



Universidade do Porto

Faculdade de Engenharia

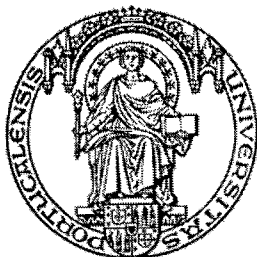
FEUP



Maria José Loureiro Moreira Padrão

Reabilitação de Solos Contaminados com Produtos Petrolíferos Utilizando Técnicas Agrárias

FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO



Departamento de Engenharia de Minas e Geoambiente

Reabilitação de Solos Contaminados com Produtos Petrolíferos Utilizando Técnicas Agrárias

Dissertação apresentada à Universidade do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, ramo Geoambiente, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor António Manuel Antunes Fiúza da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Maria José Loureiro Moreira Padrão

Licenciada em Engenharia Química

pelo Instituto Superior de Engenharia do Porto

Porto, Janeiro de 2004

UNIVERSIDADE DO PORTO
Faculdade de Engenharia
BIBLIOTECA M
N.º 79701
CDU 628(043)
Data 11 / 5 / 2004

TENHO UM MARTELO!



POSSO CONSTRUIR COISAS!
POSSO DESTRUIR COISAS!
POSSO ALTERAR O MEU MEIO AMBIENTE
AO MESMO TEMPO QUE FAÇO UM BARULHO
ENSURDECEDOR!



É BESTIAL SER
HOMEM!



WREZON

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao meu Orientador Científico, Professor Doutor António Fiúza, por todo o apoio prestado e sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

Por toda a disponibilidade, paciência e conhecimento que me foi transmitido, quero agradecer à Eng.^a Cristina Vila.

Ao Eng. João Amorim, em representação da empresa Petrogal, S.A., por toda a atenção dispensada.

A todos os meus amigos pelo estímulo, por estarem sempre presentes, por tudo... um muito obrigada do fundo do coração.

Uma referência muito especial aos meus pais e irmãos, que me foram aturando e que das mais diversas formas me foram incentivando e proporcionando sempre um constante apoio.

Ao João, Afonso, Matilde, Bernardo e José Eduardo...

Resumo

A tecnologia conhecida como técnicas agrárias demonstra uma elevada aptidão na degradação de solos contaminados com hidrocarbonetos petrolíferos.

Os estudos laboratoriais foram conduzidos utilizando bioreactores contendo dois tipos de solos: um contaminado com crude e outro contaminado com diesel. Ambos foram recolhidos no seu local de ocorrência. A actividade microbiana foi estimulada por arejamento e adição de uma solução enriquecida em nutrientes. Os solos foram amostrados semanalmente de modo a controlar e monitorizar os seguintes parâmetros: pH, humidade, população bacteriana, teor em nutrientes e concentração de contaminantes. As percentagens de degradação alcançadas foram satisfatórias nos dois solos, sendo de 80% no crude e de 76% no diesel.

O estudo da cinética da degradação foi desenvolvido a partir dos resultados experimentais obtidos. Foram testados diversos modelos de modo a determinar o melhor ajuste aos dados experimentais. O modelo de primeira ordem descreve um ajuste razoável aos resultados obtidos, com constantes cinéticas de $0,021 \text{ dia}^{-1}$ e $0,019 \text{ dia}^{-1}$ para o crude e diesel respectivamente. O modelo logístico aplicado ao desenvolvimento temporal da densidade da população microbiana, não se revelou uma escolha acertada, por carência de dados experimentais relativos à concentração de biomassa na fase estacionária. Foi igualmente testado, a título meramente informativo, um modelo dinâmico de difusão do oxigénio no solo para avaliar a importância do arejamento nas técnicas agrárias. Finalmente, foi utilizado um complexo modelo matemático que descreve simultaneamente a evolução temporal da biomassa e da degradação biótica e abiótica do contaminante. O ajuste foi o mais adequado aos resultados experimentais, tendo o modelo revelado uma boa robustez e flexibilidade.

Abstract

The technology known as landfarming exhibits a high capacity of biodegradation for soils contaminated by petroleum hydrocarbons.

Tests at laboratory scale were conducted using pans filled with two types of soil, one contaminated with crude oil and the other with diesel. Both samples were collected at the respective occurrence site. The microbial activity was stimulated by aeration and by successive addition of a solution enriched in nutrients. The soils were weekly sampled in order to control and monitorize the following parameters: pH, moisture content, microbial population density, nutrient concentrations and the grade of the contaminants. The efficiency of degradation reached for both soils was satisfactory, 80% for the crude and 76% for the diesel.

The kinetics of the biodegradation was also studied based on the experimental results. Several models were considered in order to determine the best fitting for the experimental data. The first order decay model shows a reasonable fit to the results, with a specific rate of 0.021 day^{-1} for the crude oil and 0.019 day^{-1} for the diesel. The logistic model applied to the time evolution of the microbial population density did not revealed to be a wise choice, specially because there no data available for the biomass concentration on the stationary phase. It was also developed a theoretical dynamic model for the diffusion of the oxygen in soils with shows the importance of the aeration in landfarming. Finally, it was used a complex dynamic model which simultaneously describes the time evolution of the biomass and the contaminant degradation, both for the biotic and the abiotic components. The fitting to the experimental results was adequate and the model exhibits a fair robustness and flexibility.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1 Enquadramento.....	2
1.2 Tratamentos biológicos.....	3
1.3 Processo de biodegradação de hidrocarbonetos.....	4
1.4 Técnicas Agrárias.....	6
1.4.1 Características do solo.....	8
1.4.1.1 Densidade da população microbiana.....	8
1.4.1.2 pH do solo.....	8
1.4.1.3 Teor de humidade.....	9
1.4.1.4 Temperatura do solo.....	9
1.4.1.5 Concentração em nutrientes.....	10
1.4.1.6 Textura do solo.....	11
1.4.2 Características dos contaminantes.....	11
1.4.2.1. Volatilidade.....	11
1.4.2.2. Estrutura química.....	12
1.4.2.3. Concentração e toxicidade.....	13
1.4.3 Condições climatéricas.....	13
2. Fase Experimental.....	15
2.1 Recolha das amostras.....	16
2.2. Preparação das amostras.....	16
2.3 Caracterização das amostras.....	17

2.3.1 Caracterização física.....	17
2.3.1.1 Análise granulométrica e textura do solo.....	17
2.3.1.2 Densidade a granel.....	19
2.3.1.3 Densidade das partículas.....	19
2.3.1.4 Porosidade.....	19
2.3.1.5 Humidade e grau de saturação.....	20
2.3.2 Caracterização química.....	20
2.3.2.1 Teor de matéria orgânica.....	20
2.3.2.2 pH.....	21
2.3.2.3 Concentração de contaminantes.....	21
2.3.2.4 Azoto de Kjeldahl.....	22
2.3.3 Caracterização microbiológica.....	22
2.4 Análise cruzada das caracterizações.....	24
2.5. Estudos de biodegradabilidade.....	27
2.5.1 Evolução temporal da biodegradação.....	29
2.5.1.1 pH.....	29
2.5.1.2 Humidade.....	32
2.5.1.3 Teor em azoto e fósforo.....	37
2.5.1.4 Densidade da população bacteriana.....	38
2.5.1.5 Concentração dos contaminantes.....	45
3. Modelos Cinéticos.....	53
3.1 Modelo cinético de 1ª ordem.....	54
3.2 Modelo logístico.....	59

3.3 Modelo de difusão do oxigénio.....	62
3.4 Modelo matemático de interacção substrato-biomassa.....	69
4. Conclusões.....	77
5. Prosseguimento de estudos.....	80
6. Bibliografia.....	82
Anexos.....	93
Anexo A Tabelas Auxiliares.....	94
A.1 Tabelas auxiliares de apoio ao capítulo 2.....	95
A.2 Tabelas auxiliares e Figuras de apoio ao capítulo 3.....	100
A.2.1 Tabelas auxiliares para a construção do modelo logístico.....	100
A.2.2 Tabelas e Figuras auxiliares para o desenvolvimento do modelo matemático de interacção substrato-biomassa.....	100
Anexo B Integrações numéricas.....	103
B.1 Integração da equação logística.....	104
B.2 Integração da equação diferencial do modelo matemático de interacção substrato-biomassa.....	106
Anexo C Procedimentos experimentais.....	109
C.1 Análises químicas ao solo.....	110
C.1.1 Determinação do teor natural de matéria orgânica.....	110
C.1.2 Determinação do azoto de Kjeldahl.....	113
C.1.3 Determinação do fósforo total.....	116
C.1.4 Determinação da concentração em TPH's.....	119
C.2 Análises microbiológicas ao solo.....	122
C.2.1 Preparação do meio mineral.....	122

C.2.2 Determinação da densidade bacteriana no solo (meio Agar).....	124
C.2.3 Determinação da densidade bacteriana no solo (método MPN)).....	126
Anexo D Publicações efectuadas sobre o tema proposto a dissertação.....	128

Índice de Figuras

Figura 1.1 Imagem de bactérias presentes no solo.....	4
Figura 1.2 Representação esquemática da biodegradação aeróbia no solo.....	6
Figura 1.3 Esquema representativo das técnicas agrárias.....	7
Figura 1.4 Potencial relativo de biodegradação.....	12
Figura 1.5 Operação típica das técnicas agrárias.....	13
Figura 2.1 Diagrama triangular para determinação da classe granulométrica dos solos.....	18
Figura 2.2 Imagem dos kits de determinação dos TPH's.....	21
Figura 2.3 Imagem do destilador de azoto de Kjeldahl.....	22
Figura 2.4 Aspecto geral da montagem laboratorial.....	27
Figura 2.5 Aspecto dos dois tabuleiros de controlo.....	27
Figura 2.6 Aspecto dos tabuleiros contendo solos contaminados com crude e diesel.....	28
Figura 2.7 Pormenor da colocação de areia nos tabuleiros.....	28
Figura 2.8 Pormenor da inclinação dos tabuleiros para a recolha dos lixiviados....	28
Figura 2.9 Evolução temporal do pH nos solos em estudo.....	29
Figura 2.10 Evolução do pH no tabuleiro controlo do crude.....	30
Figura 2.11 Evolução do pH no tabuleiro controlo do diesel.....	30
Figura 2.12 Evolução do pH no solo contaminado com crude (estudo de biodegradabilidade).....	31
Figura 2.13 Evolução do pH no solo contaminado com diesel (estudo de biodegradabilidade).....	32
Figura 2.14 Evolução temporal da humidade nos solos em estudo.....	32

Figura 2.15 Registo diário da temperatura ambiente (recolha efectuada no interior do laboratório às 8h).....	33
Figura 2.16 Evolução da humidade no tabuleiro controlo do crude.....	33
Figura 2.17 Evolução da humidade no tabuleiro controlo do diesel.....	34
Figura 2.18 Evolução da humidade no solo contaminado com crude (estudo de biodegradabilidade).....	34
Figura 2.19 Evolução da humidade no solo contaminado com diesel (estudo de biodegradabilidade).....	36
Figura 2.20 Aspecto das colónias bacterianas.....	38
Figura 2.21 Evolução da densidade bacteriológica no solo contaminado com crude.....	39
Figura 2.22 Análise combinada entre a densidade bacteriológica e o pH no solo contaminado com crude (estudo de biodegradabilidade).....	40
Figura 2.23 Análise combinada entre a densidade bacteriológica e a humidade no solo contaminado com crude (estudo de biodegradabilidade).....	40
Figura 2.24 Evolução da densidade bacteriológica no solo contaminado com diesel.....	41
Figura 2.25 Análise combinada entre a densidade bacteriológica e o pH no solo contaminado com diesel (estudo de biodegradabilidade).....	42
Figura 2.26 Análise combinada entre a densidade bacteriológica e a humidade no solo contaminado com diesel (estudo de biodegradabilidade).....	42
Figura 2.27 Determinação do número de bactérias com o meio <i>Trypticase Soy Broth</i>	43
Figura 2.28 Evolução da densidade bacteriana específica do crude.....	44
Figura 2.29 Evolução da densidade bacteriana específica do diesel.....	44
Figura 2.30 Evolução da degradação dos contaminantes nos solos em estudo...	45
Figura 2.31 Evolução da degradação do crude no tabuleiro controlo.....	46
Figura 2.32 Evolução da degradação do diesel no tabuleiro controlo.....	46

Figura 2.33 Relação entre as propriedades físico-químicas dos contaminantes e potencial de volatilização.....	47
Figura 2.34 Análise combinada entre a densidade bacteriológica e a concentração de crude no tabuleiro controlo.....	48
Figura 2.35 Análise combinada entre a densidade bacteriológica e a concentração de diesel no tabuleiro controlo.....	48
Figura 2.36 Evolução da biodegradação do crude.....	49
Figura 2.37 Análise combinada entre a densidade bacteriológica e a concentração de crude.....	50
Figura 2.38 Evolução da biodegradação do diesel.....	50
Figura 2.39 Análise combinada entre a densidade bacteriológica e a concentração de diesel.....	51
Figura 3.1 Determinação da constante cinética de primeira ordem para o crude...	58
Figura 3.2 Determinação da constante cinética de primeira ordem para o diesel..	58
Figura 3.3 Curva logística ($\lambda > 0$)	60
Figura 3.4 Ajuste dos resultados experimentais de biomassa pelo modelo logístico.....	61
Figura 3.5 Distribuição de oxigénio no solo para $r = -4,17 \cdot 10^{-5} \text{ g}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$	66
Figura 3.6 Distribuição de oxigénio no solo para $r = -1 \cdot 10^{-5} \text{ g}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$	67
Figura 3.7 Distribuição de oxigénio no solo para $r = -6 \cdot 10^{-6} \text{ g}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$	68
Figura 3.8 Determinação da constante cinética k_3 para o crude.....	71
Figura 3.9 Determinação da constante cinética k_3 para o diesel.....	72
Figura 3.10 Ajuste entre os valores experimentais e os resultados teóricos para o crude.....	73
Figura 3.11 Evolução da biomassa no solo contaminado com crude.....	74
Figura 3.12 Ajuste entre os valores experimentais e os resultados teóricos para o diesel.....	75

Figura A.1	Determinação do parâmetro a para o solo contaminado com crude.....	100
Figura A.2	Determinação do parâmetro a para o solo contaminado com diesel....	101
Figura C.1	Determinação do número de microorganismos.....	126

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 Microorganismos presentes no solo com capacidade para degradarem hidrocarbonetos.....	5
Tabela 2.1 Classificação do solo de acordo com o calibre das partículas.....	17
Tabela 2.2 Propriedades físicas, químicas e microbiológicas das amostras.....	24
Tabela 2.3 Análise aos lixiviados obtidos no solo contaminado com crude.....	35
Tabela 2.4 Identificação visual das colónias existentes nos solos.....	38
Tabela 3.1 Modelos de biodegradação.....	57
Tabela 3.2 Valores dos parâmetros do modelo matemático de interacção substrato-biomassa.....	71
Tabela A.1 Análise granulométrica do solo contaminado com crude.....	95
Tabela A.2 Análise granulométrica do solo contaminado com diesel.....	95
Tabela A.3 Classificação textural dos solos em estudo.....	95
Tabela A.4 Evolução temporal do pH no solo contaminado com crude.....	96
Tabela A.5 Evolução temporal do pH no solo contaminado com diesel.....	96
Tabela A.6 Evolução temporal da humidade no solo contaminado com crude.....	96
Tabela A.7 Evolução temporal da humidade no solo contaminado com diesel.....	97
Tabela A.8 Evolução temporal da temperatura.....	97
Tabela A.9 Evolução da densidade bacteriana no solo contaminado com crude (meio Agar).....	98
Tabela A.10 Evolução da densidade bacteriana no solo contaminado com diesel (meio Agar).....	98
Tabela A.11 Evolução da densidade bacteriana no solo contaminado com crude (meio <i>Bushnell-Haas</i>).....	98
Tabela A.12 Evolução da densidade bacteriana no solo contaminado com diesel (meio <i>Bushnell-Haas</i>).....	99
Tabela A.13 Evolução da concentração de TPH's no solo contaminado com crude.....	99
Tabela A.14 Evolução da concentração de TPH's no solo contaminado com diesel.....	99
Tabela A.15 Conversão da densidade bacteriana no solo contaminado com crude (meio Agar).....	100

Tabela A.16 Determinação da constante cinética k_3 para o solo contaminado com crude.....	101
Tabela A.17 Determinação da constante cinética k_3 para o solo contaminado com diesel.....	101
Tabela A.18 Conversão da densidade bacteriana no solo contaminado com diesel (meio Agar).....	102
Tabela C.1 Factores de resposta para os hidrocarbonetos petrolíferos mais comuns.....	121
Tabela C.2 Preparação da solução de macro e micronutrientes.....	122

Lista de símbolos

a	concentração assintótica, mg/Kg
B	concentração de células na fase sólida, mg/Kg
c	concentração de oxigénio, g/m ³
C	concentração de substrato, mg/L ou mg/Kg
C₂	fracção biodegradável do produto petrolífero, mg/Kg
C₃	fracção abiótica do produto petrolífero, mg/Kg
D	difusividade do oxigénio no ar, m ² /s
f_s	grau de saturação
I	constante de integração
I₂	constante de integração
J	fluxo, g/(m ² .s)
k	constante
k₁	constante cinética de segunda ordem, L/(mg.dia)
k₂	constante cinética de segunda ordem, L/(mg.dia)
k₃	constante cinética de primeira ordem, dia ⁻¹
k₄	constante, L/(mg.dia)
k_d	coeficiente de manutenção de energia, dia ⁻¹
K_s	coeficiente de saturação, mg/L
L	profundidade para a qual a concentração de oxigénio se nula, m
r	velocidade de consumo do oxigénio, g/(m ³ .s)
r_c	velocidade de crescimento, mg/(L.dia)

r_0	velocidade de remoção do contaminante, mg/(L.dia)
S	área, m ²
t	tempo, dia
$t_{1/2}$	tempo de semi-vida, dia ⁻¹
X	concentração de biomassa, mg/L
Y	factor de conversão do substrato, g de células geradas/g de substrato utilizado
z	distância a partir da superfície, m
β	factor de inibição, mg/L
θ	humidade, %
μ	constante
$\mu_{\text{máx}}$	velocidade específica de crescimento máximo, dia ⁻¹
ρ	densidade a granel, g/cm ³
ρ_m	densidade das partículas, g/cm ³
Φ	porosidade

Introdução

1. Introdução

1.1 Enquadramento

Pode definir-se o solo como a camada superficial da litosfera, substrato essencial para a biosfera terrestre, que desempenha como principal função ser suporte e fonte de nutrientes para a vegetação e, como tal, base de toda a cadeia alimentar. Constituído por minerais, matéria orgânica, organismos vivos, ar e água, o solo contribui como um sistema complexo e interactivo na regularização do ciclo hidrológico, nomeadamente através da sua capacidade de transformação, de filtro e de tampão. É no solo que se situam os aquíferos que abastecem a maioria das populações com água potável. Por esta razão, o solo pode ser visto com um “organismo vivo” onde a actividade biológica determina o seu potencial.

O uso do solo para actividades agrícolas, pecuárias e industriais tem tido como consequência elevados níveis de contaminação. De facto, aos usos referidos associam-se, geralmente, a deposição inadequada de resíduos, o impróprio manuseamento ou armazenamento de substâncias perigosas, o uso excessivo de nutrientes e pesticidas.

No território nacional, a existência de locais potencialmente contaminados são, segundo o Laboratório Nacional de Engenharia Civil (LNEC), numerosos e de acordo com o Instituto Nacional de Resíduos (INR), este problema de poluição está relacionado com um desenvolvimento industrial insustentável. Esta constatação suscita a necessidade de aprofundar a limitação dos recursos do solo face aos usos que o reclamam e a tomada de decisões que caminhem cada vez mais para a sua preservação e utilização sustentável.

Apesar da existência de uma lacuna no quadro normativo nacional no que concerne à poluição dos solos, esta área tem sido compensada, caso a caso, pelo recurso às legislações canadiana e holandesa. A legislação canadiana baseia-se na concepção da utilização específica para o solo, distinguindo três tipologias de utilização de solo: a agrícola, a habitacional e a industrial. A legislação holandesa é particularmente rigorosa pois baseia-se numa perspectiva de multi-utilização do solo, o que obriga a que este deve sempre obedecer às limitações derivadas dos cenários mais restritivos.

Actualmente existem vários tipos de tecnologias que podem ser aplicadas segundo diferentes princípios de funcionamento. Para a selecção da melhor tecnologia

disponível contribuem factores como as características geológicas da área de intervenção, a actividade aí anteriormente exercida, o tipo de contaminação presente, a sua localização espacial e o uso a dar ao solo em questão. O projecto de descontaminação e remediação de solos considera, normalmente, três fases fundamentais: identificação dos locais contaminados, diagnóstico e avaliação e finalmente a implementação de soluções de remediação/descontaminação [Correia, 2002].

É neste âmbito que se pretende elaborar este trabalho, partindo de dois solos contaminados, respectivamente com crude e diesel, recolhidos do seu local de ocorrência. A investigação foi orientada de acordo com os seguintes objectivos:

- Avaliação da aptidão de uma tecnologia de reabilitação biológica ao problema proposto.
- Quantificação das principais variáveis do processo de biodegradação.
- Determinação da cinética de degradação.
- Desenvolvimento de um modelo matemático.

1.2 Tratamentos biológicos

Um dos aspectos de maior relevância no solo é a sua heterogeneidade. O facto de conter poros e espaços descontínuos cria gradientes químicos e físicos que proporcionam a ocorrência de fenómenos biológicos.

Recentemente tem sido dada particular atenção aos tratamentos biológicos de descontaminação de solos, tecnologia promissora com inúmeras vantagens face aos tratamentos físicos e químicos, das quais se destacam a diminuição do risco para a saúde pública bem como para o ecossistema e a não interferência com as propriedades naturais do solo.

O termo bio reabilitação é aplicado a qualquer sistema ou processo no qual métodos biológicos são utilizados para transformar ou imobilizar contaminantes do solo [Eweis et al., 1998].

Em termos globais a bio reabilitação de solo pode ser operada por duas vias distintas: processos de descontaminação *in situ* ou *ex situ*. O termo *in situ* provém do latim e significa “no seu local original”, ou seja requer o transporte de oxigénio, e possivelmente de nutrientes para o local onde se encontra o solo a regenerar. Os

métodos de tratamento *in situ* incluem as tecnologias: bio-ventilação (*bioventing*), bio-arrastamento *in-situ* (*bio-sparging*), atenuação natural e bioremediação *in-situ* [Grasso, 1993]. O tratamento *ex situ* exige a extracção, por escavação, do solo contaminado. O solo extraído é reabilitado em estações de tratamento, sendo depois reposto no local de origem ou noutro, para outros fins, depois de descontaminado. Os métodos *ex situ* incluem tecnologias conhecidas por técnicas agrárias (*landfarming*), eiras biológicas (*bio-piles*), compostagem e reactores biológicos [Grasso, 1993].

1.3 Processo de biodegradação de hidrocarbonetos

O reconhecimento da capacidade dos microorganismos presentes no solo degradarem os hidrocarbonetos petrolíferos remonta ao final do século XIX.

Em 1946, Claude E. ZoBell demonstrou a existência de interacções entre os microorganismos e os hidrocarbonetos. Das cem espécies de microorganismos analisadas, trinta possuíam capacidade para degradarem os compostos petrolíferos como única fonte de carbono e energia. Mais tarde, ZoBell verificou que a utilização microbiológica dos hidrocarbonetos é dependente sobretudo da natureza química dos componentes existentes no petróleo e de factores ambientais [Atlas, 1981]. No final da década de 70, Jones e Eddington comprovaram que entre 1% a 10% dos microorganismos presentes no solo são capazes de metabolizar compostos petrolíferos. As espécies microbiológicas, com aptidão para degradarem hidrocarbonetos, que com maior frequência se encontram no solo estão sintetizadas na Tabela 1.1.

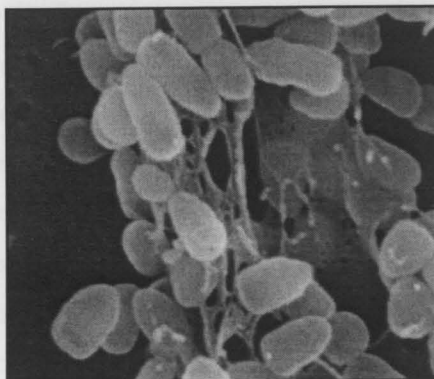


Figura 1.1 – Imagem de bactérias presentes no solo

[adap. www.wpi.edu/]

Tabela 1.1 – Microorganismos presentes no solo com capacidade para degradarem hidrocarbonetos [adap. Atlas, 1981]

Bactérias	Actinomicetes	Fungos
<i>Agrobacterium</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Cândida</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Cladosporium</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Hormocoris</i>
<i>Corynebacterium</i>		<i>Mortierella</i>
<i>Flavobacterium</i>		<i>Penicillium</i>
<i>Micrococcus</i>		<i>Rhodotorula</i>
<i>Pseudomonas</i>		<i>Trichoderma</i>

O termo biodegradação refere-se à mineralização completa dos contaminantes orgânicos em dióxido de carbono, água, compostos inorgânicos e proteínas celulares, ou à transformação de contaminantes orgânicos em outros compostos orgânicos [WDNR, 1994].

Os hidrocarbonetos presentes no crude estão classificados como alcanos, cicloalcanos, aromáticos, policíclicos aromáticos, asfaltenos e resinas. Variações no comprimento da cadeia, na possibilidade de existência de ramificações, anéis, radicais de azoto, enxofre e oxigénio e a capacidade de combinações entre diferentes classes, proporcionam uma grande diversidade de compostos petrolíferos. A biodegradabilidade dos hidrocarbonetos depende do seu estado físico e toxicidade. Uma vez que o petróleo é uma complexa mistura de componentes, a sua degradação é favorecida por uma população mista de microorganismos com uma elevada capacidade enzimática. A maioria das enzimas não são libertadas pelas células microbianas, o que leva a que as substâncias poluentes entrem em contacto ou sejam transportadas para dentro das células. Uma das propriedades enzimáticas mais importantes é a sua especificidade para o substrato; são necessários vários tipos de enzimas para completar a biodegradação dos compostos orgânicos. A degradação levada a cabo pelos microorganismos é fundamentalmente um processo de transferência de electrões catalisado pelas enzimas. A energia biológica é obtida através de substâncias reduzidas. Os electrões são transportados ao longo da cadeia metabólica constituída por uma série de compostos até ao aceitador terminal de

electrões. Se a biodegradação ocorrer num ambiente aeróbio, o oxigénio é o aceitador terminal de electrões (oxidante final) [Eweis et al., 1998].

Encontram-se publicados muitos e variados trabalhos sobre a degradação de hidrocarbonetos por microorganismos. Contudo, muitas das vias metabólicas utilizadas são ainda desconhecidas e por isso alvo frequente de estudos desenvolvidos nesta área.

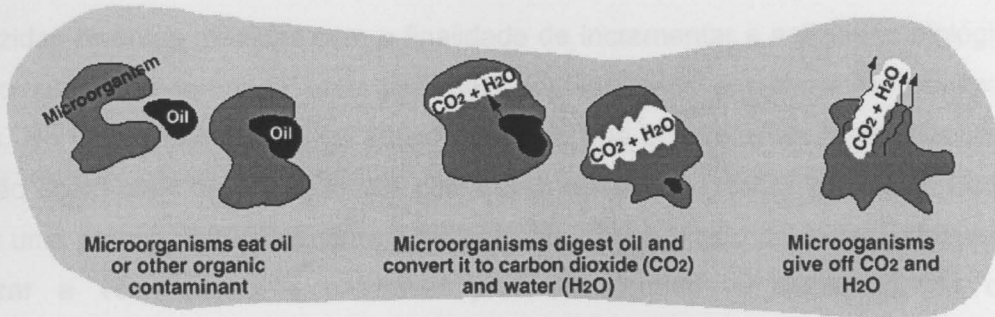


Figura 1.2 – Representação esquemática da biodegradação aeróbia no solo
[adap. US EPA, 1996]

O sucesso da biodegradação dos hidrocarbonetos petrolíferos está dependente da capacidade de proporcionar e manter condições favoráveis para o crescimento dos microorganismos.

