solução).

$$X = 0,2 \text{ g} \cdot 1000\text{mL} / 350\text{g}$$

$$X = 0,5714 \text{ mL de peróxido para 1L de solução}$$

Para 2,78mL de solução será necessário 1,59mL de peróxido

ANEXO II
RESPIRAÇÃO DO SOLO

RESPIRAÇÃO DO SOLO CONTAMINADO COM INÓCULO

	SCA + INÓCULO			
	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS	28 DIAS
TEMPO 1	158,79	83,43	79,83	-
TEMPO 2	113,44	79,30	41,84	11,19
TEMPO 3	73,31	33,45	46,12	58,05
TEMPO 4	35,27	73,16	77,23	31,74
TEMPO 5	56,47	105,51	95,71	50,47
TEMPO 6	58,42	51,46	57,67	70,68

RESPIRAÇÃO DO SOLO CONTAMINADO COM INÓCULO E NITRATO

	SCA + INÓCULO + NITRATO			
	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS	28 DIAS
TEMPO 1	152,77	69,12	98,08	-
TEMPO 2	104,47	64,27	39,09	12,34
TEMPO 3	88,04	37,23	49,37	57,66
TEMPO 4	44,19	80,79	81,04	29,89
TEMPO 5	71,93	109,93	93,95	49,56
TEMPO 6	59,43	55,07	60,47	62,13

RESPIRAÇÃO DO SOLO CONTAMINADO COM INÓCULO E PERÓXIDO

SCA + INÓCULO + PERÓXIDO				
	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS	28 DIAS
TEMPO 1	189,59	87,30	88,18	-
TEMPO 2	115,64	90,48	42,41	13,23
TEMPO 3	86,53	35,00	46,33	64,15
TEMPO 4	42,48	74,71	91,80	33,06
TEMPO 5	62,50	106,94	79,78	42,47
TEMPO 6	72,29	58,90	58,79	63,80

RESPIRAÇÃO DO SOLO CONTAMINADO COM INÓCULO COM BACTERICIDA E ANTIMICÓTICO

SCA + INÓCULO + BACTERICIDA E ANTIMICÓTICO				
	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS	28 DIAS
TEMPO 1	172,87	72,02	87,21	-
TEMPO 2	90,19	68,75	17,67	3,14
TEMPO 3	61,67	35,74	60,48	57,52
TEMPO 4	36,18	70,34	66,04	39,59
TEMPO 5	40,70	90,48	77,76	37,53
TEMPO 6	59,65	50,69	60,72	73,08

RESPIRAÇÃO DO SOLO CONTAMINADO COM INÓCULO, NITRATO, BACTERICIDA E ANTIMICÓTICO

SCA + INÓCULO + NITRATO + BACTERICIDA E ANTIMICÓTICO				
	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS	28 DIAS
TEMPO 1	123,10	58,16	74,07	-
TEMPO 2	94,58	67,09	31,71	9,28
TEMPO 3	95,63	28,92	46,99	50,66
TEMPO 4	43,85	43,11	26,44	18,18
TEMPO 5	57,03	57,00	61,22	33,07
TEMPO 6	71,63	57,08	47,93	56,57

RESPIRAÇÃO DO SOLO CONTAMINADO COM INÓCULO, PERÓXIDO, BACTERICIDA E ANTIMICÓTICO

SCA + INÓCULO + PERÓXIDO + BACTERICIDA E ANTIMICÓTICO				
	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS	28 DIAS
TEMPO 1	155,81	76,98	90,08	-
TEMPO 2	101,97	85,53	46,25	6,76
TEMPO 3	78,89	28,11	55,37	46,92
TEMPO 4	31,03	36,94	31,21	21,48
TEMPO 5	50,83	48,92	55,74	39,12
TEMPO 6	58,25	47,52	55,19	73,39

ANEXO III

ÁREAS DOS COMPOSTOS EM DEGRADAÇÃO

THP

Área de compostos em degradação. A tabela apresenta as massas de área da zona de degradação indefinida, através do qual foram determinados os índices.

