

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

---

**ESTABILIZAÇÃO DE “LANDFARMING” DE REFINARIA DE  
PETRÓLEO, MEDIANTE METABOLISMO MICROBIANO, E  
APLICABILIDADE EM SOLOS PRÉ-DESERTIFICADOS**

**FABIANA APARECIDA HENCKLEIN**

**Dissertação apresentada ao  
Instituto de Biociências da  
Universidade Estadual Paulista  
“Julio de Mesquita Filho”,  
Campus de Rio Claro, para a  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências Biológicas  
(Microbiologia Aplicada).**

**Janeiro - 2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

---

**ESTABILIZAÇÃO DE “LANDFARMING” DE REFINARIA DE  
PETRÓLEO, MEDIANTE METABOLISMO MICROBIANO, E  
APLICABILIDADE EM SOLOS PRÉ-DESERTIFICADOS**

**FABIANA APARECIDA HENCKLEIN**

**Orientadora: Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis**

**Dissertação apresentada ao  
Instituto de Biociências da  
Universidade Estadual Paulista  
“Julio de Mesquita Filho”,  
Campus de Rio Claro, para a  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências Biológicas  
(Microbiologia Aplicada).**

***Rio Claro*  
Estado de São Paulo -Brasil  
Janeiro de 2008**

620.1122 Hencklein, Fabiana Aparecida

H494e Estabilização de "landfarming" de refinaria de petróleo, mediante metabolismo microbiano, e aplicabilidade em solos pré-desertificados. – Rio Claro : [s.n.], 2008  
97 f. : il., tabs, gráfs., fots., mapas

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Dejanira de Franceschi de Angelis

1. Biodegradação. 2. Respirometria. 3. Agente descompactante. 4. Vinhaça. 5. Casca de arroz. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI – Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

*À todos que acreditam e lutam por um mundo  
mais justo e limpo, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida;

Agradeço a meus pais (Benedito Hencklein e Maria Judith P. S. Hencklein) por sempre acreditarem em mim;

Agradeço a Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis pelos ensinamentos e por ser, para sempre, minha mãe científica;

Agradeço a meus irmãos (Nádia e Marcelo) pelas conversas sempre construtivas;

Agradeço a meus amigos de graduação que ainda permanecem em Rio Claro e também àqueles que estão longe, mas sempre presentes em minha vida. Vocês sempre farão diferença;

Agradeço aos amigos de pós-graduação pelos almoços, jantares, baladas e também conselhos;

Agradeço aos amigos, técnicos e professores do Departamento de Bioquímica e Microbiologia da Unesp, campus de Rio Claro. Esse trabalho sempre teve o apoio de vocês;

Agradeço ao pessoal do Grupo de Educação Ambiental “Preserve o Planeta Terra: Reciclando” por toda a experiência que vivemos;

Agradeço aos professores e alunos do Cursinho Praxis os quais me fizeram enxergar o quanto gosto de lecionar;

Agradeço aos amigos do Coral “Uirapuru”, pelos bons momentos de aprendizado;

Agradeço aos demais amigos de outros departamentos, institutos, centros de pesquisa e universidades que sempre prestaram apoio a meu enriquecimento científico;

Agradeço ao Prof. Roberto Naves Domingos pelo apoio e conselhos;

Agradeço ao Prof. Newton La Scala Jr. por ceder o aparelho analisador de CO<sub>2</sub>;

Agradeço a meu namorado, que sempre buscou me auxiliar e me fez acreditar cada vez mais na pesquisa científica. “*Enquanto eu respirar...*”;

Agradeço ao Programa de Recursos Humanos (PRH-05) da Agência Nacional de Petróleo pelo apoio financeiro.

## ÍNDICE

	Página
AGRADECIMENTOS .....	iii
RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	3
2.1. Objetivos Gerais .....	3
2.2. Objetivos Específicos .....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
3.1. Solos – Sistema de tratamento de resíduos .....	4
3.2. Biodegradação .....	8
3.2.1. Agentes Descompactantes .....	18
3.2.2. Vinhaça .....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	23
4.1 Material .....	23
4.1.1 Solos .....	23
4.1.2 Matérias Descompactantes .....	24
4.1.3 Aditivo orgânico .....	25
4.1.4 Respirômetros de Bartha & Pramer .....	25
4.1.5 Equipamentos, vidraria, reagentes, meios de cultura e aparelho de absorção óptica no infravermelho .....	26
4.2 Métodos .....	27
4.2.1 Método de coleta do solo de cerrado e do “landfarming” e vinhaça .....	27
4.2.2 Preservação dos solos .....	27
4.2.3 Caracterização físico-química dos solos e vinhaça .....	27
4.2.3.1 Solos .....	28
4.2.3.2 Vinhaça .....	28
4.2.4 Preparo dos solos .....	28
4.2.4.1 Capacidade de Campo (adaptada de ANDERSON e INGRAM, 1996) e Umidade Relativa .....	28
4.2.4.2 Adição dos Agentes Descompactantes .....	29
4.2.5 Ensaio respirométrico .....	30
4.2.5.1 Experimento de Respirometria .....	30
4.2.5.2 Cálculos .....	32
4.2.5.3 Quantificação do número de bactérias e fungos dos tratamentos do ensaio respirométrico .....	33
4.2.6 Ensaio de avaliação do CO <sub>2</sub> produzido utilizando espectroscopia de absorção óptica no infravermelho .....	33
4.2.6.1 Montagem dos Reatores .....	34
4.2.6.2 Leituras da produção de CO <sub>2</sub> .....	36
4.2.6.3 - Avaliação de Temperatura .....	37
4.2.6.4 – Avaliação de pH .....	37
4.2.6.5 - Avaliação do crescimento de bactérias e fungos presentes nos tratamentos .....	37
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO .....	38
5.1. Caracterização dos solos e da vinhaça .....	38
5.2. Ensaio Respirométricos .....	41

5.2.1. Quantidade de CO <sub>2</sub> produzido por dia de tratamento .....	41
5.2.2. Carbono Biodegradado acumulado.....	44
5.2.3. Eficiência de Biodegradação.....	47
5.2.4. Avaliação do crescimento de bactérias e fungos .....	49
5.3. Utilização de espectroscopia de absorção ótica no infravermelho .....	54
5.3.1. Quantificação do CO <sub>2</sub> liberado e acumulado .....	54
5.3.2. Avaliação dos microrganismos presentes nos solos estudados neste ensaio. ....	59
5.3.3. Avaliação da Umidade inicial e final.....	62
5.3.4. Avaliação dos valores de pH inicial e final .....	64
5.3.5. Avaliação dos valores Máximos e Mínimos de Temperatura .....	66
6. CONCLUSÕES .....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70
ANEXO I .....	82
Ensaio respirométricos .....	82
ANEXO II .....	86
Ensaio utilizando espectroscopia de absorção ótica no infravermelho.....	86

## RESUMO

O aumento da população humana tem acrescentado ao meio ambiente grande quantidade e diversidade de compostos. Isto acopla-se ao desenvolvimento das atividades industriais acrescentando novas técnicas que geram novos resíduos. Essas substâncias podem ou não ser degradadas dentro dos processos edáficos. Os microrganismos têm sido por muito tempo os agentes controladores dos resíduos produzidos em nosso planeta, porém, os seres humanos ultrapassaram a capacidade de suporte do ecossistema. Sendo assim, a microbiota necessita de auxílio na biodegradação dos xenobióticos, estes têm sido adicionados aos solos. “Landfarming” consiste na aplicação do contaminante na camada arável do solo, onde esse resíduo é misturado mecanicamente por aração e gradeamento. Nestes sítios as condições físico-químicas são ajustadas para maximizar a atividade microbiana. Este trabalho buscou verificar mediante estudos de respirometria, a biodegradação da matéria orgânica presente no solo de “landfarming” de refinaria de petróleo. Os resultados apontam que a evolução de CO<sub>2</sub> ocorre neste solo e que sua eficiência de biodegradação aumenta (13,9%) quando se adiciona casca de grão de arroz em associação com vinhaça, resíduo proveniente das destilarias de etanol. Também detectou-se que a mistura de solo de cerrado, contendo baixa quantidade de matéria orgânica, pode estimular o aumento na liberação de CO<sub>2</sub> (15,8%). Contudo, quando a essa mistura acrescenta-se casca de grão de arroz e vinhaça, o aumento da evolução de CO<sub>2</sub> é mais pronunciado (78%). A atividade das bactérias e fungos também foi avaliada, mediante contagem das UFC/g/ss, e observou-se aumento de até 300 vezes no número de colônias nos tratamentos em que foram adicionados casca de arroz e vinhaça. Sendo assim, conclui-se que o solo de “landfarming” pode ainda ser estimulado a aumentar a biodegradação das substâncias recalcitrantes se a ele for acrescentado produtos que auxiliem a aeração e forneçam nutrientes, tais como a associação de casca de grão de arroz e vinhaça, agentes utilizados neste trabalho.

## ABSTRACT

The increase of human population added great amount and diversity of composts into the environment. This occurs because of the industrial activities development that adds new technologies, generating new wastes. These substances can or not be degraded by soil processes. The microorganisms have been for much time the controlling agents of residues produced in our planet. However, the human being had exceeded the ecosystem support capacity. So, microbial community needs help in biodegradation of xenobiotics added to soil. "Landfarming" consists in contaminants application at the arable layer of soil, where these wastes are mechanically mixed by tillage and the physico-chemical conditions are adjusted to maximize the microbial activity. This work verified, using respirometric methods, the biodegradation of organic matter present in "landfarming" soil of an oil refinery. The results showed that CO<sub>2</sub> evolution occurs in this soil, and that its biodegradation efficiency increases (13,9%) when added rice grain husk in association with vinasse, an alcohol production waste. We also detected that the mixture with brazilians savanna soil, that has low organic matter amount, can stimulate the increase in CO<sub>2</sub> release. However, when vinasse and rice grain husk are added to this mixture, CO<sub>2</sub> evolution rises up (78%). The activity of the bacteria and fungus was also evaluated by means of UFC/g/ss counting. An increase of 300 times of colonies number was observed at the treatments where rice husk and vinasse had been added. Therefore we conclude that the "landfarming" soil still can be stimulated to increase the recalcitrant substances biodegradation, if these products that assist the aeration and supply nutrients are added, as the association of rice grain husk and vinasse used at this work.

## 1. INTRODUÇÃO

O solo pode ser visto de diversas formas, uma como um importante biotransformador. Essa função foi construída ao longo de muitos anos de evolução dos processos químicos, físicos e biológicos, sendo assim, os solos são formados pela decomposição de rochas e também de animais e plantas, que são incorporados a esse sistema. Nos solos tropicais, mesmo os solos sob vegetação natural possuem baixas reservas de matéria orgânica, pois essas são transformadas rapidamente, devido às altas temperaturas, que são ótimas para a atividade das comunidades microbianas.

O aumento da população humana tem acrescentado grandes quantidades e diversidade de compostos, pois o desenvolvimento das atividades industriais envolve o estabelecimento de novas técnicas, que geram novos resíduos (xenobióticos). Essas substâncias podem ou não ser degradadas dentro dos processos edáficos. Os microrganismos têm sido por muito tempo os agentes controladores dos resíduos produzidos em nosso planeta, porém os seres humanos ultrapassaram a capacidade de suporte do ecossistema.

A atividade microbiana cumpre um importante papel na biodegradação de novos compostos, pois suas respostas fisiológicas podem se adaptar as

mudanças ambientais, que são provocadas pelo número crescente de novos materiais adicionados pelo homem. Deve-se tomar cuidado com as formas e locais de disposição dos resíduos, pois se seu manejo não for bem previsto, eles podem causar sérios problemas ao solo, além das ameaças à qualidade das águas superficiais e subterrâneas, além de ameaçar os próprios solos.

A decomposição de compostos xenobióticos ocorre sem e com a participação dos microrganismos. A biodegradação (degradação devida a microbiota) pode diminuir o tempo de transformação desses compostos e também sua toxicidade, pois a ação catalizadora de suas enzimas diminui a energia necessária para a degradação dos xenobióticos. O uso de processos biológicos para a biodegradação de compostos persistentes, inclui a possível mineralização do contaminante a produtos inócuos ao meio ambiente, como gás carbônico e água.

A biodegradação de resíduos de hidrocarbonetos provenientes das indústrias de refino envolve a atividade de monoxigenases e a clivagem por beta-oxidação, processos dependentes de oxigênio. Sendo assim, embora exista uma grande variedade de microrganismos capazes de oxidar esses compostos, a biotransformação de hidrocarbonetos ocorre, principalmente, por via aeróbia e, o oxigênio pode ser a substância limitante em muitos casos.

Vários fatores podem afetar a biodegradação em solos contaminados com hidrocarbonetos, entre eles, a aeração, a umidade, a temperatura, a textura dos solos, a toxicidade do contaminante e a disponibilidade de nutrientes. A maioria deles é dependente das condições ambientais, porém muito se tem feito para adequar os locais, a fim de otimizar a biodegradação e, uma das maneiras, mais efetivas e menos custosas, é o acréscimo de compostos que aumentam a aeração nos solos e também provêm nutrientes, acréscimo de biomassa e, possibilitam maior estabilidade na umidade. Estes compostos são chamados agentes descompactantes, que podem ser acrescentados aos solos, somente como aeradores, mas também podem possibilitar maior sorção dos contaminantes e, quando tem composição orgânica, ser fonte de nutrientes e biomassa, desta forma, aumentando a biodegradação.

## **2. OBJETIVOS**

### ***2.1. Objetivos Gerais***

Avaliar a biodegradação da matéria orgânica de refinaria de petróleo presente no solo de seu tratamento denominado “landfarming”, mediante os métodos respirométricos de Bartha e Pramer e absorção óptica no infravermelho.

### ***2.2. Objetivos Específicos***

- Avaliar a biodegradação da matéria orgânica presente no solo de “landfarming”, mediante a evolução de CO<sub>2</sub> em função da compactação e presença de vinhaça;
- Investigar a possibilidade de co-disposição de solos de “landfarming” com solo em etapa de pré-desertificação;
- Auxiliar a biodegradação nos processos de recuperação da borra no “landfarming” de refinaria.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1. Solos – Sistema de tratamento de resíduos**

O solo é um grande e complexo sistema de biodegradação construído ao longo de anos, formado pela decomposição de rochas e também de animais e plantas, que são incorporados a esse sistema (PRIMAVESI, 1985).

Moreira e Siqueira (2006) comentam que a presença de uma população microbiana em um ambiente é em função de sua carga genética, que determina suas respostas fisiológicas às condições ambientais predominantes. Além disso, os microrganismos são bastante versáteis em sua adaptação a mudanças, tanto físicas (água, aeração, porosidade, etc.), quanto químicas (disponibilidade de nutrientes e toxicidade de alguns elementos persistentes, como xenobióticos). A quantidade de oxigênio (O<sub>2</sub>) nos solos depende da atividade microbiana, da sua textura, quantidade de água e a profundidade que se está estudando. Profundidades acima de 30 centímetros a concentração de O<sub>2</sub> varia entre 15% em solos secos e 5% em solos úmidos (RHYKERD et al, 1999).

A matéria orgânica do solo é um importante determinante da sua fertilidade, produtividade e sustentabilidade e é um ótimo indicador da qualidade dos solos tropicais nos sistemas agrícolas, porém as baixas reservas de matéria orgânica presentes em solos tropicais, ainda sob vegetação natural, são rapidamente consumidas em poucos anos sob cultivos agrícolas, mesmo em pequenas propriedades (CHIVENGE, et al, 2007 e ZINGORE et al, 2005).

O fluxo de eliminação de gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) do solo cumpre um papel importante dentro do ciclo do carbono. As medições deste fluxo são amplamente utilizadas para avaliar o desempenho deste composto. Quando esta medida é usada como uma avaliação da atividade metabólica da microbiota do solo e das raízes das plantas pode-se entender melhor as características dos controles ambientais sobre a respiração do solo em ecossistemas naturais e nos agroecossistemas (LUND, et al, 1999 e BUTNOR e JOHNSEN, 2004).

Pouco se entende sobre o comportamento da respiração dos organismos heterotróficos e autotróficos nos solos, os processos individuais que contribuem para a respiração total desse sistema e os fatores que os controlam. A respiração do solo nos ecossistemas e agrossistemas, somando-se da respiração microbiana e a decomposição química da serrapilheira e da matéria orgânica presente neste, pode fornecer 80% ou mais de todo o  $\text{CO}_2$  do sistema. Devido às taxas de produção de  $\text{CO}_2$  entre a interface solo-ar serem lentas, grande concentração de  $\text{CO}_2$  acumula-se no solo, dificultando a observação de seu fluxo sem perturbá-lo (BAIN et al, 2005).

Lund et al (1999) fizeram uma revisão das técnicas utilizadas para se mensurar o  $\text{CO}_2$  liberado pelo solo e, em sua maioria, esses estudos utilizam técnicas de câmaras estáticas, porque são relativamente econômicas e de fácil aplicação. Nestas metodologias o  $\text{CO}_2$  difundido pelo solo é capturado em um frasco utilizando-se soluções alcalinas (KOH, NaOH, por exemplo) ou cal sodada. Embora sejam técnicas interessantes, elas podem subestimar ou superestimar a quantidade de  $\text{CO}_2$  liberada pelo sistema. A utilização de cromatografia gasosa em câmaras estáticas parece fornecer dados mais apurados, pois minimiza as mudanças no gradiente de concentração de  $\text{CO}_2$ .

Os autores também citam o uso de analisadores de gás por infravermelho em métodos utilizando câmaras dinâmicas e não estáticas.

O papel do solo na reciclagem de resíduos, principalmente orgânicos, tem recebido crescente atenção nos últimos anos, devido à quantidade e variedade de resíduos e dos métodos de disposição destes. As formas e locais em que os resíduos são dispostos, no entanto, apresentam sérios problemas para a qualidade das águas superficiais e subterrâneas, além de ameaçar os próprios solos, pois a taxa de biodegradação dependerá: do tipo de substrato, da relação espacial (acessíveis ou não) entre os materiais e as células e/ou enzimas e, das condições físico-químicas do micro-habitat. Além disso, nem toda substância, mesmo que orgânica, é passível de degradação por microrganismos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Métodos mais seguros para a disposição de resíduos sólidos perigosos em solos ainda necessitam ser estudados (FULLER e WARRICK, 1985).

Os microrganismos têm sido por muito tempo os agentes controladores dos resíduos produzidos em nosso planeta, porém os seres humanos ultrapassaram sua capacidade de suporte do ecossistema, acrescentando muitos e variados novos produtos e, desta forma, a microbiota necessita de ajuda (PAUL e CLARK, 1996).

Como consequência à aceleração das ameaças causadas pela poluição ao meio ambiente e o nosso incompleto conhecimento de maneiras para estabilizar a dispersão dos poluentes nos ambientes, novos tratamentos e aperfeiçoamentos tem sido pesquisados (FULLER e WARRICK, 1985).

A contaminação dos solos é um efeito típico da atividade industrial. Muitos compostos são transformados em outros materiais por vários processos metabólicos, que podem diminuir ou aumentar sua toxicidade (LANDIS e YU, 1995). A incorporação de matéria orgânica e nutrientes favorece o aumento dos microrganismos heterotróficos presentes no solo, porém à medida que o substrato é consumido ocorre declínio nas populações. Desta forma, torna-se necessário a estimulação de solos rizosféricos, pois aqueles que não o são, tornam-se desertos nutricionais (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Os resíduos carbonáceos de organismos em depósitos biogênicos mostram que a decomposição microbiana ocorre também nas grandes reservas de materiais orgânicos, como carvão e petróleo, portanto são consideradas biodegradáveis se condições ambientais apropriadas forem fornecidas (RICHARDS, 1987). Porém, os impactos à saúde humana e a do meio ambiente associado à presença de hidrocarbonetos do petróleo na subsuperfície causa preocupação (DAVIS, et al, 2003). Afinal, a grande complexidade e variedade de compostos presentes no petróleo dificultam a interpretação das taxas de biodegradação (CAPONE e BAUER, 1992).

Segundo Pelczar, et al (1996) os microrganismos estão associados com o petróleo na sua formação, pois esses estão presentes nos materiais sedimentados em ambientes marinhos e na sua recuperação final dos poços de perfuração, pois algumas bactérias produzem ácido que dissolvem a formação rochosa e, assim o óleo é liberado com maior facilidade. Além disso, os microrganismos fazem parte dos processos de decomposição do petróleo. Aproveitando-se desta propriedade muitas espécies de microrganismos são utilizadas em locais poluídos por petróleo na tentativa de degradar o óleo derramado. Porém, a capacidade de determinadas bactérias – as autótrofas – processarem ainda compostos inorgânicos pode causar sérios contratempos na recuperação do óleo, pois, se não forem controladas, podem gerar corrosão nas tubulações, além de alterar as características físicas dos fluídos.

O tratamento de resíduos em solos pode ocorrer pelas vias:

- pela suplementação de nutrientes, principalmente nitrogênio (N) e fósforo (P) para estimular o crescimento de espécies potencialmente biodegradadoras;

- pela inserção de populações de bactérias modificadas geneticamente, que são adicionadas em culturas puras. Capone e Bauer (1992) comentam que a primeira opção, que é menos complicada e controversa, tem dado resultados promissores.

### 3.2. Biodegradação

Skladany e Metting (1993) definem biodegradação como a atividade biológica que resulta na quebra de um composto. Moléculas complexas são biodegradadas envolvendo o efeito interativo de populações mistas de microrganismos em que os principais componentes são fungos e bactérias. A biodegradação pode ser estudada de diferentes maneiras. Uma delas é observação da degradação de um composto sob condições ambientais bem definidas, sem considerar detalhes da ação da comunidade microbiana. Outra forma é o estudo de culturas puras para identificar os caminhos catabólicos, as enzimas responsáveis e os mecanismos de controle genético.

A biodegradação é um dos principais mecanismos de transformação de xenobióticos no solo, embora sua decomposição também ocorra sem o envolvimento dos microrganismos e suas enzimas, a participação da microbiota neste processo diminui o tempo de degradação e a toxicidade desses compostos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Biodegradação é o mais efetivo e econômico meio de eliminar a capacidade que muitos materiais e compostos orgânicos têm de poluir o meio ambiente. Como uma ferramenta no controle da poluição, ainda começa-se a entender e a utilizar os processos biodegradativos eficientemente, embora estes tenham estado sempre disponíveis nos ambientes (FULLER e WARRICK, 1985). As vantagens de se utilizar a biotransformação (transformação de compostos utilizando processos biológicos) incluem a possível mineralização completa dos contaminantes a produtos inócuos ( $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ ) e a observação que reações enzimáticas mediadas pela microbiota acontecem mais rapidamente do que aquelas em que a participação microbiana não ocorre (BOUWER, 1992).

Algumas relações têm sido propostas para aumentar a biodegradação de compostos derivados do petróleo (CAPONE e BAUER, 1992):

- Otimizar as condições ambientais a fim de maximizar o potencial degradador de contaminantes de bactérias nativas: mediante suplementação

de fatores nutricionais limitantes ao crescimento de microrganismos biodegradadores de hidrocarbonetos;

– Disseminar o meio ambiente contaminado com cepas de bactérias que sejam tolerantes e capazes de degradação rápida de um dado contaminante e, desta forma, suplementando a microbiota autóctone;

– Suplementar as populações naturais com espécies de bactérias que podem ser genomicamente alteradas para suprir a proliferação de caminho metabólico específico.

Os microrganismos demonstram uma grande habilidade em utilizar os mais raros complexos enzimáticos para degradar xenobióticos. Hidrocarbonetos alifáticos são componentes do óleo cru e dos produtos do refinamento do petróleo, incluindo combustíveis. A biodegradação destes compostos envolve atividades de monoxigenases e a clivagem por beta-oxidação. Alguns exemplos desta transformação são (SKLADANY e METTING, 1993):

- n-alcanos de cadeia longa são biodegradados mais lentamente do que os de cadeia curta;

- hidrocarbonetos saturados são mais rapidamente degradados do que seus análogos insaturados;

- o grau de ramificação é inversamente relacionado à taxa de biodegradação e;

- a recalcitrância é comum para os grandes compostos alifáticos metilados.

Segundo Fuller e Warrick (1985), os três processos biológicos mais efetivos no controle da poluição causada por resíduos são:

- Oxidação/Redução;

- Mineralização/Imobilização;

- Síntese de constituintes orgânicos/Reações complexas.