1.4 Técnicas agrárias

As técnicas agrárias, também conhecidas na literatura anglo-saxónica como *landfarming*, *land treatment* ou *land application* representam um dos processos mais simples de bio reabilitação, aplicando-se essencialmente a solos contaminados com produtos petrolíferos.

A utilização desta tecnologia remonta ao início do século XX. Nessa época, era comum a deposição de lamas provenientes do processo de refinação de crude em terrenos arenosos baldios, localizados nas imediações das refinarias, muitas vezes bancos de areia de um rio local ou ribeiros, os quais eram utilizados para suprir a necessidade de água no interior das mesmas. Ao longo do tempo assistia-se a um decréscimo do volume das lamas depositadas. A explicação para este fenómeno era, na altura, desconhecida; na realidade, parte do material depositado era lixiviado e removido da área de "tratamento" antes que a actividade microbiológica pudesse

modificar a estrutura química dos componentes da lama. Outra importante fracção desse material era volatilizada e transportada pelo vento para longe do local, não apresentando quimicamente nenhuma alteração significativa. A adsorção, a fotodecomposição e mesmo a biodegradação também contribuíam para o efeito descrito mas com uma menor importância. À medida que os conhecimentos científicos sobre este fenómeno aumentaram surgiu a necessidade de otimizar o processo para que o decréscimo das lamas pudesse ser mais rápido e significativo. Foram introduzidas diversas medidas com a finalidade de incrementar a actividade biológica. A tecnologia foi-se tornando cada vez mais popular tendo em conta os resultados obtidos. No final dos anos 70, as antigas práticas que encorajavam a volatilização e lixiviação como meio de remoção dos contaminantes do solo, foram proibidas. Deram lugar a uma prática ambientalmente mais correcta com o intuito de evitar a lixiviação, minimizar a volatilização e promover preferencialmente a biodegradação dos compostos orgânicos [Eweis, et al., 1998].

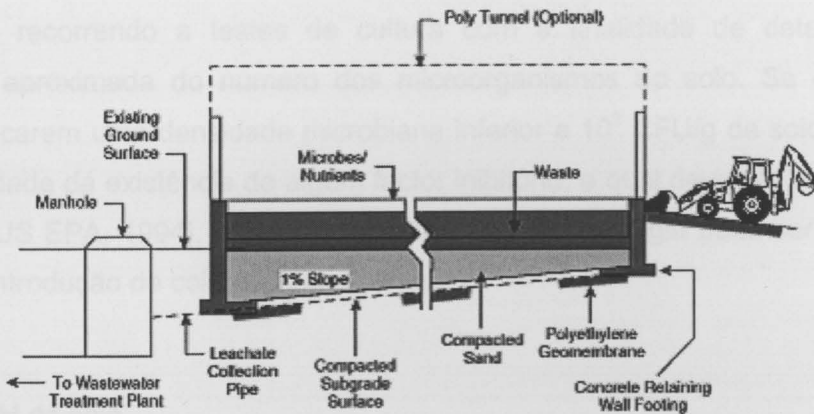


Figura 1.3 – Esquema representativo das técnicas agrícolas

[adap. www.frtr.gov/]

O objectivo desta tecnologia é a conversão dos hidrocarbonetos em dióxido de carbono, água, células bacterianas (biomassa) e materiais húmicos recorrendo aos microorganismos indígenas presentes no solo [Huesemann, 1994].

Na literatura estão documentados diversos factores que afectam a cinética de degradação e a remoção dos hidrocarbonetos petrolíferos dos solos contaminados. Estes factores podem ser agrupados segundo três categorias: características do solo, características dos contaminantes e condições climáticas [US EPA, 1994].

1.4.1 Características do solo

1.4.1.1 Densidade da população microbiana

O solo normalmente contém um elevado número de microorganismos. Entre estes, as bactérias, especialmente as heterotróficas aeróbias, são o grupo mais numeroso (em média 10^6 CFU/g (Colony Forming Units)) e biologicamente mais activo na degradação de hidrocarbonetos [Huesemann, 1994]. Em determinadas condições é possível que a actividade dos microorganismos seja perturbada por condicionantes inibitórios. A inibição microbiana pode ocorrer na presença de elevadas concentrações de sais, metais pesados (e.g., Ni, Cr, Cd, As), de alguns hidrocarbonetos petrolíferos como os compostos aromáticos de baixa massa molecular ou associada a elevados níveis de contaminação.

A confirmação da presença de uma população bacteriana indígena viável, deve ser efectuada recorrendo a testes de cultura com a finalidade de determinar a concentração aproximada do número dos microorganismos do solo. Se os testes realizados indicarem uma densidade microbiana inferior a 10^3 CFU/g de solo, admite-se a possibilidade da existência de algum factor inibitório, o qual deve ser identificado rapidamente [US EPA, 1994]. Mesmo nesta situação, a tecnologia pode ser aplicável recorrendo à introdução de colónias alienígenas.

1.4.1.2 pH do solo

Para promover a biodegradação, ou seja incrementar a população bacteriana, o pH do solo deve-se situar numa gama de valores entre 6 e 8, sendo 7 o valor óptimo [Eweis et al., 1998]. Os solos que possuírem valores de pH fora deste intervalo devem ser corrigidos à priori e durante o tratamento. Se o solo for demasiado ácido ($\text{pH} < 5$), deve ser adicionada cal, de modo a elevar o pH até aos valores citados [Eweis et al., 1998]. Se pelo contrário, este for demasiado alcalino ($\text{pH} > 9$), a acidificação deve ser feita recorrendo a enxofre elementar, sulfato de amónio ou alumínio [Eweis et al., 1998].

1.4.1.3 Teor de humidade

A actividade microbiológica depende do teor de humidade existente no solo. Assim um solo com carência de água pode reduzir ou eliminar o crescimento bacteriano. Por outro lado, uma humidade excessiva restringe a transferência de oxigénio, reduzindo a actividade dos microorganismos.

O teor de humidade deve estar compreendido entre os 40% a 85% da capacidade de retenção do solo, ou seja uma humidade expressa em fracção mássica variável entre os 12% e os 30% [US EPA, 1994].

A capacidade de retenção de humidade depende do tipo de solo. Os solos argilosos ou com teores elevados de matéria orgânica apresentam geralmente maior capacidade retenção do que solos arenosos. Reveste-se por isso de particular atenção a determinação do teor de humidade para o solo em estudo.

1.4.1.4 Temperatura do solo

A taxa de crescimento bacteriano é uma função da temperatura. Os microorganismos são mais activos entre os 10°C e os 45°C, o que se traduz em maiores taxas de degradação dentro deste intervalo de temperatura [US EPA, 1994]. As temperaturas baixas retardam a volatilização de compostos com baixo peso molecular, muitos dos quais tóxicos para os microorganismos. Apesar de na maioria dos casos estudados, temperaturas médias de 20°C serem consideradas ideais para o desenvolvimento microbiano, encontram-se publicados diversos trabalhos onde é relatada a biodegradação de hidrocarbonetos a temperaturas inferiores a 0°C [Atlas, 1981]. Os investigadores Atlas e Bartha descreveram alterações na composição da comunidade microbiana associadas às mudanças sazonais de temperatura. Nos seus estudos referenciaram que os efeitos da temperatura diferem consoante a composição dos hidrocarbonetos presentes no solo. A 20°C, solos com contaminações de crude contendo elevadas percentagens em compostos leves são mais susceptíveis de serem biodegradadas [Atlas, 1981]. Ao contrário, as taxas de degradação no crude rico em fracções pesadas são mais significativas a temperaturas mais baixas.

A investigação veio comprovar que a temperatura por si só não é um factor limitante, excepto se estiver relacionada com outras variáveis, como o tipo de crude e a composição da comunidade microbiológica.

1.4.1.5 Concentração em nutrientes

Alguns nutrientes inorgânicos, como o azoto (N) e o fósforo (P) constituem um suporte fundamental dos processos de degradação exercido pelas bactérias contribuindo para o rápido desenvolvimento da colónia. Durante a biodegradação os microorganismos incorporam carbono (C) a partir da fonte de contaminação, juntamente com azoto e fósforo para o interior da sua estrutura celular. A relação entre o carbono, o azoto e o fósforo, nas células bacterianas é de aproximadamente 100:20:1 [Huesemann, 1994]. A quantidade de azoto e fósforo necessária para estimular a degradação dos hidrocarbonetos (fonte de carbono) é menor do que a enunciada, pois nem todo o contaminante é transformado em biomassa (uma fracção é convertida em dióxido de carbono), e uma porção significativa de azoto (orgânico) é reciclada quando as células microbianas morrem.

Na literatura há referência a inúmeras relações C:N:P. Enquanto Frankenberger faz alusão a uma razão C:N:P de 100:10:1, Dibble e Bartha recomendam a utilização de uma razão C:N e C:P de 60:1 e 800:1 respectivamente [Atlas, 1981]. Huesemann refere nos seus trabalhos uma razão C:N:P de 100:1:0,2 [Huesemann, 1994]; Brown et al. sugerem uma razão C:N de 9:1; Huddleston aconselha que a relação C:N deve ser mantida entre 25 e 38 [Walworth et al., 1997]. Finalmente, da pesquisa realizada por Morgan e Watkinson a numerosos estudos sobre biodegradação publicados, resultou uma razão óptima C:N entre 9:1 e 200:1 [Walworth et al., 1997]. As aparentes discrepâncias encontradas na procura de uma relação C:N:P óptima são o resultado de diferenças no tipo de contaminação, cinéticas de biodegradação, concentração em azoto orgânico existente no solo, taxa de azoto reciclado e condições experimentais.

Se houver necessidade de correcção dos níveis de nutrientes, os compostos a fornecer ao solo devem ser adicionados em pequenas quantidades durante o período de tratamento. O objectivo é minimizar a produção de lixiviados ricos em nitratos provenientes do processo de nitrificação, evitar despesas e possíveis efeitos tóxicos causados pela introdução de elevadas quantidades de nutrientes num curto intervalo de tempo.

1.4.1.6 Textura do solo

A textura do solo afecta a permeabilidade, a humidade e a densidade a granel. A presença de percentagens elevadas de argila ou de matéria orgânica pode limitar a disponibilidade biológica dos hidrocarbonetos para os microorganismos. Em solos contaminados sujeitos a uma meteoração intensa, os contaminantes podem migrar para o interior dos microporos do solo e assim ficarem menos acessíveis ao ataque microbiano. Nesse caso, as cinéticas de biodegradação não seriam limitadas pelo número de microorganismos ou pela biodegradabilidade dos compostos mas por fenómenos de transporte de massa (dessorção, difusão, convecção, etc.) associados às características físicas do solo. Foi demonstrado em contaminações por hidrocarbonetos poliaromáticos (PAH's) que as taxas de biodegradabilidade são afectadas pela fracção de finos (diâmetro efectivo das partículas menor que 0,075 mm) [Amellal et al., 2001]. Solos que apresentem na sua composição granulométrica uma fracção de finos superior a 10%, possuem velocidades de degradação menores e mais lentas do que os que têm percentagens em finos inferiores a 10% [Huesemann, 1994]. Por estas razões é recomendada particular atenção à textura do solo.

1.4.2 Características dos contaminantes

1.4.2.1 Volatilidade

A volatilidade dos contaminantes é um importante factor a ter em conta quando se propõe a tratamento um solo contaminado com produtos petrolíferos. Os compostos voláteis tendem a dissipar-se durante o arejamento do solo, não tendo oportunidade de serem biodegradados.

Os produtos petrolíferos têm uma volatilidade extremamente variável desde os de volatilidade elevada, como a gasolina, aos de baixa volatilidade como os óleos de aquecimento.

1.4.2.2 Estrutura química

A estrutura química dos contaminantes é importante para estimar o potencial de degradação biológica do solo. A Figura 1.4 sumaria o potencial relativo de biodegradação baseado em dados fornecidos pela literatura.

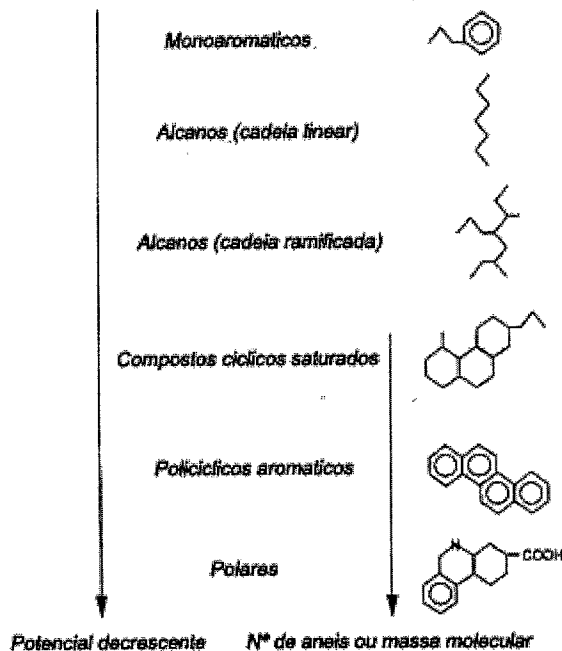


Figura 1.4 – Potencial relativo de biodegradação [adap. Huesemann, 1994]

Os compostos monoaromáticos, como o benzeno, são facilmente biodegradáveis devido à sua elevada solubilidade na água. A biodegradabilidade dos alcanos de cadeia linear (n-alcanos) e dos de cadeia ramificada (iso-alcanos) depende do comprimento da cadeia de carbono (i.e., massa molecular) e do grau de ramificação. Enquanto que os n-alcanos de peso molecular reduzido são facilmente degradados pelos microorganismos, algumas moléculas que apresentam massas moleculares mais significativas e muito ramificadas tendem a ser recalcitrantes. Apesar deste facto, foi demonstrado em alguns casos envolvendo alcanos de cadeia longa (acima de C_{44}) e ramificados (pristanos ou outros isoprenoídes) a sua biodegradabilidade [Huesemann, 1994]. A taxa de degradação dos compostos cíclicos saturados, policíclicos aromáticos e polares diminui proporcionalmente com o aumento do número de anéis (massa molecular). Compostos com dois ou três anéis são mais rapidamente degradados, enquanto que compostos saturados e aromáticos com mais

de quatro anéis podem ser considerados recalcitrantes relativamente ao tempo esperado de tratamento.

1.4.2.3 Concentração e toxicidade

A presença de concentrações elevadas em produtos derivados do petróleo e em metais pesados pode inibir o desenvolvimento das colónias bacterianas, como já foi referido. Normalmente, concentrações expressas em TPH's (Total Petroleum Hydrocarbons) entre 10000 e 50000 mg/Kg de solo são consideradas aceitáveis para a aplicação desta tecnologia [US EPA, 1994]. No entanto, concentrações em metais pesados superiores a 2500 mg/Kg de solo são inibidoras da actividade biológica. Se as concentrações em TPH forem superiores a 50000 mg/Kg de solo, ou a concentração em metais pesados for maior que 2500 mg/Kg de solo, a composição dos solos deve ser corrigida pela adição de outros solos, originando uma média ponderada inferior aos limites apontados. Por outro lado, se as concentrações dos contaminantes forem inferiores a um determinado limite, em média cerca de 10000 mg/Kg de solo, variável consoante o tipo de microorganismos e de contaminantes, não existirão condições para o desenvolvimento da colónia. Os rendimentos superiores a 95% ou concentrações de contaminantes inferiores a 0,1 mg/Kg de solo são extremamente difíceis de obter com o recurso a esta tecnologia.

1.4.3 Condições climáticas

O estudo das condições climáticas do local de tratamento são um requisito importante a ter em conta na fase de projecto e implementação das técnicas agrárias. Normalmente, as unidades de tratamento estão sujeitas directamente a factores climáticos como pluviosidade, neve, vento e temperatura ambiente, como pode ser observado na Figura 1.5.



Figura 1.5 – Operação típica das técnicas agrárias

A pluviosidade aumenta o teor de humidade no solo e causa erosão. Durante uma precipitação significativa, a humidade contida no solo vai exceder

temporariamente os limites óptimos de actividade bacteriana. Por outro lado, durante um período de seca, a humidade estará abaixo do intervalo previsto e haverá necessidade de se proceder à sua correcção. Uma pluviosidade anual superior a 750 mm constitui um indicador da necessidade de uma cobertura para o local como forma de evitar uma humidade excessiva. O escoamento das águas das chuvas deve ser encaminhado para bermas existentes a todo o perímetro da unidade de tratamento, assim como os lixiviados devem ser enviados para um sistema de recolha de modo a evitar a contaminação da água subterrânea.

Um clima ventoso pode originar uma erosão acelerada dos solos em tratamento, contribuindo para a sua dispersão, pelo que se deve prever no projecto, dispositivos correctores.

A temperatura ambiente, por condicionar a temperatura do solo, deve também ser alvo de atenção.

Fase Experimental

2. Fase experimental

Os ensaios laboratoriais tiveram como objectivo:

- Demonstrar a capacidade dos microorganismos indígenas em degradar os contaminantes existentes no solo.
- Definir condições optimizadas de crescimento da colónia.
- Determinar a cinética do processo.
- Analisar e comparar os resultados obtidos.

2.1 Recolha das amostras

Para a realização da fase experimental foram ensaiados solos com dois tipos de contaminação (crude e diesel) com o intuito de observar e estudar as eventuais diferenças nas cinéticas de degradação.

A recolha das amostras foi efectuada no interior nas instalações da refinaria de Matosinhos (Petrogal, S.A.). Os solos contaminados foram retirados dos seus locais de ocorrência, junto aos tanques de armazenamento TK 6018 e TK 6110, de crude e diesel respectivamente. Em ambos os casos foram colhidas amostras compostas, recolhidas em diversos pontos ao redor dos tanques, efectuadas na camada superficial do solo a uma profundidade máxima de 20 cm. As amostras foram colocadas em sacos de plástico devidamente identificados e encaminhadas para o laboratório.

Não foi possível obter qualquer informação ou registo sobre a data de ocorrência das fugas nos tanques em questão.

2.2 Preparação das amostras

Antes de se proceder à caracterização dos solos, as amostras foram submetidas a um período de “repouso”, uma semana, com a finalidade de eliminar o excesso de humidade que ambas apresentavam, resultado das condições climáticas adversas sentidas no dia de recolha.

2.3 Caracterização das amostras

Foram realizadas algumas determinações físicas, químicas e microbiológicas nos solos em estudo. A finalidade destas análises prende-se com a:

- Determinação das concentrações dos contaminantes presentes nas amostras a ensaiar e que se pressupõem representativas das contaminações existentes, de modo a se poder quantificar evoluções posteriores;
- Verificação da existência de condições que permitam suportar a actividade bacteriana;
- Avaliação dos parâmetros que possam inibir o desenvolvimento dos microorganismos.

2.3.1 Caracterização física

2.3.1.1 Análise granulométrica e textura do solo

O solo é uma mistura de diferentes materiais orgânicos e inorgânicos. A fracção inorgânica consiste essencialmente em grãos minerais finos, que se subdividem de acordo com o calibre (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Classificação do solo de acordo com o calibre das partículas [adap. LaGrega, 1994]

Classificação	Descrição	Diâmetro efectivo (mm)
Argila	Partículas minerais microscópicas de natureza coloidal, laminadas em camadas ou placas	< 0,002
Silte	Partículas finas de minerais provenientes da formação mãe	0,002 - 0,075
Areia	Partículas intermédias de minerais provenientes da formação mãe	0,075 - 2
Gravilha	Partículas grosseiras de minerais provenientes da formação mãe	2 - 75

Para caracterizar a textura do solo efectuou-se a análise granulométrica por crivagem das amostras recolhidas de crude e diesel.

Não foram determinadas as fracções granulométricas inferiores a 63 μm , pois exigiam o recurso a outros instrumentos: ciclosizer ou granulómetro laser. Contudo, as fracções de argila e silte foram inferidas através de uma representação gráfica da distribuição granulométrica dos solos (Anexo A).

Definida a granulometria, os solos podem ser classificados com base no diagrama triangular (Figura 2.1).

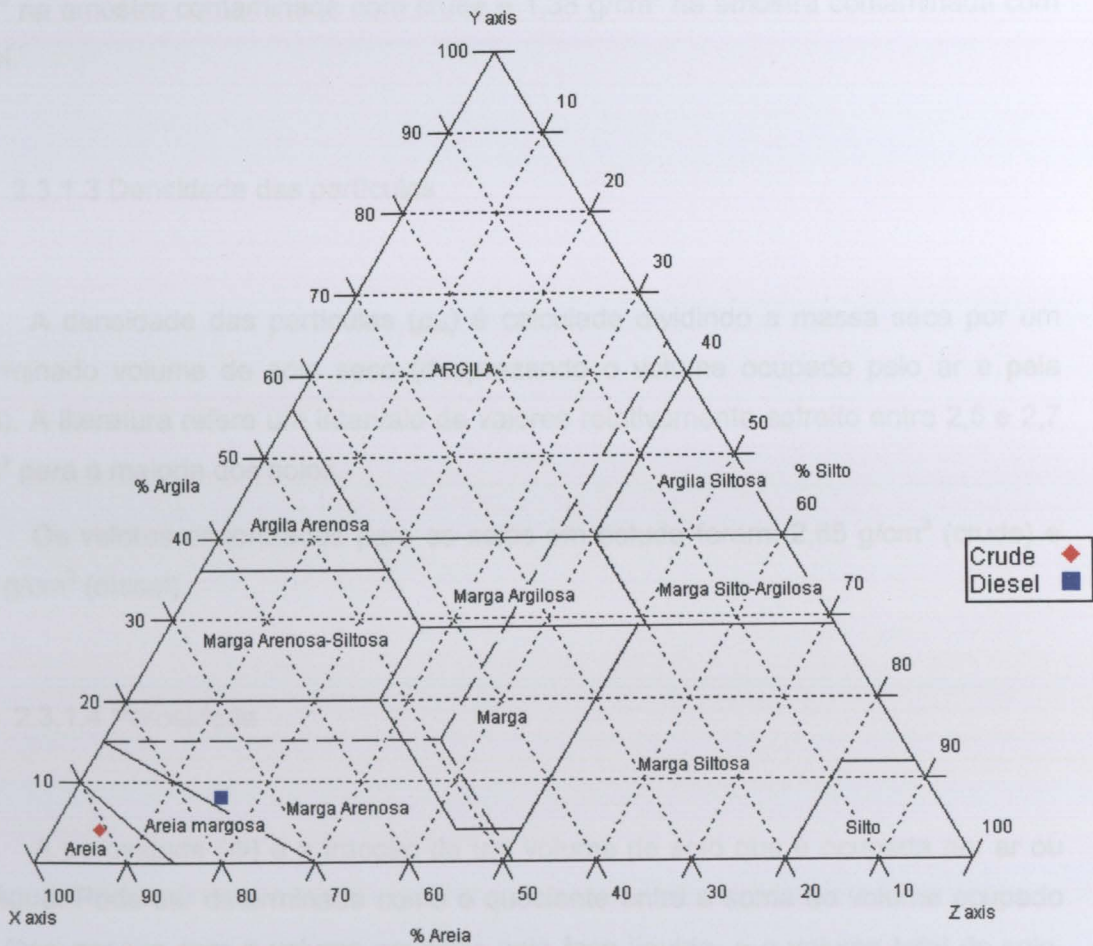


Figura 2.1 – Diagrama triangular para determinação da classe granulométrica dos solos

A localização dos pontos no diagrama triangular evidencia uma textura arenosa dos solos, sendo esta bastante mais significativa no solo contaminado com crude.

2.3.1.2 Densidade a granel

A densidade a granel, ou densidade seca do solo (ρ) é definida como sendo o quociente entre a massa seca de um determinado volume de solo (seco a 106°C durante pelo menos 16 horas) e o volume total do solo antes da secagem. Os valores típicos para esta propriedade variam entre 1,11 g/cm³ para solos argilosos e 1,6 g/cm³ para solos arenosos.

As determinações experimentais conduziram aos seguintes resultados: 1,53 g/cm³ na amostra contaminada com crude e 1,38 g/cm³ na amostra contaminada com diesel.

2.3.1.3 Densidade das partículas

A densidade das partículas (ρ_m) é calculada dividindo a massa seca por um determinado volume de solo seco (desprezando o volume ocupado pelo ar e pela água). A literatura refere um intervalo de valores relativamente estreito entre 2,6 e 2,7 g/cm³ para a maioria dos solos.

Os valores encontrados para os solos em estudo foram: 2,68 g/cm³ (crude) e 2,66 g/cm³ (diesel).

2.3.1.4 Porosidade

A porosidade (Φ) é a fracção de um volume de solo que é ocupada por ar ou por água. Pode ser determinada como o quociente entre a soma do volume ocupado pela fase gasosa com o volume ocupado pela fase líquida, e o volume total de solo. Os valores da porosidade variam numa gama entre 0,3 (solos arenosos) e 0,6 (solos argilosos).

Os resultados alcançados foram calculados com base nos valores experimentais obtidos nos pontos 2.3.1.2 e 2.3.1.3. Assim, o solo contaminado com crude apresenta uma porosidade de 0,43, enquanto que 0,48 foi o valor encontrado para o solo contaminado com diesel.

2.3.2.2 pH

O pH é um factor condicionante da actividade microbiológica. Este parâmetro foi medido utilizando um eléctrodo padrão devidamente calibrado, mergulhado numa mistura com uma razão solo-água de 1:1 de acordo com o método ASTM D4972 [ASTM, 2000].

O solo contaminado com crude apresentava um valor neutro de 6,8. O solo contaminado com diesel manifestava claramente uma tendência ácida, com um valor de 4,4.

2.3.2.3 Concentração dos contaminantes

Um dos parâmetros mais importantes é, sem dúvida, a determinação da concentração dos contaminantes presentes no solo, essencial para quantificar a evolução da biodegradação.

A determinação da concentração dos contaminantes foi efectuada recorrendo a kits (RemediAid™ Total Petroleum Hydrocarbon Test Kit), que podem ser visualizados na Figura 2.22. Esta opção prende-se com as seguintes vantagens: facilidade de utilização, boa exactidão e precisão dos resultados e elevada correlação (coeficiente de correlação da ordem dos 0,95 a 0,98) com o método de referência 8015B (modificado), adoptado pela EPA (Environmental Protection Agency) [US EPA, 2001].



Figura 2.2 – Imagem dos kits de determinação dos TPH's

O princípio do método baseia-se numa combinação entre uma reacção de alquilação de Friedel Crafts e colorimetria envolvendo três passos fundamentais: (1) extracção dos contaminantes do solo, (2) desenvolvimento da cor, (3) medição da intensidade da cor a 430 nm, com o recurso a um fotómetro [US EPA, 2001]. O procedimento experimental encontra-se descrito no Anexo B.

A concentração dos contaminantes é expressa em TPH's (Total Petroleum Hydrocarbons).

A concentração inicial de crude revelou ser bastante elevada - 17700,13 mg/kg solo. Por sua vez, a concentração de diesel no solo foi de 6261,65 mg/kg solo.

2.3.2.4 Azoto de Kjeldahl

A finalidade desta determinação foi avaliar a presença de nutrientes em quantidade suficiente para suportar um forte incremento na actividade bacteriana.