THP (MG/KG)	T0	T1	T3	T6
SCA	0,07	-	-	
SCA I	-	0,11	0,10	0,14
SCA N	-	0,11	0,11	0,15
SCA P	-	0,05	0,09	0,28
SCA I BF	-	0,06	0,15	0,21
SCA N BF	-	0,07	0,06	0,13
SCA P BF	-	0,18	0,12	0,34

ANEXO IV

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

SEMANA 1						
	SCA+I	SCA+I+N	SCA+I+P	SCA+I+BA	SCA+I+N+BA	SCA+I+P+BA
Tempo 0	163,34	163,34	163,34	163,34	163,34	163,34
Tempo 1	158,79	152,77	189,59	172,87	123,10	155,81
Tempo 2	113,44	104,47	115,64	90,19	94,58	101,97
Tempo 3	73,31	88,04	86,53	61,67	95,63	78,89
Tempo 4	35,270	44,19	42,48	36,18	43,85	31,03
Tempo 5	56,47	71,93	62,50	40,70	57,03	50,83
Tempo 6	58,42	59,43	72,29	59,65	71,63	58,25

Anova: fator duplo sem repetição SEMANA 1

RESUMO	Contagem	Soma	Média	Variância
Linha 1	6	980,0304312	163,33841	0
Linha 2	6	952,9249489	158,82082	493,184003
Linha 3	6	620,2926283	103,3821	101,203497
Linha 4	6	484,0668624	80,67781	146,143277
Linha 5	6	233,0102694	38,835045	29,5575548
Linha 6	6	339,4586596	56,576443	111,20743
Linha 7	6	379,6737586	63,27896	45,564641
Coluna 1	7	659,0340966	94,147728	2655,83144
Coluna 2	7	684,1655358	97,737934	2078,61418
Coluna 3	7	732,3612069	104,62303	2966,10382
Coluna 4	7	624,6090122	89,229859	3215,46498
Coluna 5	7	649,1647061	92,737815	1671,31605
Coluna 6	7	640,1230006	91,446143	2663,59113

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	87934,29132	6	14655,715	123,114569	9,36995E-20	3,473473953
Colunas	1063,063779	5	212,61276	1,78604234	0,14594923	3,699028639
Erro	3571,238232	30	119,04127			
Total	92568,59333	41				

Após analisar os dados, conclui-se que não houve diferença significativa entre os métodos, apenas entre os tempos.

SEMANA 2						
	SCA+I	SCA+I+N	SCA+I+P	SCA+I+BA	SCA+I+N+BA	SCA+I+P+BA
Tempo 0	84,05	84,05	84,05	84,05	84,05	84,05
Tempo 1	83,43	69,12	87,30	72,02	58,16	76,98
Tempo 2	79,30	64,27	90,48	68,75	67,09	85,53
Tempo 3	33,45	37,23	35,00	35,74	28,92	28,11
Tempo 4	73,158	80,79	74,71	70,34	43,11	36,94
Tempo 5	105,51	109,93	106,94	90,48	57,00	48,92
Tempo 6	51,46	55,07	58,90	50,69	57,08	47,52

Anova: fator duplo sem repetição SEMANA 2

RESUMO	Contagem	Soma	Média	Variância
Linha 1	6	504,3054435	84,050907	0
Linha 2	6	447,0026171	74,500436	110,381488
Linha 3	6	455,4148599	75,902477	116,164084
Linha 4	6	198,4465953	33,074433	14,0373642
Linha 5	6	379,0425416	63,173757	337,071434
Linha 6	6	518,7868509	86,464475	725,260676
Linha 7	6	320,7232544	53,453876	18,4369077
Coluna 1	7	510,363331	72,909047	559,237702
Coluna 2	7	500,461096	71,494442	537,219436
Coluna 3	7	537,3703509	76,767193	555,00062
Coluna 4	7	472,0699162	67,438559	353,959713
Coluna 5	7	395,4095544	56,487079	302,444066
Coluna 6	7	408,0479141	58,292559	554,233715

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	12922,89917	6	2153,8165	15,204583	6,41529E-08	3,473473953
Colunas	2357,087432	5	471,41749	3,32790941	0,016504215	3,699028639
Erro	4249,672341	30	141,65574			
Total	19529,65895	41				

Após analisar os dados, conclui-se que não houve diferença significativa entre os métodos, apenas entre os tempos.

SEMANA 3						
	SCA+I	SCA+I+N	SCA+I+P	SCA+I+BA	SCA+I+N+BA	SCA+I+P+BA
Tempo 0	66,30	66,30	66,30	66,30	66,30	66,30
Tempo 1	79,83	98,08	88,18	87,21	74,07	90,08
Tempo 2	41,84	39,09	42,41	17,67	31,71	46,25
Tempo 3	46,12	49,37	46,33	60,48	46,99	55,37
Tempo 4	77,225	81,04	91,80	66,04	26,44	31,21
Tempo 5	95,71	93,95	79,78	77,76	61,22	55,74
Tempo 6	57,67	60,47	58,79	60,72	47,93	55,19