Essas categorias são amplas e representam uma base para discussão dos seus ciclos implícitos. Para que a biodegradação ocorra é necessário um ambiente propício, embora não exista um conjunto ideal de fatores para todos os organismos, há um meio ambiente geralmente considerado ótimo para a

decomposição de matéria orgânica no solo. A temperatura mais adequada está entre 25 e 35°C. A umidade do solo não pode exceder um nível que impeça a aeração ou a difusão do oxigênio, geralmente esse nível está levemente abaixo da capacidade de campo, onde a água ocupa todos os espaços e poros do solo, e também deve estar acima do ponto de murcha das plantas. Outros fatores de controle de biodegradação incluem pH, fonte de energia, aceptores de elétrons e nutrientes essenciais (FULLER e WARRICK, 1985).

Os microrganismos devem transformar os nutrientes disponíveis no meio em formas que são utilizáveis para incorporação em suas células e para a síntese de seus polímeros. As células usam formas reduzidas de polímeros (monômeros) e para essa transformação necessitam de energia e uma fonte de elétrons. Os doadores de elétrons são essenciais para o crescimento celular, pois tornam os nutrientes disponíveis em energia viável, quando o doador os transfere para a um composto aceptor de elétrons (BOUWER, 1992).

A biodegradação de resíduos orgânicos pode ocorrer em um amplo espectro de valores de pH, porém a taxas de decomposição nos pontos extremos são mais lentas. A escala ótima para a maioria dos microrganismos do solo está entre os valores 5,5 e 8,5 de pH. A natureza do resíduo e a taxa de disposição influenciam a disponibilidade de oxigênio e podem influenciar os níveis de pH do solo. Frequentemente a maior influência causada pelos níveis de pH para a microflora é a modificação na disponibilidade de nutrientes (FULLER e WARRICK, 1985).

Muitas indústrias e dentre elas, as refinarias de petróleo, geram grande quantidade de lodo proveniente da decantação nos tanques de estocagem, e este resíduo é um subproduto descartável, que contém uma mistura de hidrocarbonetos, água e sedimentos e alguns são perigosos (ADMON et al, 2001). Desta forma, faz-se necessário a seleção de microrganismos que sejam capazes de biodegradar esse lodo, também chamado de borra oleosa, pois os problemas para a sua disposição final são complexos (KATAOKA, 2001). Kirtland et al (2000) comentam que a atenuação (diminuição) natural de hidrocarbonetos do petróleo requer adequado monitoramento para assegurar-

se que os contaminantes permaneçam apenas no local de estudo e sejam biodegradados pelos processos microbianos.

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

O baixo custo e o sucesso de uma aplicação da biorremediação dependem da precisão do processo de medição das taxas de biodegradação para que se possa prever a efetividade desta e estimar o tempo necessário para que a degradação ocorra (DAVIS, et al, 2003; SKLADANY e METTING, 1993). Landis e Yu, 1995 comentam que é importante usar certos critérios na opção por biorremediação, pois deve-se considerar a complexidade do ambiente, bem como, a concentração dos contaminantes.

Técnicas de biorremediação baseadas nas atividades metabólicas dos microrganismos têm certas vantagens (SABATÉ et al, 2004), pois estimulam os processos naturais de biodegradação, quando a atenuação natural não alcança os limites regulamentados em um tempo razoável. Esses processos de biorremediação são recursos e opções ambientalmente responsáveis para limpar o derramamento de óleo e de combustíveis (PRINCE, 2000). Biorremediação é uma aceleração de fatos naturais e assim uma ótima solução para o problema de poluentes derivados do petróleo que causam muitos transtornos nos ecossistemas.

As tecnologias de biorremediação *in situ* (no local) para a descontaminação dos sedimentos no solo e em águas contaminadas com hidrocarbonetos do petróleo envolvem estimulação dos microrganismos autóctones capazes de degradar contaminantes orgânicos (BOOPATHY, 2003). Usando produtos contaminantes como substrato para gerar energia e crescimento, os microrganismos os convertem em produtos menos perigosos, principalmente CO<sub>2</sub>, massa de células, sais inorgânicos e água (BOOPATHY, 2003; LANDIS e YU, 1995; SKLADANY e METTING, 1993 e BOUWER, 1992). Alguns gêneros de bactéria como *Corynebacterium*, *Mycobacterium* e

*Pseudomonas* podem utilizar os hidrocarbonetos como fonte de carbono (RICHARDS, 1987).

As técnicas de biorremediação são fundamentadas nos processos de biodegradação, mas possuem variações de tratamentos *in situ* ou *ex-situ* (fora do local). A grande maioria dessas técnicas envolve o tratamento em superfície, mas também podem envolver a biorremediação em subsuperfície. Moreira e Siqueira (2006) citando Skipper (1998) comentam alguns tipos e estratégias de biorremediação em solo, apresentados no quadro abaixo.

**Quadro 1** – Tipos e estratégias para biorremediação do solo (Skipper, 1998 apud MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

	<b>Biorremediação</b>	<b>Fundamentos e definições</b>
<i>In situ</i>	Natural	Consiste na degradação intrínseca ou natural pelos microrganismos indígenas do solo.
	Bioestimulação	Consiste na adição de nutrientes, como N e P, para estimular os microrganismos indígenas.
	Bioventilação	É a forma de bioestimulação por meio da adição de gases estimulantes, como O <sub>2</sub> e CH <sub>4</sub> , para aumentar a atividade microbiana decompositora.
	Bioaugmentação	É a inoculação no local contaminado com microrganismos selecionados para degradação do contaminante.
<i>Ex situ</i>	“Landfarming”	É a aplicação e incorporação de contaminantes ou rejeitos contaminados na superfície do solo não contaminado para degradação. O solo é arado e gradeado para promover aeração e mistura uniforme do contaminante.
	Compostagem	É o uso de microrganismos termofílicos aeróbios em pilhas construídas para degradar o contaminante.

Brown e Nadeau (2002) recomendam uma técnica de biorremediação que consiste em duas fases, nas quais há opções de tratamentos passivos e

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

As condições químicas e a matéria orgânica do solo são importantes para a população microbiana cometabolizante, pois muitos contaminantes apresentam baixa degradabilidade e, desta forma, se faz necessário o tratamento do resíduo com surfactantes (químicos ou biológicos) ou agentes pré-oxidantes, pois este procedimento reduz a recalcitrância e acelera a biodegradação (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Sabaté et al (2004) observaram que solos possuem diferenças nas atividades metabólicas dos microrganismos selvagens, sendo assim, a estrutura e composição do solo afetam as características e o comportamento coligativo deste. As propriedades dos solos podem controlar os padrões de emissão de CO<sub>2</sub> pelos microrganismos, uma vez que este é uma das maiores fontes deste gás (LA SCALA et al, 2000a, 2001). Nestas condições a cinética de todo o processo de biodegradação será diferente em cada tipo de solo. O comportamento bifásico dos compostos no solo deve também ser considerado, pois pelo modelo de seqüestro, a proporção inicial de poluentes livres introduzidos no solo é fixada nos nanoporos de suas partículas tornando os compostos inacessíveis aos microrganismos. Assim também certas frações de hidrocarbonetos podem ficar “presas” nesses nanoporos do solo juntamente com os agregados deste tornando-os inacessíveis aos microorganismos (ADMON et al, 2001). Seabra (2001) relata que vários são os fatores que

influenciam a biodegradação dos hidrocarbonetos, entre eles estão: a sua composição química, concentração, estado físico e toxicidade.

A sobrevivência de microrganismos consumidores de hidrocarbonetos em solos diferentes demonstra a presença de uma larga variedade de organismos capazes de oxidar hidrocarbonetos (BHATNAGAR e FATHEPURE, 1991). Mais de 10 milhões de compostos são biodegradáveis e como o número de substâncias químicas sujeitas ao catabolismo microbiano é grande ( $10^6$ ), deve haver equivalente número de enzimas e vias metabólicas ocorrendo na natureza (WACKETT e ELLIS, 1999), porém os microrganismos autóctones podem não ser capazes de biodegradar as diversas substâncias presentes nos compostos derivados de petróleo. Esses organismos geralmente falham ao degradar asfaltos e compostos aromáticos com quatro ou mais anéis, assim, acrescentar microrganismos exógenos já adaptados é uma solução interessante (ATLAS, 1995).

A adição de grande quantidade de biomassa celular de conhecidos biodegradadores de hidrocarbonetos pode ocasionar aumento nas taxas de biodegradação das substâncias presentes nas complexas misturas do petróleo. Atlas (1995) e Rittmann (1992) relataram que a degradação somente ocorrerá se houver algumas interações, como: o contaminante deve estar próximo e disponível ao microrganismo e este deve ser capaz de participar de alguma parte do processo de degradação ou transformação (HOEPPEL e HINCHEE, 1994), porém o simples desaparecimento do material não implica que ele foi totalmente biodegradado (LANDIS e YU, 1995).

Devido a concentrações muito baixas de alguns contaminantes orgânicos no ambiente, eles não sustentam o crescimento microbiano como únicos doadores de elétrons. Desta forma, os contaminantes orgânicos podem continuar a serem transformados pela população microbiana, que obtém a maioria da energia e do carbono de um composto diferente que serve como primeiro substrato, sendo assim esse metabolismo é chamado de “utilização secundária”. Existem casos em que substratos não utilizados como fonte de energia e, que não possuem átomos de carbono para fornecer, necessitam de um composto primário para que o crescimento microbiano aconteça, este

fornece energia e carbono. Este tipo de metabolismo é chamado “cometabolismo”, pois as enzimas, que degradam o substrato não utilizado como fonte de energia, são aquelas utilizadas para degradar os compostos intermediários do composto primário (BOUWER, 1992; SKLADANY e METTING, 1993).

Focht (1993) recomenda o emprego de culturas consorciadas para que o metabolismo microbiano ocasione a biodegradação de compostos bifenílicos. Os inter-relacionamentos entre espécies diferentes são os aspectos chaves da ação de culturas mistas e comunidades microbianas. Assim, as espécies de microrganismos agem em cadeias e as capacidades degradativas diferentes de cada população auxiliam outras, que nada conseguiriam sem a biotransformação de produtos químicos tóxicos a essas (BHATNAGAR e FATHEPURE, 1991). Bottura (1994) constatou que culturas mistas de bactérias e fungos são os principais responsáveis pela biodegradação de substâncias graxas e a aplicação de um surfactante auxilia a ação dos biodegradadores, o que também foi encontrado por Kataoka (2001).

Muitos estudos têm revelado maior eficiência de biodegradação de hidrocarbonetos por culturas mistas (DAVE et al, 1994; AL-HADHRAMI et al, 1995; VENKATESWARAN e HARAYAMAI, 1995; GRADY, 1985). Estes trabalhos comprovam que a capacidade degradativa e a resistência à substâncias tóxicas de uma comunidade são maiores que de uma cultura pura, pois a mineralização de um composto xenobiótico, às vezes, requer a união da atividade de múltiplas enzimas e fatores físico-químicos.

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

forma, as indústrias podem desenvolver produtos mais facilmente biodegradáveis (WACKETT e ELLIS, 1999).

Os pesquisadores comentam sobre as etapas para prever a biodegradação, para os quais são necessários conhecimentos sobre:

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

O tratamento em “landfarming”, onde fertilizantes são adicionados para acelerar a biodegradação dos hidrocarbonetos do petróleo, é uma maneira eficiente de tratar os resíduos e impedir a contaminação do meio ambiente (PAUL e CLARK, 1996). Esse tratamento, por ser um processo de baixo custo para tratamento de grandes volumes de resíduos, tem sido utilizado com sucesso por décadas, como método de biorremediação, para o biotratamento de substâncias derivadas do petróleo e que muitas são liberadas pelas indústrias de refino de óleo (ADMON et al, 2001).

Os testes para biotratamento são compostos por duas fases. A primeira envolve a caracterização microbiológica baseada na enumeração dos microrganismos heterotróficos e degradadores de hidrocarbonetos e a taxa de atividade metabólica. A fase seguinte é a identificação do tratamento mais apropriado mediante a avaliação das várias condições presentes na área de estudo. Na segunda etapa a informação obtida na primeira fase de tratamento ajuda a decidir onde a aplicação da tecnologia de biorremediação em solos contaminados é mais apropriada (SABATÉ et al, 2004). Devem ser realizadas ainda nesta fase testes de toxicidade para se prevenir a contaminação do local.

As substâncias simples são mais rapidamente biodegradadas. Por outro lado, moléculas mais recalcitrantes, devido a sua estrutura química,

tendem a serem biodegradadas lentamente e a acumularem-se no solo. Sugere-se, assim, que interações abióticas podem interferir em processos biológicos, significando que a capacidade de biodegradação dos microrganismos não é o único fator afetando a extensão da biodegradação no solo. Admon, et al (2001) observaram que a taxa de biodegradação do segundo estágio não varia com as diferentes temperaturas, sugerindo que os processos de controle dessa fase não são biológicos. Esses processos podem envolver a capacidade de transformação e o tempo de permanência dos hidrocarbonetos no solo, tornando-os indisponíveis para os microrganismos (SABATÉ et al, 2004). Assim, deve-se criar e manter condições favoráveis para biodegradação durante o período inicial (três semanas) de tratamento para que a máxima capacidade de degradação seja atingida.

O diesel e outros hidrocarbonetos do petróleo são degradados mais rapidamente sobre condições aeróbias, pois o início da biodegradação envolve, geralmente, a oxidação dos substratos por oxigenases (BOOPATHY, 2003). Hidrocarbonetos aromáticos são oxidados por dioxigenases bacterianas usando oxigênio molecular para hidrolisarem intermediários e causar a clivagem dos anéis para formarem ácido pirúvico e mucônico (CAPONE e BAUER, 1992). Os microrganismos mais comumente usados para metabolizar de compostos aromáticos são bactérias dos gêneros *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Vibrio* e *Xantobacter* (BARBIERI, 1997).

As taxas de biodegradação em sistemas anaeróbios são pequenas devido ao decréscimo de acesso ao composto xenobiótico, uma vez que a distribuição da umidade pode influenciar a disponibilidade destes aos microrganismos degradadores. Alguns compostos monoaromáticos que contém oxigênio em sua estrutura química podem ser degradados na ausência de oxigênio, mas para muitos hidrocarbonetos o oxigênio é considerado um fator limitante em sua degradação (DAVIS, et al, 2003). Em termos gerais cadeias ramificadas de alcanos são degradadas mais lentamente do que seus isômeros com cadeia reta (DEL'ARCO e FRANÇA, 1999). Davis, et al (2003) verificaram

que alguns hidrocarbonetos aromáticos quando presentes em misturas são mais facilmente degradados que quando fornecidos individualmente como fonte de carbono.

### **3.2.1. Agentes Descompactantes**

As concentrações de oxigênio e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) na fase gasosa presentes no solo são variáveis que podem indiretamente caracterizar a biodegradação (RICHARDS, 1987). Os processos de oxidação/redução influenciam o comportamento dos poluentes nos solos, da mesma forma como qualquer fator biológico ou químico. Em condições anaeróbias ou de redução, nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), cromatos ( $\text{CrO}_4^{6-}$ ), e outros são os aceptores de elétrons, porém em condições aeróbias o oxigênio cumpre esse papel (FULLER e WARRICK, 1985). A biorremediação utiliza microrganismos biodegradadores para remediar solos contaminados por compostos oleosos. Uma aeração adequada é essencial para que esse microrganismos se tornem ativos, pois neste caso o oxigênio é o acceptor de elétrons que auxilia neste processo. Os métodos mais comuns para promover a aeração do solo são: bombeamento de ar no subsolo, aragem e adicionamento de agentes descompactantes para aumentar a porosidade do solo (RHYKERD, et al, 1999).

Os agentes descompactantes são materiais volumosos de baixa densidade que quando adicionados aos solos diminuem sua compactação, aumentando sua porosidade e a difusão do oxigênio, e pode ajudar a formar agregados de água estável, o que auxilia a comunidade microbiana. Essas alterações melhoram a biodegradação de resíduos em sistemas de compostagem, por isso alguns agentes descompactantes, como serragem, restos de madeira e casca de arroz são utilizados neste sistema. Esses compostos aumentam a aeração e a atividade microbiana (VASUDEVAN e RAJARAM, 2001; RHYKERD, et al, 1999).

O sucesso na biodegradação de compostos provindos do petróleo tem relação direta com a quantidade de oxigênio presente no processo, pois sua

degradação acontece principalmente por via aeróbia. Desta forma, faz-se necessário garantir sua presença dentro do processo, seja proporcionando a aeração por meios físicos ou adicionando materiais descompactantes que garantam a entrada de ar no sistema, para que o oxigênio não seja limitante e, assim, propiciar o fluxo de elétrons da bioxidação, a disponibilidade de N, P e outros nutrientes são essenciais. Os agentes descompactantes facilitam a difusão de O<sub>2</sub> favorecendo a biodegradação de hidrocarbonetos mediante metabolismo aeróbio, que pela seqüência natural transformam-se em álcoois, aldeídos e ácidos carboxílicos antes da etapa da cisão em cadeias de moléculas monoméricas (HIGGINS e BURNS, 1975).

Os lodos de refinaria de petróleo necessitam de uma relação C:N inferior a 10:1, por isso a importância de se verificar o tipo de solo, seu teor de matéria orgânica e a concentração de nitrogênio no sistema (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Os organismos biodegradadores de contaminantes geralmente encontram-se localizados na superfície dos solos, indicando que a biodegradação de contaminantes hidrofóbicos é realizada em sua maioria em condições aeróbias (SCHOEFS et al, 2003). O estudo das emissões de CO<sub>2</sub> é uma tarefa importante, uma vez que está relacionado com muitos problemas ambientais (LA SCALA, et al, 2000b).

A evolução do crescimento microbiano e o contato entre os microrganismos e o contaminante permitem identificar duas fases limitantes: o limite do crescimento microbiano e a fase limitante de biocontato. Isso é interessante, pois indica que durante o processo de biodegradação deve-se buscar aumentar o biocontato, inserindo biosurfactantes, mudando a quantidade de água ou revolvendo o solo. Rhykerd et al (1999) compararam a adição de agentes descompactantes (orgânicos e inorgânicos) e métodos físicos de aeração do solo. Neste estudo os autores observaram que os agentes descompactantes orgânicos associados à aragem obtiveram os melhores resultados, porém esse sistema de revolvimento de solo ocasiona grandes perdas de matéria orgânica, o que em solos tropicais é prejudicial devido à sua alta taxa de biodegradação natural. Estes verificaram ainda que

solos com características arenosas, fornecem baixa proteção física à matéria orgânica (CHIVENGE, et al, 2007).

Segundo Embar et al (2006), uma série de fatores pode afetar o grau e a extensão da biorremediação *in situ* de solos contaminados com óleo, entre eles, as condições ambientais (predominantemente a umidade e a aeração) e disponibilidade de nutrientes (nitrogênio e fósforo). Uma das maneiras mais efetivas e menos custosas de se prover aeração no solo é pela introdução de minerais de argila, como a vermiculita. Quando introduzidos no solo, essas substâncias podem trocar cátions com íons orgânicos carregados positivamente, resultando numa diminuição na polaridade e facilitando a sorção de contaminantes hidrofóbicos, como o óleo cru (EMBAR, et al, 2006).

Gray, et al (2000) observaram lenta degradação na transformação de contaminantes no solo e essa dificuldade na biodegradação foi atribuída a fatores físicos como difusão de partículas ou forte atração destas à matéria orgânica presente no material estudado. A biodegradação do petróleo pode ser acentuada por uma alta taxa de aeração, porque a disponibilidade de oxigênio é essencial para a atividade das enzimas degradadoras de hidrocarbonetos do petróleo (mono- ou dioxigenases). A aeração do solo e, conseqüentemente, a biodegradação de hidrocarbonetos pode ser estimulada pela adição de vários minerais que agirão como agentes descompactantes (EMBAR, et al, 2006).

Além de proporcionar aeração os agentes descompactantes podem auxiliar na biodegradação fornecendo massa microbiana e também nutrientes se for enriquecido. Madejón et al (2001) estudaram a co-compostagem de vinhaça, resultante da produção de açúcar de beterraba, utilizando resíduos de difícil degradação resultantes da agricultura, neste caso, cascas de uva e resíduo do descaroçamento de algodão. Os autores observaram que o composto resultante apresentava alta concentração de matéria orgânica e nutrientes e baixa toxicidade, sendo assim concluíram que a co-compostagem pode ser um método interessante para a reciclagem das frações orgânicas de resíduos. Essa metodologia pode prover a necessidade da correção nos níveis de nutrientes de solos que naturalmente apresentam baixa concentração de nutrientes.

### 3.2.2. Vinhaça

A vinhaça é o resíduo líquido resultante da destilação do álcool obtido pela fermentação do caldo da cana-de-açúcar ou de resíduos de fabricação de açúcar. É produzida em grandes quantidades, cerca de 10 a 15L de vinhaça por litro de álcool produzido (LAMONICA, 2006 e DEMATTÊ et al, 2004). Devido a sua composição orgânica e inorgânica a maioria da vinhaça produzida é aplicada nos próprios solos de plantações de cana-de-açúcar como um fertilizante aquoso (BENKE, et al, 1999). Gómez e Rodríguez (2000) comentam a ação corrosiva da vinhaça e seu alto poder contaminante em águas superficiais. Os autores também discursam sobre os altos níveis de potássio, cálcio e matéria orgânica presentes, assim como pequenas proporções de nitrogênio e fósforo, sendo assim a vinhaça pode representar uma alternativa para suprir os nutrientes na produção de grãos.

Embora a aplicação deste resíduo apresente certas vantagens para o solo, nas últimas décadas, sua aplicação têm se efetuado indiscriminadamente. Isso fez com que fossem identificados problemas com a quantidade de alguns elementos presentes no solo, como o aumento de potássio, podendo atingir proporções não compatíveis com outros elementos presentes, resultando em riscos de fertilidade, produtividade e poluição dos solos e aquíferos (DEMATTÊ et al, 2004). Faz-se necessário uma avaliação mais apurada deste resíduo e seu efeito no meio ambiente, utilizando novas metodologias.

A vinhaça, resíduo do processo de fermentação do álcool, consiste numa fonte de carbono e sais minerais solúveis, e a sua adição pode modificar temporariamente alguns atributos químicos e biológicos do solo, como o pH, o C orgânico, a acidez trocável, a atividade e a biomassa microbiana, os quais interferem diretamente na biodegradação natural de compostos presentes no solo (PRATA, et al, 2001). Silva et al (2005) observaram que a adição de vinhaça, gerada pela destilação do álcool, diminui a dispersão de sólidos pequenos, como a argila, eles relacionaram esse resultado a presença de cátions flocculantes como cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ). Esse efeito pode ser interessante em solos arenosos, pois aumenta a quantidade de argila e assim a

retenção de água no meio, porém Tejada et al (2006; 2007) observaram que a vinhaça, provinda da produção de açúcar de beterraba, presente em altas doses em solos pode ser responsável pela degradação da estrutura desse, devido à alta concentração de cátions monovalentes e de ácidos fúlvicos, que ao contrário dos ácidos húmicos, apresentam baixa polimerização. Além disso, Tejada, et al (2007) afirmam que essa vinhaça apresentou impacto prejudicial nas propriedades biológicas (biomassa microbiana, respiração do solo, atividades enzimáticas a urease, protease, glucosidase, fosfatase). Tejada e Gonzalez (2006) afirmam a preferência pela adição dessa vinhaça previamente decomposta com o auxílio de resíduos persistentes da agricultura.