Tendo em conta as condições laboratoriais existentes, a determinação do azoto de Kjeldahl foi adaptada a partir do método 4500 B referenciado na bibliografia [APHA, 1989] e descrito em anexo (Anexo B). A amostra é digerida em ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), na presença de um catalisador. O azoto amoniacal dos compostos orgânicos é convertido em amónio, que é fixado pelo H_2SO_4 sob a forma de sulfato de amónio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Após a digestão, os iões de amónio são deslocados por uma base forte (NaOH) em excesso. O amoníaco é então destilado e absorvido numa solução de ácido bórico (H_3BO_3). O ião borato, libertado na reacção entre o H_3BO_3 e o amoníaco é determinado por titulação com um ácido forte.



Figura 2.3 – Imagem do destilador de azoto de Kjeldahl

Os solos em estudo continham concentrações em azoto da ordem dos 2,05 mg/L (crude) e 3,48 mg/L (diesel).

2.3.3 Caracterização microbiológica

A taxa a que ocorre a degradação dos hidrocarbonetos petrolíferos depende simultaneamente da densidade da população microbiológica e da sua actividade. O crescimento dos microorganismos é normalmente quantificado relativamente à variação do número de células ou de massa celular presente e estima o número total de bactérias heterotróficas aeróbias no solo.

Na determinação da densidade da população de microorganismos, presente em cada amostra, foi utilizado o método 9215 C referenciado na bibliografia [APHA, 1989]. A contagem foi realizada em placas de Petri, após a incubação de um pequeno volume de cultura diluída, espalhada à superfície de meio Agar, conforme se encontra descrito no Anexo B. Cada colônia formada à superfície é assumida como correspondente a uma célula viável na cultura original. A contagem é expressa em CFU/g solo.

O número de bactérias heterotróficas aeróbias totais indígenas foi considerado suficiente, da ordem dos 10^6 CFU/g solo (Colony Forming Units) em ambas as amostras, para a continuação dos estudos propostos.

2.4 Análise cruzada das caracterizações

Da análise às propriedades químicas, físicas e microbiológicas resulta, em síntese, a Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Propriedades físicas, químicas e microbiológicas das amostras

Propriedades do solo	Tipo de amostras	
	Crude	Diesel
Classificação granulométrica	Arenoso	Marga arenosa
Densidade a granel, g/cm ³	1,53	1,38
Densidade das partículas, g/cm ³	2,68	2,66
Porosidade	0,43	0,48
Humidade, wt. %	8,91	14,31
Fracção saturada	0,21	0,30
Matéria orgânica, wt. %	0,65	1,73
pH (escala de Sorensen)	6,8	4,4
TPH, mg/Kg solo	17700,13	6261,65
Azoto de Kjeldahl, mg N/L	2,0	3,5
Densidade da população microbiológica, CFU/g solo	~10 ⁶	~10 ⁶

Uma análise conjunta e combinada dos resultados obtidos – químicos, físicos e microbiológicos – evidenciou diversas relações importantes, a saber:

- A amostra contaminada com crude evidencia uma textura arenosa, com uma fracção argilosa pouco significativa. Ora sendo a argila a principal responsável pela retardação dos contaminantes do solo, quer por fenómenos de sorção, quer por permuta iónica, pressupõe-se que a probabilidade de um aprisionamento de contaminantes no solo, seja reduzida.
- Por sua vez, o solo contaminado com diesel pode ser classificado, de acordo com a sua localização na Figura 2.1, como marga arenosa, por possuir uma maior percentagem de silte na sua constituição. A fracção silte + argila perfaz 24%, representando uma área superficial significativa (46,53 m²/Kg) [Ewies et al.,

1998]. Esta área potencia a redução da disponibilidade biológica de certos compostos orgânicos, através de fenómenos de adsorção.

- O valor obtido para a densidade a granel, nos dois tipos de solos, embora um pouco inferior ao referenciado na literatura, é característico dos solos arenosos.
- A propriedade física, densidade das partículas, encontra-se dentro da média típica para solos minerais.
- A porosidade total subdivide-se em porosidade não capilar ou macroporosidade, que corresponde ao volume dos poros mais grosseiros ($> 8 \mu\text{m}$) e porosidade capilar ou microporosidade, correspondente ao volume dos poros capilares. As características do espaço poroso de um solo controlam muitos processos físicos e biológicos que nele ocorrem. A porosidade relaciona-se com a estrutura e textura de um solo. Às texturas arenosas corresponde uma porosidade total relativamente elevada, sendo a macroporosidade superior à microporosidade, tal como se pode verificar nos resultados obtidos.
- O teor de humidade existente no solo contaminado com humidade revelou-se inferior ao pretendido em tratamentos biológicos. Antes de se dar início aos estudos laboratoriais o seu valor deve ser corrigido.
- Relativamente às propriedades físicas, estes solos, por possuírem uma fracção de areia dominante na sua textura, apresentam uma capacidade de retenção de água reduzida, boa permeabilidade, boa capacidade de arejamento e facilidade de drenagem. Estas características revelam-se adequadas à tecnologia de tratamento escolhida.
- No que respeita à análise do teor de matéria orgânica, destaca-se o facto do valor obtido em ambos os casos ser relativamente baixo. Assim sendo, reduz-se a possibilidade de adsorção dos contaminantes orgânicos. Os hidrocarbonetos estabelecem ligações fortes com as substâncias húmicas [Löser et al., 1999].
- O solo contaminado com diesel apresenta um pH ácido. O seu valor deve ser corrigido com um composto alcalino para proporcionar condições favoráveis aos microorganismos existentes no solo.
- O solo contaminado com crude possui uma razão C:N de 100:0,08, o que evidencia uma carência significativa de azoto. Já o solo contaminado com diesel apresenta uma relação C:N de 100:0,5, que apesar de não ser satisfatória é bastante superior ao esperado. Estes valores suscitam a necessidade de adicionar nutrientes que estimulem o crescimento bacteriano.

- A razão C:N foi calculada admitindo que a massa total de hidrocarbonetos presente representa a massa de carbono disponível para a biodegradação. Esta aproximação é válida porque se verificou estatisticamente, em contaminações reais, que cerca de 90% da massa total é constituída por carbono [US EPA, 1994].
- A densidade da população microbiológica revelou ser suficiente nos dois solos, pelo que não há necessidade de se proceder a uma inoculação para avançar com os estudos de biodegradabilidade.

2.5 Estudos de biodegradabilidade

Uma vez definida a aptidão dos solos às técnicas agrárias, foram desenvolvidos em paralelo, estudos em quatro tabuleiros, distribuídos dois a dois consoante o tipo de solo e sua correspondente contaminação (Figura 2.4).



Figura 2.4 - Aspecto geral da montagem laboratorial

Características de Instalação:

Tabuleiros:

- Número de tabuleiros: 4
- Material de fabrico: aço inoxidável
- Dimensões: 1 * 0,33 * 0,24 m
- Diâmetro do orifício de escoamento: 2,5 cm

Tubo de recolha dos lixiviados:

- Material de fabrico: polietileno
- Diâmetro interno: 2,54 cm
- Comprimento: 1 m

Para cada tipo de solo e contaminação, foram testadas diferentes condições de degradação:

- Estudo de controlo com o solo tal como recolhido com agitação periódica (Figura 2.5). Pretende-se quantificar a degradação originada pelos processos abióticos.



Figura 2.5 – Aspecto dos dois tabuleiros de controlo

- Estudo com ajuste de pH, humidade e adição suplementar de uma solução enriquecida em nutrientes em condições oxigenadas, com a finalidade de otimizar os parâmetros fundamentais para alcançar a biodegradação máxima (Figura 2.6).



Figura 2.6 – Aspecto dos tabuleiros contendo solos contaminados com crude e diesel

Em cada tabuleiro foi colocado inicialmente uma camada de areia, que funciona como meio drenante, perfazendo uma altura de aproximadamente 3 cm, tal como pode ser observado na Figura 2.7. Com o intuito de impedir o arrastamento de solo e permitir o escoamento da solução percolante, foi colocado um material filtrante no orifício de recolha de lixiviados.



Figura 2.7 – Pormenor da colocação de areia nos tabuleiros

Para garantir o encaminhamento dos lixiviados para um recipiente de recolha, todos os tabuleiros sofreram uma inclinação de aproximadamente 2% (Figura 2.8), simulando condições reais de funcionamento.

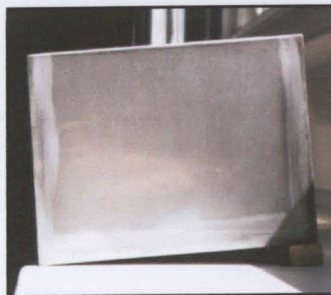


Figura 2.8 – Pormenor da inclinação dos tabuleiros para a recolha dos lixiviados

Após serem submetidos a uma crivagem de 4,67 mm, para minimizar eventuais erros de amostragem, os solos contaminados foram distribuídos pelos respectivos tabuleiros (dois para cada tipo de contaminação, sendo um deles, o tabuleiro controlo) até um nível que varia entre os 10 e os 15 cm.

Durante o período experimental estabeleceu-se uma periodicidade diária de arejamento de modo a incrementar a transferência de oxigénio através dos solos.

Uma vez por semana, amostras compostas de 250 g por tabuleiro, retiradas de cinco localizações a diferentes profundidades, foram submetidas a análise.

Em cada tabuleiro, a degradação é medida pela redução da concentração dos contaminantes, variações na população bacteriológica e outros parâmetros ao longo do tempo como pH, humidade e teor em azoto e fósforo.

2.5.1 Evolução temporal da biodegradação

2.5.1.1 pH

O comportamento do pH nos quatro tabuleiros pode ser observado na Figura

2.9.

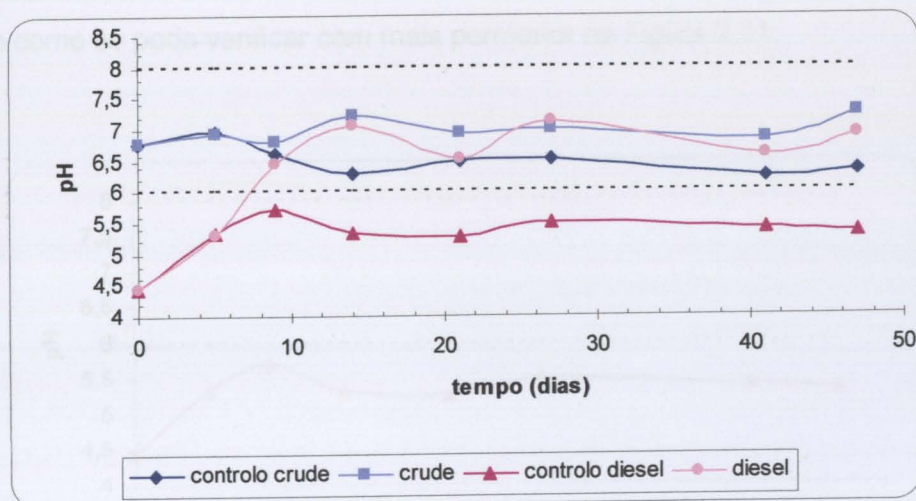


Figura 2.9 – Evolução temporal do pH nos solos em estudo

O solo contaminado com crude presente no tabuleiro submetido a controlo, apresenta uma ligeira redução inicial de pH na primeira quinzena, mantendo-se depois constante até à conclusão do período experimental. Na Figura 2.10 salienta-se o facto do valor de pH se situar sempre dentro do intervalo considerado óptimo (6 a 8) -representado no gráfico a tracejado- para o desenvolvimento da actividade dos microorganismos.

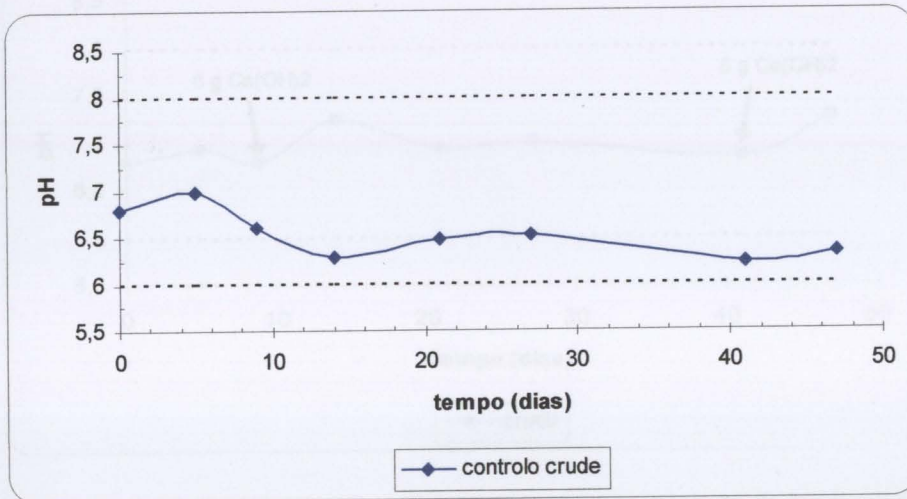


Figura 2.10 – Evolução do pH no tabuleiro controlo do crude

Tal como foi referido na caracterização química preliminar, o solo contaminado com diesel demonstrava uma acidez inicial acentuada, que se manteve no tabuleiro controlo como se pode verificar com mais pormenor na Figura 2.11.

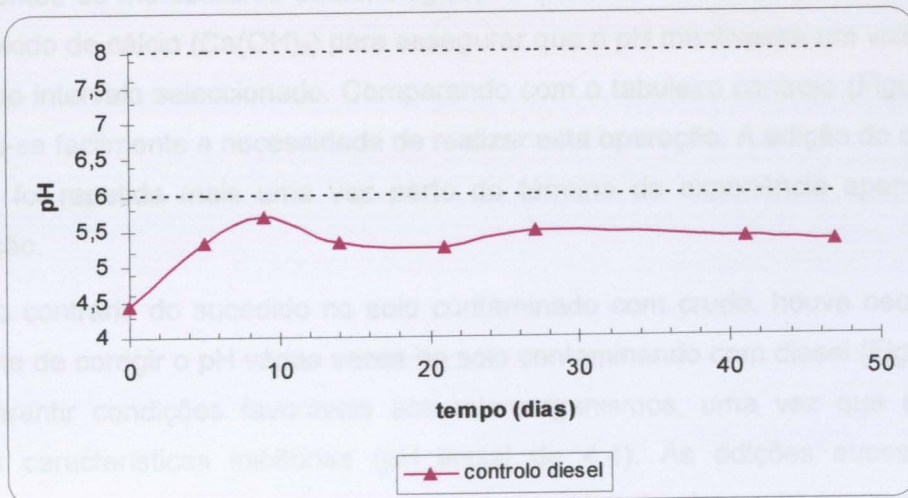


Figura 2.11 - Evolução do pH no tabuleiro controlo do diesel

Uma análise mais cuidada a este gráfico (Figura 2.11) destaca a subida de pH nos primeiros dez dias, oscilando depois o seu valor em torno dos 5,5. A explicação para esta subida anormal de pH poderá dever-se a erros de amostragem decorrentes do trabalho experimental desenvolvido, já que cientificamente não existe nenhuma explicação para este acontecimento.

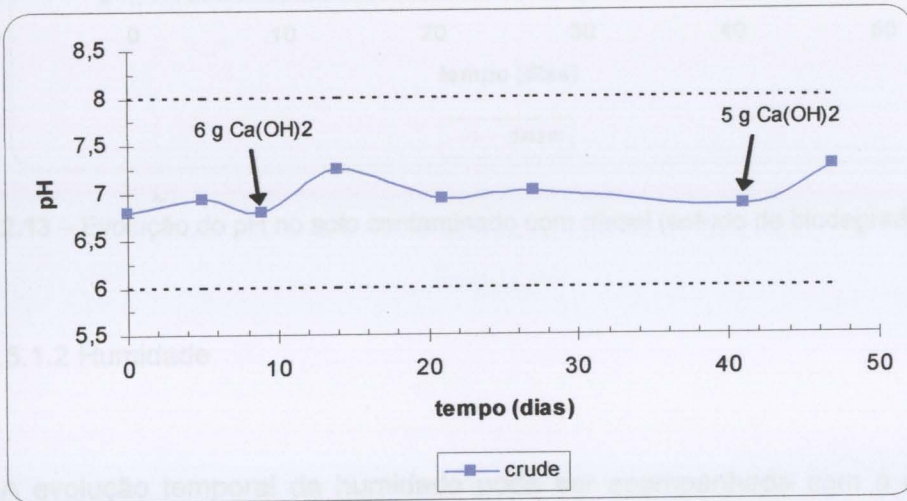


Figura 2.12 – Evolução do pH no solo contaminado com crude (estudo de biodegradabilidade)

A Figura 2.12 representa a evolução do pH na amostra com crude no tabuleiro no qual se pretende quantificar a taxa de biodegradação. Os valores deste parâmetro mantiveram-se sempre dentro dos limites (6 a 8) citados na bibliografia [Huesemann, 1994; US EPA, 1994] como ideais para os microorganismos. Após um ligeiro decréscimo do pH nos primeiros dias, resultante da produção de ácidos orgânicos provenientes do metabolismo bacteriológico, foi adicionada uma pequena quantidade de hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) para assegurar que o pH mantivesse um valor médio, dentro do intervalo seleccionado. Comparando com o tabuleiro controlo (Figura 2.10), concluiu-se facilmente a necessidade de realizar esta operação. A adição do composto alcalino foi repetida mais uma vez perto do término da experiência apenas como precaução.

Ao contrário do sucedido no solo contaminado com crude, houve necessidade premente de corrigir o pH várias vezes no solo contaminando com diesel (Figura 2.13) para garantir condições favoráveis aos microorganismos, uma vez que este solo possuía características inibitórias (pH inicial de 4,4). As adições sucessivas de Ca(OH)_2 mascararam o decréscimo natural do pH fruto dos produtos metabólicos gerados pelos microorganismos durante a biodegradação.

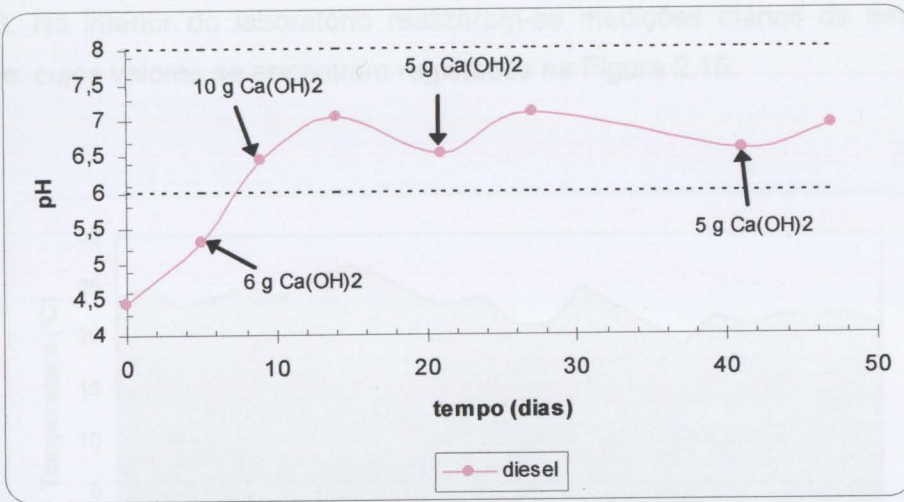


Figura 2.13 – Evolução do pH no solo contaminado com diesel (estudo de biodegradabilidade)

2.5.1.2 Humidade

A evolução temporal da humidade pode ser acompanhada com o auxílio da Figura 2.14.

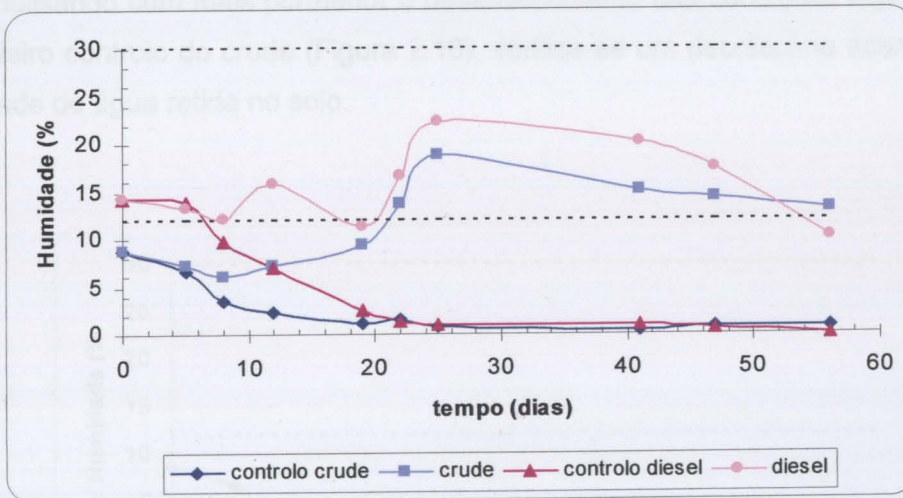


Figura 2.14 – Evolução temporal da humidade nos solos em estudo

O teor de humidade no solo foi talvez o parâmetro mais difícil de controlar devido à influência das condições climáticas. O trabalho laboratorial foi realizado entre os meses de Junho a Setembro. Os primeiros trinta dias, de importância vital em tratamentos biológicos, coincidiram com os dias mais quentes sentidos durante o ano

de 2003. No interior do laboratório realizaram-se medições diárias da temperatura ambiente, cujos valores se encontram registados na Figura 2.15.

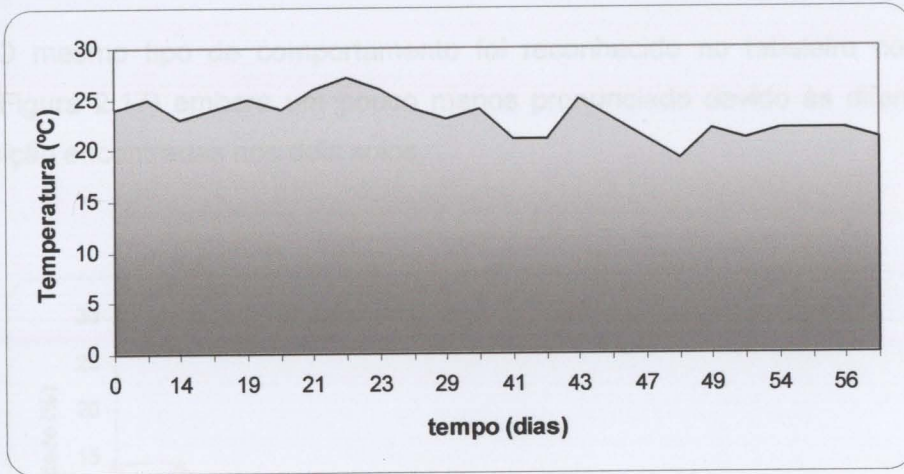


Figura 2.15 – Registo diário da temperatura ambiente
(recolha efectuada no interior do laboratório às 8h)

A temperatura média sentida ao longo do decorrer do trabalho laboratorial foi de 23°C, sendo de 24,6°C no primeiro mês.

Analisando com mais pormenor o desenvolvimento das condições higrométricas no tabuleiro controlo do crude (Figura 2.16), verifica-se um decréscimo acentuado da quantidade de água retida no solo.

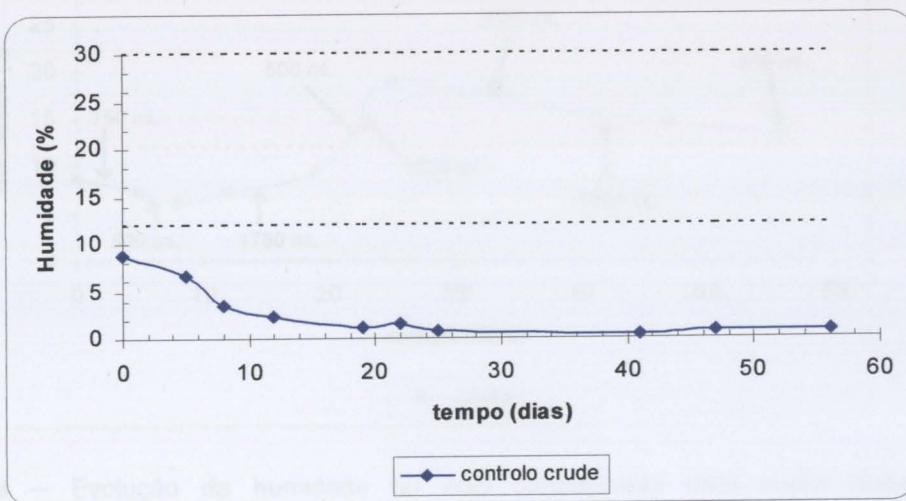


Figura 2.16 – Evolução da humidade no tabuleiro controlo do crude

Esta constatação já era esperada em virtude da classificação textural efectuada na caracterização preliminar desta amostra. A sua textura arenosa e a temperatura ambiente sentida no início deste estudo levaram a uma rápida diminuição do teor de humidade contido no solo.

O mesmo tipo de comportamento foi reconhecido no tabuleiro controlo do diesel (Figura 2.17) embora um pouco menos pronunciado devido às diferenças de composição encontradas nos dois solos.

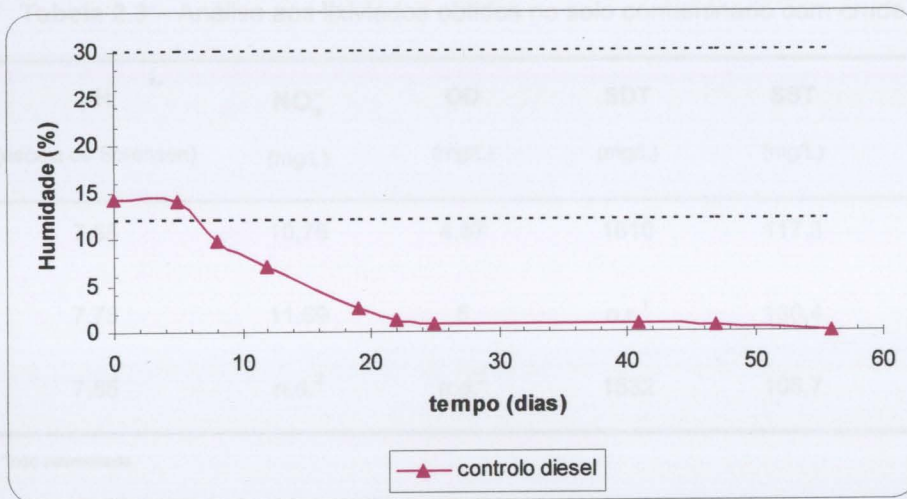


Figura 2.17 – Evolução da humidade no tabuleiro controlo do diesel

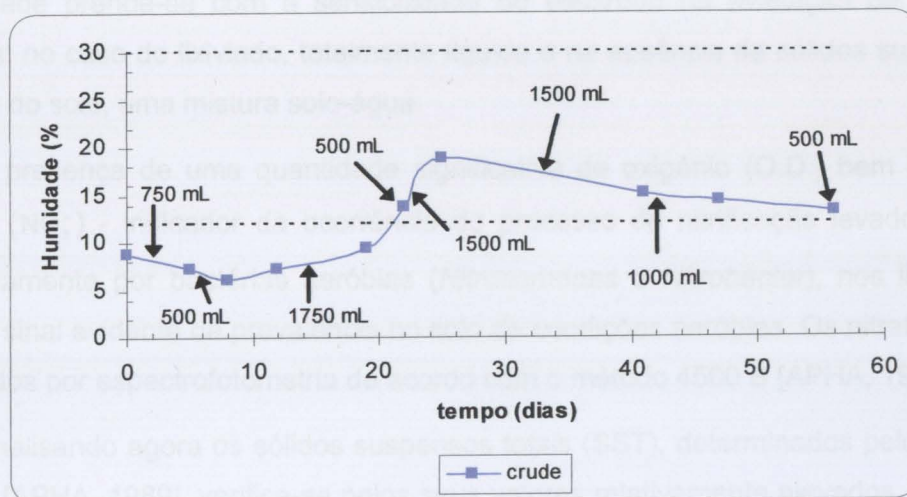


Figura 2.18 – Evolução da humidade no solo contaminado com crude (estudo de biodegradabilidade)

Observando atentamente a evolução da humidade no solo contaminado com crude (Figura 2.18), é possível demonstrar a dificuldade em manter o seu valor dentro do intervalo recomendado pela bibliografia - 12 a 30% (representado na Figura 2.18 a tracejado), pelas razões já referidas. O ajuste do teor de humidade foi efectuado com água destilada, sempre que necessário. As sucessivas correcções de humidade neste tabuleiro conduziram à obtenção de lixiviados, cujas características e ocorrência temporal se encontram descritas na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Análise aos lixiviados obtidos no solo contaminado com crude

Dia	pH (escala de Sorensen)	NO ₃ ⁻ (mg/L)	OD (mg/L)	SDT (mg/L)	SST (mg/L)	V (mL)
21	7,65	10,76	4,87	1610	117,3	50
28	7,73	11,69	5	o.r. ¹	130,4	45
30	7,85	n.d. ²	n.d. ²	1532	106,7	156

¹ out of range; ² não determinado.