Anova: fator duplo sem repetição SEMANA 3

RESUMO	Contagem	Soma	Média	Variância
Linha 1	6	397,821338	66,303556	0
Linha 2	6	517,4508705	86,241812	69,7516326
Linha 3	6	218,9589902	36,493165	108,559558
Linha 4	6	304,6547995	50,7758	34,5904961
Linha 5	6	373,7595668	62,293261	742,141235
Linha 6	6	464,176466	77,362744	269,191606
Linha 7	6	340,7824762	56,797079	22,9731543
Coluna 1	7	464,7080787	66,386868	374,554763
Coluna 2	7	488,3042424	69,757749	494,908819
Coluna 3	7	473,5947856	67,656398	387,286384
Coluna 4	7	436,1938811	62,313412	481,292289
Coluna 5	7	354,6729595	50,667566	311,817222
Coluna 6	7	400,1305599	57,161509	328,169903

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	9871,219054	6	1645,2032	11,2250569	1,47717E-06	3,473473953
Colunas	1839,081174	5	367,81623	2,50957343	0,051734539	3,699028639
Erro	4396,957232	30	146,56524			
Total	16107,25746	41				

Após analisar os dados, conclui-se que não houve diferença significativa entre os métodos, apenas entre os tempos.

SEMANA 4						
	SCA+I	SCA+I+N	SCA+I+P	SCA+I+BA	SCA+I+N+BA	SCA+I+P+BA
Tempo 0						
Tempo 1						
Tempo 2	11,19	12,34	13,23	3,14	9,28	6,76
Tempo 3	58,05	57,66	64,15	57,52	50,66	46,92
Tempo 4	31,736	29,89	33,06	39,59	18,18	21,48
Tempo 5	50,47	49,56	42,47	37,53	33,07	39,12
Tempo 6	70,68	62,13	63,80	73,08	56,57	73,39

Anova: fator duplo sem repetição SEMANA 4

RESUMO	Contagem	Soma	Média	Variância
Linha 1	6	55,93426806	9,322378	14,5271935
Linha 2	6	334,9636546	55,827276	37,2803449
Linha 3	6	173,9308082	28,988468	62,0784837
Linha 4	6	252,2271908	42,037865	47,445934
Linha 5	6	399,655376	66,609229	46,6296391
Coluna 1	5	222,1340222	44,426804	544,385107
Coluna 2	5	211,5845267	42,316905	433,388456
Coluna 3	5	216,7082289	43,341646	466,176333
Coluna 4	5	210,8493177	42,169864	685,633123
Coluna 5	5	167,765202	33,55304	412,120647
Coluna 6	5	187,67	37,534	645,25878

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	12141,15287	4	3035,2882	100,059459	6,27383E-13	4,430717127
Colunas	433,1110664	5	86,622213	2,85553501	0,041903858	4,102673756
Erro	606,6969099	20	30,334845			
Total	13180,96085	29				

Após analisar os dados, conclui-se que não houve diferença significativa entre os métodos, apenas entre os tempos.

THP (mg/kg)	T0	T1	T3	T6
SCA	5300	-	-	2372
SCA I	-	4882	4604	5566
SCA N	-	4352	2932	4861
SCA P	-	2636	4269	4463
SCA I BF	-	2149	3699	4807
SCA N BF	-	3695	3142	4113
SCA P BF	-	6016	4420	4500

Anova: fator duplo sem repetição

RESUMO	Contagem	Soma	Média	Variância
Linha 1	3	15052	5017,3333	245097,333
Linha 2	3	12145	4048,3333	999420,333
Linha 3	3	11368	3789,3333	1007042,33
Linha 4	3	10655	3551,6667	1782521,33
Linha 5	3	10950	3650	237229
Linha 6	3	14936	4978,6667	808645,333
Coluna 1	6	23730	3955	2066731,2
Coluna 2	6	23066	3844,3333	487114,667
Coluna 3	6	28310	4718,3333	245209,467

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	6552967,111	5	1310593,4	1,76100364	0,208656491	5,636366041
Colunas	2717601,778	2	1358800,9	1,82577852	0,210906061	7,559492587
Erro	7442309,556	10	744230,96			
Total	16712878,44	17				

Após analisar os dados, conclui-se que não houve diferença significativa entre os métodos e entre os tempos.

pH EM ÁGUA						
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
SCA I	4,8	4,72	5,07	4,94	5,08	4,5
SCA N	4,89	4,8	5,1	5,07	5,06	5,01
SCA P	4,87	4,74	4,85	4,97	4,97	5,03
SCA I BF	4,68	4,58	4,73	5,62	4,88	4,99
SCA N BF	4,72	4,63	4,82	4,92	4,99	4,82
SCA P BF	4,61	4,48	4,76	4,72	4,76	5,12