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

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

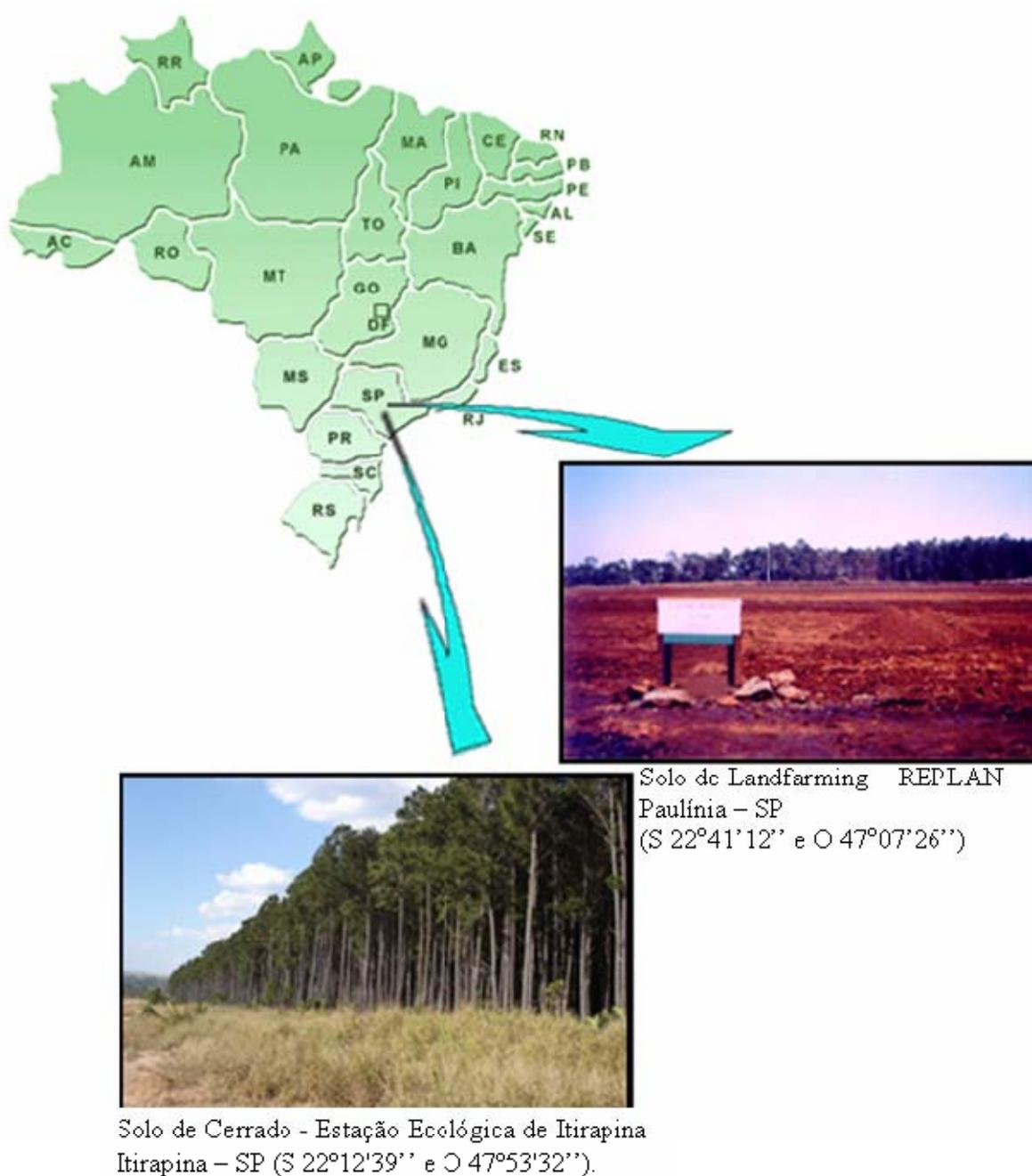
### ***4.1 Material***

#### **4.1.1 Solos**

Foram utilizados neste estudo dois tipos de solos com o intuito de comparar as suas diferentes taxas de biodegradação (Figura 1).

O solo de cerrado (SC) foi coletado na Estação Ecológica de Itirapina localizada entre os Municípios de Itirapina e Brotas, no Estado de São Paulo, Brasil (S 22°12'39" e O 47°53'32").

O solo de "landfarming" (SL), aqui denominado, foi coletado na superfície de uma das células reservadas para tratamento de borra oleosa mediante "landfarming" da Refinaria de Petróleo – REPLAN, localizada no município de Paulínia, estado de São Paulo, Brasil (S 22°41'12" e O 47°07'26").



**Figura 1** – Localização dos pontos de coleta dos solos utilizados neste estudo.

#### 4.1.2 Matérias Descompactantes

Utilizaram-se dois tipos de materiais descompactantes, um orgânico e outro inorgânico, buscando aumentar a porosidade do solo. A casca de grão de

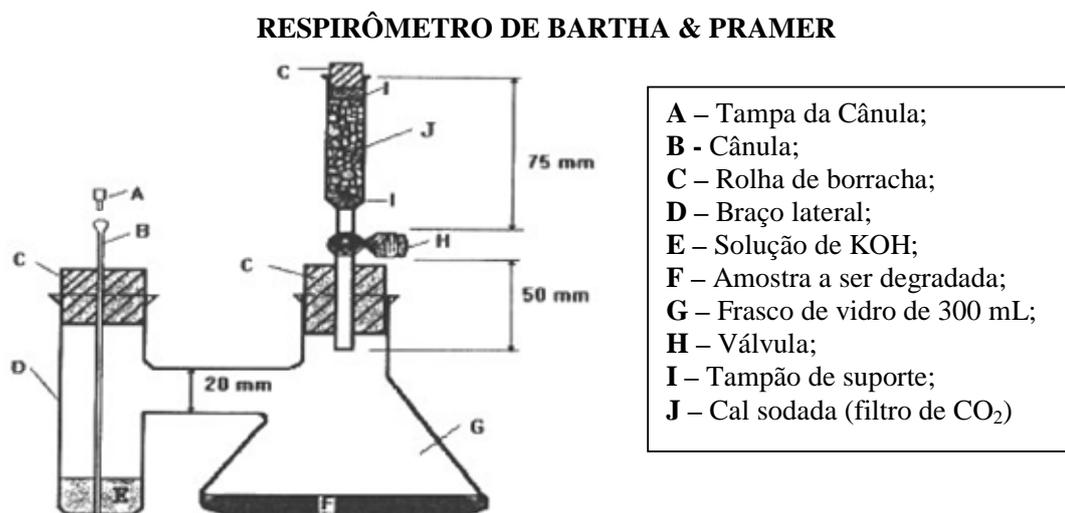
arroz (ca) foi o material orgânico utilizado e a argila expandida (ae) o inorgânico.

#### 4.1.3 Aditivo orgânico

Para avaliar o desempenho do solo perante a complementação de nutrientes utilizou-se a vinhaça, resíduo da destilação do álcool, como aditivo orgânico. Este composto foi coletado na Usina Santa Lúcia, município de Araras, estado de São Paulo (S 22°20'12" e O 47°24'29").

#### 4.1.4 Respirômetros de Bartha & Pramer

Este respirômetro é constituído de duas câmaras interligadas, onde uma contém o substrato, que está sendo analisado, e a segunda possui uma solução alcalina (hidróxido de potássio 0,2N – KOH), que reage como CO<sub>2</sub> liberado pela biodegradação do substrato, que ocorreu na primeira câmara (Figura 2).



**Figura 2** – Desenho esquemático do respirômetro de Bartha & Pramer

#### **4.1.5 Equipamentos, vidraria, reagentes, meios de cultura e aparelho de absorção óptica no infravermelho.**

- Vidraria usual de laboratório de microbiologia;
- Medidor eletrônico de pH modelo DMPH – 2 (Digimed);
- Balança de precisão de  $\pm 0,001\text{g}$  modelo ADA 210L (marca: Adam Equipament)
- Peneira com abertura de 1,62mm
- Estufa 105 °C modelo 315SE (marca: Fanem);
- Água destilada isenta de CO<sub>2</sub>;
- Solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,2N;
- Solução indicadora de vermelho de metila;
- Solução indicadora de fenolftaleína;
- Solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1N;
- Solução de carbonato de potássio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 0,1N;
- Solução de Cloreto de bário (BaCl<sub>2</sub>) 1N;
- Solução salina (NaCl) 0,85%;
- Meio de cultura para bactérias “Plate Count Agar” – PCA (marca: Acumedia – Neogen);
- Meio de cultura para fungos extrato de malte com agar (marca: Criterion – Hardy Diagnostics);
- Autoclave – modelo 105 (marca: SOC. FABBE);
- Shaker;
- Espectrofotômetro de absorção óptica no infravermelho - LI-COR 820 Gas Analyzer- (marca: Li-Cor);
- Termômetro de máxima e mínima (marca: Incoterm);
- Câmara Fria (marca: Líder);
- Baldes de 20 litros;
- Baldes de 2 litros;
- Estabilizador eletrônico;
- Ventoinha elétrica para disco rígido;
- Bomba aspiradora de secreção modelo MA 520 (marca: AspiraMax).

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 Método de coleta do solo de cerrado e do “landfarming” e vinhaça**

O solo de cerrado (SC) foi coletado, de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (1986), Norma Técnica NBR 6.457: Amostras de solo - Preparação para ensaios de compactação e ensaios de caracterização.

O solo de “landfarming” (SL) foi coletado, de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (2004), NBR 10.007: Amostragem de resíduos.

A vinhaça foi coletada de acordo com a Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (2006), Norma Técnica P4.231: Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação em solo agrícola.

### **4.2.2 Preservação dos solos**

Após a coleta os dois solos utilizados neste trabalho foram armazenados em câmara fria à 4 °C, para preservar sua composição e microbiota, até sua utilização nos ensaios.

### **4.2.3 Caracterização físico-química dos solos e vinhaça**

A análise físico-química das amostras de solos e vinhaça foi realizada no início dos experimentos pelo Instituto Campineiro de Análise de Solo (ICASA). As leituras realizadas pelo ICASA são feitas em Espectrômetro de emissão por Plasma (ICP - Inductivity Coupled Plasma). Excetuando-se a determinação da capacidade de campo e umidade relativa, descritas a seguir.

No início de cada ensaio foi realizada a análise de matéria orgânica (MO) de cada tratamento, pelo mesmo Instituto, para que se pudesse realizar os cálculos de eficiência de biodegradação (EB), explicados adiante.

#### **4.2.3.1 Solos**

Os solos foram analisados no início dos experimentos. Os compostos analisados foram: pH, matéria orgânica (MO), macronutrientes (K, fósforo residual (Pres), Ca, Mg e S), micronutrientes (Na, Fe, Al, Mn, Cu, Zn e B) soma de bases (SB), capacidade catiônica (CTC), metais pesados (Ba, Cd, Cr, Ni e Pb) e textura dos solos.

#### **4.2.3.2 Vinhaça**

As análises na vinhaça utilizada neste estudo foram: pH, MO, macronutrientes, micronutrientes e metais pesados.

#### **4.2.4 Preparo dos solos**

##### **4.2.4.1 Capacidade de Campo (adaptada de ANDERSON e INGRAM, 1996) e Umidade Relativa**

Para a montagem dos experimentos, tanto respirométricos quanto utilizando-se o LI-COR 820, os solos foram secos ao ar e peneirados em peneira ABNT com gramatura de 1,62mm. Foi realizada a medida da capacidade de campo (CC) e acertada a umidade para 70% da CC.

A capacidade de campo dos solos e das misturas utilizadas, consiste na determinação da quantidade de água necessária para se obter a saturação do solo. A capacidade de campo foi calculada mediante método gravimétrico saturando-se o solo (S1) e, após período de 24 horas, foi pesado  $1 \pm 0,001\text{g}$  do material em cadinho (SCa), previamente seco e tarado, e levado à estufa  $105^\circ\text{C}$ , por 24 horas. Após esse período, o conjunto cadinho + solo (S1SCa) foram pesados e, calcula-se a quantidade máxima de água (A1) para se saturar o material estudado (Equação 1).

$$A1 = (S1SCa) - (SCa) \quad \text{Equação (1)}$$

Para se calcular a umidade já existente nos solos e tratamentos, retirou-se cerca de  $1 \pm 0,001$  g de substrato (S2), de cada tratamento, e colocou-se em cadinhos (C), previamente secos e tarados (CS2). Após, 24 horas de permanência em estufa a  $105^\circ\text{C}$ , pesou-se o conjunto (cadinho + substrato – CS3), e calculou-se a água existente (A2) da seguinte forma (Equação 2):

$$A2 = (CS2-CS3) \quad \text{Equação (2)}$$

A Umidade relativa é calculada da seguinte forma (Equação 3):

$$U (\%) = (A2/A1) \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

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

#### **4.2.4.2 Adição dos Agentes Descompactantes**

Nos experimentos analisou-se o emprego de agentes descompactantes na otimização da biodegradação da matéria orgânica presente nos solos estudados.

Nos ensaios respirométricos foram utilizados dois tipos de agentes: casca de arroz e argila expandida. Esses compostos foram acrescentados na porcentagem de 10% em relação à quantidade total de substrato utilizado em cada respirômetro.

Nos ensaios de avaliação do  $\text{CO}_2$  produzido, utilizando espectroscopia de absorção ótica no infravermelho, acrescentou-se apenas casca de arroz como agente descompactante na proporção de 5% do volume total de solo presente no reator, onde esse agente foi utilizado.

## 4.2.5 Ensaio respirométrico

Este ensaio foi realizado segundo a Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (1990), Norma Técnica L.6.350: Solos – Determinação da Biodegradação de Resíduos – Método respirométrico de Bartha e segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas (1999), NBR 14.283: Resíduos em solo – Determinação da biodegradação pelo método respirométrico. Estas normas utilizam a quantificação de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) produzido em um sistema fechado (respirômetro).

### 4.2.5.1 Experimento de Respirometria

O experimento foi realizado em oito tratamentos com três repetições para cada um, nos dois ensaios foram executados.

O primeiro ensaio buscou avaliar a ação dos seguintes agentes descompactantes:

- casca de arroz (ca);
- argila expandida (ae)

Essa complementação foi feita nos dois tipos de solos a seguir:

- Solo de cerrado (SC)
- Solo de “landfarming” (SL)

Esse ensaio teve a duração de 108 dias e foi realizado segundo protocolo descrito na tabela 1.

**Tabela 1** – Primeiro ensaio respirométrico empregando solo de cerrado e de “landfarming, casca de arroz e argila expandida (SC – solo de cerrado; SCca – SC + casca de arroz; SCae – SC + argila expandida; SCcae – SC + casca de arroz + argila expandida; SL – solo de “landfarming”; SLca – SL + casca de arroz; SLae – SL + argila expandida; SLcae – SL + casca de arroz + argila expandida)

Componentes	SC	SCca	SCae	SCcae	SL	SLca	SLae	SLcae
Solo de cerrado (50g)	+	+	+	+	-	-	-	-
Solo de “landfarming” (50g)	-	-	-	-	+	+	+	+
Casca de Arroz (g)	-	5	-	2,5	-	5	-	2,5
Argila Expandida (g)	-	-	5	2,5	-	-	5	2,5

(+) presença; (-) ausência – os números significam as quantidades adicionadas.

O segundo ensaio analisou a adição de 25% de solo de “landfarming” no solo de cerrado (75%), além do acréscimo de casca de arroz, como agente descompactante, e vinhaça, como aditivo orgânico. Esse experimento foi realizado durante 122 dias. O segundo ensaio respirométrico foi executado segundo o protocolo da tabela 2.

**Tabela 2** – Segundo ensaio respirométrico empregando solo de cerrado e de “landfarming, casca de arroz e vinhaça (SC – solo de cerrado; SCca – SC + casca de arroz; SCv – SC + vinhaça; SCcav – SC + casca de arroz + vinhaça; SL – solo de “landfarming”; SLca – SL + casca de arroz; SLv – SL + vinhaça; SLcav – SL + casca de arroz + vinhaça

Componentes	SC	SCca	SCv	SCcav	SCSL	SCSLca	SCSLv	SCSLcav
Solo de cerrado (g)	50	50	50	50	37,5	37,5	37,5	37,5
Solo de “landfarming” (g)	-	-	-	-	12,5	12,5	12,5	12,5
Casca de Arroz (g)	-	5	-	5	-	5	-	5
Vinhaça (mL)	-	-	8	8	-	-	8	8
Água (mL)	8	8	-	-	8	8	-	-

(-) ausência – os números representam as quantidades acrescentadas

A solução alcalina foi periodicamente retirada e repostada, tomando-se os cuidados para impedir a entrada de CO<sub>2</sub> externo (utilizou-se coluna de cal sodada), buscando-se avaliar a taxa de biodegradação durante o tempo. Após a retirada, esta foi transferida para um erlenmeyer de 150mL, onde foi acrescentado 1mL de cloreto de bário (BaCl) 1N e 2 gotas de solução de fenolftaleína, como indicador ácido-base. Titulou-se com ácido clorídrico (HCl) 0,1N e anotou-se a quantidade de ácido utilizada, para alcançar a viragem do indicador na solução alcalina.

Este procedimento foi realizado para todos os respirômetros. Um frasco contendo solução alcalina recentemente preparada e dos demais componentes anteriores foi também titulado com HCl 0,1N. Este frasco foi considerado a solução em branco, cujo valor foi comparado com as leituras feitas nos respirômetros.

#### 4.2.5.2 Cálculos

##### - Produção de CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>p)

A quantidade de CO<sub>2</sub> produzido foi calculado a partir da fórmula (Equação 4):

$$CO_{2p} = (A-B) \times 50 \times f_{HCl} \quad \text{Equação (4)}$$

**Onde:**

**A** = volume de HCl 0,1N gasto para titular o branco, em mL.

**B** = volume de HCl 0,1N gasto para titular o tratamento, em mL.

**50** = fator para transformar equivalente em μmol de CO<sub>2</sub>

**f<sub>HCl</sub>** = fator do HCl 0,1N (0,1/normalidade do HCl utilizado)

O cálculo do CO<sub>2</sub> produzido devido à biodegradação (CO<sub>2</sub>b) é feito subtraindo-se a quantidade de CO<sub>2</sub>p no respirômetro controle (somente com solo) da quantidade obtida no respirômetro teste.

##### - Carbono Biodegradado (Cb)

Admitindo-se que 50% do carbono biodegradado se transforma em CO<sub>2</sub> e que os 50% remanescentes se incorporam ao solo sob a forma de húmus e biomassa, o valor é calculado pela fórmula (Equação 5):

$$Cb = 2 \times CO_{2b} \quad \text{Equação (5)}$$

##### - Eficiência de Biodegradação (EB)

A EB é calculada da seguinte forma (Equação 6):

$$EB (\%) = (C_b/C_i) \times 100 \quad \text{Equação (6)}$$

**Onde:**

**C<sub>i</sub> (μmol)** = quantidade de carbono inicial aplicada por 50g de solo, assim calculada (Equação 7):

$$C_i = COT/12$$

**Equação (7)**

**COT**= carbono orgânico total inicial, em μg/g

**12** = fator de conversão, em μg/μmol de carbono.

#### **4.2.5.3 Quantificação do número de bactérias e fungos dos tratamentos do ensaio respirométrico**

A avaliação do desenvolvimento de microrganismos foi realizada mediante contagem das Unidades Formadoras de Colônias por grama de solo seco (UFC/g/ss) no início e final do ensaio respirométrico.

Preparou-se uma suspensão de solo misturando-se 10g com 90mL de solução salina estéril (0,85% de cloreto de sódio - NaCl). Após a agitação de 15 minutos, aguardou-se 5 para decantação e coletou-se o líquido sobrenadante. Este foi adequadamente diluído para os plaqueamentos e posterior contagens das colônias de microrganismos. Os meios utilizados foram: Plate Count Agar (PCA) para bactérias e extrato de malte com agar para fungos. Após a inoculação, as culturas foram mantidas a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  para bactérias e  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  para fungos. Para quantificar a UFC/g/ss verificou-se o peso seco do solo mediante sua secagem em estufa  $105^\circ\text{C}$  por duas horas.

#### **4.2.6 Ensaio de avaliação do CO<sub>2</sub> produzido utilizando espectroscopia de absorção ótica no infravermelho**

Este ensaio foi realizado utilizando-se reatores contendo os solos preparados da forma como no item 3.2.4. Utilizou-se o aparelho LI-COR 820,

fabricado pela companhia Li-Cor, Nebraska, EUA. Esse dispositivo utiliza a luz infravermelha para quantificar o gás carbônico presente na amostra (Figura 3).



**Figura 3** – Aparência interna (a) e externa (b). LI – 820 CO<sub>2</sub> Gas Analyzer.

#### 4.2.6.1 Montagem dos Reatores

O experimento foi realizado em laboratório, a temperatura oscilou durante o período do experimento de 26°C a 36°C. Os reatores eram de 20 litros e continham 10 litros de solo, alcançando uma coluna de solo com profundidade de 30 cm. Além destes, foram realizados três tratamentos contendo solo esterilizado em vapor úmido (autoclave) em reatores de 10 litros com 5 litros de solo alcançando uma coluna de solo de 20 cm de profundidade (Figura 4).

Foram analisados os comportamentos dos dois solos supracitados e de uma mistura de 25% em volume de solo de “landfarming” com 75% de solo de cerrado. Analisou-se também o ar atmosférico do local em que os reatores se encontravam.



**Figura 4** – Reatores com as respectivas câmaras de armazenamento. A – reatores em triplicata; B – Detalhe de reator com câmara conectada a mangueira.

Os tratamentos foram realizados em triplicata, excetuando-se os tratamentos esterilizados, de acordo com protocolo apresentado no Quadro 2.

**Quadro 2.** Descrição das leituras realizadas durante o ensaio de avaliação do CO<sub>2</sub> produzido utilizando espectroscopia de absorção ótica no infravermelho.

<b>Tratamentos</b>	<b>Descrição dos Tratamentos</b>
<b>SC</b>	Solo de cerrado (SC)
<b>SCca</b>	Solo de cerrado com casca de arroz (ca)
<b>SCv</b>	Solo de cerrado com vinhaça (v)
<b>SCcav</b>	Solo de cerrado com casca de arroz e vinhaça (cav)
<b>SCSL</b>	SC com 25% de solo de “landfarming” (SL)
<b>SCSLca</b>	SC com 25% de solo de “landfarming” e ca
<b>SCSLv</b>	SC com 25% de solo de “landfarming” e vinhaça
<b>SCSLcav</b>	SC com 25% de solo de “landfarming”, ca e vinhaça
<b>SL</b>	Solo de “landfarming”
<b>SLca</b>	Solo de “landfarming” com casca de arroz
<b>SLv</b>	Solo de “landfarming” com vinhaça
<b>SLcav</b>	Solo de “landfarming” com casca de arroz e vinhaça
<b>SCE</b>	Solo de cerrado esterilizado
<b>SCSLE</b>	SC com 25% de solo de “landfarming” esterilizado
<b>SLE</b>	Solo de “landfarming” esterilizado

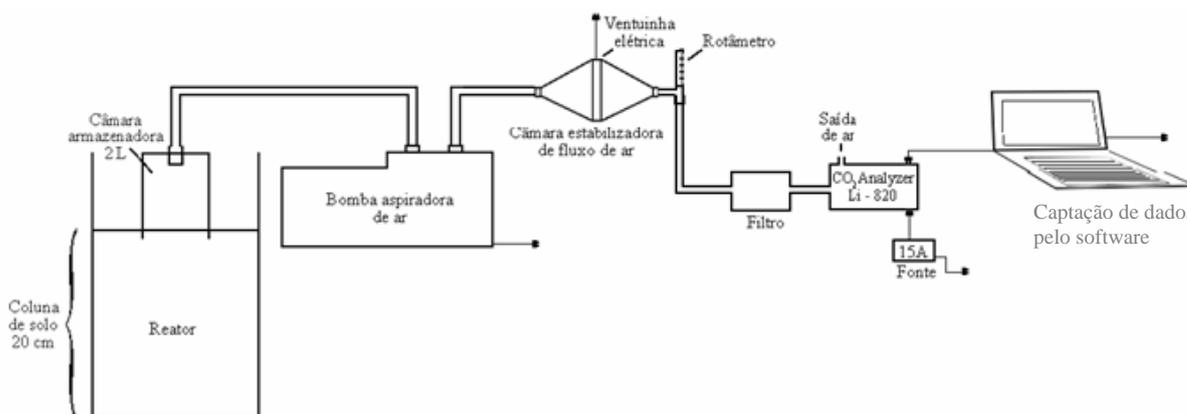
#### 4.2.6.2 Leituras da produção de CO<sub>2</sub>

A atividade microbiana foi avaliada comparativamente mediante a produção de CO<sub>2</sub>, que foi armazenado em câmaras, com volume de 2 litros, colocadas sobre a coluna de solo dos reatores. Os gases armazenados foram succionados por uma bomba de ar e fluía para o analisador de CO<sub>2</sub> (LI-COR 820), que utilizando a espectroscopia de absorção ótica no infravermelho quantificava a concentração de CO<sub>2</sub>.

As quantificações foram realizadas diariamente, durante os primeiros 15 dias e a seguir fizeram-se medições a cada dois dias. Constatou-se que o CO<sub>2</sub> produzido mantinha-se armazenado dentro da câmara colocada sobre a coluna de solo do reator.

Para quantificar o CO<sub>2</sub> produzido continuamente pelos microrganismos foi necessário realizar sucção seguida do ar contido nas câmaras armazenadoras durante certo tempo para que os valores registrados no equipamento demonstrassem serem significativos, desta forma procedia-se a quantificação do CO<sub>2</sub> presente dentro das câmaras.

Nas medições realizadas estabeleceu-se um tempo pré-determinado de 5 minutos de sucção em cada câmara para as leituras. O registro dos valores era realizado a cada 5 segundos, resultando num total de 60 valores registrados. Desta forma, para um resultado integral do comportamento do solo de cada reator, realizava-se a média aritmética desses 60 valores obtidos durante 5 minutos de aspiração realizada de cada câmara (Figura 5).