As amostras de lixiviado recolhidas revelaram valores de pH ligeiramente superiores aos obtidos no solo. A principal razão encontrada para esta aparente disparidade prende-se com a sensibilidade do eléctrodo na avaliação de matrizes distintas: no caso do lixiviado, totalmente líquida e na ausência de sólidos suspensos; no caso do solo, uma mistura solo-água.

A presença de uma quantidade significativa de oxigénio (O.D.) bem como de nitratos (NO₃⁻) - indicador da ocorrência do processo de nitrificação levado a cabo exclusivamente por bactérias aeróbias (*Nitrosomonas* e *Nitrobacter*), nos lixiviados, são um sinal evidente da prevalência no solo de condições aeróbias. Os nitratos foram analisados por espectrofotometria de acordo com o método 4500 B [APHA, 1989].

Analisando agora os sólidos suspensos totais (SST), determinados pelo método 2540 D [APHA, 1989], verifica-se pelos seus valores relativamente elevados, um claro arrastamento do solo, impossível de evitar apesar das medidas preventivas tomadas. Por sua vez, os sólidos dissolvidos totais (SDT) indicam a existência de sais inorgânicos no solo em quantidades significativas, provavelmente provenientes da própria composição do crude.

Os lixiviados apresentavam uma coloração intensa, não eliminada após filtração (diâmetro efectivo dos poros inferior a 2 μm), o que significa que a cor adquirida provém do contacto entre a água e contaminante de origem orgânica.

No trigésimo dia, não foram determinadas quer a concentração de oxigénio quer a concentração de nitratos por não ter sido possível a sua determinação imediata, tal como o exigido pelos procedimentos experimentais. Estes parâmetros sofrem alterações temporais.

O objectivo primordial da caracterização dos lixiviados era a determinação da carência química (CQO) e bioquímica de oxigénio (CBO_5), que poderia revelar dados importantes e complementares sobre a comunidade microbológica do solo. Porém, não foi possível a sua determinação experimental pois o equipamento laboratorial disponível necessitava, para análise, de quantidades volumétricas de lixiviados superiores às existentes.

O solo contaminado com diesel, não obstante as diversas correcções à humidade efectuadas (Figura 2.19), nunca obteve lixiviados devido à sua capacidade de retenção de água no solo. Comparativamente ao solo contaminado com crude, a dificuldade em manter do teor de humidade foi muito menor, nunca tendo o seu valor ultrapassado o limite inferior do intervalo recomendado, como pode ser observado na Figura 2.19.

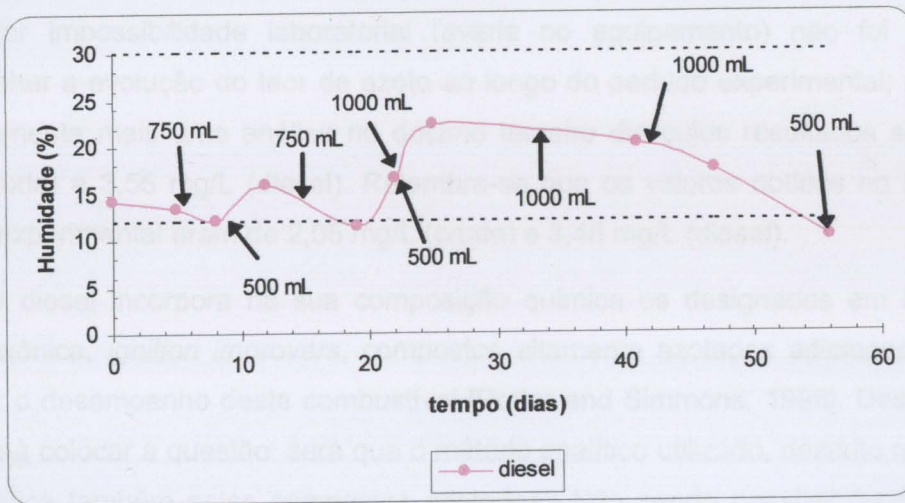


Figura 2.19 – Evolução da humidade no solo contaminado com diesel (estudo de biodegradabilidade)

2.5.1.3 Teor em azoto e fósforo

A quantidade de azoto determinada na caracterização preliminar das amostras é manifestamente insuficiente para assegurar o crescimento dos microorganismos nos dois tipos de solo. Com a finalidade de aumentar o teor de azoto, optou-se por adicionar uma solução enriquecida em macro e micronutrientes em detrimento do acerto da razão C:N. Esta decisão foi fundamentada com base nos resultados obtidos num estudo desenvolvido em 2001 [Padrão e Salvador, 2001] em condições semelhantes às que se propõe este trabalho. Adicionou-se semanalmente 500 mL de meio mineral aos tabuleiros nos quais se pretendia determinar a taxa de biodegradação.

O meio mineral é composto por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 10% (w/v), bem como por Na_2HPO_4 , $12\text{H}_2\text{O}$ (71,63 g/L) e KH_2PO_4 (27,22 g/L), como fontes de fósforo. Além destes compostos o meio mineral contém CaCl_2 , H_2O (0,696 g/L); NaCl (0,08 g/L); KNO_3 (1,03 g/L); NaNO_3 (6,98 g/L); MgSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$ (1,00 g/L); NTA (1,00 g/L); FeSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$ (2 mg/L); ZnSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 mg/L); MnSO_4 , H_2O (0,043 mg/L); H_3BO_3 (0,3 mg/L); CoSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$ (0,24 mg/L); CuSO_4 , $5\text{H}_2\text{O}$ (0,01 mg/L); NiSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$ (0,02 mg/L); NaMoO_4 , $2\text{H}_2\text{O}$ (0,03 mg/L); $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (0,5 mg/L) e EDTA (5 mg/L). A manipulação deste meio encontra-se descrita em anexo (Anexo B).

Por impossibilidade laboratorial (avaria no equipamento) não foi possível acompanhar a evolução do teor de azoto ao longo do período experimental; realizou-se unicamente mais uma análise no décimo terceiro dia cujos resultados são: 2,33 mg/L (crude) e 3,55 mg/L (diesel). Relembra-se que os valores obtidos no início do período experimental eram de 2,05 mg/L (crude) e 3,48 mg/L (diesel).

O diesel incorpora na sua composição química os designados em literatura anglo-saxónica, *ignition improvers*, compostos altamente azotados adicionados para melhorar o desempenho deste combustível [Potter and Simmons, 1998]. Deste modo poder-se-à colocar a questão: será que o método analítico utilizado, descrito no Anexo B, quantifica também estes compostos azotados? Não sendo possível fundamentar esta hipótese torna-se pertinente equacioná-la para o desenvolvimento de estudos futuros.

A determinação de fósforo presente no solo não foi descurada. O método experimental seleccionado, descrito em anexo (Anexo B), revelou não ser o mais apropriado por falta de sensibilidade na detecção do fósforo existente nos solos. Os resultados obtidos foram desprezados.

Na fase final do estudo decidiu-se adicionar, faseadamente, 100 g de nitrato de amónio (NH₄NO₃) aos solos submetidos a estudos de biodegradação, para investigar os efeitos da adição suplementar de uma fonte de azoto.

2.5.1.4 Densidade da população bacteriana

A degradação dos contaminantes num tratamento biológico implica a existência de uma população bacteriana. O acompanhamento do desenvolvimento dos microorganismos é essencial para garantir as condições necessárias à ocorrência da biodegradação.

A contagem, referida no ponto 2.3.2, foi realizada em placas de Petri contendo meio Agar, como pode ser apreciado na Figura 2.20.

A identificação visual das colónias indígenas existentes no solo permitiram distinguir quatro a cinco colónias em cada tabuleiro. Esta informação foi sintetizada na Tabela 2.4.



Figura 2.20 – Aspecto das colónias bacterianas

Tabela 2.4 – Identificação visual das colónias existentes nos solos

Nº colónias	Crude				Diesel			
	Controlo		Tabuleiro		Controlo		Tabuleiro	
	Cor	Tamanho	Cor	Tamanho	Cor	Tamanho	Cor	Tamanho
1	amarelo claro	grande	amarelo claro	grande	amarelo claro	grande	amarelo claro	grande
2	amarelo claro	grande	amarelo claro	grande	amarelo claro	grande	amarelo claro	grande
3	translúcida	pequena	translúcida	pequena	amarelo	pequena	amarelo	pequena
4	translúcida	grande	translúcida	grande	translúcida	pequena	translúcida	pequena
5	translúcida com núcleo amarelo	grande	translúcida com núcleo amarelo	grande				

Com base na observação visual, verificou-se a existência de um maior número de colónias bacterianas no solo contaminado com crude. Das cinco colónias

identificadas neste solo, três são coincidentes com as existentes no solo contaminado com diesel. Como seria de esperar, não foram detectadas quaisquer diferenças entre os tabuleiros e os seus respectivos controlos. Estas observações levam a supor uma certa especificidade das bactérias para com o substrato.

O desenvolvimento dos microorganismos no solo contaminado com crude está expresso na Figura 2.21.

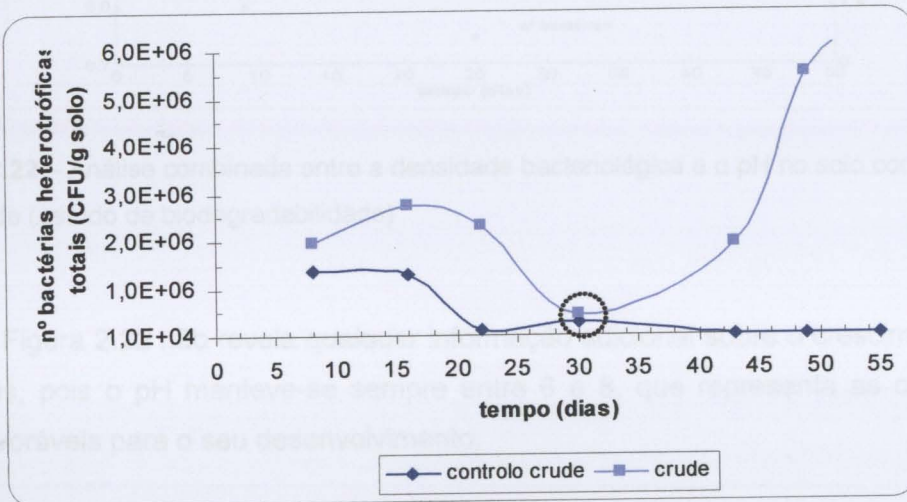


Figura 2.21 - Evolução da densidade bacteriológica no solo contaminado com crude

Desta, ressalta a óbvia diferença entre as curvas de crescimento das bactérias heterotróficas totais, com e sem ajuste de pH, humidade e teor em nutrientes.

No tabuleiro no qual se pretende quantificar a taxa de biodegradação observou-se um ligeiro aumento do número de colónias bacterianas nos primeiros quinze dias de trabalho, seguido de uma fase estacionária. No trigésimo dia verificou-se um decréscimo significativo na contagem das bactérias, assinalado na Figura 2.21, que se deve a falhas do operador na execução do espalhamento nas placas. A partir do quadragésimo quinto dia, há um novo incremento no número de bactérias, mas desta vez exponencial.

Para compreender melhor, a influência do pH e da humidade no crescimento bacteriano exprimiou-se graficamente a combinação entre os resultados obtidos.

Uma análise mais pormenorizada à Figura 2.21, revela que a partir do momento em que o teor de humidade atingiu o limite superior estabelecido, ou seja, de 12% de humidade, o número de colónias bacterianas aumentou. A influência do teor de humidade reflectiu-se num crescimento exponencial de bactérias heterotróficas

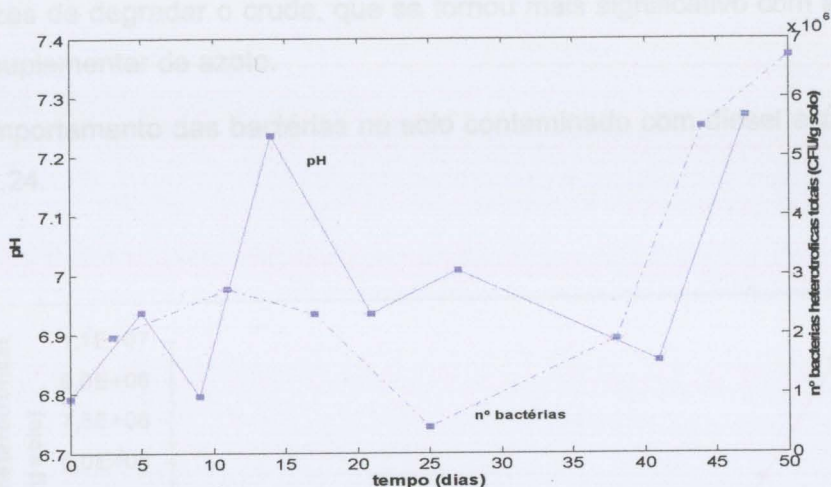


Figura 2.22 – Análise combinada entre a densidade bacteriológica e o pH no solo contaminado com crude (estudo de biodegradabilidade)

A Figura 2.22 não revela qualquer informação adicional sobre o crescimento das bactérias, pois o pH manteve-se sempre entre 6 e 8, que representa as condições mais favoráveis para o seu desenvolvimento.

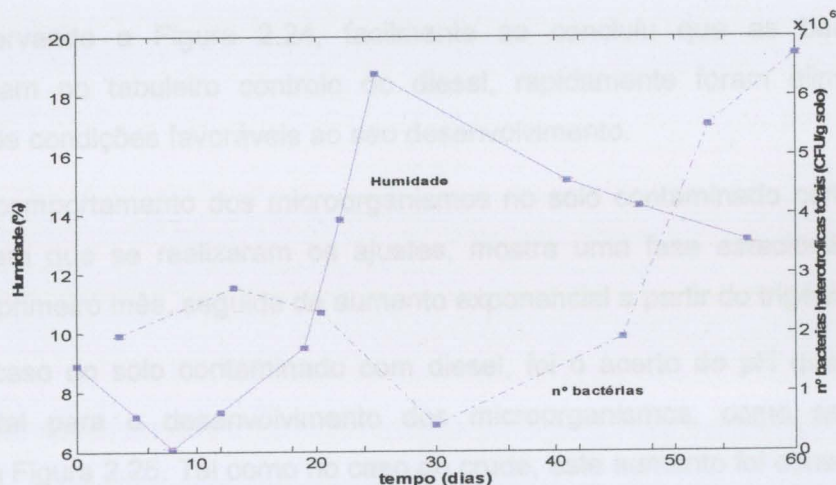


Figura 2.23 – Análise combinada entre a densidade bacteriológica e a humidade no solo contaminado com crude (estudo de biodegradabilidade)

Uma análise mais pormenorizada à Figura 2.23, revela que a partir do momento em que o teor de humidade atingiu o limiar inferior óptimo, ou seja os 12% de humidade, o número de colónias bacterianas aumentou. A correcção do teor de humidade traduziu-se num crescimento efectivo do número de bactérias heterotróficas

totais capazes de degradar o crude, que se tornou mais significativo com a adição de uma fonte suplementar de azoto.

O comportamento das bactérias no solo contaminado com diesel está traduzido na Figura 2.24.

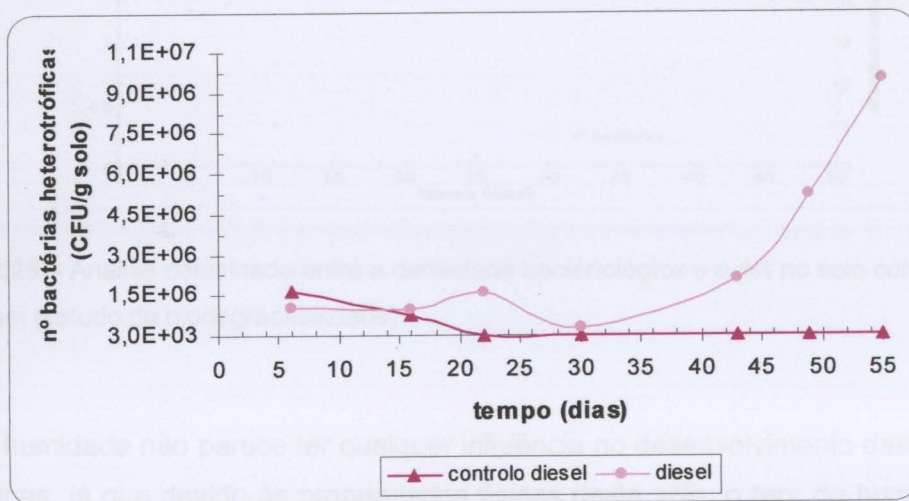


Figura 2.24 - Evolução da densidade bacteriológica no solo contaminado com diesel

Observando a Figura 2.24, facilmente se concluiu que as bactérias que permaneciam no tabuleiro controlo do diesel, rapidamente foram eliminadas por ausência de condições favoráveis ao seu desenvolvimento.

O comportamento dos microorganismos no solo contaminado com diesel, no tabuleiro em que se realizaram os ajustes, mostra uma fase estacionária extensa durante o primeiro mês, seguida de aumento exponencial a partir do trigésimo dia.

No caso do solo contaminado com diesel, foi o acerto do pH que se revelou fundamental para o desenvolvimento dos microorganismos, como se comprova através da Figura 2.25. Tal como no caso do crude, este aumento foi consolidado pela adição de NH_4NO_3 .

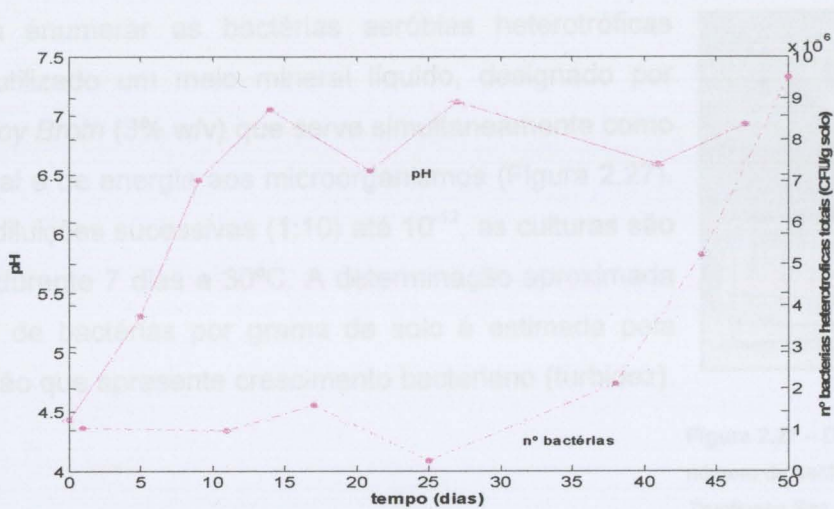


Figura 2.25 – Análise combinada entre a densidade bacteriológica e o pH no solo contaminado com diesel (estudo de biodegradabilidade)

A humidade não parece ter qualquer influência no desenvolvimento das colónias bacterianas, já que devido às propriedades físicas deste solo, o teor de humidade se conservou sempre dentro dos limites estabelecidos.

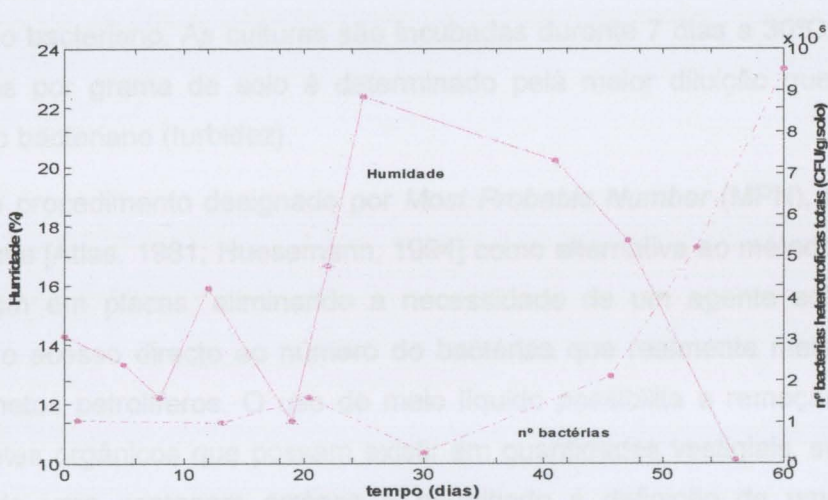


Figura 2.26 – Análise combinada entre a densidade bacteriológica e a humidade no solo contaminado com diesel (estudo de biodegradabilidade)

A par da contagem bacteriana efectuada com o recurso ao método de referência 9215 C, foi testado um outro método para a determinação da densidade bacteriológica nos solos, cujo procedimento experimental se encontra descrito no Anexo B.

Para enumerar as bactérias aeróbias heterotróficas totais, foi utilizado um meio mineral líquido, designado por *Trypticase Soy Broth* (3% w/v) que serve simultaneamente como fonte mineral e de energia aos microorganismos (Figura 2.27). Depois de diluições sucessivas (1:10) até 10^{-12} , as culturas são incubadas durante 7 dias a 30°C. A determinação aproximada do número de bactérias por grama de solo é estimada pela maior diluição que apresente crescimento bacteriano (turbidez).



Figura 2.27 – Determinação do número de bactérias com o meio *Trypticase Soy Broth*

Após a realização de alguns ensaios este método foi abandonado, por exigir uma série de material laboratorial não disponível durante o período experimental.

Foi ainda testado um outro método para a determinação do número de bactérias aeróbias com capacidade para degradarem especificamente hidrocarbonetos petrolíferos (crude e diesel), cujo procedimento experimental se encontra descrito no Anexo B. O meio mineral utilizado denomina-se *Bushnell-Haas*. A este é adicionado 0,3 mL de crude ou diesel, consoante o tipo de solo, após consecutivas diluições (1:10). Os hidrocarbonetos petrolíferos fornecem a fonte de carbono e energia para o metabolismo bacteriano. As culturas são incubadas durante 7 dias a 30°C. O número de bactérias por grama de solo é determinado pela maior diluição que apresente crescimento bacteriano (turbidez).

Este procedimento designado por *Most Probable Number* (MPN), foi sugerido na bibliografia [Atlas, 1981; Huesemann, 1994] como alternativa ao método tradicional de contagem em placas, eliminando a necessidade de um agente solidificante e permitindo o acesso directo ao número de bactérias que realmente metabolizam os hidrocarbonetos petrolíferos. O uso do meio líquido possibilita a remoção de outros contaminantes orgânicos que possam existir em quantidades vestigiais, suprimindo o problema de uma contagem errónea e permitindo a definição de um meio com hidrocarbonetos como única fonte de carbono.

Embora os resultados alcançados não sejam correlacionáveis com os obtidos na contagem em placas são bastante coerentes.

Acompanhando a evolução da densidade bacteriana específica do crude, Figura 2.28, facilmente se observa a partir dos quarenta dias um crescimento exponencial, coincidente com o ocorrido na determinação do número de bactérias heterotróficas totais. A causa deste crescimento intenso aponta no sentido da estabilização das

condições higrométricas e adição suplementar de uma fonte de azoto, favorecendo condições ideais de desenvolvimento.

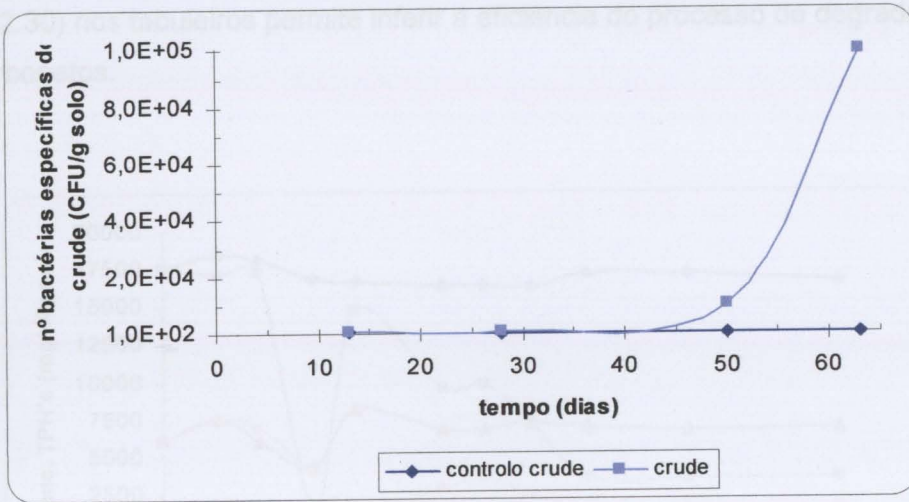


Figura 2.28 – Evolução da densidade bacteriana específica do crude

Da mesma forma, no solo contaminando com diesel (Figura 2.29) se observa um incremento do número de bactérias na fase final do estudo experimental, semelhante ao verificado nos resultados obtidos recorrendo ao primeiro método empregue.

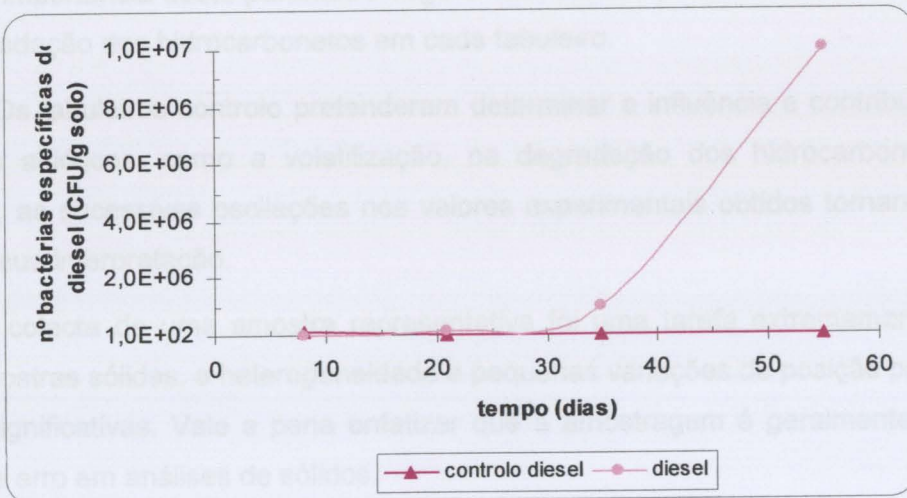


Figura 2.29 – Evolução da densidade bacteriana específica do diesel

A explicação recai na correcção do valor do pH e na adição do NH_4NO_3 , como medidas essenciais para alcançar condições mais favoráveis de desenvolvimento.