Anova: fator duplo sem repetição

RESUMO	Contagem	Soma	Média	Variância
Linha 1	6	29,11	4,8516667	0,05025667
Linha 2	6	29,93	4,9883333	0,01397667
Linha 3	6	29,43	4,905	0,01111
Linha 4	6	29,48	4,9133333	0,14110667
Linha 5	6	28,9	4,8166667	0,01698667
Linha 6	6	28,45	4,7416667	0,04601667
Coluna 1	6	28,57	4,7616667	0,01221667
Coluna 2	6	27,95	4,6583333	0,01385667
Coluna 3	6	29,33	4,8883333	0,02509667
Coluna 4	6	30,24	5,04	0,0938
Coluna 5	6	29,74	4,9566667	0,01434667
Coluna 6	6	29,47	4,9116667	0,05021667

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	0,220522222	5	0,0441044	1,33303333	0,282805854	2,602988047
Colunas	0,570122222	5	0,1140244	3,44632806	0,016643168	2,602988047
Erro	0,827144444	25	0,0330858			
Total	1,617788889	35				

Ao relacionar as linhas chega-se ao resultado estatístico de que não há diferença significativa entre os métodos. Em relação aos tempos os resultados são significativos, ou seja houve mudança em relação ao tempo de tratamento.

pH EM CLORETO DE CÁLCIO						
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
SCA I	4,75	4	4,83	4,51	4,41	4,5
SCA N	4,6	4,06	4,88	4,52	4,49	5,01
SCA P	4,42	4,08	4,57	4,47	4,5	5,03
SCA I BF	4,44	4,08	4,51	5,35	4,42	4,99
SCA N BF	4,66	4,02	4,7	4,63	4,54	4,82
SCA P BF	4,48	4,04	4,52	4,51	4,48	5,12

Anova: fator duplo sem repetição

RESUMO	Contagem	Soma	Média	Variância
Linha 1	6	27	4,5	0,08592
Linha 2	6	27,56	4,5933333	0,11126667
Linha 3	6	27,07	4,5116667	0,09373667
Linha 4	6	27,79	4,6316667	0,20901667
Linha 5	6	27,37	4,5616667	0,07881667
Linha 6	6	27,15	4,525	0,11871
Coluna 1	6	27,35	4,5583333	0,01761667
Coluna 2	6	24,28	4,0466667	0,00106667
Coluna 3	6	28,01	4,6683333	0,02573667
Coluna 4	6	27,99	4,665	0,11551
Coluna 5	6	26,84	4,4733333	0,00246667
Coluna 6	6	29,47	4,9116667	0,05021667

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	0,079122222	5	0,0158244	0,40206651	0,842701757	2,602988047
Colunas	2,503388889	5	0,5006778	12,7211902	3,29201E-06	2,602988047
Erro	0,983944444	25	0,0393578			
Total	3,566455556	35				

Ao relacionar as linhas chega-se ao resultado estatístico de que não há diferença significativa entre os métodos. Em relação aos tempos os resultados são significativos, ou seja houve mudança em relação ao tempo de tratamento

Cinzas			
	T1	T3	T6
SCA I	7,2463	7,5128	7,711
SCA N	7,2717	7,6539	8,0126
SCA P	7,5446	7,8452	8,1266
SCA I BF	7,5738	7,9033	8,5058
SCA N BF	7,1253	7,6186	7,7803
SCA P BF	7,4785	7,5243	7,6644

Anova: fator duplo sem repetição

RESUMO	Contagem	Soma	Média	Variância
Linha 1	3	22,4701	7,4900333	0,05437526
Linha 2	3	22,9382	7,6460667	0,13727922
Linha 3	3	23,5164	7,8388	0,08471172
Linha 4	3	23,9829	7,9943	0,22336675
Linha 5	3	22,5242	7,5080667	0,11641946
Linha 6	3	22,6672	7,5557333	0,00938074
Coluna 1	6	44,2402	7,3733667	0,0337133
Coluna 2	6	46,0581	7,67635	0,0267447
Coluna 3	6	47,8007	7,9667833	0,10196327

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	0,617627533	5	0,1235255	6,35161799	0,006620496	5,636366041
Colunas	1,056587523	2	0,5282938	27,1645934	9,07736E-05	7,559492587
Erro	0,194478803	10	0,0194479			
Total	1,86869386	17				

Houve diferença altamente significativa entre os métodos e os tempos de tratamento.