**Figura 5** – Fluxograma da sucção de CO<sub>2</sub> no experimento utilizando o detector de CO<sub>2</sub> – LICOR 820.

#### 4.2.6.3 - Avaliação de Temperatura

As medidas de temperatura foram efetuadas todos os dias de leitura utilizando-se um termômetro de máxima e mínima, mantido no local dos reatores.

#### 4.2.6.4 – Avaliação de pH

Este parâmetro também foi avaliado no início e após o término dos experimentos.

Foram pesados 10g de solo de cada tratamento em becker de 150 mL , onde adicionou-se 50 mL de água destilada. Essa solução foi agitada com agitador magnético por 15 minutos e após 5 minutos procedeu-se a medição do pH da solução sobrenadante.

#### 4.2.6.5 - Avaliação do crescimento de bactérias e fungos presentes nos tratamentos

A avaliação do crescimento de bactérias e fungos foi efetuada, da mesma maneira que nos ensaios respirométricos (item 3.2.5.3).

## **5. RESULTADOS e DISCUSSÃO**

### **5.1. Caracterização dos solos e da vinhaça**

As tabelas 3; 4 e 5 inserem os dados de granulometria, elementos químicos e características físico-químicas dos dois solos utilizados neste estudo. Mediante estes dados, pode-se constatar diferenças entre os solos. O solo de cerrado (SC) analisado tem granulometria arenosa apresenta pouca quantidade de matéria orgânica e também de íons quando comparado com o solo de “landfarming” (SL). O único elemento químico que o solo de cerrado apresenta em maior quantidade é o alumínio (Al). As principais características apresentadas por Coutinho (2000) sobre os solos de cerrado são: textura predominantemente arenosa, baixo teor de matéria orgânica (em 3 e 5%), pH baixo (entre 4 e 5) e altos níveis de íons de alumínio ( $Al^{3+}$ ). O que coincide com os resultados expressos nas tabelas 3; 4 e 5.

**Tabela 3** – Composição granulométrica e tipo do solo de cerrado e do solo de “landfarming”

Tipos de solo	Areia		Argila	Silte	Cascalho
	Grossa	Fina			
SC	47,0	39,0	9,9	4,1	0,0
SL	21,4	18,1	41,1	19,4	0,0

O solo de “landfarming” (SL) possui características argilosas e grande quantidade de matéria orgânica, proveniente da refinaria de petróleo. A maior parte são hidrocarbonetos originários do petróleo nos tanques de estocagem. Neste resíduo, juntamente com os hidrocarbonetos estão agregados metais pesados, como: bário (Ba), cromo (Cr) e níquel (Ni) que vão se acumulando ao longo do período de tratamento no landfarming. Outros elementos encontrados são:

**Tabela 4** – Quantificação de alguns elementos químicos encontrados no solo de cerrado e solo de “landfarming”

Tipos de Solos	Na	Fe	Mn	Cu	Zn	B	Ba	Cd	Cr	Ni	Pb
	mg/dm <sup>3</sup>										
SC	3,0	25,0	0,6	0,9	0,9	0,2	14,4	<0,01	11,9	<0,01	<0,01
SL	195,0	112,0	13,8	3,2	84,8	2,0	493,4	<0,01	400,2	104,5	18,8

Cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), sódio (Na) e ferro (Fe). Estes elementos estão presentes no petróleo bruto e na borra oleosa. Como a borra é tratada continuamente no “landfarming” por aplicações sucessivas, os elementos químicos vão sendo acumulados. Os sais contidos no solo de “landfarming” são, predominantemente, advindos da água de produção. O resíduo de “landfarming” é considerado resíduo perigoso segundo Associação Brasileira de Normas Técnicas (2004), NBR 10.004: Resíduos Sólidos – Classificação.

**Tabela 5** – Características físicas e químicas dos solos utilizados.

Tipos de Solos	pH	MO	K	Ca	Mg	Al	SB	CTC	Pres	S
		g/dm <sup>3</sup>							mmolc/dm <sup>3</sup>	
SC	4,0	8,0	0,6	1,0	1,0	1,0	2,7	27,7	8,0	10,0
SL	5,0	115,0	1,8	75,0	75,0	27,0	112,2	14,02	115,0	760,0

MO: matéria orgânica; SB: soma de bases; CTC: capacidade de troca catiônica; Pres: fósforo residual

A capacidade de troca catiônica (CTC) e a soma de bases (SB) são bem maiores no solo de “landfarming”, talvez devido à textura, pois esse tem composição predominantemente argilosa e alta concentração dos cátions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^+$ ,  $\text{Zn}^+$  e  $\text{Ba}^{2+}$ ). Esses parâmetros estão altamente relacionados à disponibilidade de nutrientes, pois auxiliam na troca de íons (cátions e ânions).

As tabelas 6 e 7 inserem as características da vinhaça utilizada como aditivo orgânico neste trabalho. Os elementos que aparecem em maior abundância são: S, Ca, Mg e Na e em concentrações menores: Fe, Al e P total.

O pH da vinhaça é ácido e a quantidade matéria orgânica por litro na amostra aplicada é baixa se comparada com os solos estudados. Outra característica é a baixa concentração de metais pesados, de nitrogênio (N) e potássio (K), o que está de acordo com os valores apresentados por Resende et al (2006).

**Tabela 6** - Características físicas e químicas da vinhaça Usina Santa Lúcia (safra 2006)

Vinhaça	pH	MO	K	Ca	Mg	Al	P total	N
		g/dm <sup>3</sup>						mg/dm <sup>3</sup>
	3,9	4,0	0,3	740,0	210,0	72,0	65,0	0,2

MO: matéria orgânica

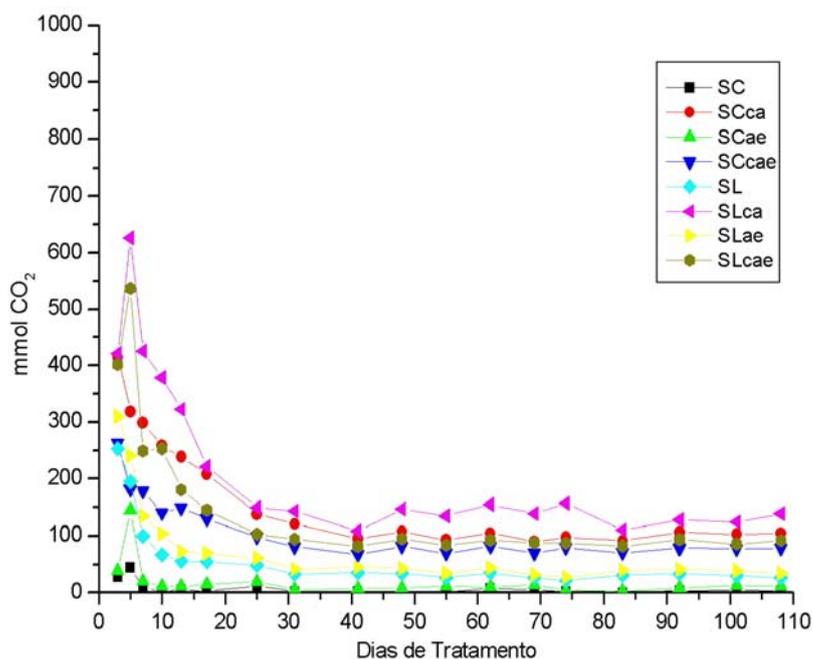
**Tabela 7** – Quantificação de alguns elementos químicos encontrados na vinhaça Usina Santa Lúcia (safra 2006)

Vinhaça	S	Na	Fe	Mn	Cu	Zn	B	Ba	Cd	Cr	Ni	Pb	Co	Mo
	mg/dm <sup>3</sup>													
	835,0	113,0	97,5	-	-	7,5	5,0	0,5	1,06	0,15	0,26	<0,01	-	2,0

## 5.2. Ensaio Respirométricos

### 5.2.1. Quantidade de CO<sub>2</sub> produzido por dia de tratamento

A Figura 6 indica que no ensaio respirométrico, onde foram acrescentados dois tipos de agentes descompactantes, os tratamentos que forneceram maior liberação de CO<sub>2</sub> foram aqueles nos quais se acrescentou casca de arroz (tratamento SCca e SLca). O tratamento contendo solo de “landfarming” e casca de arroz apresentou a maior liberação durante todo o período. Pode-se verificar ainda que os substratos contendo casca de arroz, nos primeiros 15 dias, tiveram um período de intenso metabolismo, provavelmente, favorecido pelos materiais mais facilmente disponíveis, contudo, a casca de arroz favoreceu o metabolismo durante os 108 dias.

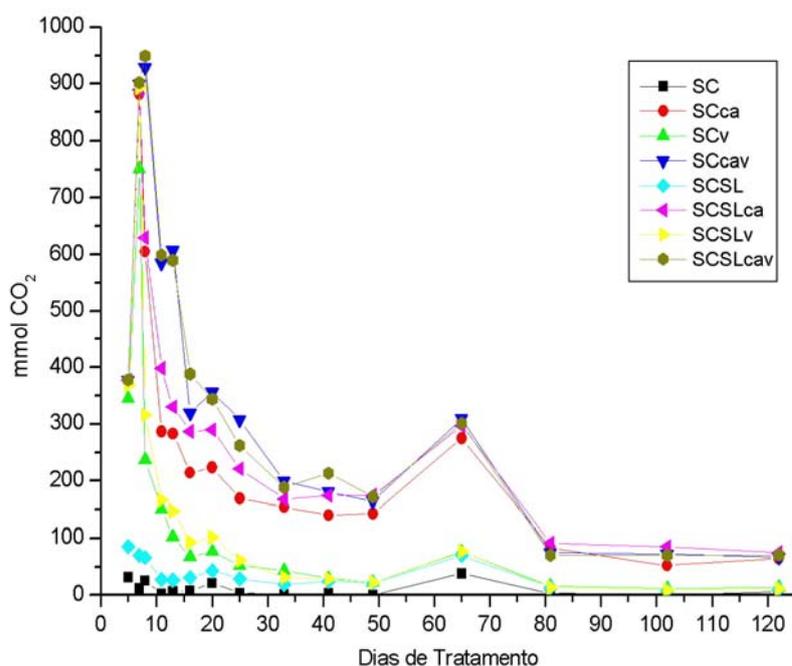


**Figura 6** – Quantidade de gás carbônico produzido diariamente no ensaio respirométrico, durante período de 108 dias, envolvendo misturas de Solo de Cerrado (SC) e Solo de “landfarming” (SL) com: casca de arroz (ca) e argila expandida (ae).

Vasudevan e Rajaram (2001) adicionaram farelo de trigo a reatores com agente descompactante e observaram que a adição destes materiais volumosos parece ter um efeito estimulador sobre as populações microbianas,

e, que a adição de materiais orgânicos em solos estimula a degradação do óleo proveniente da borra oleosa. Estes materiais auxiliam na diminuição da compactação do solo, favorecendo a troca de oxigênio e outros gases, bem como, fornecem, mediante sua degradação o  $O_2$ . Além disso, o material orgânico adicional, facilmente degradável, fornece o carbono inicial para o processo de biodegradação de outras moléculas.

Na Figura 7 estão inseridos os dados da liberação de  $CO_2$ . O comportamento dos dois solos após o acréscimo de vinhaça como um biofertilizante. Neste ensaio respirométrico, analisou-se o desempenho da mistura dos solos estudados (75% de solo de cerrado (SC) e 25% de solo de “landfarming” (SL)). Constatou-se que os tratamentos que resultaram nas maiores produções de  $CO_2$  foram aqueles que continham somente casca de arroz ou sua associação com vinhaça. Sendo assim, os tratamentos SCca e SCcav que contêm solo de cerrado e os tratamentos SCSLca e SCSLcav que contêm a mistura de solos (75% de SC e 25% de SL) apresentaram as maiores liberações de  $CO_2$ .



**Figura 7** – Quantidade de gás carbônico produzido diariamente no ensaio respirométrico, durante período de 122 dias, envolvendo Solo de Cerrado (SC), misturas de SC com 25% de Solo de “landfarming” (SCSL), casca de arroz (ca) e vinhaça (v).

A vinhaça utilizada é rica em cálcio, magnésio, alumínio, fósforo, enxofre, sódio e ferro, sendo assim um complemento importante para auxiliar o metabolismo microbiano. Quanto a presença do fósforo a pesquisa de Zanini, et al (2005) não encontrou relação na quantidade adicionada ao solo com a emissão de CO<sub>2</sub>, indicando que esse nutriente não é um fator limitante para a atividade microbiana. Neste mesmo estudo, os autores constataram que em solos desprovidos de vegetação e com baixa umidade, a correlação da temperatura do solo, com a quantidade de CO<sub>2</sub> é negativa. Sendo assim, a quantidade de CO<sub>2</sub> produzido por um solo tem alta relação com sua umidade e temperatura, que são fatores determinantes nas condições para que a atividade microbiana seja otimizada e, assim, consiga metabolizar os compostos de mais difícil degradação.

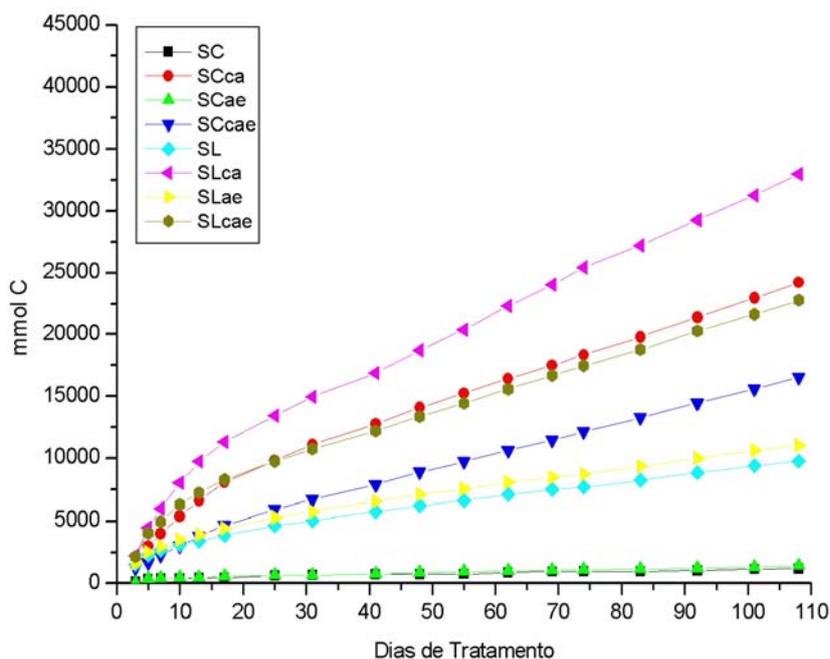
La Scala, et al (2000b) observaram uma correlação linear das emissões de CO<sub>2</sub> com a quantidade de carbono total (CT), a capacidade de troca iônica (CTC) e o ferro livre oxidado (Fe<sub>d</sub>). Os autores também verificaram que há uma relação entre a emissão de CO<sub>2</sub>, o carbono total e a soma de bases (SB). As correlações são positivas com carbono total e soma de bases e negativas com relação ao ferro livre oxidado (Fe<sub>d</sub>). Essa correlação já era esperada, pois o carbono é o elemento básico utilizado pelos microrganismos nos processos de decomposição. Assim como, a CTC é fator dominante nos processos de respiração do solo, pois mantém os valores de pH adequado para o crescimento microbiano. A correlação negativa com Fe<sub>d</sub> foi explicada pelos autores frente os altos valores de pH encontrados nos solos pesquisados. Sendo assim, a presença ferro livre está relacionada com aumento na troca aniônica do solo e, desta forma, um decréscimo na atividade microbiana.

Os solos utilizados neste estudo apresentam valores de pH (solo de cerrado - 4,0 e solo de "landfarming" – 5,0), nestas condições, a presença de ferro livre dissolvido (Fe), tanto no solo de "landfarming" quanto na vinhaça, não deve ter influenciado a quantidade de CO<sub>2</sub> produzido. Quanto aos fatores: carbono total, CTC e SB, ocorrem diferenças significativas entre os solos utilizados. Sendo que, o solo de "landfarming" (SL) apresenta maiores valores de todos os parâmetros considerados. Essa observação auxilia a entender o

fato dos tratamentos contendo este solo (Figura 6 – tratamentos contendo somente SL e Figura 7 – tratamentos contendo a mistura dos dois solos) alcançarem maiores valores de emissão de CO<sub>2</sub>, porém não justifica a grande quantidade de CO<sub>2</sub> nos tratamentos que contém apenas o solo de cerrado (SC), visto que este apresenta baixos valores nos fatores considerados (Figura 6 e Figura 7). A semelhança entre eles é a presença de casca de arroz como agente descompactante.

### 5.2.2. Carbono Biodegradado acumulado

A Figura 8 apresenta a quantidade de carbono biodegradado acumulado durante os dias de execução dos ensaios respirométricos.

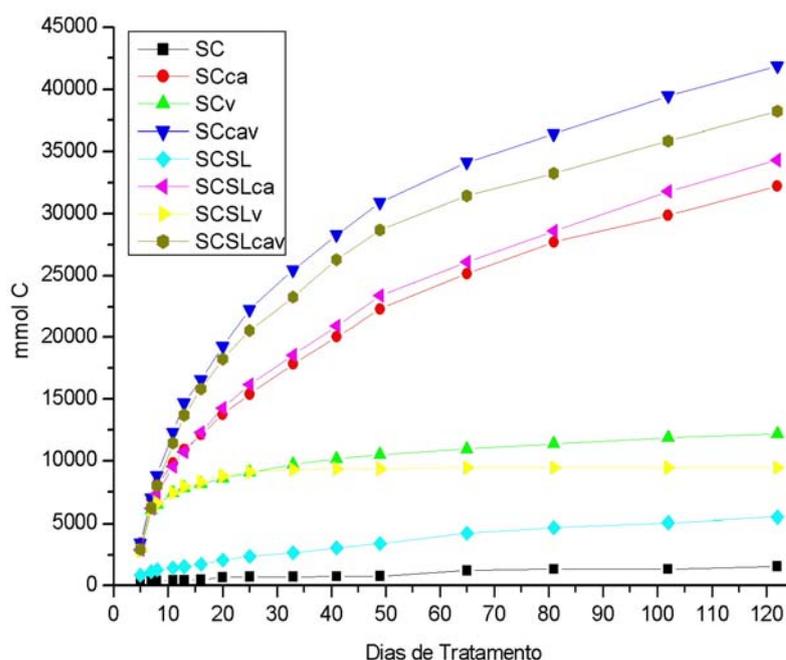


**Figura 8** – Quantidade de carbono biodegradado acumulado, durante o período de 108 dias, no ensaio respirométrico envolvendo misturas de Solo de Cerrado (SC), Solo de “landfarming” (SL) e casca de arroz (ca) e argila expandida (ae).

Esses valores correspondem ao carbono orgânico consumido, devido à biodegradação da matéria orgânica presente nos tratamentos realizados. Para a obtenção destes resultados, efetuou-se a subtração da média do consumo de carbono dos tratamentos controle, a fim de eliminar a parcela de carbono

proveniente da matéria orgânica, originalmente contida nos solos testados. Os tratamentos controle são: SC e SL (Figura 8) e SC e SCSL (Figura 9), nestes não houve acréscimo dos substratos testados: casca de arroz, argila expandida e vinhaça.

Os resultados mostram que a adição do agente descompactante casca de arroz causou aumento na quantidade de carbono biodegradado presente nos dois solos (Figura 8). Os controles, constituídos somente pelos solos, apresentaram biodegradação de pequena quantidade de carbono. Assim, todos os tratamentos resultaram em maior quantidade de carbono biodegradado, quando comparados aos seus respectivos controles, indicando que a adição de materiais descompactantes volumosos auxiliam na biodegradação da matéria orgânica presente no solo.

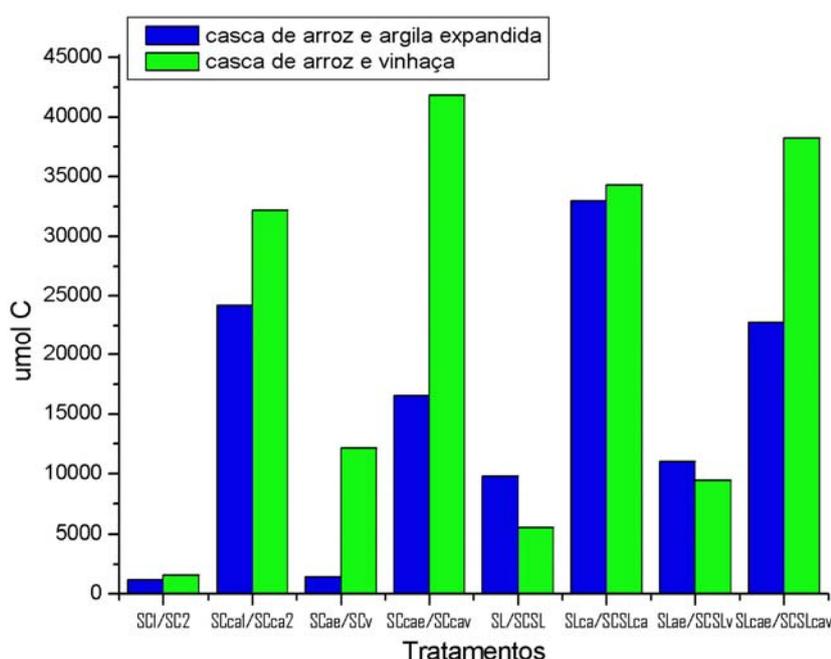


**Figura 9** – Quantidade de carbono biodegradado acumulado, durante o período de 122 dias, no ensaio respirométrico envolvendo Solo de Cerrado (SC), misturas de SC com 25% de Solo de “landfarming” (SCSL), casca de arroz (ca) e vinhaça (v).

Na Figura 9 pode-se observar que os tratamentos que resultaram em maior quantidade de carbono biodegradado foram aqueles nos quais adicionou-se aos solos casca de arroz e vinhaça (tratamentos: SCcav e SCSLcav) isso demonstra que a adição de vinhaça juntamente com casca de

arroz auxiliaram na biodegradação da matéria orgânica presente nos solos avaliados.

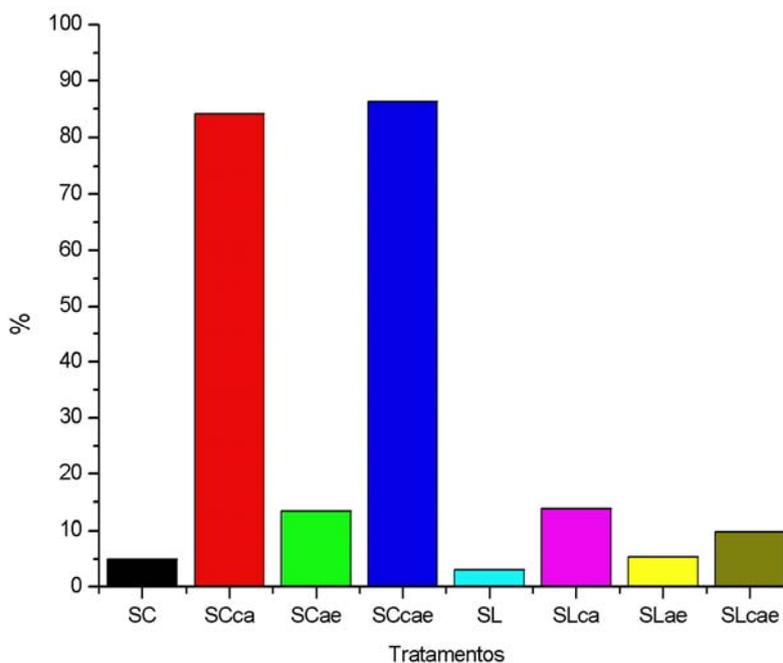
A Figura 10 apresenta os valores finais de carbono biodegradado acumulado nos dois ensaios respirométricos realizados. Pode-se observar que todos os tratamentos nos quais se adicionou casca de arroz e sua associação com vinhaça apresentaram os maiores valores de carbono biodegradado. Esse fato é evidente quando se comparam os tratamentos contendo somente solo de “landfarming” (SL) e àqueles com a mistura de solo de “landfarming” (25%) e 75% de solo de cerrado, pois SL apresenta maiores valores de carbono biodegradado que a mistura de solos estudada, porém quando se adiciona casca de arroz ou sua associação com vinhaça a situação se inverte.