2.5.1.5 Concentração dos contaminantes

A evolução temporal do decréscimo da concentração dos contaminantes (Figura 2.30) nos tabuleiros permite inferir a eficiência do processo de degradação dos hidrocarbonetos.

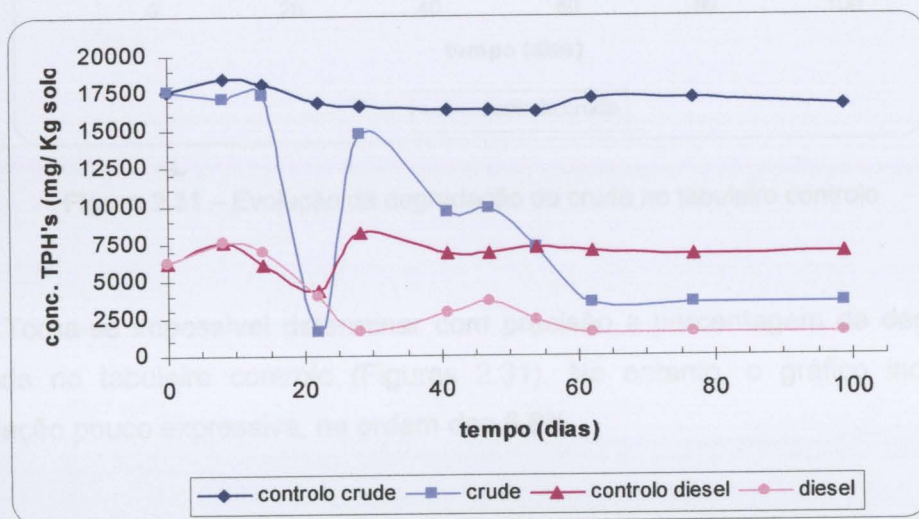


Figura 2.30 - Evolução da degradação dos contaminantes nos solos em estudo

A importância deste parâmetro sugere uma análise pormenorizada ao processo de degradação dos hidrocarbonetos em cada tabuleiro.

Os tabuleiros controlo pretenderam determinar a influência e contribuição dos factores abióticos, como a volatilização, na degradação dos hidrocarbonetos. No entanto, as sucessivas oscilações nos valores experimentais obtidos tornaram muito difícil a sua interpretação.

A colecta de uma amostra representativa foi uma tarefa extremamente difícil. Nas amostras sólidas, a heterogeneidade e pequenas variações de posição podem ser muito significativas. Vale a pena enfatizar que a amostragem é geralmente a maior fonte de erro em análises de sólidos.

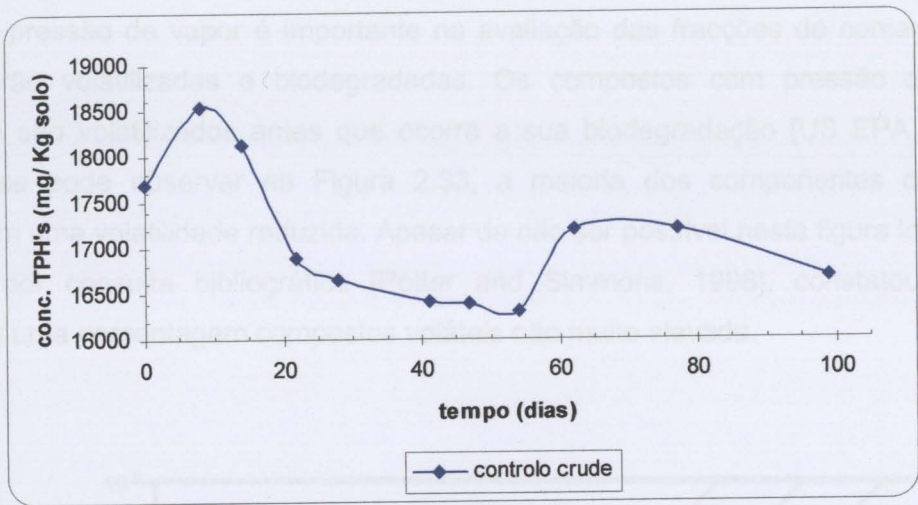


Figura 2.31 – Evolução da degradação do cruído no tabuleiro controle

Torna-se impossível determinar com precisão a percentagem de degradação do cruído no tabuleiro controle (Figuras 2.31). No entanto, o gráfico indica uma degradação pouco expressiva, na ordem dos 5,8%.

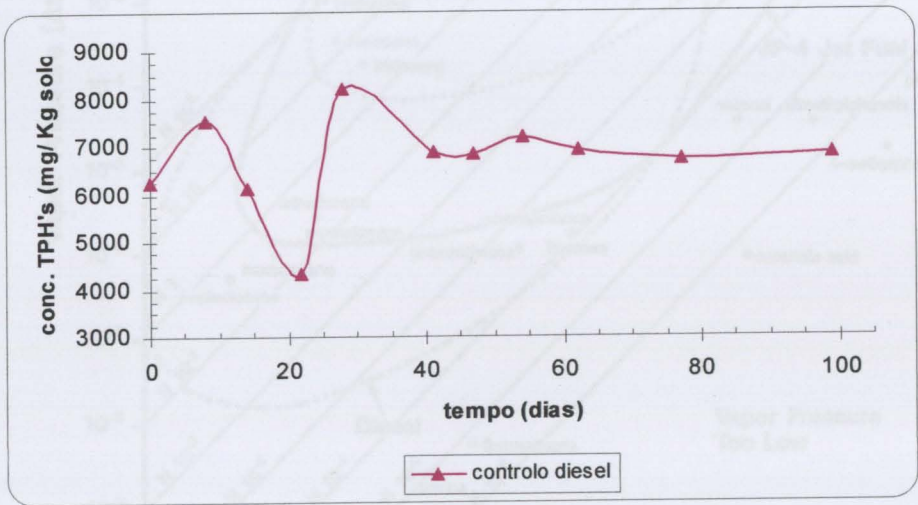


Figura 2.32 – Evolução da degradação do diesel no tabuleiro controle

No tabuleiro controle do diesel, nota-se uma oscilação considerável nos primeiros trinta dias de estudo, seguida de uma fase estacionária onde não há qualquer indício de degradação. É contudo impraticável, estimar a ordem de grandeza da degradação ocorrida.

A pressão de vapor é importante na avaliação das fracções de contaminantes que serão volatilizadas e biodegradadas. Os compostos com pressão de vapor elevada são volatilizados antes que ocorra a sua biodegradação [US EPA, 1995a]. Como se pode observar na Figura 2.33, a maioria dos componentes do diesel possuem uma volatilidade reduzida. Apesar de não ser possível nesta figura localizar o crude, por consulta bibliográfica [Potter and Simmons, 1998], constatou-se que possuía uma percentagem compostos voláteis não muito elevada.

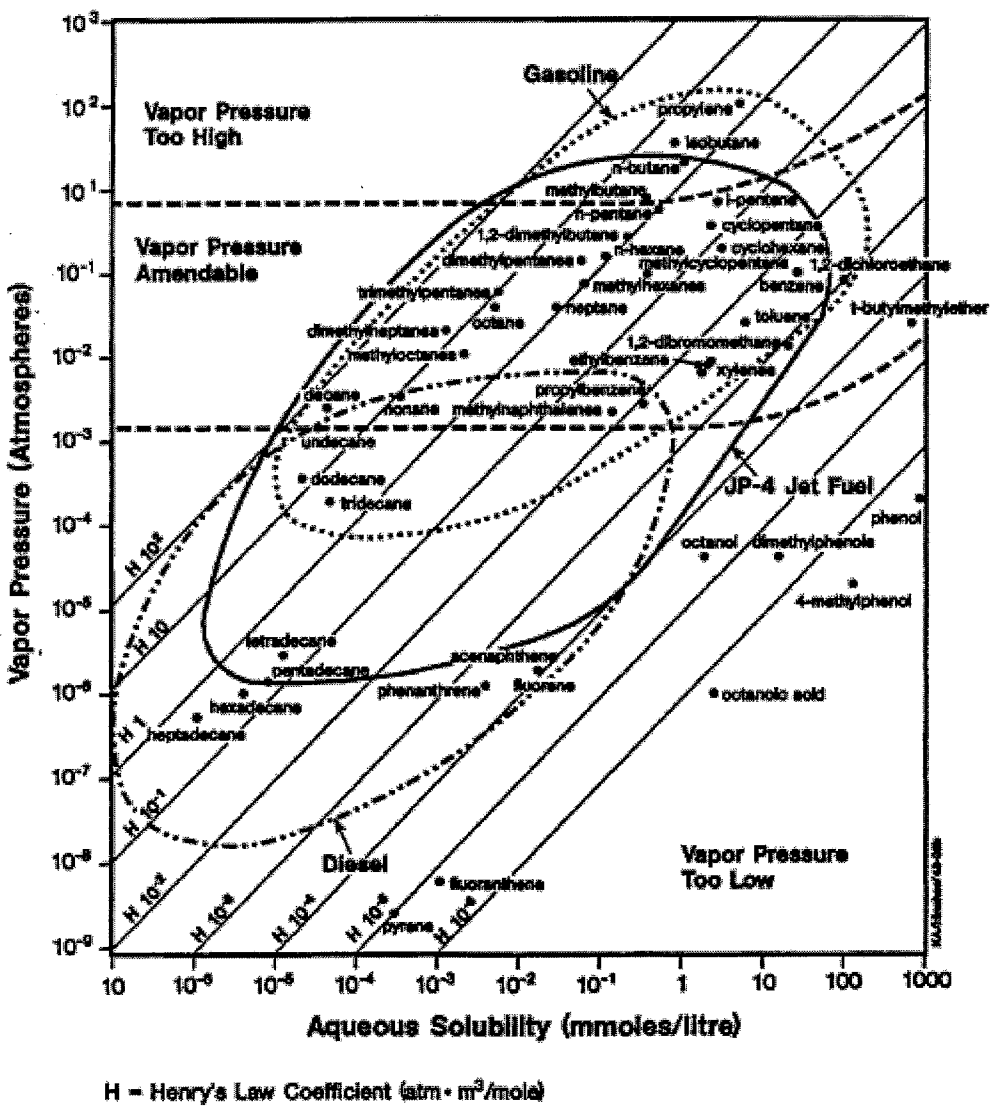


Figura 2.33 – Relação entre as propriedades físico-químicas dos contaminantes e potencial de volatilização [adap. US EPA, 1995a]

Se a volatilização teve um contributo negligenciável na degradação dos tabuleiros controlo, qual foi o processo responsável pela degradação? Na tentativa de

encontrar resposta para esta questão optou-se por um novo cruzamento de dados entre a diminuição da concentração dos contaminantes e o número de bactérias.

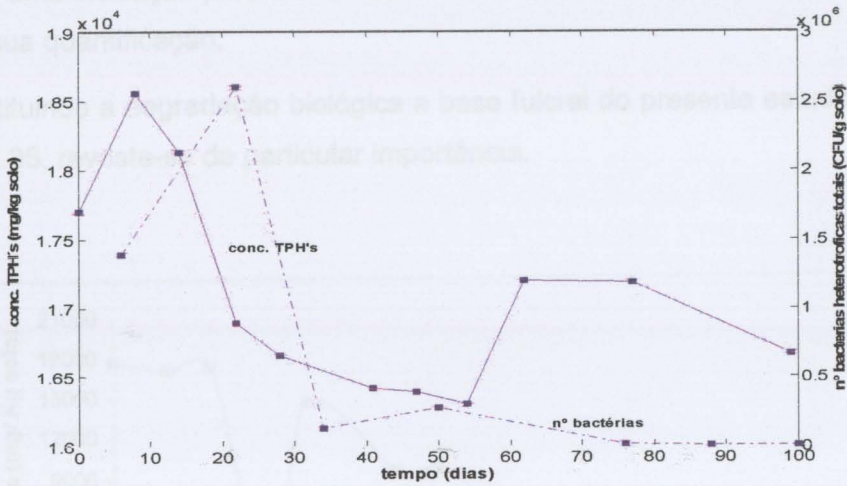


Figura 2.34 - Análise combinada entre a densidade bacteriológica e a concentração de crude no tabuleiro controlo

Os resultados apresentados na Figura 2.34 evidenciam a existência de bactérias em número suficiente para degradarem os hidrocarbonetos petrolíferos. Portanto é natural que a biodegradação seja o principal fenómeno responsável pela degradação ocorrida.

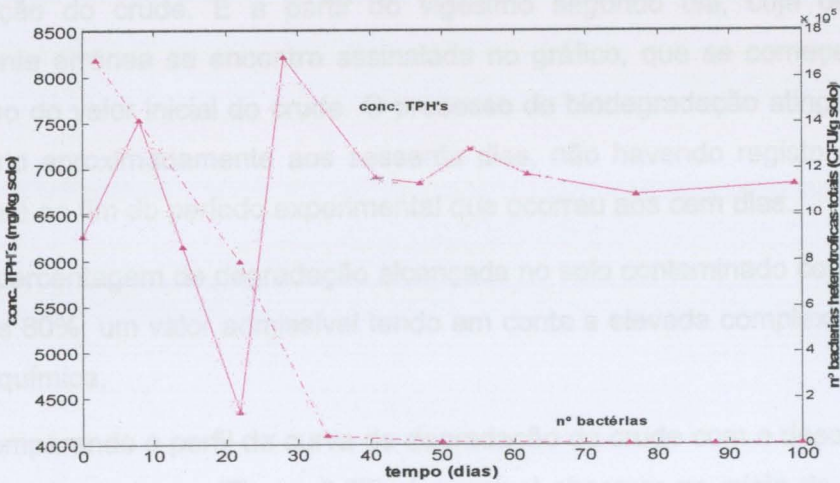


Figura 2.35 - Análise combinada entre a densidade bacteriológica e a concentração de diesel no tabuleiro controlo

A análise ao tabuleiro controlo do diesel (Figura 2.35) demonstra a existência de colónias bacterianas em número elevado no início do período experimental, o que representa uma indicação para a eventual ocorrência de biodegradação, embora seja inviável a sua quantificação.

Constituindo a degradação biológica a base fulcral do presente estudo, a análise da Figura 2.36, reveste-se de particular importância.

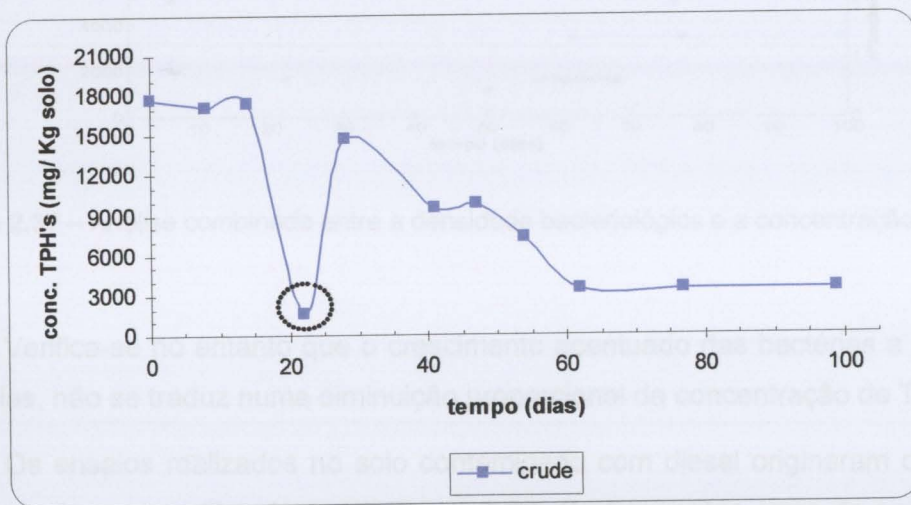


Figura 2.36 - Evolução da biodegradação do crude

Nos primeiros quinze dias de estudo não houve qualquer alteração na concentração do crude. É a partir do vigésimo segundo dia, cuja determinação notoriamente errónea se encontra assinalada no gráfico, que se começa assistir ao decréscimo do valor inicial do crude. O processo de biodegradação atinge um estado estacionário aproximadamente aos sessenta dias, não havendo registo de qualquer variação até ao fim do período experimental que ocorreu aos cem dias.

A percentagem de degradação alcançada no solo contaminado com crude é da ordem dos 80%, um valor admissível tendo em conta a elevada complexidade da sua estrutura química.

Comparando o perfil da curva de degradação do crude com o desenvolvimento das colónias bacterianas (Figura 2.37), é possível observar no início do estudo uma fase de aclimação prolongada das bactérias a que corresponde um valor estacionário da concentração. Segue-se um período de aumento do número de

bactérias existentes no solo que é acompanhado por um decréscimo da concentração do contaminante, conforme o comportamento previsto.

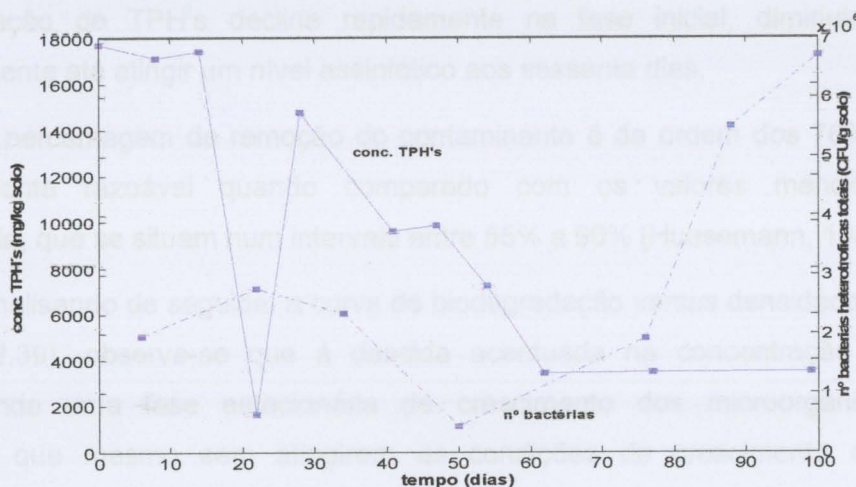


Figura 2.37 – Análise combinada entre a densidade bacteriológica e a concentração de crude

Verifica-se no entanto que o crescimento acentuado das bactérias a partir dos trinta dias, não se traduz numa diminuição proporcional da concentração de TPH's.

Os ensaios realizados no solo contaminado com diesel originaram o perfil de concentrações que está patente na Figura 2.38. Os frequentes erros de amostragem tornaram crítica a sua interpretação. De acordo com o comportamento teórico esperado, os três pontos assinalados na Figura 2.38 foram desprezados para facilitar a compreensão da evolução da degradação deste contaminante.

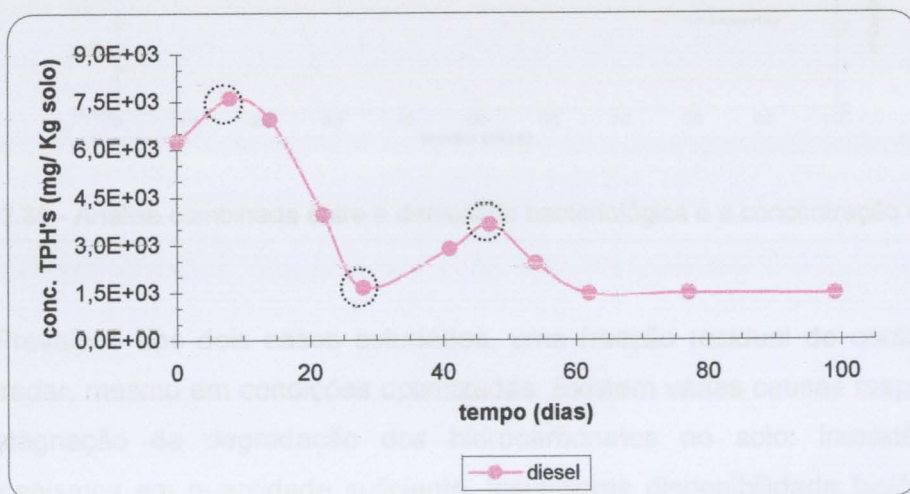


Figura 2.38 - Evolução da biodegradação do diesel

Como é possível visualizar na Figura 2.38, após uma curta fase estacionária, a concentração de TPH's declina rapidamente na fase inicial, diminuindo depois gradualmente até atingir um nível assintótico aos sessenta dias.

A percentagem de remoção do contaminante é da ordem dos 76%, um valor perfeitamente razoável quando comparado com os valores mencionados na bibliografia, que se situam num intervalo entre 55% a 90% [Huesemann, 1995].

Analisando de seguida, a curva de biodegradação *versus* densidade bacteriana (Figura 2.39), observa-se que à descida acentuada na concentração do diesel, corresponde uma fase estacionária de crescimento dos microorganismos. Isto significa, que mesmo sem atingirem as condições de crescimento optimizadas existiam bactérias em número suficiente para facilmente metabolizarem os hidrocarbonetos de reduzida massa molecular. Posteriormente, tal como no crude, há um crescimento exponencial dos microorganismos, que não equivale a uma diminuição assinalável da concentração em TPH's.

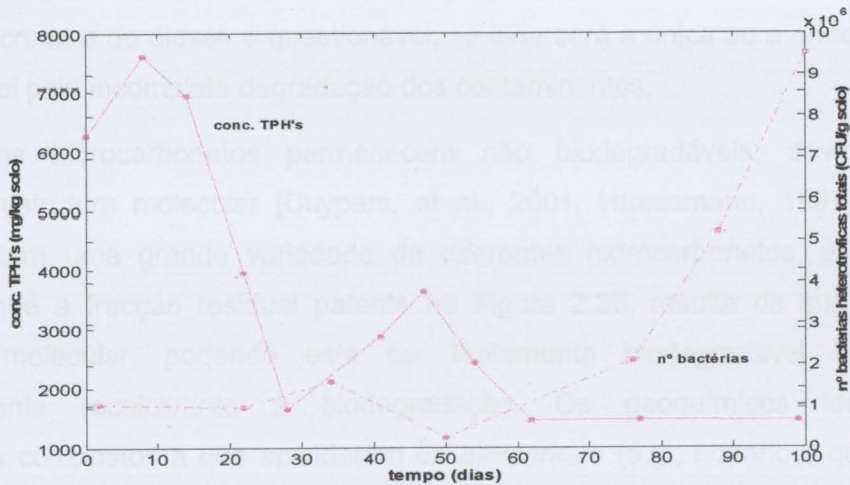


Figura 2.39 - Análise combinada entre a densidade bacteriológica e a concentração de diesel

Prevalece nos dois casos estudados, uma fracção residual de contaminante por degradar, mesmo em condições optimizadas. Existem várias causas responsáveis pela estagnação da degradação dos hidrocarbonetos no solo: inexistência de microorganismos em quantidade suficiente, insuficiente disponibilidade biológica dos poluentes, persistência dos compostos.

O conceito do sequestro do contaminante em pequenos poros nas partículas do solo ou em agregados, que se traduz na limitação biológica dos mesmos, é uma suposição provável [Admon et al., 2001; Cuypers, et al., 2001, Huesemann, 1997; Löser et al., 1999]. Este modelo baseia-se no pressuposto de que são os processos de sorção e difusão que controlam a taxa de biodegradação. A rápida biodegradação inicial pode ser explicada em termos de uma célere dessorção dos compostos bio disponíveis que se situam na camada superficial das partículas contaminadas do solo ou agregados. Posteriormente, as taxas de biodegradação serão cada vez menores à medida que as moléculas do contaminante se difundem através dos poros tortuosos do interior das partículas ou agregados, para as áreas periféricas onde se encontram as colónias bacterianas responsáveis pela degradação dos respectivos compostos. Assumindo que as paredes dos poros estão revestidas com matéria orgânica, o processo de difusão intra particular (ou intra-agregados) é retardado pela repetida sorção e dessorção das moléculas hidrofóbicas ao longo das paredes dos poros e pela tortuosidade dos mesmos. De acordo com este modelo é possível prever que os compostos com maior hidrofobicidade possuem uma menor capacidade de dessorção e conseqüentemente uma menor taxa de biodegradabilidade. No entanto, quando se aborda o comportamento de misturas multi-componentes de hidrocarbonetos, como é o caso do crude e do diesel, é questionável, se esta será a única ou a principal causa responsável pela incompleta degradação dos contaminantes.

Alguns hidrocarbonetos permanecem não biodegradáveis, devido à sua complexa estrutura molecular [Cuypers, et al., 2001, Huesemann, 1997]. Como o crude contém uma grande variedade de diferentes hidrocarbonetos, é facilmente aceitável que a fracção residual patente na Figura 2.36, resulta da sua complexa estrutura molecular, podendo esta ser lentamente biodegradável ou mesmo inerentemente recalcitrante à biodegradação. Os geoquímicos identificaram numerosos compostos a que apelidaram de *biomarkers* (e.g., hopanos) que são tão resistentes à biodegradação que podem ser utilizados para determinar a idade geológica e a origem de jazigos de petróleo. Em vários estudos efectuados foi também reconhecida a presença de pristanos e fitanos (alcanos com elevado grau de ramificação) na fracção remanescente de diesel [Zytner et al., 2001].

A conjugação entre o sequestro dos contaminantes e a sua persistência fornece a explicação mais consistente para a incompleta biodegradação verificada no crude e no diesel.

Modelos cinéticos

3. Modelos cinéticos

O objectivo deste capítulo é testar vários modelos cinéticos bem como desenvolver um modelo cinético capaz de prever e quantificar as interacções biomassa/substrato.

As análises cinéticas foram desenvolvidas a partir dos resultados obtidos nos estudos de biodegradação.

3.1 Modelo cinético de 1ª ordem

A taxa de crescimento das bactérias é uma função das condições ambientais, concentração de substrato, concentração de oxigénio, e concentração de células. Atendendo a todos estes factores a velocidade de crescimento das bactérias pode ser expressa pela seguinte equação:

$$r_c = \left(\frac{\mu_{\text{máx}} * C}{K_s + C} - k_d \right) * X \quad (3.1)$$

sendo,

r_c = velocidade de crescimento, mg/(L.dia)

$\mu_{\text{máx}}$ = velocidade específica de crescimento máximo, dia⁻¹

C = concentração de substrato, mg/L

K_s = coeficiente de saturação, mg/L

k_d = coeficiente de manutenção de energia, dia⁻¹

X = concentração de biomassa, mg/L

Em processos de bio reabilitação de solos, a determinação da concentração de biomassa é extremamente difícil. Por esta razão o termo correspondente à manutenção de energia é habitualmente desprezado e a concentração de biomassa é considerada aproximadamente constante.

$$r_c \approx \frac{\mu_{m\acute{a}x} * C}{K_S + C} * X \quad (3.2a)$$

$$\approx \frac{u_{m\acute{a}x} * C}{K_S + C} \quad (3.2b)$$

sendo,

$$u_{m\acute{a}x} = \mu_{m\acute{a}x} * X, \text{ mg/L.dia}$$

De notar que quando a concentração de substrato é abundante, $C \gg K_S$, a velocidade de crescimento torna-se aproximadamente igual a $u_{m\acute{a}x}$. O valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ depende de diversos factores como a temperatura, pH, composição da solução nutriente e das espécies bacterianas presentes no solo.

Nos tratamentos biológicos, o substrato utilizado pelas bactérias como fonte de carbono ou de energia é geralmente o composto poluente. Assim, modelar o consumo do substrato é um factor importante na avaliação da performance do processo. Na maioria dos casos o consumo do substrato depende de muitas variáveis como a competição entre microorganismos, a disponibilidade biológica do substrato, a presença de fontes preferenciais de carbono, e a necessidade de um período de aclimação. Assume-se a cinética de Monod modificada (Equação 3.2) como adequada para descrever a dinâmica da população microbiológica, limitada apenas pela concentração do substrato. A Equação 3.3 relaciona a massa de células produzida com a massa de substrato utilizada.

$$r_c = -Y * r_0 \quad (3.3)$$

sendo,

Y = factor de conversão do substrato, g de células geradas/g de substrato utilizado

r_0 = velocidade de remoção do contaminante, mg/L.dia

A biodegradação nos solos pode ser considerada, em termos simplificativos, como um processo batch descontínuo. Em processos desta natureza a velocidade de reacção é igual à velocidade de acumulação. Considerando que as bactérias colonizam as partículas do solo, a concentração de células na fase sólida (B) substitui a concentração na fase líquida (X).

$$r_c = \frac{\mu_{m\acute{a}x} * C}{K_S + C} * B \quad (3.4)$$

$$= -Y * \frac{dC}{dt} = \frac{\mu_{m\acute{a}x} * C}{K_S + C} * B \quad (3.5)$$

O factor de conversão do substrato, Y, pode ser usado para estimar a produção de biomassa, baseado na quantidade de contaminante orgânico removido.

$$Y = -\frac{\Delta B}{\Delta C} \quad (3.6a)$$

$$B = B_0 + Y * (C_0 - C) \quad (3.6b)$$

Substituindo os termos (3.6) na Equação (3.5) vem:

$$\frac{dC}{dt} = -\frac{B}{Y} * \frac{\mu_{m\acute{a}x} * C}{K_S + C} \quad (3.7a)$$

$$= -\frac{\mu_{m\acute{a}x}}{Y} * \frac{C * [B_0 + Y * (C_0 - C)]}{K_S + C} \quad (3.7b)$$

A Equação (3.7b) é a solução geral que descreve o consumo do substrato num sistema onde a densidade populacional e a concentração do mesmo são os únicos factores que determinam a cinética de degradação. A forma integral da Equação (3.7b) é a seguinte,

$$\frac{\mu_{m\acute{a}x}}{Y} * t = \frac{1}{Y} * \ln \frac{B_0 + Y * C_0 - Y * C}{B_0} - \frac{K_S}{B_0 + Y * C_0} * \ln \left(\frac{C * B_0}{C_0 * (B_0 + Y * C_0 - Y * C)} \right) \quad (3.8)$$

A Equação (3.7b) e consequentemente a Equação (3.8), podem ser simplificadas matematicamente. Assim, se $B_0 \gg Y * C_0$, a Equação (3.7b) reduz-se a uma expressão de ordem zero:

$$\frac{dC}{dt} = -\frac{\mu_{m\acute{a}x}}{Y} * B_0$$
(3.9a)

$$C = C_0 - \frac{\mu_{m\acute{a}x}}{Y} * B_0 * t$$
(3.9b)

No solo, a Equação (3.7) pode ser simplificada mediante determinados pressupostos, obtendo-se assim uma expressão de ordem zero, descrita anteriormente, um modelo de não crescimento (B = constante), e um modelo de primeira ordem (K_S » C). Estes três modelos encontram-se sumariados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Modelos de biodegradação [adap. Eweis et al., 1998]

Modelo	Condição necessária	Forma diferencial	Forma integrada
Ordem zero	C ₀ » K _S B ₀ » Y*C ₀	$\frac{dC}{dt} = -\frac{\mu_{m\acute{a}x}}{Y} * B_0$	$C = C_0 - \frac{\mu_{m\acute{a}x}}{Y} * B_0 * t$
Monod (sem crescimento)	B = const.	$\frac{dC}{dt} = -\frac{\mu_{m\acute{a}x} * B_0 * C}{Y * (K_S + C)}$	$K_S * \ln \frac{C}{C_0} + C - C_0 = -\frac{B_0}{Y} * \mu_{m\acute{a}x} * t$
Primeira ordem (sem crescimento)	C ₀ « K _S B ₀ = const.	$\frac{dC}{dt} = -\frac{\mu_{m\acute{a}x}}{Y * K_S} * B_0 * C$	$C = C_0 * \exp\left(-\frac{\mu_{m\acute{a}x}}{Y * K_S} * B_0 * t\right)$

De todos os modelos apresentados na Tabela 3.1, o mais utilizado para descrever o consumo do substrato é sem dúvida o de primeira ordem. Este modelo assume como pressuposto que em condições normais de tratamento biológico, todos os factores devem permanecer constantes excepto a concentração de substrato. O oxigénio, a humidade e os nutrientes devem ser mantidos em condições não limitantes; os microorganismos devem estar presentes no solo em abundância proporcionando assim uma variação constante na concentração do substrato à medida que os hidrocarbonetos vão sendo consumidos.

As cinéticas de degradação do crude e do diesel foram determinadas, assumindo uma aproximação a um modelo de primeira ordem: C = C₀ * e^{-k*t}.

Utilizando a forma linear integrada desta equação: $\ln \frac{C}{C_0} = \frac{\mu_{\max} * B_0}{Y} * t = k * t$, a constante cinética, k , foi obtida graficamente por regressão linear.

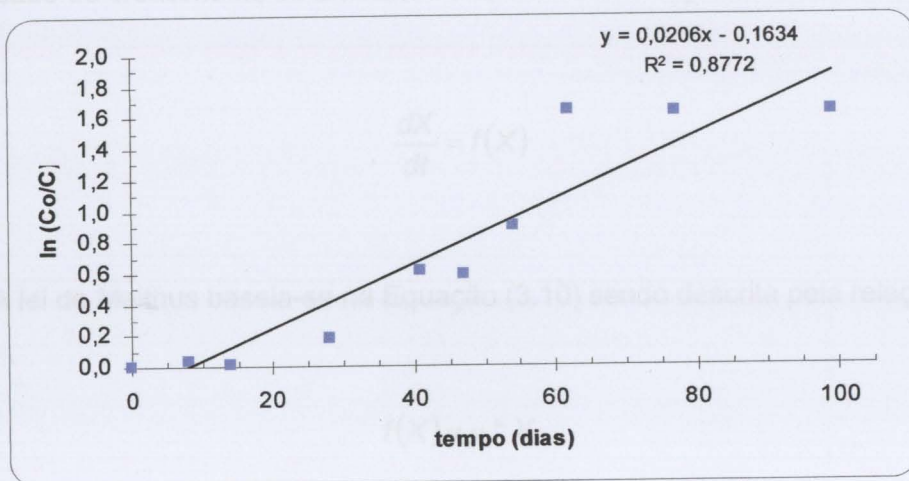


Figura 3.1 – Determinação da constante cinética de primeira ordem para o crude

A degradação do crude (Figura 3.1) é caracterizada por uma constante cinética de $0,021 \text{ dia}^{-1}$ ($R^2 = 0,88$). O seu tempo de semi-vida ($t_{1/2}$), ou seja, o tempo necessário para degradar 50% da contaminação inicial é de 33,7 dias.

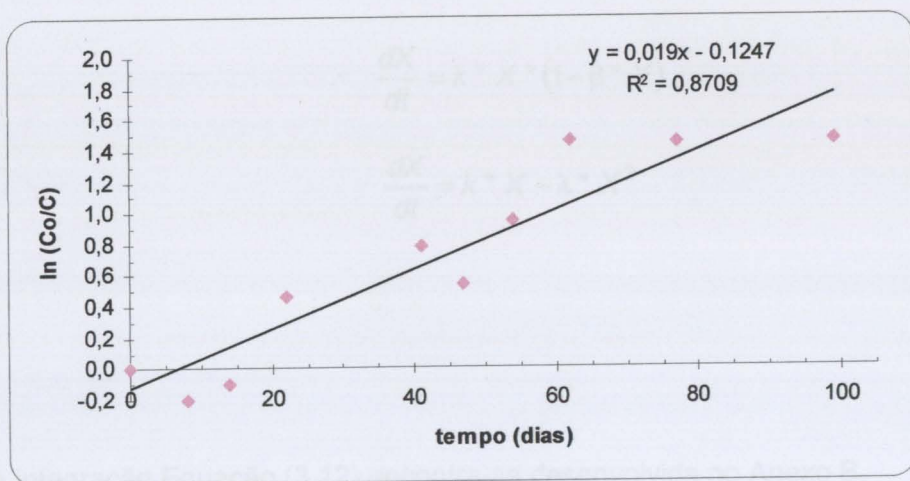


Figura 3.2 – Determinação da constante cinética de primeira ordem para o diesel

O diesel (Figura 3.2) apresenta uma constante cinética de $0,019 \text{ dia}^{-1}$ ($R^2 = 0,87$). O tempo semi-vida para este composto é de 36,5 dias.

3.2 Modelo logístico

Considerando a biodegradação como um modelo batch simples, admite-se que a velocidade de crescimento da biomassa é apenas uma função da massa celular.

$$\frac{dX}{dt} = f(X) \quad (3.10)$$

A lei de Malthus baseia-se na Equação (3.10) sendo descrita pela relação

$$f(X) = \mu * X \quad (3.11)$$

onde μ é uma constante. Neste caso a velocidade de crescimento é caracterizada por um crescimento exponencial.

Vários autores [Bailey and Ollis, 1986] desenvolveram esta relação, introduzindo um factor inibitório ao crescimento dos microorganismos. Assumindo que a inibição é proporcional a X^2 , estabeleceram a seguinte equação:

$$\frac{dX}{dt} = k * X * (1 - \beta * X) \quad (3.12a)$$

$$\frac{dX}{dt} = k * X - \lambda * X^2 \quad (3.12b)$$

sendo,

$$\lambda = \beta * k$$

A integração Equação (3.12) encontra-se desenvolvida no Anexo B.

$$X = \frac{k * e^{k*t} * X_0}{e^{k*t_0} * (k - X_0 * \lambda) + \lambda * e^{k*t} * X_0} \quad (3.13)$$

A curva logística (Figura 3.3) é sigmoideal e tende para um estado estacionário definido por $X_s = \frac{k}{\lambda}$.

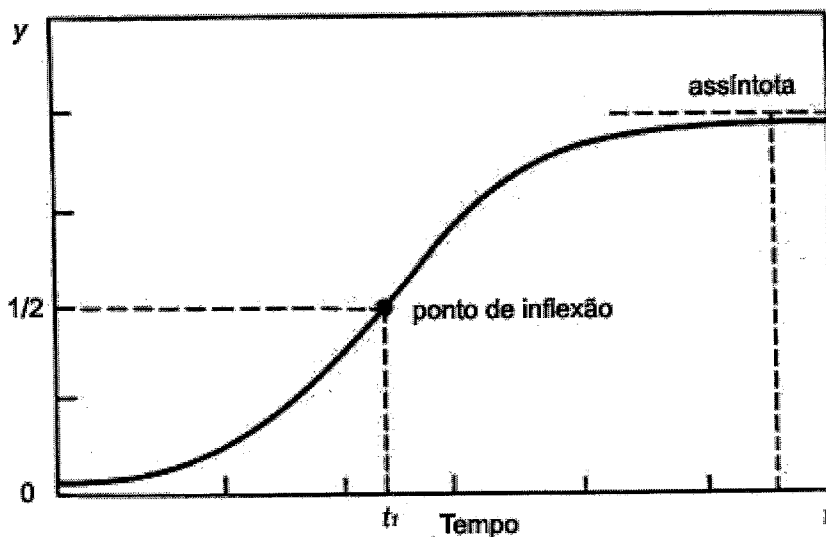


Figura 3.3 – Curva logística ($\lambda > 0$)

Para simular o comportamento do modelo descrito pela Equação (3.13), elaborou-se um algoritmo que inclui uma minimização do quadrado dos desvios, recorrendo ao programa informático MATLAB 6.5. Para testar a equação da logística os resultados obtidos referentes à densidade bacteriana, expressos em CFU/g solo, foram convertidos em mg/L (Anexo A), admitindo que as bactérias possuem uma forma esférica com $2 \cdot 10^{-3}$ cm de diâmetro, de densidade aproximadamente igual à da água.

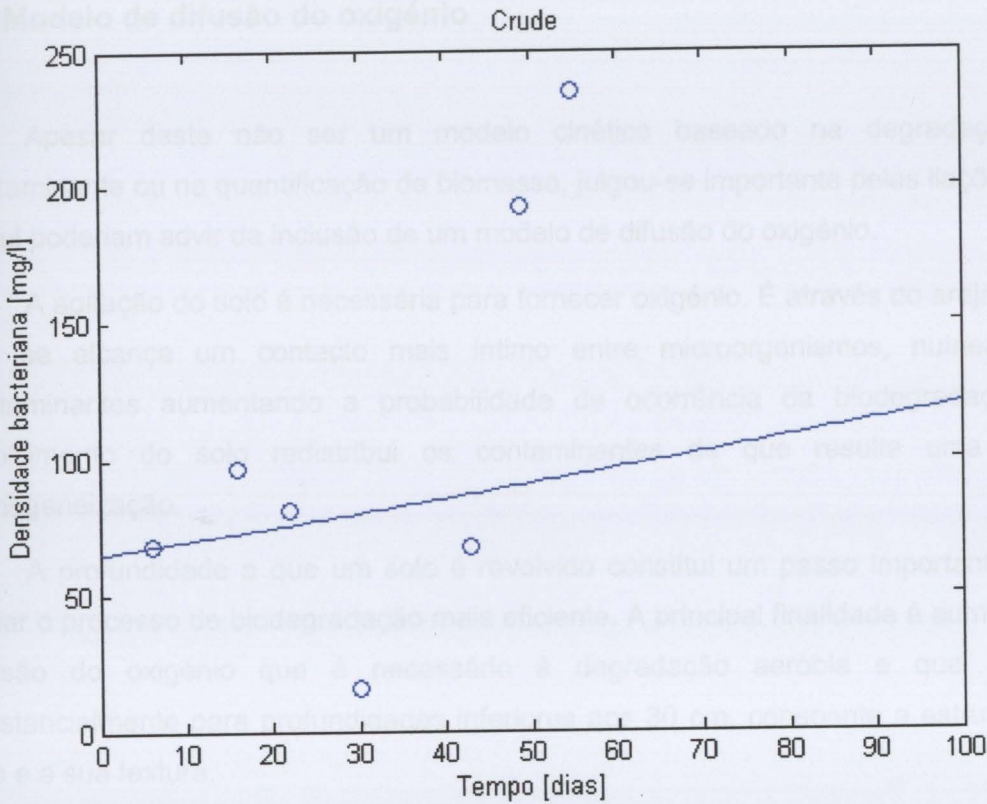


Figura 3.4 – Ajuste dos resultados experimentais de biomassa pelo modelo logístico

Como é evidente pela Figura (3.4), não foi possível obter qualquer ajuste. O comportamento experimental da biomassa foi temporalmente limitado. Constatou-se que a fase de crescimento exponencial ainda vigorava aquando das últimas contagens. O facto de não haver dados sobre a fase estacionária, conduziu a um mau ajuste. Por esta razão este modelo não foi testado para o diesel.

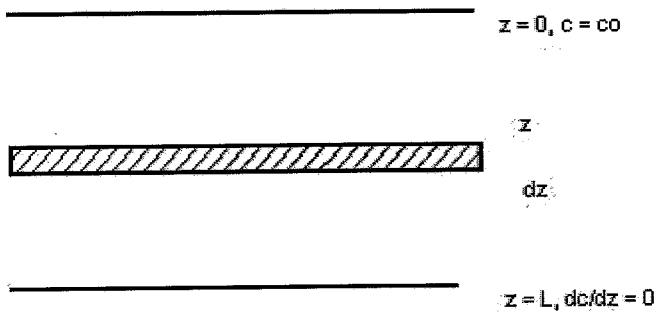
3.3 Modelo de difusão do oxigénio

Apesar deste não ser um modelo cinético baseado na degradação do contaminante ou na quantificação da biomassa, julgou-se importante pelas ilações que daqui poderiam advir da inclusão de um modelo de difusão do oxigénio.

A agitação do solo é necessária para fornecer oxigénio. É através do arejamento que se alcança um contacto mais íntimo entre microorganismos, nutrientes e contaminantes aumentando a probabilidade de ocorrência da biodegradação. O revolvimento do solo redistribui os contaminantes de que resulta uma maior homogeneização.

A profundidade a que um solo é revolvido constitui um passo importante para tornar o processo de biodegradação mais eficiente. A principal finalidade é aumentar a difusão do oxigénio que é necessário à degradação aeróbia e que diminui substancialmente para profundidades inferiores aos 30 cm, consoante a estrutura do solo e a sua textura.

A profundidade a que o oxigénio pode penetrar no solo, devido apenas à difusão pode ser estimada a partir de um simples balanço de massa. Para simplificar, admite-se que o solo está seco estando todos os poros preenchidos com ar, sendo a porosidade uniforme. Neste modelo supõe-se que a cinética de utilização do oxigénio é de ordem zero.



Efectuando um balanço de massa ao elemento infinitesimal de espessura dz situado à distância z da superfície do solo, e designando S como área e J como fluxo, vem:

$$\text{Entra: } S \cdot J$$

$$\text{Sai: } S^* J + \frac{\partial(S^* J)}{\partial z} dz$$

A variação do retido é dada por:

$$\frac{\partial(S^* dz * c)}{\partial t}$$

e a quantidade de oxigénio utilizada nesse elemento é dada por

$$S^* dz * r$$

sendo r a quantidade de oxigénio utilizada por unidade de volume e unidade de tempo.

Assim, a equação de balanço de massa é dada pela seguinte expressão,

$$\frac{\partial(S^* dz * c)}{\partial t} = S^* J - S^* J - \frac{\partial(S^* J)}{\partial z} dz - S^* dz * r \quad (3.20a)$$

ou seja,

$$\frac{\partial c}{\partial t} = - \frac{\partial J}{\partial z} - r \quad (3.20b)$$

Aplicando a 1ª lei de Fick,

$$\frac{\partial c}{\partial t} = - \frac{\partial}{\partial z} \left(-D^* \phi^* \frac{\partial c}{\partial z} \right) - r \quad (3.21)$$

sendo D a difusividade do oxigénio no ar e ϕ a porosidade do solo.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D^* \phi^* \frac{\partial c^2}{\partial z^2} - r \quad (3.22)$$

Considerando condições de estado estacionário,

$$\frac{d^2 c}{dz^2} = \frac{r}{D^* \phi} \quad (3.23)$$

Integrando a Equação (3.23) entre os limites $c = c_0$ a $c = 0$ e $z = 0$ a $z = L$ vem,

$$\frac{dc}{dz} = \frac{r}{D^* \phi} * z + I \quad (3.24)$$

sendo I uma constante de integração.

Atendendo à condição fronteira $\frac{dc}{dz} = 0$ para $z = L$, determina-se a constante I .

$$0 = \frac{r}{D^* \phi} * L + I \Rightarrow I = -\frac{r}{D^* \phi} * L$$

Substituindo

$$\frac{dc}{dz} = \frac{r}{D^* \phi} * (z - L) \quad (3.25)$$

Integrando novamente, obtém-se

$$c = \frac{r}{D^* \phi} * \frac{z^2}{2} - \frac{r * L}{D^* \phi} * z + I_2 \quad (3.26)$$

sendo I_2 a constante de integração.

Da condição $z = 0$, $c = c_0$ retira-se o valor de I_2 .

$$c = c_0 + \frac{r^* z}{D^* \phi} * \left(\frac{z}{2} - L \right) \quad (3.27)$$

Aplicando a condição fronteira $c = 0$ para $z = L$, resulta

$$0 = c_0 + \frac{r^* L}{D^* \phi} * \left(\frac{L}{2} - L \right) \quad (3.28a)$$

Resolvendo a Equação (3.28a) em ordem a L chega-se à expressão que permite calcular a distância a que se difunde o oxigénio

$$L = \sqrt{\frac{2^* D^* \phi^* c_0}{r}} \quad (3.28b)$$

Partindo da equação às derivadas parciais (Equação (3.22)), que é uma equação parabólica do tipo $\frac{\partial u}{\partial t} = b^* \frac{\partial^2 u}{\partial x^2}$, é possível criar um modelo dinâmico, simulando condições reais de funcionamento das técnicas agrárias. Uma vez que não foram determinados quaisquer dos parâmetros enunciados neste modelo, mas considerando importante uma abordagem aos modelos de transferência de oxigénio, estimaram-se vários parâmetros a partir de dados obtidos na bibliografia [Eweis et al., 1998], nomeadamente a velocidade de consumo de oxigénio (r), e o coeficiente de difusão do oxigénio no solo (D).

Como a Equação (3.22) representa um modelo matemático de um processo físico de transferência de oxigénio é necessário colocar o problema de um modo bem formulado. Utilizando a interface gráfica (MATLAB 6.5 - toolbox PDE) simulou-se a colocação de solo sobre uma eira impermeabilizada até uma profundidade máxima de 50 cm e com 3 m de comprimento. Definiram-se as condições fronteira:

● Condição de Dirichlet na superfície do solo: u (concentração de oxigénio do ar) = 275 g/m^3 (a 25°C)

● Condição de Neuman na face inferior e laterais. $\frac{\partial u}{\partial n} = 0$ (condição de não fluxo na direcção perpendicular à face).

Os resultados obtidos considerando uma condição fronteira de Neuman na face inferior, proporciona concentrações negativas de difusão de oxigénio no solo. Por esta razão considerou-se nesse local uma condição de Dirichlet.

A equação parabólica tem o aspecto $d \frac{\partial u}{\partial t} - \nabla(c \cdot \nabla u) + au = f$, em que os coeficientes assumiam os respectivos valores:

$$d = 1$$

$$c = D \cdot \Phi, \text{ em que } D = 2 \cdot 10^{-5} \text{ m}^2/\text{s} \text{ e } \Phi = 0,35 \text{ m}^3/\text{m}^3$$

$$a = 0$$

$$f = r, \text{ em que } r = -4,17 \cdot 10^{-5} \text{ g}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$$

A Figura 3.5 mostra a distribuição final da concentração de oxigénio.

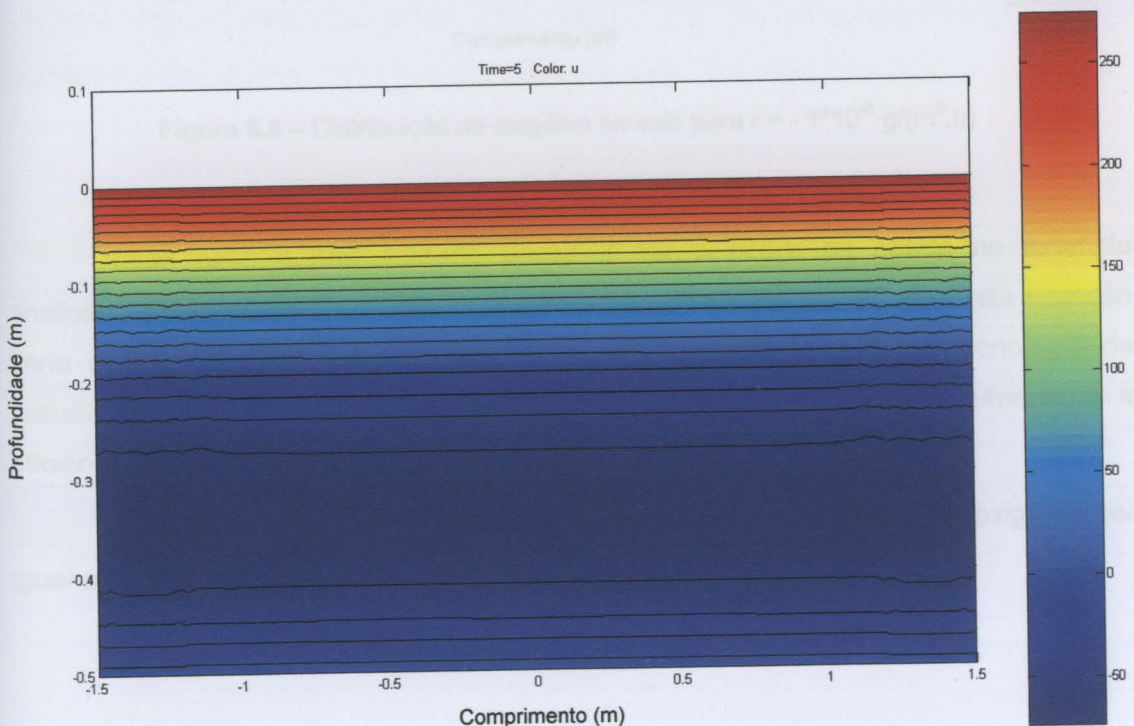


Figura 3.5 – Distribuição de oxigénio no solo para $r = -4,17 \cdot 10^{-5} \text{ g}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$

A profundidade até à qual o oxigénio se difunde, considerando a velocidade de consumo de oxigénio - $4,17 \cdot 10^{-5} \text{ g}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$, é de aproximadamente 20 cm. Fazendo variar a quantidade de oxigénio utilizada por unidade de volume e unidade de tempo para um valor superior de - $1 \cdot 10^{-5} \text{ g}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$, obtém-se a Figura 3.6.

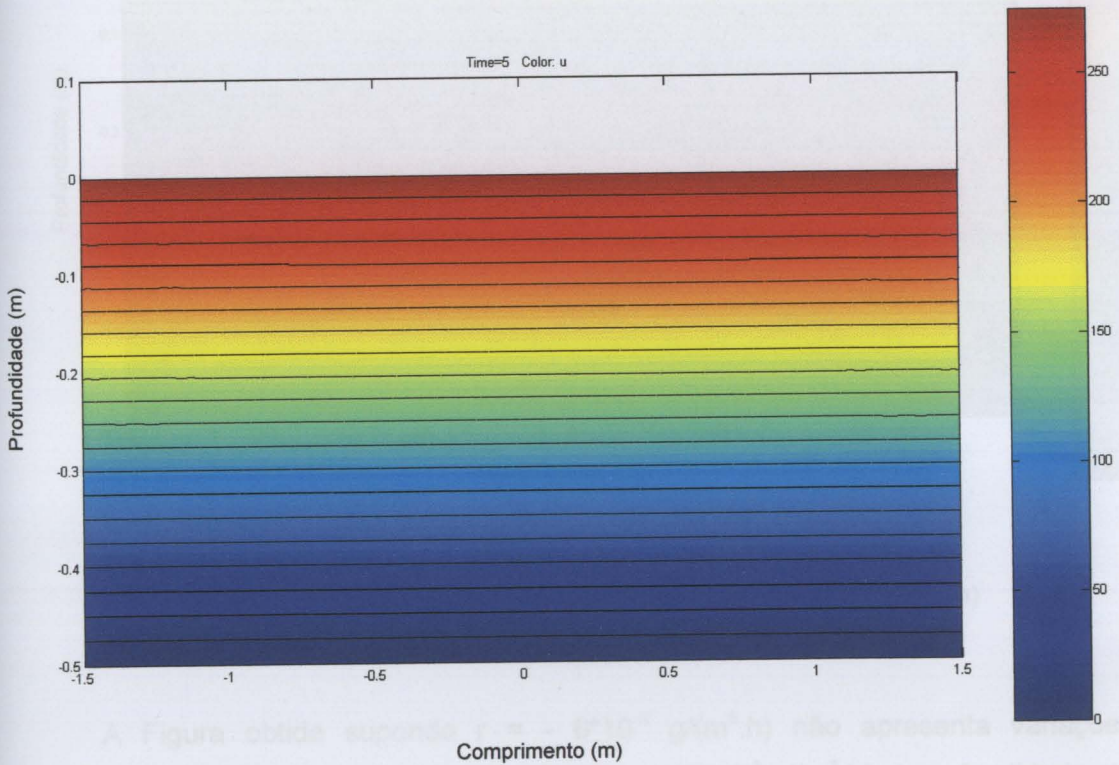


Figura 3.6 – Distribuição de oxigénio no solo para $r = - 1 \cdot 10^{-5} \text{ g}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$

Neste caso a profundidade passa a ser o dobro da obtida no exemplo analisado anteriormente, ou seja, o oxigénio difunde-se até aos 40 cm. Esta situação seria a ideal considerando condições reais de aplicabilidade desta tecnologia de reabilitação de solos. A difusão de oxigénio até esta profundidade aumentaria a eficiência do processo de degradação aeróbia.