**Figura 10** – Quantidade de carbono biodegradado acumulado final dos dois ensaios respirométricos. Ensaio envolvendo solo de cerrado, solo e “landfarming”, casca de arroz e argila expandida (108 dias de duração) e ensaio utilizando os mesmos solos, casca de arroz e vinhaça (122 dias de duração). Solo de Cerrado (SC), misturas de SC com 25% de Solo de “landfarming” (SCSL), casca de arroz (ca) e vinhaça (v).

### 5.2.3. Eficiência de Biodegradação

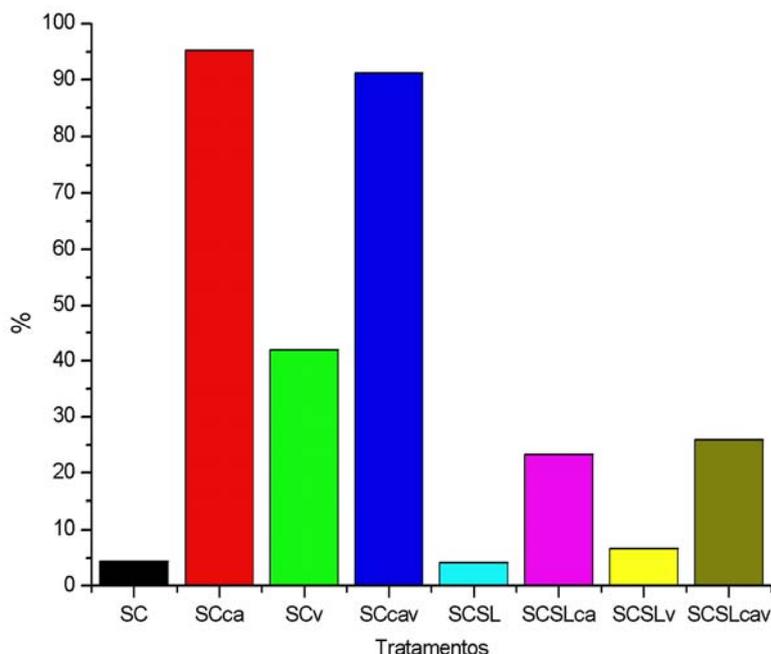
As Figuras 11 e 12 apresentam a eficiência de biodegradação calculada de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (1999), NBR 14.283: Resíduos em solo – Determinação da biodegradação pelo método respirométrico (Equação 6), dos ensaios respirométricos realizados. Para estes cálculos foram subtraídas as quantidades de carbono orgânico inicial do carbono residual final dos tratamentos respirométricos. Pode-se constatar que os tratamentos onde houve adição de agentes descompactantes ocorrem maior eficiência de biodegradação e aqueles os quais continham casca de arroz tiveram eficiência superior nos dois solos testados.



**Figura 11** – Eficiência de Biodegradação obtida no ensaio respirométrico após 108 dias envolvendo misturas de Solo de Cerrado (SC), Solo de “landfarming” (SL), casca de arroz (ca) e argila expandida (ae).

O solo de “landfarming” (SL) apresentou menor eficiência que o solo de cerrado (SC), provavelmente em função da grande quantidade inicial de matéria orgânica (hidrocarbonetos do petróleo), que no material algumas frações já foram biodegradadas, diferentemente de SC que possuía uma baixa concentração de carbono orgânico total. Quanto à associação com a vinhaça (Figura 12), os dados indicam que os tratamentos que a continham não

apresentaram os valores esperados, porém o CO<sub>2</sub> evoluído foi maior que dos controles. Sendo assim, pode-se inferir que a adição de vinhaça auxilia na biodegradação da matéria orgânica presente nos solos testados e sua eficiência é aumentada se for associada com casca de arroz.



**Figura 12** – Eficiência de Biodegradação obtida no ensaio respirométrico após 122 dias envolvendo Solo de Cerrado (SC), misturas de SC com 25% de Solo de “landfarming” (SCSL), casca de arroz (ca) e vinhaça (v).

As altas taxas de biodegradação encontradas nos tratamentos com casca de arroz podem ser devido a sua própria biodegradabilidade efetuada pelos microrganismos presente nos solos testados. Considerando-se que a casca do grão de arroz tem um período relativamente longo para biodegradar, a suposição de aumento da porosidade do solo deve ser considerada.

Crivelaro (2005) obteve aumento na taxa de biodegradação da “borra oleosa de petróleo” quando utilizou vinhaça como bioestimulante. Porém, Mariano et al (2006), ao utilizarem vinhaça, não encontraram a mesma eficiência na biodegradação de óleo diesel em solos fertilizados com vinhaça.

Hencklein (2005) observou em sua pesquisa que o solo de “landfarming” mantém baixa eficiência de biodegradação, mesmo após a bioestimulação com nutrientes minerais como nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) ou surfactante químico (Tween® 80). A autora avaliou também a adição de microrganismos,

que tiveram seu crescimento estimulado previamente, porém não verificou mudança significativa na taxa de biodegradação. Desta forma, pode-se considerar como positiva a eficácia do emprego da associação de agentes descompactantes e aditivos orgânicos, na biodegradação de hidrocarbonetos quando comparados com seus controles.

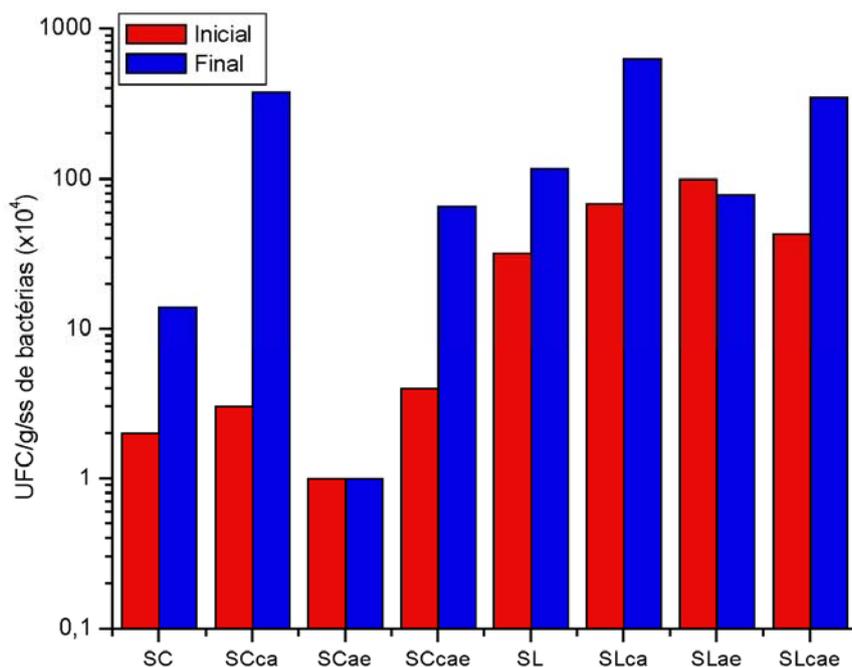
#### **5.2.4. Avaliação do crescimento de bactérias e fungos**

O aumento da população de bactérias e fungos nos tratamentos do ensaio de biodegradação foi considerado um parâmetro complementar, sendo capaz de indicar variações na população inicial. As contagens de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g de solo seco) foram realizadas no início e no final do ensaio de biodegradação permitindo a análise de possíveis efeitos estimulantes às comunidades microbianas.

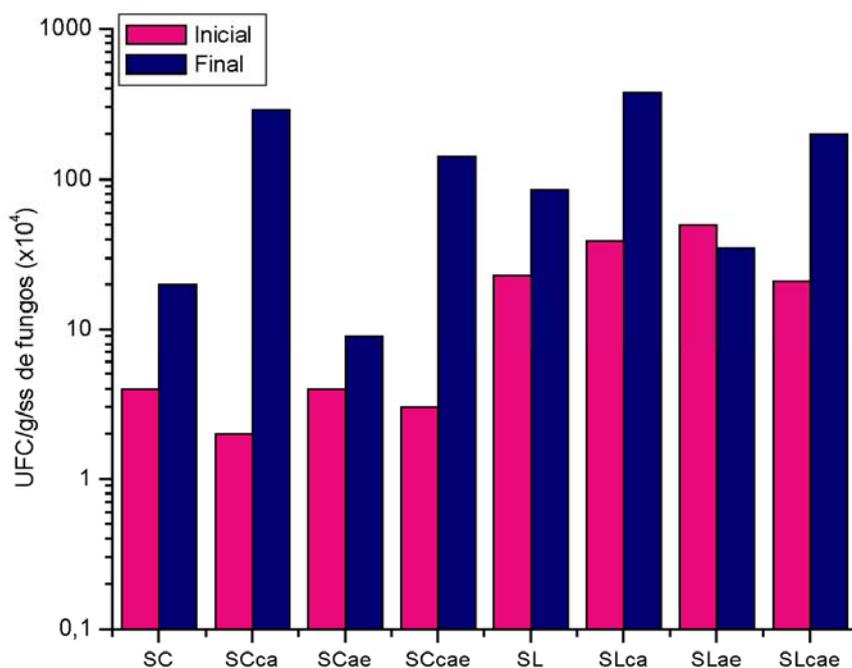
Analisando as Figuras 12; 13; 14 e 15, pode-se verificar que há aumento na quantidade final de bactérias e fungos de microrganismos praticamente em todos os experimentos.

O ensaio respirométrico, no qual se estudou a ação de agentes descompactantes na biodegradação, tem os resultados expressos na Figuras 13 e 14. Os resultados indicam que os tratamentos onde houve acréscimo de casca de arroz apresentaram os maiores valores de UFC/g/ss de bactérias e de fungos. Estes dois grupos de microrganismos aumentaram em quase todos os tratamentos, fazendo exceção naquele com solo de “landfarming” e argila expandida (ae). A diminuição detectada pode ser causada pela ação tóxica dos componentes da borra de petróleo sobre os microrganismos presentes na ae. No “landfarming”, que recebe sucessivas cargas de borra, vão sendo acumulados, além dos materiais inorgânicos na forma de íons, substâncias recalcitrantes advindas do petróleo.

Desta forma, justifica-se o aumento do crescimento das bactérias que atingem cerca de 100 vezes para o tratamento com solo de cerrado (SC) acrescido somente de casca de arroz e, cerca de 10 vezes para aquele com solo de “landfarming” (SL) na presença do mesmo agente descompactante.



**Figura 13** – Quantificação de bactérias heterotróficas presentes no início e término de ensaio respirométrico de 108 dias envolvendo tratamentos com misturas de Solo de Cerrado (SC), Solo de “landfarming” (SL), casca de arroz (ca) e argila expandida (ae).



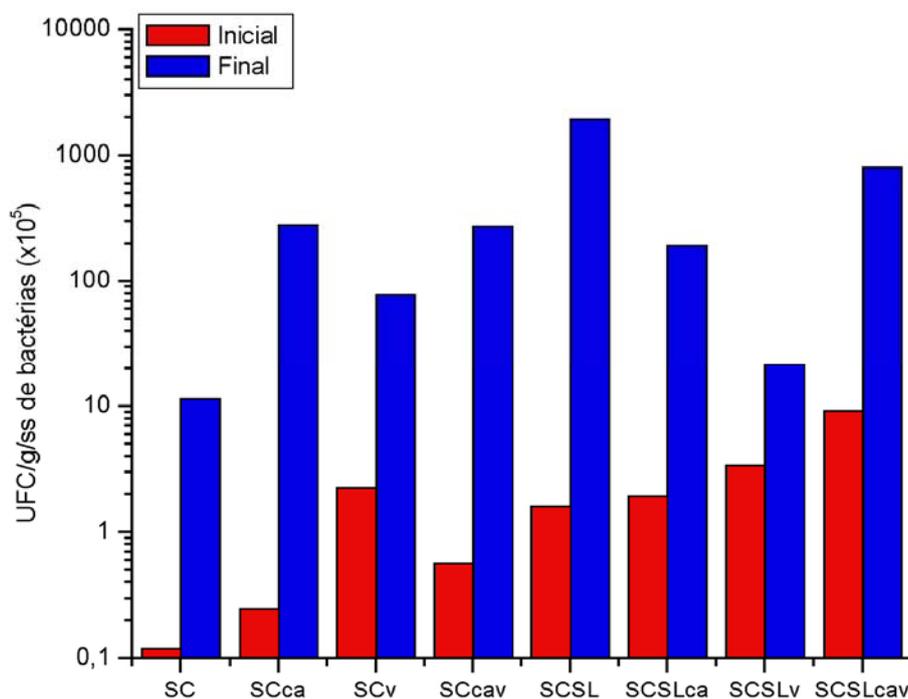
**Figura 14** – Quantificação de fungos presentes no início e término de ensaio respirométrico de 108 dias envolvendo tratamentos com misturas de Solo de Cerrado (SC), Solo de “landfarming” (SL), casca de arroz (ca) e argila expandida (ae).

Os tratamentos contendo a mistura dos agentes descompactantes (argila expandida e casca de arroz) também propiciaram importante crescimento microbiano (cerca de 10 vezes a contagem inicial). Na quantificação de fungos o tratamento contendo solo de cerrado, casca de arroz e argila expandida (SCcae) apresentou em cerca de 100 vezes mais que a contagem inicial.

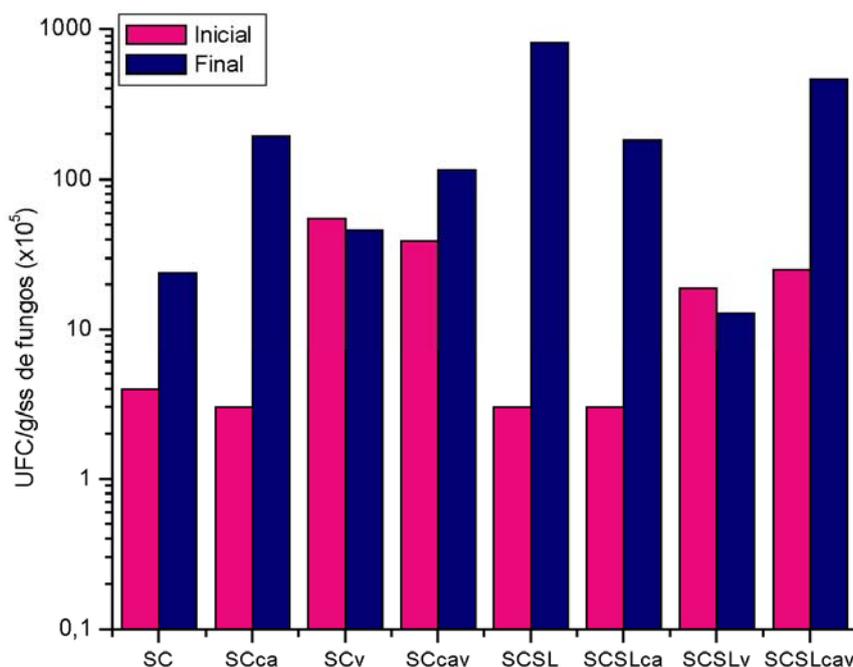
No ensaio de biodegradação, que analisou a associação de casca de arroz e vinhaça (Figuras 15 e 16) todos os tratamentos apresentaram acréscimo no número de colônias de bactérias heterotróficas e somente nos tratamentos SCSL não houve crescimento de fungos.

O tratamento contendo somente a mistura de solo de cerrado (75%) e solo de “landfarming” (25%) – SCSL - apresentou o maior valor final em quantidade de bactérias heterotróficas e fungos. A quantificação de bactérias foi o parâmetro que apresentou o maior aumento (1000 vezes o valor inicial). Esta diferença de crescimento identificada e comparada com as quantidades alcançadas pelos outros tratamentos é semelhante.

Os tratamentos que favoreceram o crescimento de até 100 vezes no número de colônias de bactérias são: SC, SCv, SCcav, SCSLca e SCSLcav, sendo que o tratamento SCcav alcançou um crescimento 1000 vezes maior que o valor inicial. Na quantificação de fungos os tratamentos com crescimentos importantes foram: SCca, SCSL e SCSLca (cerca de 100 vezes o valor inicial).



**Figura 15** – Quantificação de bactérias presentes no início e término de ensaio respirométrico de 122 dias envolvendo Solo de Cerrado (SC), misturas de SC com 25% de Solo de “landfarming” (SCSL), casca de arroz (ca) e vinhaça (v).



**Figura 16** – Quantificação de fungos presentes no início e término de ensaio respirométrico de 122 dias envolvendo Solo de Cerrado (SC), misturas de SC com 25% de Solo de “landfarming” (SCSL), casca de arroz (ca) e vinhaça (v).

Constatou-se que as contagens iniciais das colônias microbianas presentes nos dois solos diferem em até 1000 vezes e os maiores aumentos das comunidades ao final do ensaio ocorrem nos tratamentos utilizando somente solo de cerrado ou a mistura de 75% deste com 25% de solo de “landfarming”.

A quantidade presente no solo de cerrado foi semelhante no início comparado com os do solo de “landfarming”. Este fato pode indicar o baixo estímulo e a pouca disponibilidade de matéria orgânica e minerais, que a microbiota recebe para aumento de sua população nos solos de cerrado, enquanto que no SL pode acontecer alguma inibição por parte da matéria orgânica ou dos sais. No SL pode-se afirmar que a adição dos nutrientes, da vinhaça e a aeração descompactante, que foram aplicadas durante este tratamento, (“landfarming”) favoreceram o crescimento populacional dos fungos. O crescimento provavelmente aconteceu em função da maior disponibilidade de oxigênio que estimulou os microrganismos autóctones presentes no solo de “landfarming”. Tais microrganismos metabolizam certa quantidade de carbono, porém para que a biodegradação seja otimizada em sua eficiência biodegradativa são necessários outras substâncias. Este trabalho mostra que introduzindo-se pequenas alterações no material de “landfarming” pode-se estimular o metabolismo aeróbio. Verificou-se que uma das formas viáveis é o favorecimento da descompactação mediante acréscimo de agentes descompactantes capazes de promover a formação de poros de transferência de O<sub>2</sub>.

Crivelaro (2005) em sua pesquisa apresentou resultados significativos de estímulo no aumento do número de UFC/g/ss quando utilizou vinhaça em associação com a borra oleosa. O número de fungos foi relacionado à quantidade de carbono biodegradado encontrada pelo método respirométrico. Tais resultados somam-se aos obtidos neste trabalho quanto a eficiência da biodegradação. O autor observou que o período de adaptação dos microrganismos influencia sua capacidade de metabolizar compostos, e que qualquer perspectiva de melhoria na eficiência de biodegradação é importante. Portanto, em qualquer pesquisa que se tenha como objetivo o uso de

microrganismos é relevante que se considere a prévia adaptação para obtenção de sucesso.

O aumento do número de UFC/g/ss de microrganismos durante o período de incubação do ensaio de biodegradação, está de acordo com os resultados referentes à quantidade de carbono orgânico biodegradado mostrado nas figuras 11 e 12. Excetuando-se o fato dos valores alcançados pelo tratamento que contem somente a mistura de solos de cerrado (75%) e de “landfarming” (25%) - SCSL (Figuras 15 e 16). Neste caso, pode-se inferir que embora os microrganismos estivessem presentes neste solo, apresentaram-se incapazes de degradar, isso foi refletido nas baixas medições do CO<sub>2</sub> liberado.

### **5.3. Utilização de espectroscopia de absorção ótica no infravermelho**

#### **5.3.1. Quantificação do CO<sub>2</sub> liberado e acumulado**

Os valores de CO<sub>2</sub> em mg/L obtidos por reator de cada tratamento, durante a sucção por 5 minutos das câmaras armazenadoras, foram somados obtendo-se a média aritmética. Os dados de CO<sub>2</sub> permitiram verificar o seu acúmulo durante o período estudado. O gás carbônico pode ter sido produzido mediante respiração microbiana e também pelos processos químicos de mineralização do carbono presente no solo. Segundo La Scala et al (2003) as diferenças temporais na transferência de carbono em solos desprovidos de vegetação são devidas às mudanças climáticas.

Bain et al (2005) estudaram em alguns ensaios de avaliação do CO<sub>2</sub> do solo utilizando câmaras fechadas, como as utilizadas neste estudo. Os autores comentam, que esse tipo de câmara pode influenciar a liberação de CO<sub>2</sub>, pois existe uma pequena diferença de pressão entre o ambiente interno da câmara e a atmosfera externa. Sendo assim, torna-se difícil extrapolar os resultados obtidos para situações de campo, porém é possível realizar comparações da liberação de CO<sub>2</sub> dos solos dentro dos tratamentos.

Os resultados dos experimentos realizados com o solo de “landfarming” (SL) e de cerrado (SC) demonstraram que a associação da adição de vinhaça

e casca de arroz proporcionou aumento na liberação de CO<sub>2</sub> quando se compara com os tratamentos em que estes compostos não estavam presentes (Figura 17).

Butnor e Johnsen (2004) constataram que as propriedades físicas dos solos podem afetar a precisão das medições de CO<sub>2</sub> realizadas em câmaras fechadas não-estáticas, pois solos menos porosos, possuem menos gases diluídos em seus compartimentos e, assim, a perturbação causada pela câmara não altera demasiadamente a medida do CO<sub>2</sub> nelas contido. Entretanto, neste trabalho, a influência sob os gases presentes nos poros foi mínima, pois as câmaras eram estáticas, e permaneceram fixas sob o solo durante todo o ensaio (33 dias).

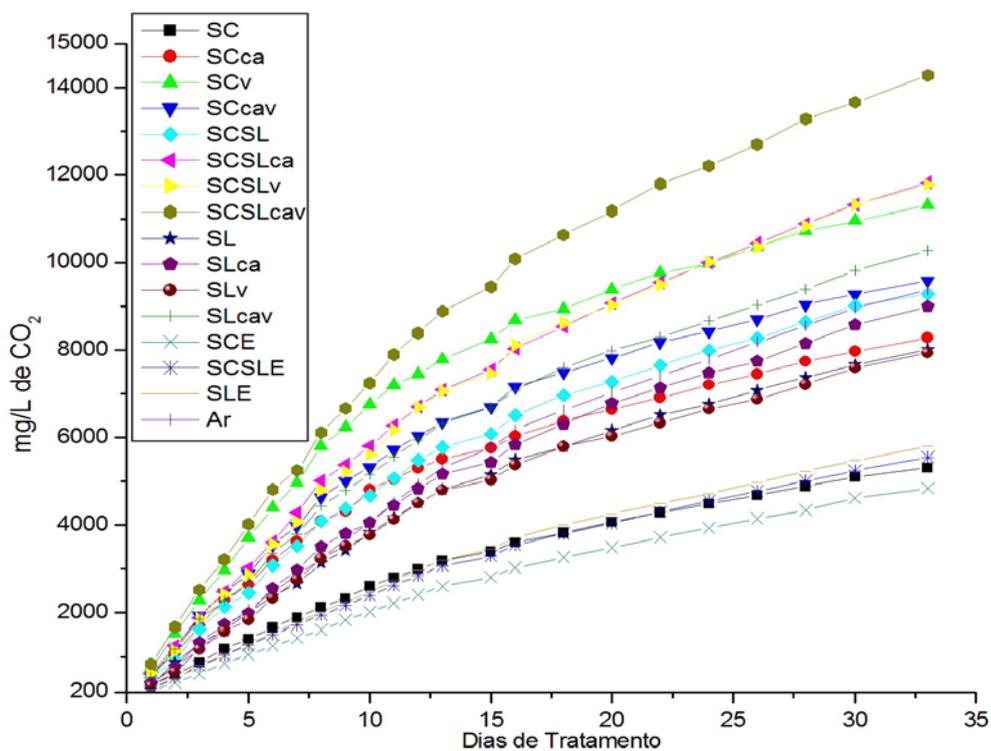
Lund et al (1999) relataram em seu trabalho que o fluxo de CO<sub>2</sub> da superfície do solo decresceu com o aumento da pressão em câmaras fechadas, e esse efeito foi maior em solos secos. Os autores discutiram que a diminuição no fluxo de CO<sub>2</sub> que se difunde pelo solo é um efeito causado por vários fatores: pressão da câmara, diâmetro da câmara, umidade do solo, textura do solo e a profundidade em que o CO<sub>2</sub> é gerado.

Neste experimento os tratamentos contendo a mistura de 25% de solo de "landfarming" e 75% de solo de cerrado (SCSL) apresentaram os maiores valores de liberação de CO<sub>2</sub>. A associação de casca de arroz e vinhaça adicionada à mistura (SCSLcav) apresentou o maior valor acumulado (14274 mg/L), seguido dos tratamentos SCSLca e SCSLv (11817 mg/L e 11770 mg/L, respectivamente).