Considerando agora, a hipótese da velocidade de consumo de oxigénio ser igual a - $6 \cdot 10^{-6} \text{ g}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$:

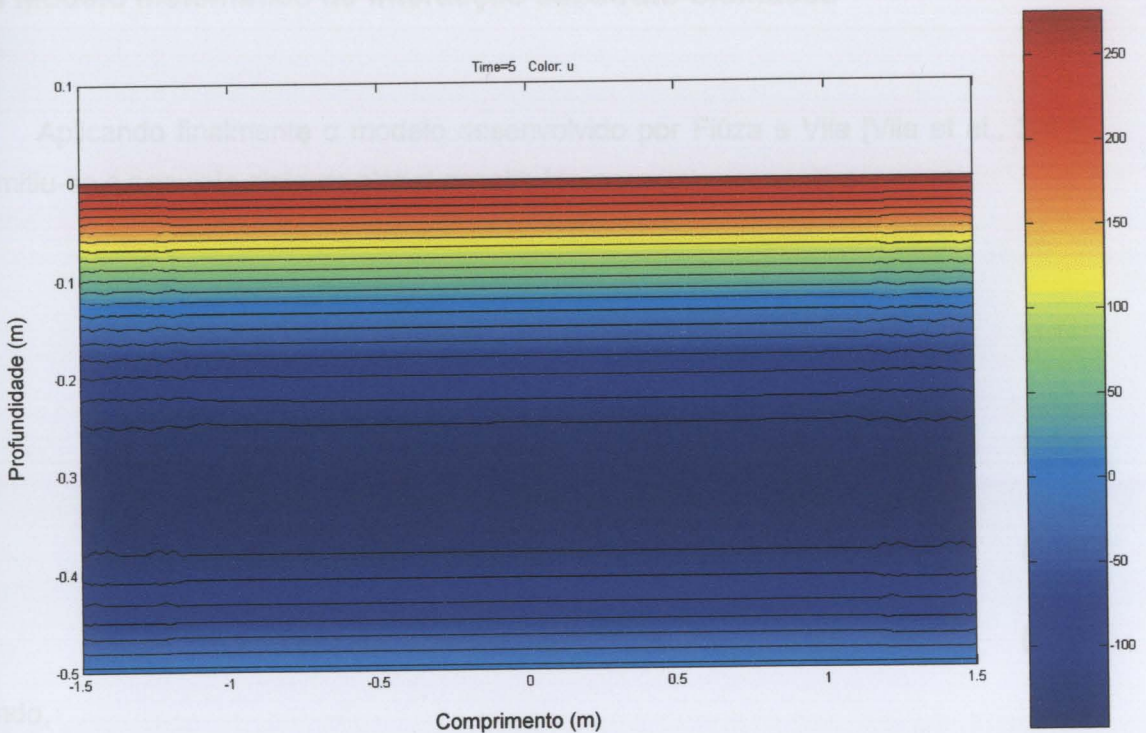


Figura 3.7 – Distribuição de oxigénio no solo para $r = -6 \cdot 10^{-6} \text{ g}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$

A Figura obtida supondo $r = -6 \cdot 10^{-6} \text{ g}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$ não apresenta variações significativas face ao primeiro valor testado ($r = -4,17 \cdot 10^{-5} \text{ g}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$). A profundidade até à qual o oxigénio se difunde passa a ser de, aproximadamente, 15 cm.

Como já foi referido anteriormente esta simulação é de capital importância, quando se abordam tecnologias de bio reabilitação de solos. Sendo o processo de biodegradação o controlador da degradação dos hidrocarbonetos petrolíferos, a profundidade a que o oxigénio se difunde no solo proporciona condições favoráveis aos microorganismos aeróbios, aumentando a eficiência do processo. A importância do oxigénio na degradação dos hidrocarbonetos é indicada pelo facto que a maioria das vias metabólicas utilizada nesta degradação envolverem oxigenases e oxigénio molecular.

3.4 Modelo matemático de interacção substrato-biomassa

Aplicando finalmente o modelo desenvolvido por Fiúza e Vila [Vila et al., 2001] admitiu-se o seguinte sistema global constituído por quatro equações:

$$\frac{dX}{dt} = k_1 * X * C_2 - k_2 * X^2 \quad (3.14)$$

$$\frac{dC_2}{dt} = -\frac{1}{Y} * k_1 * X * C_2 \quad (3.15)$$

$$\frac{dC_3}{dt} = -k_3 * C_3 + k_4 \quad (3.16)$$

$$C = C_2 + C_3 \quad (3.17)$$

sendo,

X - concentração em biomassa [ML^{-3}]

C_2 - fracção biodegradável do produto petrolífero [M]

C_3 - fracção abiótica do produto petrolífero [M]

k_1 - constante cinética de segunda ordem [$M^{-1}L^3T^{-1}$]

k_2 - constante cinética de segunda ordem [$M^{-1}L^3T^{-1}$]

k_3 - constante cinética de primeira ordem [T^{-1}]

k_4 - constante [$M^{-1}L^3T^{-1}$]

O modelo assume como pressuposto que os produtos petrolíferos são constituídos por uma componente biodegradável e uma componente abiótica.

A componente abiótica, C_3 , é essencialmente constituída por dois tipos de componentes: a volátil, de baixa solubilidade, que se degrada rapidamente e a de elevada solubilidade que apresenta uma degradação lenta. Nestas condições, admite-se que o modelo de decaimento apresenta um decréscimo exponencial que tende para uma concentração assintota não nula quando $t \rightarrow \infty$. É por esta razão que a velocidade de degradação não é uma recta que passa pela origem, tal como na cinética de 1ª ordem, mas uma recta de ordenada não nula.

Ao integrar Equação (3.16) (Anexo B), conhecida a condição inicial $C_3(0)$, obtém-se:

$$C_3 = C_3(0) * e^{-k_3 * t} + \frac{k_4}{K_3} * (1 - e^{-k_3 * t}) \quad (3.18)$$

Quando o tempo tende para infinito, $C_3(t)$ tende para a concentração assintótica $a = \frac{k_4}{k_3}$. O parâmetro k_3 pode ser inferido por regressão linear entre $\ln \frac{(C_3(0) - a)}{(C_3(t) - a)}$ e o tempo (t).

O estudo da componente biodegradável foi focalizado na interacção entre a fracção biodegradável do substrato (contaminante) e a biomassa. Admite-se que a cinética da biomassa segue uma cinética de Monod modificada (Equação (3.14)), em que a velocidade de degradação é proporcional ao produto das concentrações da biomassa e do substrato. Foi incluída nesta cinética uma componente logística, que se traduz numa diminuição da velocidade proporcional ao quadrado da concentração da biomassa.

A equação relativa à degradação do substrato, Equação (3.15) apresenta apenas a componente de Monod, admitindo-se um factor constante de conversão do substrato (Y).

É possível fazer uma avaliação aproximada da concentração inicial da componente biodegradável $C_2(0)$. Atendendo a que a Equação (3.15) se trata de uma cinética de 2ª ordem, o tempo de semi-vida inicial é inversamente proporcional à concentração inicial. Esta dedução permite estimar a constante cinética k_1 .

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{1}{k_1 * C_2(0)} \quad (3.19a)$$

Resolvendo a equação (3.19a) em ordem a k_1 vem,

$$k_1 = \frac{1}{t_{\frac{1}{2}} * C_2(0)} \quad (3.19b)$$

Para os solos contaminados com crude e diesel respectivamente, determinaram-se a partir dos dados experimentais os parâmetros k_1 , k_3 , k_4 e Y , cujos valores se podem observar na Tabela 3.2. Os dados auxiliares para a determinação analítica destes parâmetros encontram-se no Anexo A.

Tabela 3.2 – Valores dos parâmetros do modelo matemático de interacção substrato-biomassa

Parâmetros	Crude	Diesel
k_1 (L/(mg.dia))	1,17E-06	9,35E-06
k_2 (L/(mg.dia))	2,35E-08	1,87E-07
k_3 (dia ⁻¹)	0,0262	0,0456
k_4 (L/(mg.dia))	52,40	63,84
Y	0,0154	0,0482
a	2000	1400

O parâmetro cinético k_3 , para o crude e diesel, foi determinado a partir dos valores experimentais, como se pode observar nas Figuras 3.8 e 3.9.

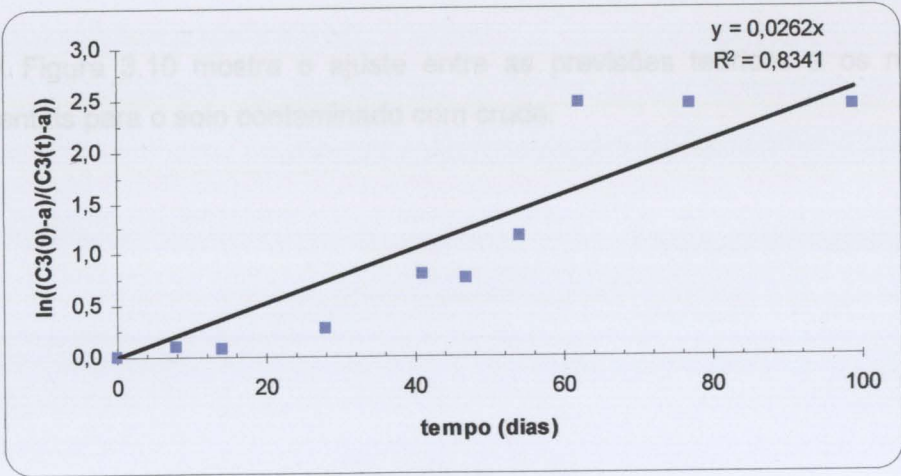


Figura 3.8 – Determinação da constante cinética k_3 para o crude

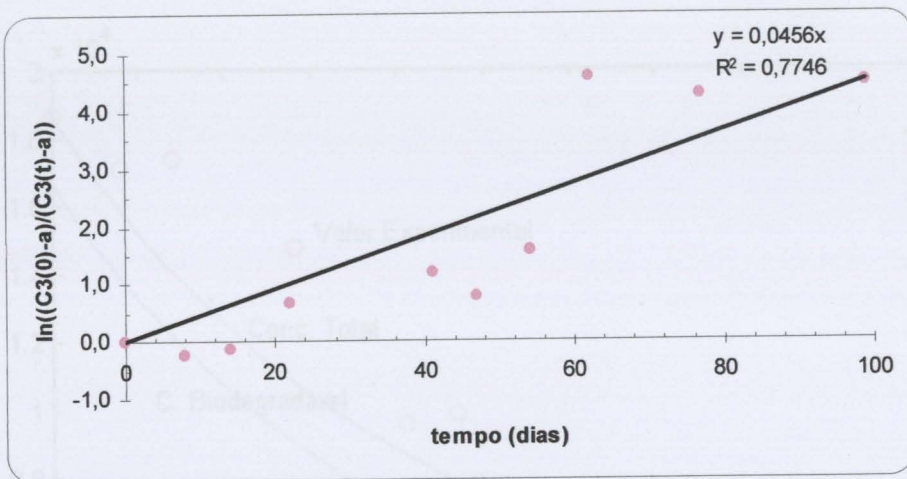


Figura 3.9 – Determinação da constante cinética k_3 para o diesel

Como não houve possibilidade de se quantificar a evolução da biomassa, para além da fase de crescimento exponencial, não foi possível determinar o parâmetro cinético k_2 . No entanto, a sua influência no modelo global apenas se faz sentir quando o substrato disponível se encontra em baixas concentrações constituindo um factor limitativo ao desenvolvimento da biomassa. Adoptou-se, depois de um estudo de sensibilidade de influência do parâmetro, que o valor de k_2 era cerca de 50 vezes inferior a k_1 .

Para simular o comportamento do modelo, o sistema constituído por três equações diferenciais foi integrado utilizando um algoritmo de Runge-Kutta de 4ª ordem.

A Figura 3.10 mostra o ajuste entre as previsões teóricas e os resultados experimentais para o solo contaminado com crude.

A evolução da biomassa não é visível neste gráfico, devido ao escalonamento, sendo os transportados os seus valores para a Figura 3.11.

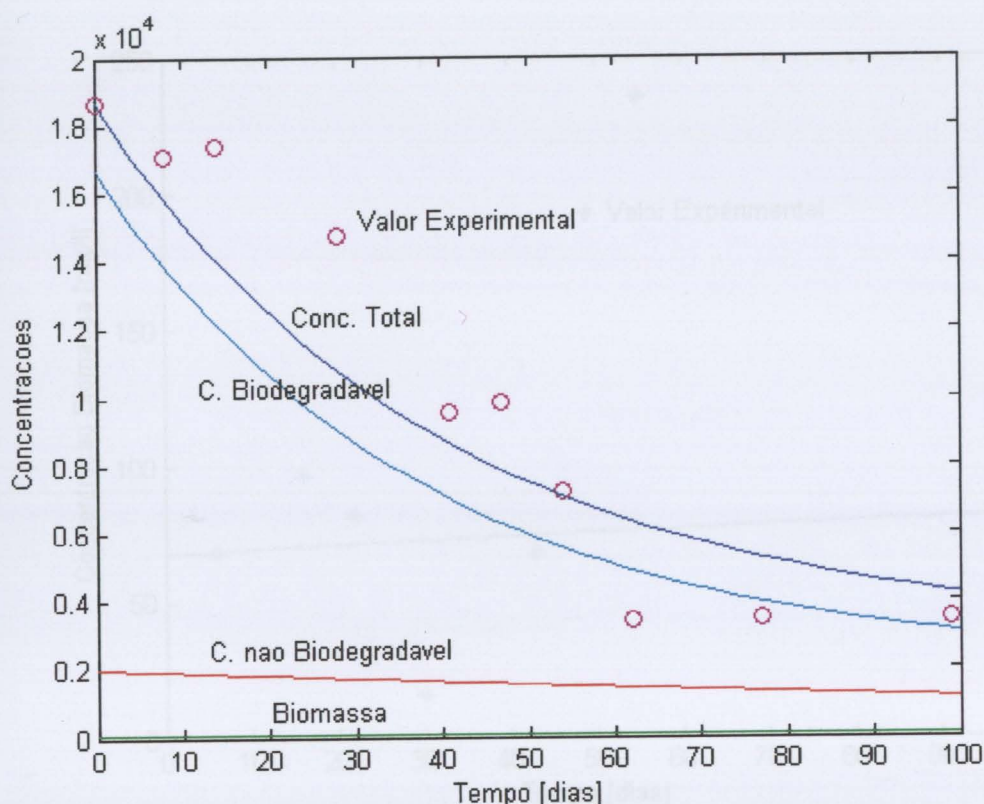


Figura 3.10 – Ajuste entre os valores experimentais e os resultados teóricos para o crude

Pela observação da Figura 3.10, os resultados evidenciam claramente determinações analíticas erradas que condicionam o ajuste. Os valores não foram eliminados de modo a salientar a correlação existente entre os valores determinados experimentalmente e os teóricos.

Por outro lado, é possível também constatar que a fracção biodegradável do crude apresenta um maior contributo na degradação dos hidrocarbonetos petrolíferos.

A evolução da biomassa não é visível neste gráfico, devido ao escalonamento, tendo-se transportado os seus valores para a Figura 3.11.

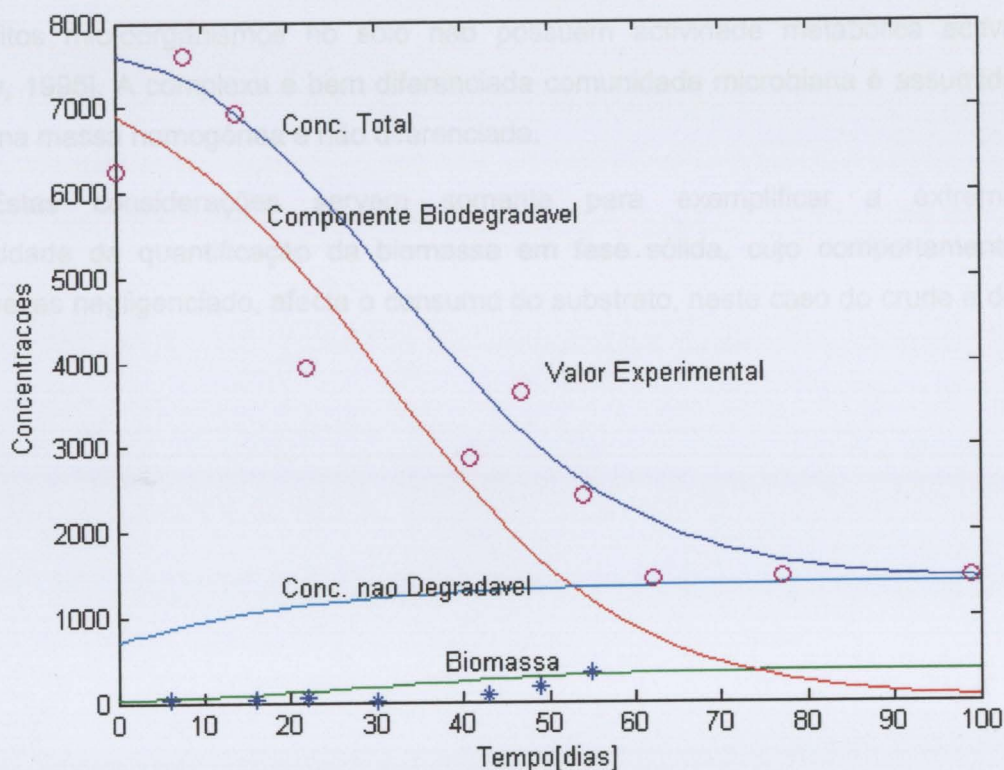


Figura 3.12 – Ajuste entre os valores experimentais e os resultados teóricos para o diesel

Analisando a Figura 3.12, observa-se um aumento inicial da componente abiótica. Tal não é analiticamente justificável. Este facto está directamente relacionado com introdução no modelo de valores experimentais erróneos.

O modelo de degradação apresentado demonstra versatilidade e robustez, revelando-se a escolha mais adequada no tratamento dos dados quantitativos obtidos.

Antes de finalizar este capítulo convém salientar diversas questões referentes à quantificação da biomassa. A percepção real dos fenómenos microbiológicos ocorridos durante a realização deste estudo é obviamente muito aproximada e incompleta. A dificuldade inerente ao próprio meio, solo, é por si só um condicionante importante a ter em conta. Especialmente no solo, existe uma multiplicidade de limitações que podem ocorrer, que implicam efeitos imediatos na eficiência da actividade dos microorganismos, que não foram previstos. A própria actividade bacteriana raramente é incluída como variável nos modelos cinéticos. A quantificação da biomassa é encarada simplesmente como uma média cuja finalidade é estimar a densidade bacteriana. Será que o crescimento das bactérias pode ser interpretado apenas em termos médios? Na realidade, as células no solo, podem estar presentes sobre

diversos estados fisiológicos. A título exemplificativo, Panikov descreve no seu estudo que muitos microorganismos no solo não possuem actividade metabólica activa [Panikov, 1995]. A complexa e bem diferenciada comunidade microbiana é assumida como uma massa homogénea e não diferenciada.

Estas considerações servem somente para exemplificar a extrema complexidade da quantificação da biomassa em fase sólida, cujo comportamento muitas vezes negligenciado, afecta o consumo do substrato, neste caso do crude e do diesel.

Conclusões

4. Conclusões

Da análise efectuada podem ser extraídas as seguintes conclusões, quanto ao estudo de biodegradabilidade:

1. A percentagem de degradação alcançada de 80% e 76% para o crude e diesel respectivamente, foi bastante favorável, sendo de sublinhar a importância da criação e manutenção de condições favoráveis, especialmente de pH e humidade, à comunidade bacteriana autóctone dos solos em questão. As técnicas agrárias demonstraram adequabilidade ao problema proposto.
2. O papel da volatilização apresenta uma importância reduzida atendendo às condições do estudo.
3. Não foi possível comprovar a real influência da adição de uma solução enriquecida em macro e micro nutrientes. No entanto a adição de uma fonte de azoto suplementar revelou-se fundamental para o desenvolvimento das bactérias, apesar deste acontecimento não ser traduzido numa taxa de degradação proporcional ao aumento da densidade bacteriana.
4. Os resultados obtidos indicam que a velocidade de biodegradação é controlada não só pela natureza dos contaminantes orgânicos, como também pela própria natureza do solo, provocando a presença de uma fracção residual de hidrocarbonetos.
5. Neste estudo a qualidade dos métodos analíticos e a amostragem têm manifestamente um papel primordial na qualidade dos resultados obtidos.

A capacidade de estimar a cinética de degradação é um factor chave na avaliação da poluição dos solos. Assim, relativamente aos modelos concluiu-se:

1. O modelo de 1ª ordem adapta-se razoavelmente aos resultados obtidos, sendo contudo demasiado simplista. Este modelo não entra em consideração com o elevado número de variáveis e as suas prováveis interacções (efeito do pH, temperatura, matéria orgânica, actividade microbiana, tipo de contaminantes).

2. O modelo logístico não se ajusta aos resultados obtidos, por não haver dados relativos à fase estacionária de crescimento da biomassa.
3. Apesar de não haver valores experimentais relativos à difusão do oxigénio no solo, a inclusão de um modelo deste tipo, permitiu avaliar a importância do arejamento em proporcionar condições aeróbias aos microorganismos presentes no solo.
4. O modelo matemático de interacção substrato-biomassa desenvolvido por Fiúza e Vila [Vila et al., 2001] é sem dúvida o que permite um melhor ajuste entre os valores teóricos e os dados experimentais, mesmo atendendo às diversas condicionantes de origem analítica sentidas no decorrer do trabalho laboratorial. Revela ser bastante robusto e versátil, sendo no entanto passível de posteriores melhoramentos.

Proseguimento de estudos

5. Prosseguimento de estudos

Alguns aspectos realçados durante este estudo, suscitaram algumas interrogações, que se julga necessário aprofundar em futuras investigações.

É importante elucidar os mecanismos que controlam a biodegradação e a persistência dos TPH's relativamente às propriedades físicas do solo. Para tal seria necessário obter mais informação sobre a natureza e polaridade da matéria orgânica, e sua capacidade de sorção de moléculas orgânicas de modo a permitir a elaboração de um modelo matemático numérico capaz de descrever o processo de dessorção entre o contaminante e as partículas de solo.

O limite da disponibilidade de muitos poluentes é um dos principais factores que afectam a biodegradação e consequentemente a eficácia da aplicação das técnicas de bio reabilitação. Para os compostos hidrofóbicos como os hidrocarbonetos petrolíferos, a biodegradação tende a aumentar se estes estiverem disponíveis em estado dissolvido, solubilizado ou emulsionado, já que desta forma o transporte desses poluentes para as células microbianas será facilitado. Seria interessante testar a influência da adição de surfactantes químicos e/ou biológicos em solos contaminados.

Outro dos problemas mais notórios durante a realização deste estudo foi a determinação analítica dos TPH's, pelo que se recomendaria a utilização da cromatografia gasosa pela sua indubitável qualidade, em detrimento dos kits.

Para futura orientação de estudos desta natureza aconselha-se a correcção da razão C:N:P, por reconhecidamente fornecer um incremento ao desenvolvimento bacteriano.

Relativamente à determinação da densidade bacteriana, recomenda-se a utilização do método MPN para quantificação das bactérias heterotróficas totais e bactérias aeróbias com capacidade para degradarem especificamente hidrocarbonetos, por permitirem eliminar os problemas subjacentes à enumeração em meio Agar, referidos anteriormente, e estabelecer correlações entre o número de bactérias totais e específicas dos hidrocarbonetos. A identificação das colónias bacterianas é igualmente um ponto a ter em conta futuramente.

Por último, sugere-se a inclusão de estudos de respirometria nos solos como uma mais valia, quer relativamente à determinação da cinética do processo, quer num controlo mais rigoroso do próprio mecanismo de biodegradação. A respirometria permitiria avaliar a dinâmica da actividade dos microorganismos.

Bibliografia

6. Bibliografia

- Aboul-Kassim, T.A.T., and Simoneit. 2001. Microbial Transformations at Aqueous-Solid Phase Interfaces: a Bioremediation Approach. In: *The Handbook of Environmental Chemistry. Pollutant-Solid Phase Interactions: Mechanisms, Chemistry and Modelling*, Springer, vol. 5, part E, chapter 5, pp. 315-430.
- Admon, S., Green, M., and Avnimelech, Y. 2001. Biodegradation Kinetics of Hydrocarbons in Soil During Land Treatment of Oily Sludge. *Bioremediation Journal*, 5(3): 193-209.
- Aichberger, H., Braun, R., and Loibner, A.P. 2003. Hydrocarbon Contamination of the Vadose Zone – Preliminary Testing to Predict Remediation Performance. In: *Proceedings of the Second European Bioremediation Conference*, Chania, Greece, pp. 67-70.
- Al-Daher, R., Al-Awadhi, N., Yateem, A., ElNawawy, A., and Balba, M.T. 2001. Compost Soil Piles for Treatment of Oil-Contaminated Soil. *Soil and Sediment Contamination*, 10(2):197-209.
- Al-Hadhrami, M.N., Lappin-Scott, H.M., and Fisher, P.J. 1997. Studies on the Biodegradation of Three Groups of Pure n-Alkenes in the Presence of Molasses and Mineral Fertilizer by *Pseudomonas aeruginosa*. *Marine Pollution Bulletin*, 34(11):969-974.
- Amellal, N., Portal, J.-M., and Berthelin, J. 2001. Effect of Soil Structure on the Bioavailability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Within Aggregates of a Contaminated Soil. *Applied Geochemistry*, 16:1611-1619.
- American Public Health Association. 1989. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17th edition, Washington, DC, Publication Office.
- ASTM. 2000. *Book of Standards. Section 04.08*, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, pp. 951.
- Atlas, R.M. 1981. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: An Environmental Perspective. *Microbial Reviews*, 45(1):180-209.

- Bailey, J.E., and Ollis, D.F. 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*. McGraw-Hill International Editions, chapter 7, pp. 373-456.
- Barnes, D., Forster, C.F., and Hudey, S.E. 1984. *Surveys in Industrial Wastewater Treatment: Petroleum and Organic Chemicals Industries*. Pitman Advanced Publishing Program, vol. 2, chapter I, pp. 1-64.
- Bleckmann, C.A., Wilson, E.J., Hayes, K.W., Hercyck, N.L. 1995. Land Treatment of Produced Oily Sand. In: *Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons*. Eds., Hincsee, R.E., Kittel, J.A., and Reisinger, H.J. Battelle Press, 3(6), pp. 293-299.
- Braga, B., Hespanhol, I., Conejo, J.G.L., Barros, M.T.L., Spencer, M., Porto, M., Nucci, N., Juliano, N. e Eiger, S. 2002. *Introdução à Engenharia Ambiental*. Prentice Hall, pp. 124-136.
- Carvalho, D.F., Marchi, D.D., and Durrant, L.R. 1997. Production of Extracellular Surface-Active Compounds by Microorganisms Grown on Hydrocarbons. In: *Papers from the Fourth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium*. Battelle Press, vol. 4, pp.91-96.
- Casarini, D.C.P., Macedo, R.M., Cunha, R.C.A., and Mauger, J.C.O. 1988. The Development of Assessment Techniques to Evaluate the Biodegradation of Oily Sludge in a Landfarming System. *Water Science Technology*, 20(10):231-236.
- Cleland, D.D., Smith, V.H. and D.W., Graham. 1997. Microbial Population Dynamics during Hydrocarbon Biodegradation under Variable Nutrient Conditions. In: *Papers from the Fourth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium*. Battelle Press, vol. 4, pp.105-110.
- Correia, J. 2002. Processos de Descontaminação de Solos e Águas Subterrâneas. *Tecnologias do Ambiente*, 9(46):18-19.
- Croft, B.C., Swannel, R.P.J., Grant, A.L., and Lee, K. 1995. Effect of Bioremediation Agents on Oil Biodegradation in Medium-Fine Sand. In: *Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons*. Eds., Hincsee, R.E., Kittel, J.A., and Reisinger, H.J. Battelle Press, 3(6), pp. 423-433.