Os tratamentos contendo casca de arroz, como agente descompactante, apresentaram resultados melhores quanto à liberação de CO<sub>2</sub>, o que também foi verificado no trabalho de Hencklein et al (2006a e b). Neste trabalho, constaram que a associação de "landfarming" com vinhaça induziu os maiores valores de gás carbônico nos dois solos analisados (HENCKLEIN et al, 2006b).

A associação de vinhaça com casca de arroz proporcionou aumento na liberação de CO<sub>2</sub> tanto no solo de cerrado (SCcav – 9592,17 mg/L de CO<sub>2</sub>), quanto no solo de "landfarming" (SLcav – 10271,51 mg/L de CO<sub>2</sub>). Entretanto, nos reatores contendo somente solo de cerrado e vinhaça (SCv) a liberação de

CO<sub>2</sub> foi de 11305,32 mg/L superando o tratamento contendo somente casca de arroz (SCcav).



**Figura 17** – Gás carbônico (CO<sub>2</sub>) acumulado (mg/L) no período de 33 dias de tratamento, envolvendo solo de Cerrado (SC), solo de “landfarming” (SL), misturas de SC (75%) com 25% de SL (SCSL), casca de arroz (ca) e vinhaça (v). Comparação com os mesmos solos e mistura utilizados (SCE, SCSLE e SLE), esterilizados em vapor úmido e a concentração de CO<sub>2</sub> encontrada no ar atmosférico.

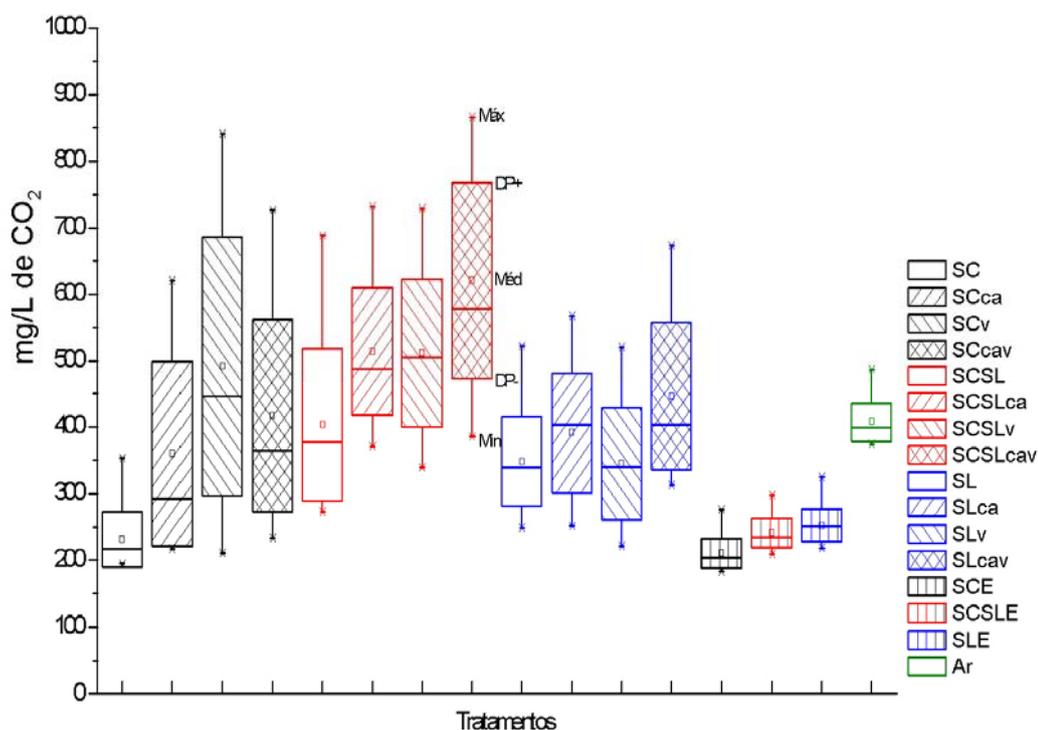
Os tratamentos foram comparados com os valores obtidos nas medições do CO<sub>2</sub> presente no ar atmosférico do local em que se realizou o estudo. Desta forma, buscou-se avaliar se a respiração do solo superava ou não a quantidade de gás carbônico presente no ar. Sendo assim, verificou-se que o tratamento SCSL (9278 mg/L) apresentou resultados semelhantes aos valores acumulados do ar atmosférico (9366 mg/L) e que registros superiores foram encontrados somente nos tratamentos: SCSLcav, SCSLca, SCSLv, SCv, SLcav e SCcav. Os demais tratamentos apresentaram valores inferiores ao encontrado no ar atmosférico. Sendo eles: SLca, SCca, SL, SLv e SC

Os experimentos de emissão de CO<sub>2</sub> foram comparados com solo esterilizado (SCE, SCSLE e SLE), nestas condições a liberação de CO<sub>2</sub> foi

menor que nos solos não esterilizados (4834 mg/L, 5537 mg/L e 5797 mg/L, respectivamente). Os valores destes tratamentos foram inferiores em relação àqueles obtidos pela medição do gás carbônico presente no ar atmosférico do ambiente onde os reatores encontravam-se (9366 mg/L).

Na avaliação das médias comparadas dos experimentos (Figura 18) pode-se observar que há grande variação nos valores máximos e mínimos e desvio padrão nos tratamentos contendo solo de cerrado (SC). As diferenças são menores no tratamento contendo somente solo de “landfarming” e quase nulas naqueles onde os solos foram esterilizados (SCE, SCSLE e SLE).

A figura 18 indica as variações que aconteceram durante o período de 33 dias em que os dados foram coletados. A figura ilustra que cada tratamento mostrou-se único em sua concepção de emissão de CO<sub>2</sub>, embora todos estivessem sob às mesmas condições ambientais.



**Figura 18** – Gráfico em Box Plot das médias (Méd), desvio padrão (DP) e valores máximos (Máx) e mínimos (Mín) da liberação de CO<sub>2</sub> (mg/L) dos tratamentos em reatores realizados no período de 33 dias, envolvendo solo de Cerrado (SC), solo de “landfarming” (SL), misturas de SC (75%) com 25% de SL (SCSL), casca de arroz (ca) e vinhaça (v). Comparação com os mesmos solos e mistura utilizados (SCE, SCSLE e SLE), esterilizados em vapor úmido e, a concentração de CO<sub>2</sub> encontrada no ar atmosférico.

Os resultados mostrados nas Figuras 17 e 18 mostram que as diferenças nos tratamentos podem ser devidas a vários fatores. Entre eles, as mudanças ocorridas no metabolismo microbiano, pois os tratamentos com solos esterilizados apresentaram pequenas variações na medição de CO<sub>2</sub>. Por outro lado, as variações ocorridas no período estudado podem indicar mudanças na população de microrganismos e, conseqüentemente na sua ação. Pode-se inferir ainda que essas modificações devem-se às texturas distintas dos solos e ainda que os tratamentos em que se adicionou casca de arroz tiveram essas texturas alteradas e, por isso, maior liberação de CO<sub>2</sub>, pois esse pode ter sido gerado a maiores profundidades e também em quantidade mais elevadas.

Os resultados indicam que o tratamento onde ocorreu maior liberação de CO<sub>2</sub> foram aqueles onde se fez uma mistura de solos e acrescentou-se casca de arroz como agente descompactante e a vinhaça como corretora de umidade e aditivo orgânico. Constatou-se ainda, por comparação com os tratamentos sem casca de arroz, que essa mistura proporcionou aumento na liberação de CO<sub>2</sub> em todos os experimentos que a continham.

Os tratamentos contendo somente solo de "landfarming" apresentaram pequenos valores de liberação de gás carbônico, quando comparados com aqueles em que o solo estava esterilizado. Esse dado corrobora a hipótese anterior, de que a mistura de solos proporcionou aumento nesta liberação.

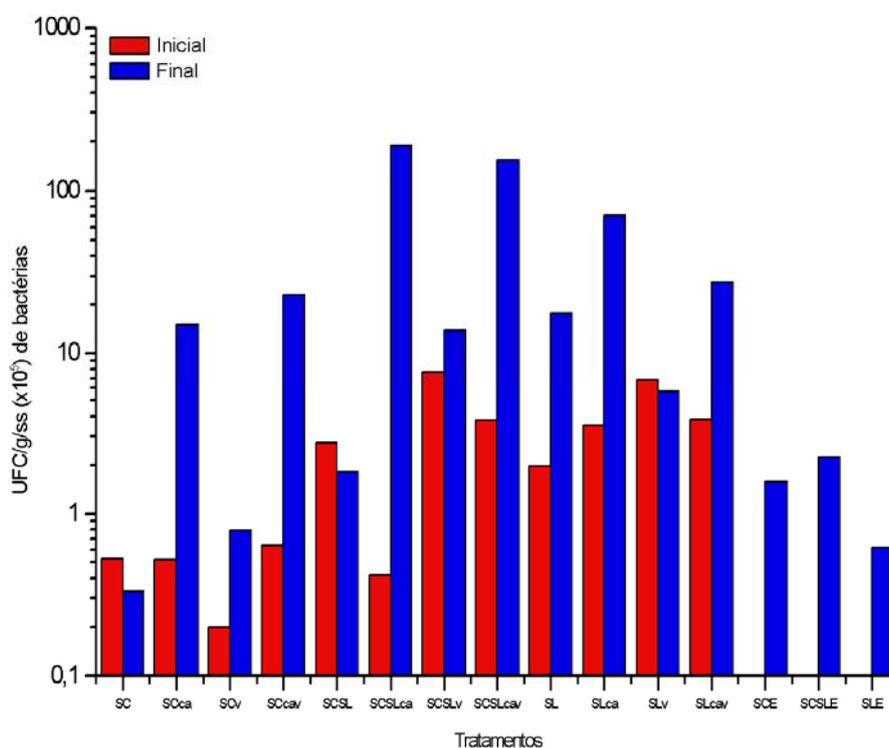
Esse ensaio, onde se quantifica o CO<sub>2</sub> por absorção óptica no infravermelho, confirma os experimentos com frascos de Bartha & Pramer de que a adição da associação de casca de arroz, como agente descompactante, e vinhaça, como aditivo orgânico, auxiliam na biodegradação da matéria orgânica presente nos solos avaliados. Embora as concentrações de CO<sub>2</sub> alcançadas pelos tratamentos contendo casca de arroz possam ser devido a sua própria degradação o efeito sinérgico desse agente descompactante orgânico, pobre nutricionalmente, parece ter auxiliado, pois além de aumentar a porosidade do solo, também figura como complemento nutritivo para as populações microbianas. Este aspecto também foi discutido por Rhykerd et al (1999).

Comparando-se os ensaios respirométricos desenvolvidos segundo Bartha e Pramer (1965) com o método em que foi utilizada a metodologia de espectroscopia de absorção óptica no infravermelho, pode-se verificar uma relação, pois os resultados complementam-se e se afirmam. Portanto, essas metodologias comprovam que a quantificação da liberação de CO<sub>2</sub> pelo solo é um indício de atividade microbiana, uma vez que os solos esterilizados apresentaram valores bem inferiores de liberação de CO<sub>2</sub>, que seus similares não esterilizados.

### **5.3.2. Avaliação dos microrganismos presentes nos solos estudados neste ensaio.**

Assim como nos ensaios respirométricos de Bartha & Pramer realizados e discutidos anteriormente, neste ensaio utilizando espectroscopia de absorção óptica no infravermelho considerou-se também o desenvolvimento de bactérias heterotróficas e fungos nos tratamentos como um parâmetro complementar. Esta avaliação da população de bactérias e fungos pode ser útil na afirmação de que são os agentes prioritários na evolução de CO<sub>2</sub>. As contagens de UFC/g de solo seco foram realizadas no início e no final do experimento permitindo a análise de possíveis efeitos estimulantes ao crescimento de bactérias e fungos

A figura 19 insere os dados das UFC/g/ss de bactérias heterotróficas presentes nos tratamentos realizados neste ensaio. O tratamento que apresentou o maior crescimento foi aquele no qual utilizou-se à mistura de solo de cerrado (75%) com 25% de solo de landfarming e casca de arroz (SCSLca). Nesta condição experimental houve aumento no número de colônias de aproximadamente 900 vezes em relação ao valor inicial.



**Figura 19** – Quantificação inicial e final das bactérias heterotróficas (UFC/g/ss) dos tratamentos em reatores realizados no período de 33 dias, envolvendo solo de Cerrado (SC), solo de “landfarming” (SL), misturas de SC (75%) com 25% de SL (SCSL), casca de arroz (ca) e vinhaça (v). Comparação com os mesmos solos e mistura utilizados (SCE, SCSLE e SLE), esterilizados em vapor úmido.

Todos os tratamentos que continham casca de arroz e sua associação com vinhaça apresentaram resultados positivos com relação ao crescimento bacteriano. O declínio das populações aconteceu somente nos tratamentos: SC, SCSL e SLv. Houve aumento de UFC/g/ss de bactérias nos tratamentos em que foi adicionado solo esterilizado (SCE, SCSLE e SLE). Este fato ocorreu em função da contaminação ambiental. Isto demonstra que um solo esterilizado, após 33 dias de exposição nas condições ambientais volta a colonizar-se com bactérias e fungos, pois as condições de temperatura e umidade provavelmente foram os fatores preponderantes para a contaminação.

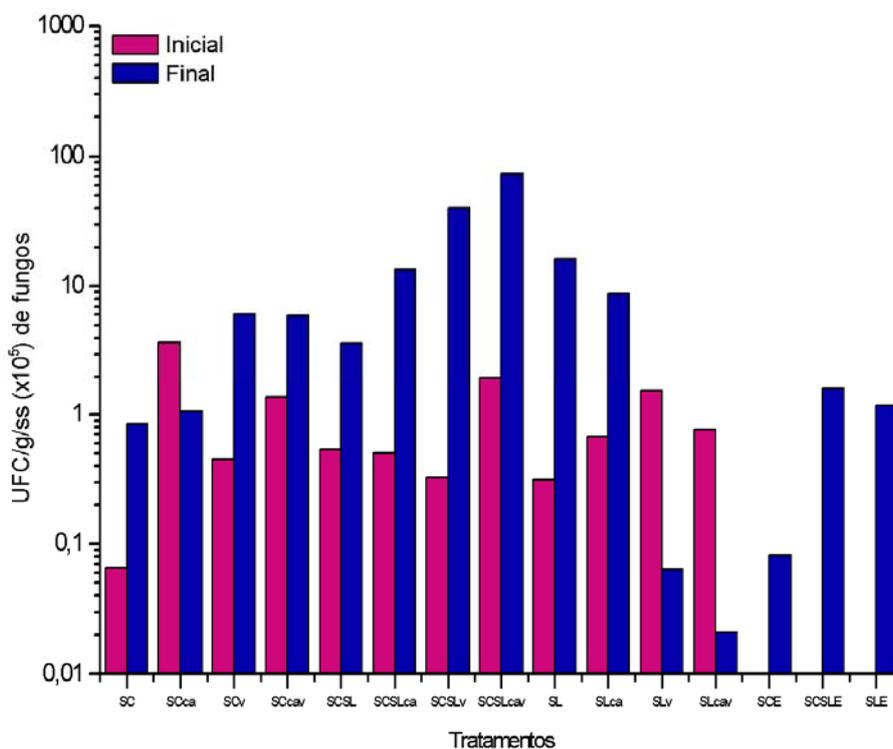
Com relação às UFC/g/ss de fungos presentes (Figura 20), houve algumas diferenças na quantificação em comparação à comunidade de bactérias, pois somente o tratamento contendo solo de “landfarming” e vinhaça não apresentou crescimento fúngico, além do bacteriano. Sendo assim, pode-se afirmar que essa combinação não favoreceu o desenvolvimento dos fungos.

A associação de casca de arroz e vinhaça neste solo também causou diminuição do número de UFC/g/ss de fungos (SLcav), porém nas condições em que adicionou-se casca de arroz os fungos tiveram condições de se desenvolverem. Pode-se inferir que, as condições do tratamento contendo solo de “landfarming”, casca de arroz e vinhaça não produziram a suficiente descompactação no solo para permitir o crescimento dos fungos, ou que a umidade final (62%) tenha sido muito alta (Figura 21).

O experimento indica que, quando se combinou solo de cerrado (75%) com 25% de solo de “landfarming” o efeito foi positivo em todas as associações (SCSL, SCSLca, SCSLv, SCSLcav). Assim, o tratamento que proporcionou o maior aumento no número de colônias de fungos foi quando se associou essa mistura com vinhaça (SCSLv), alcançando-se um número cerca de 300 vezes maior.

Balba et al (1998) relataram que as análises iniciais das populações totais da microbiota heterotrófica podem fornecer informações úteis sobre as atividades biológicas do solo estudado e verificando ainda se as comunidades estão aclimatadas às condições locais. Os resultados também podem indicar se o solo possui populações microbianas autóctones saudáveis e capazes de suportar os impactos causados por uma fonte poluidora.

Embora a relação entre aumento na biodegradação e maior crescimento microbiano seja complexa e dependa de vários fatores, observou-se neste estudo uma relação entre o crescimento microbiano e maior liberação de CO<sub>2</sub>, pois os tratamentos (SCSLca, SCSLv e SCSLcav) que obtiveram altos níveis de CO<sub>2</sub> são aqueles onde houve também crescimento importante no número de colônias microbianas (bactérias heterotróficas e fungos). Detectou-se ainda que não houve desenvolvimento microbiano no tratamento contendo somente solo de “landfarming” e vinhaça (SLv), mas sim declínio da população inicial.



**Figura 20** – Quantificação inicial e final dos fungos (UFC/g/ss) dos tratamentos em reatores realizados no período de 33 dias, envolvendo solo de Cerrado (SC), solo de “landfarming” (SL), misturas de SC (75%) com 25% de SL (SCSL), casca de arroz (ca) e vinhaça (v). Comparação com os mesmos solos e mistura utilizados (SC, SCSL e SL), esterilizados em vapor úmido.

### 5.3.3. Avaliação da Umidade inicial e final

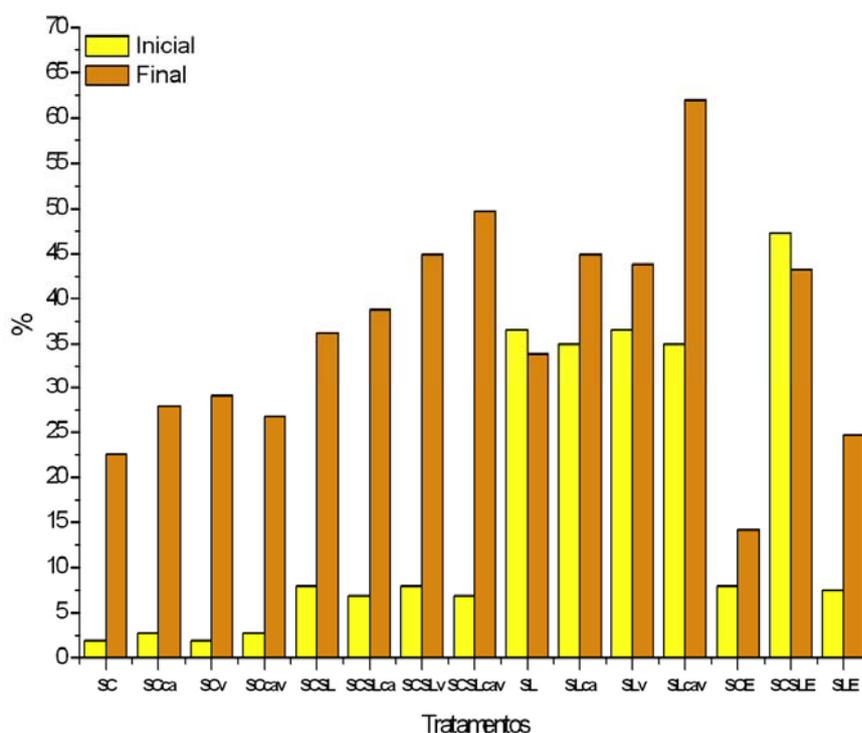
A umidade desse ensaio foi ajustada para 70% da CC dos solos e das misturas utilizados e durante o período de execução do experimento o ajuste ocorrera a cada 2 dias, pois tratava-se de um sistema aberto, sujeito a perdas por evaporação. Esse ajuste foi feito utilizando-se aspensor de água e a quantidade de água adicionada foi avaliada de acordo com inspeção visual, até que a superfície do reator estivesse saturada. A correção de umidade foi feita até 2 dias antes do fim do ensaio. Liang e McClendon (2003) verificaram que a umidade é um fator importante na compostagem de resíduos e, que 50% de umidade no solo parece ser a exigência mínima para as atividades microbianas. LA SCALA et al (2000a e 2000b), que utilizaram à espectroscopia de absorção ótica no infravermelho, observaram que há forte influência da temperatura e da umidade nas emissões de CO<sub>2</sub> pelos solos.

Neste experimento efetuou-se a medida da umidade de cada tratamento no início e ao término do ensaio, a fim de se complementar a avaliação dos parâmetros que influenciam a biodegradação. Minhoni e Cerri (1987) verificaram que a umidade tem relação direta com a liberação de CO<sub>2</sub> e a decomposição de resíduos.

Na figura 21 pode-se observar que a maioria dos tratamentos apresentou aumento importante em sua umidade e, que somente os tratamentos SL e SCSLE não apresentaram esse efeito e estes também apresentaram pouca liberação de CO<sub>2</sub>.

Os tratamentos que continham somente solo de “landfarming” apresentaram dificuldade na incorporação da água aspergida, talvez esse fato se deva a alta concentração de hidrocarbonetos. A presença destes compostos conferem características hidrofóbicas aos solos, pois são apolares e, nesta situação, alteram a capacidade de absorção de substâncias polares, como a água, porém a adição de casca de arroz auxiliou num importante aumento de retenção de umidade (62%). Este fato demonstra a importância da adição de matéria orgânica no solo. Também a mistura desse solo com solo de cerrado (SCSL) aumentou a absorção em até 9 vezes em relação aos tratamentos contendo somente solo de “landfarming”, embora esse solo possua baixa capacidade de retenção de umidade.

Além disso, a adição de vinhaça e casca de arroz pareceu facilitar a assimilação da umidade, pois todos os solos dos tratamentos em que esses substratos foram adicionados apresentaram aumento de sua umidade.



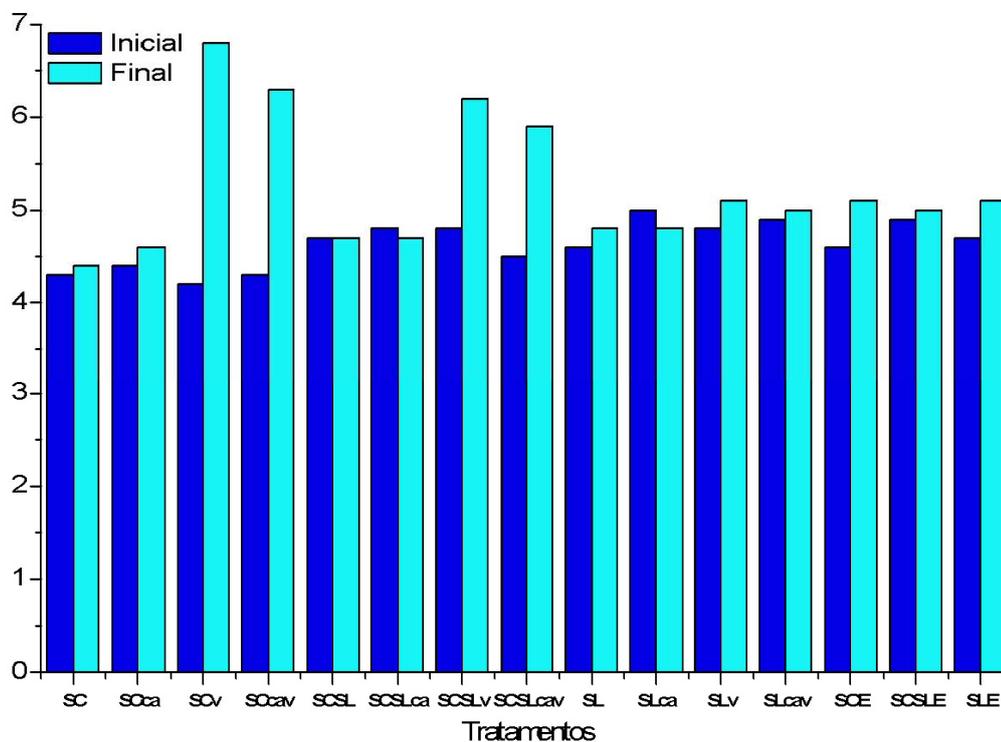
**Figura 21** – Quantificação inicial e final da umidade (%) em peso dos tratamentos em reatores realizados no período de 33 dias, envolvendo solo de Cerrado (SC), solo de “landfarming” (SL), misturas de SC (75%) com 25% de SL (SCSL), casca de arroz (ca) e vinhaça (v). Comparação com os mesmos solos e mistura utilizados (SC, SCSL e SL), esterilizados em vapor úmido.

#### 5.3.4. Avaliação dos valores de pH inicial e final

A avaliação do pH dos solos e mistura utilizados neste ensaio é um parâmetro importante a ser considerado, pois segundo Fuller e Warrick, (1985) e Rhykerd et al (1995) o valor de pH provém da atividade hidrogeniônica e sua associação com a evolução do CO<sub>2</sub> contribui para a atividade do íon de hidrogênio e para a diminuição do pH. Nesta situação de valores baixos de pH há uma maior mobilidade de contaminantes-traço pelo solo. Condições anóxicas aceleram a migração de metais pesados se comparadas as oxidativas.

Segundo Tortora et al (2005) a maioria dos microrganismos cresce melhor em ambientes com um pH entre 6,5 e 8,5, porém os fungos são capazes de tolerar condições ácidas de até 5,0. Desta forma, a sobrevivência e

desenvolvimento da microbiota depende de condições ótimas de pH e este pode ser alterado pela atividade microbiana.



**Figura 22** – Quantificação inicial e final do pH dos tratamentos em reatores realizados no período de 33 dias, envolvendo solo de Cerrado (SC), solo de “landfarming” (SL), misturas de SC (75%) com 25% de SL (SCSL), casca de arroz (ca) e vinhaça (v). Comparação com os mesmos solos e mistura utilizados (SC, SCSL e SL), esterilizados em vapor úmido.

Neste ensaio observou-se poucas alterações de pH entre os tratamentos, aqueles em que mudanças importantes devem ser verificadas são os tratamentos com solo de cerrado e adição de vinhaça ou sua associação com casca de arroz (SCv, SCcav, SCSLv, SCSLcav), nos quais os valores de pH alcançaram níveis iguais ou superiores a 6,0, porém a maioria dos tratamentos permaneceu em valores próximos ou inferiores a 5,0. O que favorece o crescimento da microbiota fúngica (Figura 22).

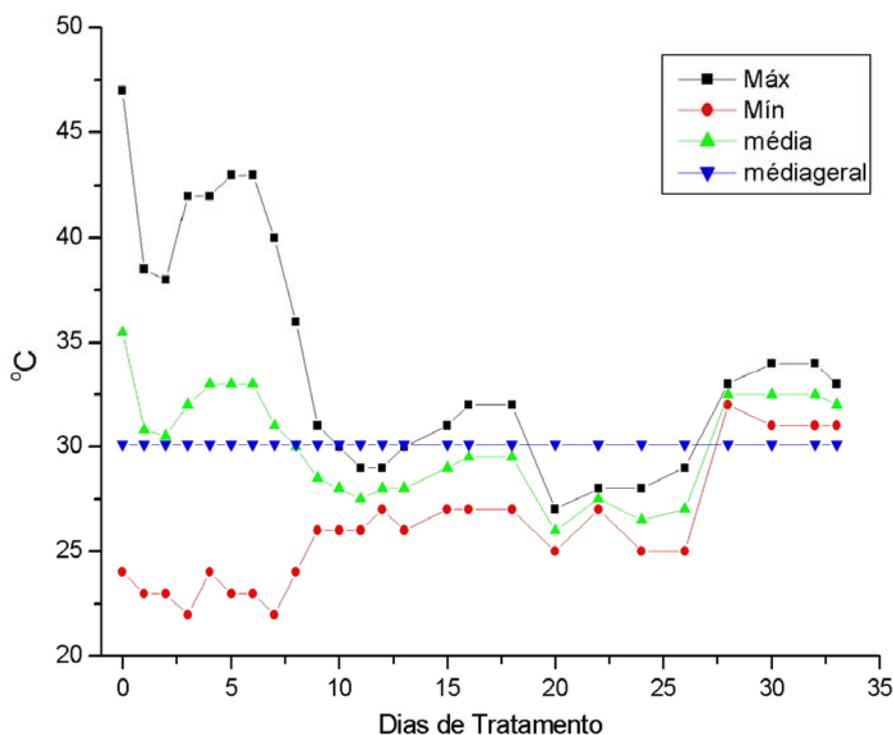
Nos tratamentos em que houve aumento do pH (SCv, SCcav, SCSL e SCSLcav), observa-se crescimento tanto de bactérias quanto de fungos, sendo assim, a ação conjunta das duas comunidades deve ter auxiliado neste efeito. Jacques et al (2007) comentam que nos últimos anos, tem sido dada atenção à obtenção de consórcios microbianos, que, comparativamente às culturas puras,

têm-se mostrado mais efetivos na degradação de hidrocarbonetos derivados do petróleo, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP).

### 5.3.5. Avaliação dos valores Máximos e Mínimos de Temperatura

Existem condições ambientais ótimas para que ocorra a biodegradação, entre os fatores importantes está à temperatura, que deve estar entre 25 e 40 °C, segundo Fuller e Warrick (1985), Rosato (1997) e Seabra (2001).

As mudanças de temperatura influenciam a biodegradação, principalmente, em seu primeiro estágio, pois neste a ação biótica possui papel imprescindível na biotransformação dos resíduos, porém numa segunda etapa, essa importância diminui e, os fatores abióticos tem uma participação mais relevante (ADMOM, et al, 2001).



**Figura 23** – Avaliação dos valores Máximos e Mínimos de Temperatura encontrados durante o experimento em reatores realizados no período de 33 dias.

Neste ensaio registrou-se uma grande amplitude nos valores da temperatura dos primeiros 10 dias de tratamento alcançando diferença de até

20 °C entre os valores máximos e mínimos (Figura 23). Essa amplitude diminuiu nos 23 dias seguintes, mas sempre manteve-se próxima a 30 °C (média geral), temperatura considerada ótima, quando foi possível adequar-se o local do experimento para um laboratório.

Comparando-se a liberação acumulada de CO<sub>2</sub> com os valores de temperatura, verifica-se a existência de uma ascensão mais pronunciada nos primeiros 10 dias das medidas de CO<sub>2</sub>, que logo em seguida diminuíram, embora com a liberação contínua desse gás. O aumento pronunciado na liberação de CO<sub>2</sub> nos primeiros 10 dias deve ter como causa a grande variação de temperatura encontrada nesse período do experimento.

## 6. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos na elaboração deste trabalho pode-se concluir que o solo de “landfarming” de refinaria de petróleo que foi estudado pode ser ainda estimulado para aumento da biodegradação de seus compostos recalcitrantes, pois os tratamentos nos quais adicionou-se casca de arroz e sua associação com vinhaça apresentaram valores maiores de evolução de CO<sub>2</sub> que aqueles onde esses componentes não foram adicionados.

A mistura de solo de “landfarming” com solo de cerrado, não proporcionou aumento na evolução de CO<sub>2</sub>. Porém, nos tratamentos onde acrescentou-se casca de arroz e vinhaça à mistura de solos os resultados foram positivos quanto a liberação de CO<sub>2</sub>.

Os métodos respirométricos de Bartha e Pramer, bem como o de detecção de CO<sub>2</sub> por absorção óptica de luz infra-vermelha, utilizados para a avaliação da evolução de CO<sub>2</sub> dos solos estudados permitiram observar que, embora os resíduos de hidrocarbonetos destinados ao tratamento em “landfarming” sejam recalcitrantes, a biodegradação pode ser estimulada se

compostos, que auxiliem a aeração e a complementação com nutrientes, forem acrescentados ao solo.

A casca de grão de arroz empregada como agente descompactante apresentou-se como um material capaz de melhorar a biodegradação que ocorre em solos contaminados por hidrocarbonetos e, portanto, pode ser empregada na melhoria dos processos de biorremediação de áreas contaminadas com essas substâncias.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, J. M.; INGRAM, J. S. I. **Tropical soil biology and fertility – a handbook of methods.** Oxon: CAB International, 1996.
  
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR - 10.004:** Resíduos Sólidos – Classificação. Rio de Janeiro, 2004. 63p.
  
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR - 10.007:** Amostragem de resíduos. Rio de Janeiro, 2004. 25p.
  
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR – 14.283:** Resíduos em solo – Determinação da biodegradação pelo método respirométrico. Rio de Janeiro, 1999.

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR - 6457: Amostras de solo - Preparação para ensaios de compactação e ensaios de caracterização**. Rio de Janeiro, 1986. 9p.
- ADMON, S.; GREEN, M.; AVNIMELECH, Y. Biodegradation kinetics of hydrocarbons in soil during land treatment of oily sludge. **Biorem. J.**, Philadelphia, v.5, n.3, p.193-209, 2001.
- AL-HADHRAMI, M. N.; LAPPIN-SEOH, H.M.; FISHER, P. J. Bacterial survival and n-alkane degradation within Omani crude oil and a mousse. **Mar. Pollut. Bullet.**, Oxford. v.30, n.6, p. 403–408, 1995.
- ATLAS, R. M. Bioremediation of petroleum pollutants. **Intern. Biodet. Biodegrad.**, Edinburg, v.35, n.1, p.317-327, 1995.
- BAIN, W. G.; HUTYRA, L.; PATTERSON, D. C.; BRIGHT, A. V.; DAUBE, B. C.; MUNGER, J. W.; WOFSY, S. C. Wind-induced error in the measurement of soil respiration using closed dynamic chambers. **Agric. For. Meteorol.** Amsterdam v. 131, n. 3-4 p. 225-232, 2005.
- BALBA, M. T.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **J. Microbiol. Methods**. Amsterdam, v. 32, n. 2, p. 155-164, 1998.
- BARBIERI, S. M. Biodegradação de compostos aromáticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Org.) **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna:EMBRAPA, 1997. Cap.10, p.211-242.
- BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Sci.**, Oxon, v. 100, p. 68-70, 1965.

- BENKE, M.B.; MERMUT, A.R.; SHARIATMADARI, H. Retention of dissolved organic carbon from vinasse by a tropical soil, kaolinite, and Fe-oxides. **Geoderma**, Amsterdam, v.91, n.1, p. 47-63, 1999.
  
- BHATNAGAR, L., FATHEPURE, B.Z. Mixed cultures in detoxification of hazardous waste. In: ZEIKUS, G., JOHNSON, E.A. (Org.) **Mixed cultures in biotechnology**. New York: McGraw-Hill, 1991. p.293-340.
  
- BOOPATHY, R. Use of anaerobic soil slurry reactors for the removal of petroleum hydrocarbons in soil. **Intern. Biodet. Biodegrad.**, Edinburg, v.52, n.3, p.161-166, 2003.
  
- BOTTURA, G. **Biodegradação de substâncias graxas por microrganismos, visando despoluição ambiental**. 1994. 49 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
  
- BOUWER, E. J. Bioremediation of organic contaminants in the subsurface. In: MITCHEL, R. (Ed.) **Environmental Microbiology**. New York: Wiley-Liss, 1992. Cap.11, p.287-318.
  
- BROWN, J. L.; NADEAU, R. J. Restoration of petroleum-contaminated soil using phased bioremediation. **Biorem. J.**, Philadelphia, v.6, n.4, p. 315-319, 2002.
  
- BUTNOR, J. R.; JOHNSON, K. H. Calibrating soil respiration measures with a dynamic flux apparatus using artificial soil media of varying porosity. **Eur. J. Soil Sci.**, Oxon, v. 55, n.4, p. 639-647, 2004.

- CHIVENGE, P.P.;MURWIRA, H.K.;GILLER, K.E.;MAPFUMO, P. SIX, J. Long-term impact of reduced tillage and residue management on soil carbon stabilization: Implications for conservation agriculture on contrasting soils. **Soil Tillage. Res.** Amsterdam, v. 94, n.2, p. 328-337, 2007.
  
- CAPONE, D. G.; BAUER, J. E. Microbial processes in coastal pollution. In: MITCHEL, R. (Ed.) **Environmental Microbiology**. New York: Wiley-Liss, 1992. Cap.8, p.197-237.
  
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Norma técnica L 6.350**: Solos – Determinação da Biodegradação de Resíduos – Método respirométrico de Bartha. São Paulo, 1990, 15p.
  
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL. **Norma Técnica P4.231**: Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação em solo agrícola. São Paulo, 2006, 17p.
  
- COUTINHO, L. M. **Cerrado**: Aspectos do solo. Estação Gráfica Ltda, 2000. Disponível em: <[http://eco.ib.usp.br/cerrado/aspectos\\_solo.htm](http://eco.ib.usp.br/cerrado/aspectos_solo.htm)>. Acesso em: 24 nov. 2007.
  
- CRIVELARO, S. H. R. **Associação de borra oleosa de refinaria de petróleo e vinhaça visando a biodegradação**. 2005. 62f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ecologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro.
  
- DAVE, H.; RAMAKRISHMA, C.; BHATT, B. D.; DESAI, J. D. Biodegradation of slop oil from a petrochemical industry and bioreclamation of slop oil contaminated soil. **W. J. Microbiol. Biotechnol.**, Paris, v.10, n.6, p. 653-656, 1994.

- DAVIS, C.; CORT, T.; DAI, D.; ILLANGASEKARE, T. H.; MUNAKATAMARR, J. Effects of heterogeneity and experimental scale on the biodegradation of diesel. **Biodegrad.**, Evanston, v.14, n.6, p.373-384, 2003.
  
- DEL'ARCO, J. P.; FRANÇA, F. P. Biodegradation of crude oil in sandy sediment. **Intern. Biodet. Biodegrad.**, Edinburg, v.44, n.2, p.87-92, 1999.
  
- DEMATTÊ, J.A.M.; GAMAA, M.A.P., COOPERA, M., ARAU'JOB, J.C., NANNI, M.R., FIORIOA, P.R. Effect of fermentation residue on the spectral reflectance properties of soils. **Geoderma**. Amsterdam, v. 120, n. 3, p. 187-200, 2004.
  
- EMBAR, K., FORGACS, C., SIVAN, A. The role of indigenous bacterial and fungal soil populations in the biodegradation of crude oil in a desert soil. **Biodegrad.**, Evanston v. 17, n.4 p. 369-377, 2006.
  
- FOCHT, D. D. Microbial degradation of chlorinated biphenyls. In: BOLLAG, J. M., STOTZKY, G. **Soil Biochem.**. New York: Marcel Dekker, 1993, vol. 8, Cap9, p.341-407.
  
- FULLER, W. H.; WARRICK, A. W. S **Soils in Waste Treatment and Utilization**. Vol.1. Boca Raton: CRC Press, 1985.
  
- GÓMEZ, J., RODRÍGUEZ, O. Effects of vinasse on sugarcane (*Saccharum officinarum*) productivity. **Rev. Fac. Agron. (LUZ)**, Maracaibo, v. 17, n. 4, p. 318-326, 2000.
  
- GRADY, C. P. L. Biodegradation: its measurement and microbiological basis. **Biotech. Bioeng.**, New Jersey, v.27, n.5, p. 660-674, 1985.

- GRAY, M. R.; BANERJEE, D. K.; DUDAS, M. J.; PICKARD, M. A. Protocols to enhance biodegradation of hydrocarbon contaminants in soil. **Biorem. J.**, Philadelphia, v.4, n.4, p.249-257, 2000
  
- HENCKLEIN, F. A. **Estabilização de “landfarming” de refinaria de petróleo e aplicabilidade em solos com baixos teores de carbono.** 2005. 61f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro.
  
- HENCKLEIN, F. A.; ANGELIS, D. F.; FURLAN, L. T.; GONÇALVES, R. A; SEABRA, P. N. Ação de agentes descompactantes e de vinhaça na biodegradação de resíduos de hidrocarbonetos no solo. **X ENAMA.** Goiânia/GO, 28/novembro-01/dezembro, 2006a.
  
- HENCKLEIN, F. A.; ANGELIS, D. F.; FURLAN, L. T.; GONÇALVES, R. A; SEABRA, P. N. Biodegradação de resíduos de hidrocarbonetos no solo de “landfarming” utilizando agentes descompactantes. **V Simp. Intern. Qual. Amb.** Porto Alegre/RS, 22-24 maio, 2006b.
  
- HENCKLEIN, F. A.; ANGELIS, D. F.; DOMINGOS, R. N.; GONÇALVES, R.N.; SEABRA, P. N.; LA SCALA, N. Avaliação da biodegradação de resíduos de hidrocarbonetos no solo de “landfarming” utilizando espectroscopia de absorção ótica no infravermelho. **4º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás.** Campinas/SP, 21-24 outubro, 2007.
  
- HIGGINS, I, J.; BURNS, R. G. The chemistry and microbiology of pollution. London: Academic Press, 1975.

- HOEPEL, R.E.; HINCHEE, R.E. Enhanced biodegradation for on-site remediation of contaminated soils and groundwater. In: WILSON, D.J.; CLARKE, A.N. (Ed.). **Hazardous waste site soil remediation. Theory and application of innovative technologies**. New York: Marcel Dekker, 1994. Cap.7, p. 311-431.
  
- JACQUES, R. J. S.; BENTOLL, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v.37, n.4, 2007.
  
- KATAOKA, A. P. A. G. **Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de “landfarming”**. 2001. 202 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
  
- KIRTLAND, B. C.; AELION, M.; STONE, P. A. Monitoring anaerobic natural attenuation of petroleum using a novel in situ respiration method in low-permeability sediment. **Biorem. J.**, Philadelphia, v.4, n.3, p.187-201, 2000.
  
- LAMONICA, H. M. **Potencial de geração de excedentes de energia elétrica a partir da biodigestão da vinhaça**. Campinas: Agrener, 2006. Apresentação em power point. Disponível em: <<http://www.nipeunicamp.org.br/agrener2006/palestras/Dia%2006-06-2006/sess5/Lamonica.ppt>> Acesso em: 22 nov. 2007.
  
- LANDIS, W. G.; YU, M. **Introduction to environmental toxicology: Impacts of chemicals upon ecological systems**. Boca Raton: CRC Press, 1995.
  
- LA SCALA, N., MARQUES, J., PEREIRA, G. T., CORA, J.E. Short-term temporal changes in the spatial variability model of CO<sub>2</sub> emissions from a Brazilian bare soil. . **Soil Biol. and Biochem.** Oxford, v. 32, n. 10, p. 1459-1462, 2000a.

- LA SCALA, N., MARQUES, J., PEREIRA, G. T., CORA, J.E. Carbon dioxide emission related to chemical properties of a tropical bare soil. **Soil Biol. and Biochem.**, Oxford v. 32, n. 10, p. 1469-1473, 2000b.
- LA SCALA, N., LOPES, A., MARQUES, J., PEREIRA, G. T., Carbon dioxide emissions after application of tillage systems for a dark red latosol in southern Brazil. **Soil and Tillage Res.**, Amsterdam, n. 3-4, v. 62, p. 163-166, 2001.
- LA SCALA, N., PANOSSO, A. R., PEREIRA, G. T., Modelling short-term temporal changes of bare soil CO<sub>2</sub> emissions in a tropical agrosystem by using meteorological data. **Appl. Soil Ecol.** Amsterdam, v. 24, n.1, p.113-116, 2003
- LIANG, K. C. C.; MCCLENDON, R.W. The influence of temperature and moisture contents regimes on the aerobic microbial activity of a biosolids composting blend. **Biores. Tech.**, Oxon, v. 86, n. 2, p.131-137, 2003.
- LUND, C. P.; RILEY, W. J.; PIERCE, L. L.; FIELD, C. B. The effect of chamber pressurization on soil surface CO<sub>2</sub> flux and the implications for NEE measurements under elevated CO<sub>2</sub> **Global Change Biol.**, Oxon, v. 5, n.3, p.269-281, 1999.
- MADEJÓN, E.; DÍAZ, M. J.; LOPEZ, R.; CABRERA, F. Co-composting of sugar beet vinasse: influence of the organic matter nature of the bulking agents used. **Biores. Tech.**, Oxon, v. 76, n. 2, p. 275-278, 2001.
- MARIANO, A.P., CRIVELARO, S.H.R., ANGELIS, D.F, BONOTTO, D.M. Use of vinasse, an ethanol distillery waste, as an amendment to bioremediation of diesel oil contaminated soils. **XXII Interam. Cong. Chem. Engin.** Buenos Aires/ARG, 1-4 outubro, 2006.
- MINHONI, M. T. A.; CERRI, C.C. Decomposição de vinhaça em solos sob diferentes níveis de umidade: liberação de CO<sub>2</sub>, formação de biomassa

microbiana e imobilização de nitrogênio adicionado. **Rev. Bras. Cienc. Solo**. Viçosa, v. 11, p. 25-30, 1987.

- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2ªed. Lavras: Editora UFLA, 2006.

- ÖSTERREICHER-CUNHA, P.; GUIMARÃES, J. R. D.; VARGAS, E. A.; SILVA, M. I. P. Study of biodegradation of BTEX-ethanol mixture in tropical soil. **Water Air Soil Pollut**. Dordrecht, v. 181, n. 1-4, p. 303-317, 2007.

- PAUL, E. A.; CLARK, F. E. **Soil Microbiol and Biochem.** 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1996.

- PELCZAR, M. J., CHAN, E. C. S., KRIEG, N. R. **Microbiologia – conceitos e aplicações**. V. 2. 2ª ed. São Paulo: Makron Books, 1996.

- PRATA, F.; LAVORENTI, A.; REGITANO, J. B.; TORNISIELO, V. L. Degradação e sorção de ametrina em dois solos com aplicação de vinhaça. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 36, n. 7, p. 975-981, 2001.

- PRIMAVESI, A. **Manejo Ecológico do Solo: a agricultura em regiões tropicais**. 8ªed. São Paulo: Nobel, 1985.

- PRINCE, R. C. Biodegradation of methy-tertiary-butyl-ether (MTBE) and other fuel oxygenates. **Critic. Rev. Microbiol.**, Philadelphia, v.26, n.3, p. 163-178, 2000.

- RESENDE, A. S; XAVIER, R. P.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Long-term effects of pre-harvest burning and nitrogen and vinasse applications on yield of sugar cane and soil carbon and nitrogen stocks on a plantation in Pernambuco, N.E. Brazil. **Plant Soil**. Dordrecht, v. 281, n.1-2, p. 339-351 2006.

- RICHARDS, B. N. **The microbiology of terrestrial ecosystems**. New York: Longman Scientific&Technical, 1987.
  
- RITTMANN, B. E. Innovation in biological processes for pollution control. In: MITCHEL, R. (Ed.) **Environm. Microbiol.**. New York: Wiley-Liss, 1992. Cap.10, p.265-286.
  
- RHYKERD, R.L.; CREWS, B.; McINNES, K.J.; WEAVER, R.W. Impact of bulking agents, forced aeration, and tillage on remediation of oil-contaminated soil. **Biores. Techn.**, Oxon:, v.67, p. 279-285, 1999.
  
- RHYKERD, R.L; WEAVER, R.W.; McINNES, K.J. Influence of salinity on bioremediation of oil in soil. **Environ. Pollut.**, Oxon, v. 90, n. 1, p. 127-130. 1995.
  
- ROSATO, Y. B. Biodegradação do petróleo In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Org.) **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna:EMBRAPA, 1997. Cap.14, p.307-334.
  
- SABATÉ, J.; VIÑAS, M.; SOLANAS, A. M. Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. **Intern. Biodet. Biodegrad.**, Edinburg, v.54, n.1, p.19-25, 2004.
  
- SCHOEFS, O.; PERRIER, M.; SAMSON, R. Estimation of contaminant depletion in unsaturated soils using a reduced-order biodegradation model and carbon dioxide measurement. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Münster, v.64, n.1, p.53-61, 2003.
  
- SEABRA, P. N. Uso da Biorremediação em Áreas Impactadas pela Indústria do Petróleo. In: MELO, I.S.; SILVA, C.M.M.S.; SCRAMIN, S.; SPESSOTO, A. (Ed.) **Biodegradação**. Jaguariúna.EMBRAPA, 2001. p.41-60.

- SKLADANY, G. J.; METTING, F. B. Jr. Bioremediation of contaminated soil. In: METTING, F. B. Jr. (Ed.) **Soil microbial ecology**. New York: Marcel Dekker, 1993, Cap. 17, p. 483-513.
  
- SILVA, A. J. N.; CABEDA, M. S. V., LIMA, J. F. W. F. Efeito de sistemas de uso e manejo nas propriedades físico-hídricas de um argissolo amarelo de tabuleiro costeiro. **R. Bras. Ci. Solo**, Viçosa, v. 29, n.6, p. 833-842, 2005.
  
- SPOSITO, G. **The chemistry of soils**. New York: Oxford University Press, 1989.
  
- TEJADA, M; GARCIA, C.; GONZALEZ, J. L.; HERNANDEZ, M. T. Organic Amendment Based on Fresh and Composted Beet Vinasse: Influence on Soil Properties and Wheat Yield. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, Stanford, v. 70, p. 900-908, 2006.
  
- TEJADA, M; GONZALEZ, J. L. Effects of two beet vinasse forms on soil physical properties and soil loss. **Catena**, Amsterdam, v. 68, n. 1 p. 41-50, 2006.
  
- TEJADA, M; MORENO, J.L.; HERNANDEZ, M.T.; GARCIA, C. Application of two beet vinasse forms in soil restoration: Effects on soil properties in an arid environment in southern Spain. **Agric. Ecosyst. Environ.** Amsterdam v. 119, n. 3-4, 2007.
  
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia** 6<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
  
- VASUDEVAN, N.; RAJARAM, P. Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. **Environ. Intern.**, Orlando, v. 26, n. 5-6, p. 409-411, 2001.

- VENKATESWARAN, K.; HARAYAMA, S. Sequential enrichment of microbial population exhibiting enhanced biodegradation of crude oil. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 41, n.9, p. 767-775, 1995.
  
- WACKETT, L. P.; ELLIS, L. B. M. Predicting biodegradation. **Environ. Microbiol.**, Braunschweig, v.1, n.2, p.119-124, 1999.
  
- ZANINI, J. R.; BARRETO, A. K. G.; LA SCALA, N. Taxa de emissão de CO<sub>2</sub> de um latossolo fertirrigado com ácido fosfórico por gotejamento. **Eng. Agríc.**, Jaboticabal, v.25, n.1, p.179-188, 2005.
  
- ZINGORE S.; MANYAME C.; NYAMUGAFATA, P.; GILLER, K. E. Long-term changes in organicmatter of woodland soils cleared for arable cropping in Zimbabwe. **Eur. J. Soil Sci.**, Oxon, v.56, n.6, p. 727-736, 2005.

## ANEXO I

### *Ensaio respirométricos*

#### 1- CO<sub>2</sub> produzido por dia

##### - Ensaio com argila expandida e casca de arroz

Dias/Tratamento	SC	SCca	SCae	SCcae	SL	SLca	SLae	SLcae
3	28,05	414,60	39,19	261,96	252,48	421,48	309,41	401,54
5	44,97	318,17	144,91	181,00	194,31	626,55	240,82	536,82
7	10,31	298,58	20,11	177,91	100,25	425,43	134,59	249,07
10	1,93	258,18	11,34	140,61	66,83	378,51	104,17	252,68
13	5,78	238,24	11,34	148,86	55,83	322,81	72,54	180,49
17	3,00	208,08	14,27	129,96	54,69	221,60	69,86	144,98
25	12,02	138,22	19,53	98,16	48,48	149,49	61,35	102,91
31	2,40	121,19	6,01	81,13	32,85	142,90	42,07	94,15
41	2,40	95,15	7,41	67,91	35,58	108,77	45,07	81,73
48	0,57	107,74	8,44	81,70	34,00	146,38	43,36	94,87
55	1,72	93,44	11,88	69,97	27,13	135,22	34,48	83,71
62	7,90	105,17	9,87	81,99	34,91	154,39	43,93	93,15
69	5,29	90,66	13,78	70,27	26,68	139,16	31,97	87,91
74	2,01	97,80	4,44	79,67	21,45	156,83	27,58	87,77
83	0,64	91,79	3,09	70,70	31,08	110,35	39,31	82,39
92	3,94	106,46	8,59	79,19	33,83	128,69	40,91	94,08
101	5,23	103,02	12,72	78,04	30,53	124,56	39,08	86,06
108	3,18	105,05	11,93	78,53	26,28	138,64	34,62	92,09

##### - Ensaio utilizando casca de arroz e vinhaça

Dias/Tratamento	SC	SCca	SCv	SCcav	SCSL	SCSLca	SCSLv	SCSLcav
5	31,74	376,99	344,63	377,63	85,67	376,99	368,11	377,63
7	11,9	881,39	750,49	898,85	70,62	889,32	892,5	902,02
8	25,4	604,53	236,4	928,23	66,63	629,93	315,73	948,83
11	2,16	286,44	150,51	584,21	28,04	398,11	166,16	598,79
13	6,47	282,4	101,95	607,69	26,7	330,14	147,27	589,89
16	7,56	213,62	67,43	319,36	30,76	286,98	93,32	387,86
20	21,23	223,36	76,36	356,07	43,28	289,92	102,08	343,82
25	3,92	168,56	52,27	307,07	29,07	220,83	61,41	261,99
33	0,83	153,96	42,71	198,75	18,75	167,92	31,25	188,33
41	2,71	139,58	29,38	180,21	24,38	173,75	28,54	213,13
49	0,42	142,5	22,71	163,75	21,88	174,38	22,71	171,67
65	38,66	274,67	76,5	308,97	69,96	296,72	77,04	301,08
81	3,16	83,1	16,03	73,91	13,99	91,77	13,99	70,23
102	0,32	52,3	11,83	72,54	8,81	85	8,81	70,48
122	6,04	64,76	13,88	66,56	11,35	74,89	11,35	70,64

## 2- Carbono biodegradado acumulado

### - - Ensaio com argila expandida e casca de arroz

Dias/Tratamento	SC	SCca	SCae	SCcae	SL	SLca	SLae	SLcae
3	168,3	2042,9	40,7	1228,8	1514,9	2247,9	1650,2	2141,5
5	348,2	2994,3	376,1	1692,5	2292,1	4475,6	2506,4	4050,2
7	389,4	4014,7	406,3	2283,8	2693,1	5988,3	2985	4935,8
10	401	5380,1	455,3	3022,2	3094,1	8007	3540,5	6283,5
13	435,6	6616,1	481,1	3781,4	3429	9728,6	3927,4	7246,1
17	459,7	8071,7	558,6	4681,6	3866,5	11304,5	4424,2	8277
25	652	9845,2	644	5885,3	4642,2	13430,6	5296,7	9740,7
31	680,8	11109,1	679,3	6721,8	5036,4	14954,8	5745,4	10745
41	728,9	12752,6	763	7881	5748	16888,5	6546,7	12198
48	736,9	14085,4	860	8889,7	6223,9	18710,1	7086,2	13378,5
55	761	15224,1	983,8	9736,4	6603,7	20392,8	7515,4	14420,2
62	871,5	16422,3	996,1	10646,1	7092,5	22314,1	8062	15579,4
69	945,6	17476,5	1093,5	11446,5	7466	24045,9	8459,8	16673,4
74	965,7	18325,8	1112,8	12134,6	7680,5	25440	8705	17453,5
83	977,2	19782,9	1150,8	13254,4	8239,9	27205,6	9333,9	18771,8
92	1048,2	21415,3	1217,4	14450,4	8848,8	29264,7	9988,5	20277,1
101	1142,2	22969,5	1326,8	15604,9	9398,3	31257,7	10613,7	21654,1
108	1186,8	24232,3	1430,8	16537,6	9766,3	32983,1	11044,6	22800,1

### - Ensaio utilizando casca de arroz e vinhaça

Dias/Tratamento	SC	SCca	SCv	SCcav	SCSL	SCSLca	SCSLv	SCSLcav
5	317,3	3452,6	3128,9	3458,9	856,8	2913,1	2824,3	2919,5
7	364,9	6930,6	6083,3	7006,7	1139,2	6188	6111,9	6245,2
8	415,7	8088,9	6505,4	8812,3	1272,5	7314,5	6610,1	8009,6
11	428,6	9794,6	7395,5	12304,7	1440,8	9534,9	7438,7	11434
13	454,5	10898,3	7777,4	14709,6	1547,6	10748,7	7921	13686,7
16	499,8	12134,7	8136,7	16580,4	1732,1	12286,1	8296,5	15829,4
20	669,7	13751,7	8577,7	19259,1	2078,4	14259,2	8766,9	18233,7
25	708,9	15398,1	9061,2	22290,6	2369,1	16176,7	9090,3	20562,8
33	722,2	17848,1	9731,2	25457,3	2669,1	18563,4	9290,3	23276,1
41	765,5	20038,1	10157,9	28297,3	3059,1	20953,4	9357	26296,1
49	772,2	22311,4	10514,6	30910,6	3409,1	23393,4	9370,3	28692,8
65	1236,1	25143,6	10968,7	34154,4	4248,6	26114,5	9455,2	31466,2
81	1337,4	27701,4	11380,3	36418,2	4696,1	28603,7	9455,2	33266,1
102	1350,7	29884,7	11863,6	39451,5	5066,1	31803,7	9455,2	35856,1
122	1592,4	32233,4	12177,2	41872,1	5520,2	34345,2	9455,2	38227,7

### 3- Eficiência de Biodegradação

#### - Ensaio com argila expandida e casca de arroz

Tratamentos	EB (%)
SC	4,9
SCca	84,1
SCae	13,5
SCcae	86,3
SL	3,1
SLca	13,9
SLae	5,4
SLcae	9,8

#### - Ensaio utilizando casca de arroz e vinhaça

Tratamentos	EB (%)
SC	4,4
SCca	95,3
SCv	42,0
SCcav	91,2
SCSL	4,2
SCSLca	23,3
SCSLv	6,7
SCSLcav	25,9

### 4- Bactérias Heterotróficas

#### - Ensaio com argila expandida e casca de arroz

Tratamentos	Inicial ( $10^4$ )	Final ( $10^4$ )
SC	1,65	14,06
SCca	3,44	373,61
SCae	1,14	1,49
SCcae	3,94	65,16
SL	32,47	116,89
SLca	67,91	629,42
SLae	99,55	78,27
SLcae	42,98	346,72

**- Ensaio utilizando casca de arroz e vinhaça**

<b>Tratamentos</b>	<b>Inicial (10<sup>4</sup>)</b>	<b>Final (10<sup>4</sup>)</b>
SC	1,20	115,10
SCca	2,50	2814,70
SCae	22,50	782,60
SCcae	5,60	2717,70
SL	16,00	19386,00
SLca	19,20	1920,40
SLae	33,90	216,60
SLcae	91,70	8113,70

**5- Fungos**

**- Ensaio com argila expandida e casca de arroz**

<b>Tratamentos</b>	<b>Inicial (10<sup>4</sup>)</b>	<b>Final (10<sup>4</sup>)</b>
SC	3,60	19,90
SCca	1,70	288,80
SCae	3,90	8,90
SCcae	3,10	143,40
SL	23,40	86,20
SLca	38,70	376,50
SLae	50,10	34,60
SLcae	20,80	201,00

**- Ensaio utilizando casca de arroz e vinhaça**

<b>Tratamentos</b>	<b>Inicial (10<sup>5</sup>)</b>	<b>Final (10<sup>5</sup>)</b>
SC	4,29	24,40
SCca	2,81	194,12
SCae	54,64	46,25
SCcae	38,82	116,47
SL	2,91	804,52
SLca	2,69	182,44
SLae	19,24	13,09
SLcae	24,68	465,70

## ANEXO II

**Ensaio utilizando espectroscopia de absorção ótica no infravermelho****1- CO<sub>2</sub> produzido durante o tratamento****- Valores acumulados**

Dias de Tratamento	SC	SCca	Scv	SCcav	SCSL	SCSLca	SCSLv	SCSLcav	SL	SLca	SLv	SLcav	SCE	SCSLE	SLE	Ar atmosférico
1	352,90	620,89	736,41	553,21	526,26	613,82	627,37	841,41	349,34	403,43	334,46	529,97	212,18	280,21	250,91	398,60
2	596,48	1073,99	1522,86	1197,19	934,98	1251,28	1139,57	1680,10	871,57	768,39	647,49	1173,95	407,83	514,84	507,82	779,82
3	871,13	1693,86	2279,52	1923,65	1623,33	1877,41	1861,69	2511,61	1311,09	1319,59	1167,92	1847,16	611,25	786,33	797,00	1169,50
4	1184,76	2287,43	2963,84	2450,35	2127,54	2475,14	2409,05	3207,03	1599,64	1732,13	1580,28	2267,62	852,55	1040,48	1058,72	1656,64
5	1408,82	2634,97	3709,34	2879,57	2448,19	3012,15	2852,14	4019,26	1987,53	1983,44	1835,74	2687,46	1052,46	1257,82	1291,78	2067,77
6	1665,17	3194,87	4391,05	3543,66	3070,04	3617,48	3557,32	4807,30	2377,45	2550,80	2320,07	3358,88	1251,12	1513,86	1546,44	2464,09
7	1882,06	3626,34	4964,72	3967,13	3515,43	4274,30	4066,19	5243,97	2654,45	2966,00	2744,69	3783,33	1434,24	1723,20	1778,22	2860,02
8	2129,18	4084,39	5804,96	4636,28	4084,02	5006,99	4794,69	6109,47	3132,78	3509,25	3237,49	4434,26	1616,70	1943,80	2009,37	3234,36
9	2323,94	4302,31	6227,50	5007,19	4377,25	5377,78	5210,26	6660,01	3409,85	3801,48	3516,72	4782,53	1822,37	2166,68	2230,06	3660,74
10	2599,92	4810,42	6746,29	5308,61	4667,08	5797,10	5602,16	7235,60	3823,00	4060,02	3765,41	5145,30	2017,78	2390,33	2467,18	4056,66
11	2796,60	5048,55	7191,79	5716,46	5066,43	6271,73	6167,41	7890,93	4161,58	4451,05	4127,17	5548,38	2213,10	2615,88	2724,55	4508,66
12	2992,09	5294,49	7447,16	6027,26	5470,76	6703,17	6691,20	8386,48	4500,37	4823,03	4494,71	5938,27	2400,94	2839,54	2975,23	4916,27
13	3187,21	5511,12	7787,66	6349,82	5771,70	7085,22	7063,20	8879,92	4801,85	5152,45	4797,95	6311,95	2596,57	3063,28	3193,16	5310,14
15	3395,03	5752,00	8244,94	6966,51	6075,77	7544,11	7459,62	9444,62	5150,15	5428,25	5030,71	6683,14	2798,30	3287,31	3439,80	5752,16
16	3598,75	6023,24	8685,70	7148,00	6508,18	8032,09	8106,67	10088,96	5486,74	5834,51	5373,75	7074,51	3020,82	3543,99	3712,92	6166,12
18	3820,66	6378,16	8936,99	7477,91	6961,50	8533,17	8611,34	10630,94	5781,75	6301,88	5786,14	7585,63	3257,84	3795,60	3996,05	6622,63
20	4069,21	6638,73	9388,09	7810,21	7272,44	9070,42	9023,81	11178,37	6155,23	6776,34	6024,68	7982,03	3483,49	4034,76	4253,67	7025,95
22	4282,44	6904,50	9768,08	8173,92	7646,03	9551,58	9493,76	11787,55	6511,17	7125,58	6330,04	8294,70	3717,84	4297,35	4487,57	7400,34
24	4477,01	7196,59	9977,96	8425,51	7990,55	9999,70	10017,35	12204,17	6759,22	7467,65	6648,01	8665,71	3927,96	4541,17	4717,99	7782,00
26	4677,84	7445,65	10362,03	8697,09	8265,63	10447,81	10356,30	12693,08	7070,75	7735,18	6868,89	9029,92	4134,23	4764,30	4965,32	8173,00
28	4877,16	7736,57	10721,13	9038,95	8642,31	10891,63	10835,28	13271,36	7373,65	8152,54	7209,38	9386,64	4335,90	5007,03	5219,56	8552,38
30	5096,40	7968,50	10956,40	9272,02	9006,18	11314,17	11314,51	13656,70	7657,38	8575,88	7586,81	9819,82	4611,95	5239,29	5472,42	8961,79
33	5305,48	8274,28	11305,32	9592,17	9278,55	11817,23	11769,99	14274,52	8012,98	8990,08	7928,57	10271,51	4834,24	5537,04	5797,44	9366,12

## - Valores Diários, Médias Máximos, Mínimos e Desvio Padrão

Dias de Tratamento	SC	SCca	SCv	SCcav	SCSL	SCSLca	SCSLv	SCSLcav	SL	SLca	SLv	SLcav	SCE	SCSLE	SLE	Ar atmosférico
1	352,90	620,89	736,41	553,21	526,26	613,62	627,37	841,41	349,34	403,43	334,46	529,97	212,18	280,21	250,91	398,60
2	243,58	453,10	786,45	643,98	408,72	637,46	512,20	838,69	522,23	364,96	313,02	643,98	195,65	234,63	256,91	381,22
3	274,65	619,87	756,66	726,46	688,36	626,14	722,13	831,50	439,51	551,20	520,44	673,20	203,42	271,49	289,18	389,68
4	313,63	593,58	684,32	526,70	504,21	597,72	547,35	695,42	288,56	412,54	412,35	420,47	241,30	264,15	261,72	487,14
5	224,06	347,53	745,50	429,23	320,64	537,02	443,09	812,23	387,89	251,31	265,47	419,83	199,92	217,34	233,07	411,13
6	296,35	559,90	681,71	664,09	621,86	605,32	705,18	788,04	369,92	567,36	484,33	671,42	198,65	256,04	254,65	396,33
7	216,89	431,47	573,67	423,48	445,38	656,62	508,87	436,67	277,00	415,20	424,62	424,46	183,12	209,34	231,78	395,93
8	247,12	458,05	840,24	669,14	568,59	732,70	728,51	865,49	478,33	543,25	492,81	650,93	182,46	220,60	231,16	374,33
9	194,77	217,91	422,54	370,91	283,23	370,78	415,57	590,54	277,07	292,23	279,23	348,27	205,67	222,89	220,69	426,38
10	275,98	508,12	518,78	301,42	289,83	419,32	391,90	575,59	413,15	288,54	248,69	362,78	195,41	223,64	237,11	395,93
11	196,68	238,13	445,50	407,85	399,34	474,62	565,24	655,33	338,57	391,04	361,75	403,08	195,33	225,55	257,38	451,99
12	195,49	245,93	255,37	310,80	404,33	431,44	523,79	485,55	338,80	371,98	367,55	389,89	187,83	223,67	250,67	407,61
13	195,13	216,63	340,50	322,56	300,94	382,05	372,00	489,44	301,47	329,42	303,24	373,68	194,63	223,74	217,94	393,88
15	207,81	240,89	457,27	346,69	304,07	458,89	396,42	584,70	348,30	275,80	232,75	371,19	202,73	224,03	246,64	442,02
16	203,72	271,24	440,76	451,49	432,41	487,98	647,04	644,34	336,59	406,26	343,04	391,37	222,52	256,68	273,12	413,96
18	221,91	354,92	251,29	329,91	453,32	501,07	504,67	541,98	295,01	467,37	412,40	511,12	237,01	251,61	283,13	456,50
20	248,55	280,57	451,10	332,29	310,94	537,25	412,47	547,44	373,47	474,47	238,54	396,40	225,65	239,16	257,61	403,32
22	213,23	285,77	379,99	363,71	373,60	481,16	469,95	609,17	355,94	349,23	305,36	312,67	234,36	262,59	233,90	374,40
24	194,56	292,09	209,88	251,60	344,51	448,12	523,59	416,63	248,05	342,07	317,97	371,01	210,12	243,82	230,42	381,70
26	200,84	249,06	384,08	271,58	275,08	448,11	338,94	488,91	311,53	267,53	220,88	364,21	206,27	223,13	247,33	390,96
28	199,31	290,92	359,10	341,86	376,68	443,82	478,99	578,28	302,91	417,36	340,49	356,72	201,67	242,73	254,24	379,37
30	219,24	231,94	235,27	233,06	363,87	422,54	479,23	385,33	283,73	423,34	377,43	433,18	276,05	232,26	252,86	409,41
33	209,08	305,78	348,92	320,15	272,37	503,05	455,48	617,83	355,60	414,20	341,76	451,69	222,29	297,75	325,02	404,33

Tratamentos	Valor Máximo (Máx)	Valor Mínimo (Min)	Média (Méd)	Desvio Padrão (DP)
SC	352,90	194,56	230,67	41,46
SCca	620,89	216,63	359,75	139,17
SCv	840,24	209,88	491,54	195,35
SCcav	726,46	233,06	417,05	144,53
SCSL	688,36	272,37	403,41	114,35
SCSLca	732,70	370,78	513,79	96,47
SCSLv	728,51	338,94	511,74	111,34
SCSLcav	865,49	385,33	620,63	147,15
SL	522,23	248,05	348,39	67,57
SLca	567,36	251,31	390,87	90,64
SLv	520,44	220,88	344,72	84,06
SLcav	673,20	312,67	446,59	111,34
SCE	276,05	182,46	210,18	21,84
SCSLE	297,75	209,34	240,74	22,45
SLE	325,02	217,94	252,06	24,06
Ar atmosférico	487,14	374,33	407,22	28,56

## 2- Quantificação da Comunidade Microbiana

### - Bactérias Heterotróficas

Tratamentos	Inicial ( $10^4$ )	Final ( $10^4$ )
SC	5,27	3,31
SCca	5,21	150,59
SCv	2,02	7,90
SCcav	6,40	229,96
SCSL	27,43	18,94
SCSLca	4,22	1893,98
SCSLv	76,36	138,81
SCSLcav	37,81	1549,98
SL	19,84	177,11
SLca	35,32	710,23
SLv	68,54	57,51
SLcav	38,49	274,42
SCE	0,00	15,78
SCSLE	0,00	22,51
SLE	0,00	6,22

### - Fungos

Tratamentos	Inicial ( $10^3$ )	Final ( $10^3$ )
SC	6,47	85,00
SCca	342,33	107,23
SCv	45,28	613,65
SCcav	137,02	598,33
SCSL	54,12	365,58
SCSLca	50,83	1362,58
SCSLv	32,82	4029,86
SCSLcav	196,46	7439,88
SL	31,57	1634,90
SLca	67,93	882,27
SLv	153,31	6414,00
SLcav	76,99	2069,00
SCE	0,00	8245,00
SCSLE	0,00	159,66
SLE	0,00	118,13

### 3- Avaliação da Umidade

Tratamentos	Inicial	Final
SC	1,9	22,6
SCca	2,8	27,9
SCv	1,9	29,1
SCcav	2,8	26,8
SCSL	8,0	36,2
SCSLca	6,9	38,8
SCSLv	8,0	44,9
SCSLcav	6,9	49,7
SL	36,6	33,9
SLca	35,0	44,9
SLv	36,6	43,8
SLcav	35,0	62,0
SCE	8,0	14,2
SCSLE	47,3	43,2
SLE	7,5	24,7

### 4- Avaliação do potencial hidrogeniônico

Tratamentos	Inicial	Final
SC	4,30	4,40
SCca	4,40	4,60
SCv	4,20	6,80
SCcav	4,30	6,30
SCSL	4,70	4,70
SCSLca	4,80	4,70
SCSLv	4,80	6,20
SCSLcav	4,50	5,90
SL	4,60	4,80
SLca	5,00	4,80
SLv	4,80	5,10
SLcav	4,90	5,00
SCE	4,60	5,10
SCSLE	4,90	5,00
SLE	4,70	5,10

**5- Avaliação da Temperatura**

<b>Dias de Tratamento</b>	<b>Valor Máximo (Máx)</b>	<b>Valor Mínimo (Min)</b>	<b>Média</b>	<b>Média Geral</b>
0	47,0	24,0	35,5	30,1
1	38,5	23,0	30,8	30,1
2	38,0	23,0	30,5	30,1
3	42,0	22,0	32,0	30,1
4	42,0	24,0	33,0	30,1
5	43,0	23,0	33,0	30,1
6	43,0	23,0	33,0	30,1
7	40,0	22,0	31,0	30,1
8	36,0	24,0	30,0	30,1
9	31,0	26,0	28,5	30,1
10	30,0	26,0	28,0	30,1
11	29,0	26,0	27,5	30,1
12	29,0	27,0	28,0	30,1
13	30,0	26,0	28,0	30,1
15	31,0	27,0	29,0	30,1
16	32,0	27,0	29,5	30,1
18	32,0	27,0	29,5	30,1
20	27,0	25,0	26,0	30,1
22	28,0	27,0	27,5	30,1
24	28,0	25,0	26,5	30,1
26	29,0	25,0	27,0	30,1
28	33,0	32,0	32,5	30,1
30	34,0	31,0	32,5	30,1
32	34,0	31,0	32,5	30,1
33	33,0	31,0	32,0	30,1

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)