- Cunningham, A.B. and, Peyton, B.M. 1995. Bench-Scale/Field-Scale Interpretations: An Overview. In: *Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons*. Eds., Hinchee, R.E., Kittel, J.A., and Reisinger, H.J. Battelle Press, 3(6), pp. 97-100.
- Cutright, T.J. 1995. A Feasible Approach to the Bioremediation of Contaminated Soil: From Lab-Scale to Field Test. *Fresenius Environmental Bulletin*, 4:67-73.
- Cuypers, C., Clemens, R., Grotenhuis, T., and Rulkens, W. 2001. Prediction of Petroleum Hydrocarbon Bioavailability in Contaminated Soils and Sediments. *Soil and Sediment Contamination*, 10(5):459-482.
- Drake, E.N., Douglas, G.S., and Prince, R.C. 1997. Nutrient Stimulated Biodegradation of Aged Landfarm Hydrocarbons in Soil. In: *Papers from the Fourth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium*. Battelle Press, vol. 2, pp.175-180.
- Errampalli, D., Trevors, J.T., Lee, H., Leung, K., Cassidy, M., Knoke, K., Marwood, T., Shaw, K., Blears, and Chung, E. 1997. Bioremediation: A Perspective. *Journal of Soil Contamination*, 6(3):207-218.
- Eweis, J.B., Ergas, S.J., Chang, D.P.Y., and Schoeder, E.D. 1998. *Bioremediation Principles*. McGraw-Hill International Editions, pp. 120-135.
- Fass, S., Vogel, T.M., Vaudrey, H., Baud-Grasset, F., and Block, J.C. 1999. Prediction of Chemicals Biodegradation in Soils: A Tentative of Modelling. *Phys. Chem. Earth (B)*, 24(6):495-499.
- Grasso, D. 1993. *Hazardous Waste Site Remediation – Source Control*. Lewis Publishers, chapter J, pp. 1-76.
- Gudin, C., and Syrratt, W.J. 1975. Biological Aspects of Land Rehabilitation Following Hydrocarbon Contamination. *Environmental Pollution*, 8:107-112.
- Haines, J.R., Kadkhodayan, M., Mocsny, D.J., Jones, C.A., Islam, M., and Venosa, A.D. 1994. Effect of Salinity, Oil Type, and Incubation Temperature on Oil Degradation. In: *Applied Biotechnology for Site Remediation*. Eds., Hinchee, R.E., Anderson, D.B., Metting Jr., F.B., Sayles, G.D. Lewis Publishers, pp. 75-83.

- Harmsen, J., Velthrost, H.J., and Bennehey, I.P.A.M. 1994. Cleaning of Residual Concentrations with an Extensive Form of Landfarming. In: *Applied Biotechnology for Site Remediation*. Lewis Publishers. Eds., Hinchee, R.E., Anderson, D.B., Metting Jr., F.B., Sayles, G.D., pp. 84-91.
- Hogg, D.S., Piotrowski, M.R., Masterson, R.P., Jorgensen, M.R., and Frey, C. 1994. Bioremediation of Hydrocarbon-Contaminated Soil. In: *Hydrocarbon Bioremediation*. Eds., Hinchee, R.E., Alleman, B.C., Hoeppel, R.E., and Miller, R.N. Lewis Publishers, pp. 398-404.
- Huesemann, M.H. 1993. Compositional Changes during Landfarming of Weathered Michigan Crude Oil-Contaminated Soil. *Journal of Soil Contamination*, 2(3):245-264.
- Huesemann, M.H. 1994. Guidelines for Land-Treating Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soils. *Journal of Soil Contamination*, 3(3):299-318.
- Huesemann, M.H. 1995. Predictive Model for Estimating the Extent of Petroleum Hydrocarbon Biodegradation in Contaminated Soils. *Environmental Science & Technology*, 29(1):7-18.
- Huesemann, M.H. 1997. Incomplete Hydrocarbon Biodegradation in Contaminated Soils: Limitations in Bioavailability or Inherent Recalcitrance? *Bioremediation Journal*, 1(1):27-39.
- Huesemann, M.H., and Moore, K.O. 1994. The Effects of Soil Type, Crude Oil Type and Loading, Oxygen, and Commercial Bacteria on Crude Oil Bioremediation Kinetics as Measured by Soil Respirometry. In: *Hydrocarbon Bioremediation*. Eds., Hinchee, R.E., Alleman, B.C., Hoeppel, R.E., and Miller, R.N. Lewis Publishers, pp. 58-71.
- King, R.B., Long, G.M., and Sheldon, J.K. 1998. *Practical Environmental Bioremediation – The Field Guide*. Lewis Publishers, pp. 89-111.
- Kingsley, M.T., Fredrickson, J.K., Metting, F.B., and Seidler, R.J. 1994. Environmental Restoration Using Plant-Microbe Bioaugmentation. In: *Bioremediation of Chlorinated and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Compounds*. Eds., Hinchee, R.E., Leeson, A., Semprini, L., and Ong, S.K. Lewis Publishers, pp. 287-292.

- Korda, A., Santas, P., Tenente, A., and Santas, R. 1997. Petroleum Hydrocarbon Bioremediation: Sampling and Analytical Techniques, In Situ Treatments and Commercial Microorganisms Currently Used. *Applied Microbiological Biotechnology*, 48:677-686.
- Lagrega, M.D., Buckingham, P.L., and Evans, J.C. 1994. *Hazardous Waste Management*. McGraw-Hill International Editions, chapter 10, pp. 555-640.
- Langbehn, A., and Steinhart, H. 1995. Biodegradation Studies of Hydrocarbons in Soils by Analyzing Metabolites Formed. *Chemosphere*, 30(5):855-868.
- Löser, C., Seidel, H., Hoffman, P., and Zehnsdorf, A. 1999. Bioavailability of Hydrocarbons during Microbial Remediation of a Sandy Soil. *Applied Microbiological Biotechnology*, 51: 105-111.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. 1997. *Brock, Biology of Microorganisms*. Prentice Hall International, 8th edition, pp. 582-583.
- Meaders, R.H. 1994. Enzyme-Enhanced Bioremediation. In: *Applied Biotechnology for Site Remediation*. Eds., Hinchee, R.E., Anderson, D.B., Metting Jr., F.B., Sayles, G.D. Lewis Publishers, pp. 410-415.
- Metcalf & Eddy. 1995. *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, Reuse*. Tata McGraw-Hill Edition, 3rd edition.
- Mishra, S., Jyot, J., Kuhad, R.C., and Lal, B. 2001. In Situ Bioremediation Potential of an Oily Sludge-Degrading Bacterial Consortium. *Current Microbiology*, 43:328-335.
- Morris, P.J., and Pritchard, P.H. 1994. Concepts in Improving Polychlorinated Biphenyl Bioavailability to Bioremediation Strategies. In: *Bioremediation of Chlorinated and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Compounds*. Eds., Hinchee, R.E., Leeson, A., Semprini, L., and Ong, S.K. Lewis Publishers, pp. 359-367.
- Myers, J.M., Banipal, B.S., and Fisher, C.W. 1995. Biodegradation of Oil Refinery Wastes. In: *Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons*. Eds., Hinchee, R.E., Kittel, J.A., and Reisinger, H.J. Battelle Press, 3(6), pp. 445-451.
- Norris, R.D. et al. 1994. *Handbook of Bioremediation*. Lewis Publishers.

- Oh, Y.-S., Choi, W.-Y., Lee, Y.-H., Choi, S.-C., and Kim, S.-J. 2000. Biological Treatment of Oil-Contaminated Sand: Comparison of Oil Degradation Based on Thin-Layer Chromatography/Flame Ionization Detector and Respirometric Analysis. *Biotechnology Letters*, 22:595-598.
- Padrão, M.J., and Fiúza, A. 2003. Remediation of a Sandy Soil Contaminated with Petroleum Products by Landfarming. In: *Proceedings of the Second International Conference on Remediation of Contaminated Sediments*, Venice, Italy, (a publicar).
- Padrão, M.J., and Fiúza, A., 2003. Respirometric Techniques in a Landfarming Study. In: *Proceedings of the Second European Bioremediation Conference*, Chania, Greece, pp. 99-102.
- Padrão, M.J., e Salvador, L.A. 2001. Bioremediação de Solos Contaminados com Produtos Petrolíferos por Técnicas Agrárias. *Projecto de Final de Curso da Licenciatura em Engenharia Química*, ISEP.
- Panikov, N.S. 1995. *Microbial Growth Kinetics*. Chapman & Hall, pp.313-348.
- Pennerstorfer, C., Bauer, and Braun R. 1995. *Biorrecuperación de Suelos y Depuración de Suelos*. Instituto Geominero de España, pp. 305-322.
- Person, N.A., and Welanger, T.G. 1994. Biotreatment of Petroleum Hydrocarbon-Containing Sludges by Land Application: a Case History and Prospects for Future Treatment. In: *Hydrocarbon Bioremediation*. Eds., Hinchee, R.E., Alleman, B.C., Hoeppel, R.E., and Miller, R.N. Lewis Publishers, pp. 334-342.
- Pinelli, D., Fava, F., Nocentini, M., and Pasquali, G. 1997. Bioremediation of a Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Contaminated Soil by Using Different Aerobic Bioreactor Systems. *Journal of soil Contamination*, 6(3):243-256.
- Potter, T.L. and Simmons, K.E. 1998. *Composition of Petroleum Mixtures*. Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group Series, vol.2.
- Ramsay, M.A., Swannell, R.J., Shipton, W.A., Duke, N.C., and Hill, R.T. 2000. Effects of Bioremediation on the Microbial Community in Oiled Mangrove Sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 41(7-12):413-419.

- Ramstad, S., Sveum, P. 1995. Bioremediation of Oil-Contaminated Shorelines: Effects of Different Nitrogen Sources. In: *Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons*. Eds., Hinchee, R.E., Kittel, J.A., and Reisinger, H.J. Battelle Press, 3(6), pp. 415-422.
- Rashid, M., and Kaluarachchi, J.J. 1999. A Simplified Numerical Algorithm for Oxygen -and Nitrate- Based Biodegradation of Hydrocarbons Using Monod Expressions. *Journal of Contaminant Hydrology*, 40:53-77.
- Reisinger, H.J. 1995. Hydrocarbon Bioremediation – An Overview. In: *Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons*. Eds., Hinchee, R.E., Kittel, J.A., and Reisinger, H.J. Battelle Press, 3(6), pp. 1-9.
- Reynolds, C.M., Travis, M.D., Braley, W.A., and Scholze, R.J. 1994. Applying Field-Expedient Bioreactors and Landfarming in Alaskan Climates. In: *Hydrocarbon Bioremediation*. Eds., Hinchee, R.E., Alleman, B.C., Hoeppel, R.E., and Miller, R.N. Lewis Publishers, pp. 100-106.
- Robertiello, A., Lucchese, G., Di Leo, C., Boni, R., and Carrera, P. 1994. In Situ Bioremediation of a Gasoline and Diesel Fuel Contaminated Site with Integrated Laboratory Simulation Experiments. In: *Hydrocarbon Bioremediation*. Eds., Hinchee, R.E., Alleman, B.C., Hoeppel, R.E., and Miller, R.N. Lewis Publishers, pp. 133-139.
- Sawyer, C.N., McCarty, P.L., and Parkin, G.F. 1994. *Chemistry for Environmental Engineering*. McGraw-Hill International Editions, 4th edition.
- Solano-Serena, F., Marchal, R., Lebeault, J.-M., and Vandecasteele, J.P. 2000. Distribution in the Environmental of Degradative Capacities for Gasoline Attenuation. *Biodegradation*, 11:29-35.
- Stoner, D.L. 1994. *Biotechnology for the Treatment of Hazardous Waste*. Lewis Publishers.
- Strauss, H.D. 1997. Is Bioremediation a Green Technology?. *Journal of Soil Contamination*, 6(3):219-225.

Tabak, H.H., and Govind, R. 1997. Protocol for Determining Bioavailability and Biokinetics of Organic Pollutants in Dispersed, Compacted and Intact Soil systems to Enhance In Situ Bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 18:330-339.

Troy, M.A., and Jerger, D.E. 1994. Matrix Effects on the Analytical Techniques Used to Monitor the Full-Scale Biological Land Treatment of Diesel Fuel-Contaminated Soils. In: *Hydrocarbon Bioremediation*. Eds., Hinchee, R.E., Alleman, B.C., Hoeppel, R.E., and Miller, R.N. Lewis Publishers, pp. 343-346.

U.S. Environmental Protection Agency. 1990. *Mobility and Degradation of Residues at Hazardous Waste Land Treatment Sites at Closure*. EPA/600/S2-90/018.

U.S. Environmental protection Agency. 1991. *Site Characterization for Subsurface Remediation. Seminar Publication*. EPA7625/4-91/026.

U.S. Environmental Protection Agency. 1994. *How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites. A Guide for Corrective Action Plan Reviewers*. EPA 510-B-95-007.

U.S. Environmental Protection Agency. 1995. *Bioventing Principles and Practices*, vol. I. EPA-540-R-95/534a.

U.S. Environmental Protection Agency. 1995. *Remediation Case Studies: Bioremediation*. EPA-542-R-95-002.

U.S. Environmental Protection Agency. 1996. *A Citizen's Guide to Natural Attenuation*. EPA-542-F-96-015.

U.S. Environmental Protection Agency. 2001. *Innovative Technology Verification Report. Field Measurement Technologies for Total Petroleum Hydrocarbons in Soil – CHEMetrics, Inc., and AZUR Environmental Ltd, Remedaid™ Total Petroleum Hydrocarbon Starter Kit*. EPA/600/R-01/082.

Uraizee, F.A., Suidan, M.T., and Venosa, A.D. 1997. Effects of Temperature and Chemical Composition on Crude Oil Biodegradation. In: *Papers from the Fourth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium*. Battelle Press, vol. 5, pp.663-668.

Utah Department of Environmental Quality. 1996. Leaking Underground Storage Tank (LUST): Corrective Action Plan. Report Guide.

Utah Solid and Hazardous Wastes Committee. 1990. Guidelines for Estimating Numeric Cleanup Levels of Petroleum-contaminated Soil at Underground Storage Tank Releases Sites.

Venosa, A.D., Haines, J.R., and Holder, E.L. 1997. Rates of Hydrocarbon Biodegradation in the Field Compared to the Laboratory. In: *Papers from the Fourth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium*. Battelle Press, vol. 4, pp.359-364.

Vila, C., Nunes, O., and Fiúza, A. 2001. A Model of Biodegradation of Crude Oil in Soils. In: *Proceedings of the First European Bioremediation Conference*, Chania, Greece, pp. 1-4.

Walworth, J.L., Woolard, C.R., Braddock, J.F., and Reynolds, C.M. 1997. Enhancement and Inhibition of Soil Petroleum Biodegradation Through the Use of Fertilizer Nitrogen: An Approach to Determining Optimum Levels. *Journal of Soil Contamination*, 6(5):465-480.

Walworth, J.L., Woolard, C.R., Braddock, J.F., and Reynolds, C.M. 1997. The Role of Soil Nitrogen Concentration in Bioremediation. In: *Papers from the Forth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium*. Battelle Press, vol. 4, pp.283-288.

Watwood, M.E., and Carr, D.L. 1994. Laboratory Feasibility Study for Bioremediation of a Kerosene-Contaminated Site. In: *Hydrocarbon Bioremediation*. Eds., Hinchee, R.E., Alleman, B.C., Hoeppel, R.E., and Miller, R.N. Lewis Publishers, pp. 424-430.

Weisman, W. 1998. *Analysis of Petroleum Hydrocarbons in Environmental Media*. Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group Series, vol. 1.

Weisman, W.H. 1998. Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group: a Risked Based Approach for the Management of Total Hydrocarbons in Soil. *Journal of Soil Contamination*, 7(1):1-15.

Wellman, D.E., Ulery, A.L., Barcelлона, M.P., and Duerr-Auster, S. 2001. Animal Waste-Enhanced Degradation of Hydrocarbon-Contaminated Soil. *Soil and Sediment Contamination*, 10(5):511-523.

Wisconsin Department of Natural Resources. 1994. Naturally Occurring Biodegradation as a Remedial Action Option for Soil Contamination. Emergency and Remedial Response Program, Madison, PUBL-SW-515-95.

Würdemann, H., Wittmaier, M., Rinkel, U., and Hanert, H.H. 1994. A Simple Method for Determining Deficiency of Oxygen During Soil Remediation. In: *Hydrocarbon Bioremediation*. Eds., Hinchee, R.E., Alleman, B.C., Hoeppe, R.E., and Miller, R.N. Lewis Publishers, pp. 454-458.

Yateem, A., Balba, M.T., Al-Shayji, Y., and Al-Awadhi, N. 2002. Isolation and Characterization of Biosurfactant-Producing Bacteria from Oil-Contaminated Soil. *Soil and Sediment Contamination*, 11(1):41-55.

Yen, T.F. 1999. *Environmental Chemistry – Chemical Principles for Environmental Processes*. Prentice Hall PTR Environmental Management & Engineering Series, vol 4B, pp. 1209-1250.

Zytner, R.G., Salb, A., Brook, T.R., Leunissen, M., and Stiver, W.H. 2001. Bioremediation of Diesel Fuel Contaminated Soil. *Canadian Journal of Civil Engineering*, 28(1):131-140.

Anexos

Anexo A

Tabelas Auxiliares

A.1 Tabelas auxiliares de apoio ao capítulo 2

Tabela A.1 - Análise granulométrica do solo contaminado com crude

Tamanho das partículas (µm)	Peso total		Frequência da densidade q ₃ (%/µm)	Cumulativo (%)	
	(g)	(%)		Q ₃ (D)	1-Q ₃ (R)
< 63	12,18	7,7	0,122	7,7	92,3
63 – 90	1,34	0,8	0,031	8,5	91,5
90 – 125	9,03	5,7	0,163	14,2	85,8
125 – 180	8,54	5,4	0,098	19,6	80,4
180 – 250	9,15	5,8	0,082	25,4	74,6
250 – 355	12,40	7,8	0,075	33,2	66,8
355 – 500	13,75	8,7	0,060	41,9	58,1
500 – 710	18,84	11,9	0,057	53,8	46,2
710 – 1000	12,03	7,6	0,026	61,4	38,6
1000 – 1400	13,13	8,3	0,021	69,7	30,3
1400 – 2000	11,61	7,3	0,012	77,0	23,0
2000 – 2800	7,57	4,8	0,006	81,8	18,2
2800 – 4000	8,42	5,3	0,004	87,1	12,9
> 4000	20,48	12,9		100,0	0,0

Tabela A.2 - Análise granulométrica do solo contaminado com diesel

Tamanho das partículas (µm)	Peso total		Frequência da densidade q ₃ (%/µm)	Cumulativo (%)	
	(g)	(%)		Q ₃ (D)	1-Q ₃ (R)
< 63	40,05	22,0	0,350	22,0	78,0
63 – 90	1,60	0,9	0,033	22,9	77,1
90 – 125	2,24	1,2	0,035	24,1	75,9
125 – 180	3,61	2,0	0,036	26,1	73,9
180 – 250	4,47	2,5	0,035	28,6	71,4
250 – 355	8,38	4,6	0,044	33,2	66,8
355 – 500	12,57	6,9	0,048	40,1	59,9
500 – 710	21,08	11,6	0,055	51,7	48,3
710 – 1000	9,78	5,4	0,019	57,1	42,9
1000 – 1400	12,69	7,0	0,017	64,1	35,9
1400 – 2000	13,54	7,4	0,012	71,5	28,5
2000 – 2800	10,80	5,9	0,007	77,5	22,5
2800 – 4000	11,44	6,3	0,005	83,8	16,2
> 4000	29,53	16,2		100,0	0,0

Tabela A.3 – Classificação textural dos solos em estudo

	Crude	Diesel
Argila (%)	4	8
Silte (%)	5	16
Areia (%)	91	76

Tabela A.4 – Evolução temporal do pH no solo contaminado com crude

pH (escala de Sorensen)			
Data	Tempo (dias)	controle	tabuleiro
28-Mai	0	6,79	6,79
02-Jun	5	6,98	6,94
06-Jun	9	6,61	6,80
11-Jun	14	6,29	7,24
18-Jun	21	6,48	6,93
24-Jun	27	6,52	7,01
08-Jul	41	6,23	6,86
14-Jul	47	6,32	7,27

Tabela A.5 – Evolução temporal do pH no solo contaminado com diesel

pH (escala de Sorensen)			
Data	Tempo (dias)	controle	tabuleiro
28-Mai	0	4,43	4,43
02-Jun	5	5,33	5,31
06-Jun	9	5,71	6,45
11-Jun	14	5,33	7,05
18-Jun	21	5,26	6,53
24-Jun	27	5,49	7,12
08-Jul	41	5,39	6,59
14-Jul	47	5,34	6,92

Tabela A.6 – Evolução temporal da humidade no solo contaminado com crude

Humidade (%)			
Data	Tempo (dias)	controle	tabuleiro
28-Mai	0	8,91	8,91
02-Jun	5	6,67	7,17
05-Jun	8	3,59	6,08
09-Jun	12	2,33	7,33
16-Jun	19	1,20	9,50
19-Jun	22	1,50	13,81
22-Jun	25	0,74	18,75
08-Jul	41	0,42	15,12
14-Jul	47	0,80	14,25
23-Jul	56	0,69	13,11

Tabela A.7 – Evolução temporal da humidade no solo contaminado com diesel

Data	Tempo (dias)	Humidade (%)	
		controlo	tabuleiro
28-Mai	0	14,31	14,31
02-Jun	5	14,01	13,36
05-Jun	8	9,77	12,22
09-Jun	12	7,10	15,92
16-Jun	19	2,55	11,40
19-Jun	22	1,29	16,65
22-Jun	25	0,94	22,38
08-Jul	41	0,91	20,21
14-Jul	47	0,60	17,53
23-Jul	56	0,07	10,11

Tabela A.8 – Evolução temporal da temperatura

Data	Tempo (dias)	Temperatura (°C)
28-Mai	0	24
10-Jun	13	25
11-Jun	14	23
13-Jun	16	24
16-Jun	19	25
17-Jun	20	24
18-Jun	21	26
19-Jun	22	27
20-Jun	23	26
25-Jun	28	24
26-Jun	29	23
27-Jun	30	24
08-Jul	41	21
09-Jul	42	21
10-Jul	43	25
11-Jul	44	23
14-Jul	47	21
15-Jul	48	19
16-Jul	49	22
17-Jul	50	21
21-Jul	54	22
22-Jul	55	22
23-Jul	56	22
24-Jul	57	21

Tabela A.9 – Evolução da densidade bacteriana no solo contaminado com crude (meio Agar)

Densidade bacteriana (CFU/ g solo)			
Data	Tempo (dias)	controle	tabuleiro
28-Mai	0	n.d. ¹	n.d. ¹
05-Jun	8	1,39E+06	1,96E+06
13-Jun	16	1,30E+06	2,77E+06
19-Jun	22	1,27E+05	2,34E+06
27-Jun	30	2,75E+05	4,45E+05
10-Jul	43	1,00E+04	1,93E+06
16-Jul	49	2,53E+03	5,50E+06
22-Jul	55	2,15E+03	6,71E+06

¹ não determinado

Tabela A.10 – Evolução da densidade bacteriana no solo contaminado com diesel (meio Agar)

Densidade bacteriana (CFU/ g solo)			
Data	Tempo (dias)	controle	tabuleiro
28-Mai	0	n.d. ¹	n.d. ¹
03-Jun	6	1,67E+06	1,03E+06
13-Jun	16	7,95E+05	9,70E+05
19-Jun	22	3,75E+04	1,59E+06
27-Jun	30	1,10E+04	2,55E+05
10-Jul	43	3,00E+03	2,09E+06
16-Jul	49	1,07E+03	5,20E+06
22-Jul	55	1,91E+03	9,50E+06

¹ não determinado

Tabela A.11 – Evolução da densidade bacteriana no solo contaminado com crude (meio Bushnell-Haas)

Densidade bacteriana (CFU/ g solo)			
Data	Tempo (dias)	controle	tabuleiro
28-Mai	0	n.d. ¹	n.d. ¹
10-Jun	13	1,0E+03	1,0E+03
25-Jun	28	1,0E+02	1,0E+03
17-Jul	50	1,0E+02	1,0E+04
30-Jul	63	1,0E+02	1,0E+05

¹ não determinado

Tabela A.12 – Evolução da densidade bacteriana no solo contaminado com diesel (meio *Bushnell-Haas*)

Densidade bacteriana (CFU/ g solo)			
Data	Tempo (dias)	controle	tabuleiro
28-Mai	0	n.d. ¹	n.d. ¹
05-Jun	8	1,0E+05	1,0E+04
18-Jun	21	1,0E+04	1,0E+05
02-Jul	35	1,0E+04	1,0E+06
22-Jul	55	1,0E+02	1,0E+07

¹ não determinado

Tabela A.13 – Evolução da concentração de TPH's no solo contaminado com crude

Concentração em TPH's (mg/ Kg solo)			
Data	Tempo (dias)	controle	tabuleiro
28-Mai	0	17700,13	17700,13
05-Jun	8	18553,90	17092,21
11-Jun	14	18127,02	17396,17
19-Jun	22	16893,30	1670,71
25-Jun	28	16654,15	14745,46
08-Jul	41	16417,24	9580,38
14-Jul	47	16394,89	9875,40
21-Jul	54	16301,02	7226,92
29-Jul	62	17199,49	3443,07
13-Ago	77	17186,08	3463,18
04-Set	99	16667,56	3492,24

Tabela A.14 – Evolução da concentração de TPH's no solo contaminado com diesel

Concentração em TPH's (mg/ Kg solo)			
Data	Tempo (dias)	controle	tabuleiro
28-Mai	0	6261,66	6261,66
05-Jun	8	7532,59	7603,96
11-Jun	14	6146,37	6932,81
19-Jun	22	4351,14	3936,64
25-Jun	28	8210,61	1652,80
08-Jul	41	6893,01	2863,35
14-Jul	47	6835,36	3634,69
21-Jul	54	7211,43	2415,91
29-Jul	62	6934,18	1449,67
13-Ago	77	6717,33	1468,89
04-Set	99	6829,24	1455,16

A.2 Tabelas e Figuras auxiliares de apoio ao capítulo 3

A.2.1 Tabelas auxiliares para a construção do modelo logístico

Tabela A.15 – Conversão da densidade bacteriana no solo contaminado com crude (meio Agar)

Data	Tempo (dias)	Densidade bacteriana	
		CFU/ g solo	mg/L
28-Mai	0	n.d. ¹	n.d. ¹
05-Jun	8	1,96E+06	68,6
13-Jun	16	2,77E+06	96,9
19-Jun	22	2,34E+06	81,8
27-Jun	30	4,45E+05	15,6
10-Jul	43	1,93E+06	67,5
16-Jul	49	5,50E+06	192,4
22-Jul	55	6,71E+06	234,7

¹ não determinado

A.2.2 Tabelas e Figuras auxiliares para o desenvolvimento do modelo matemático de interacção substrato-biomassa

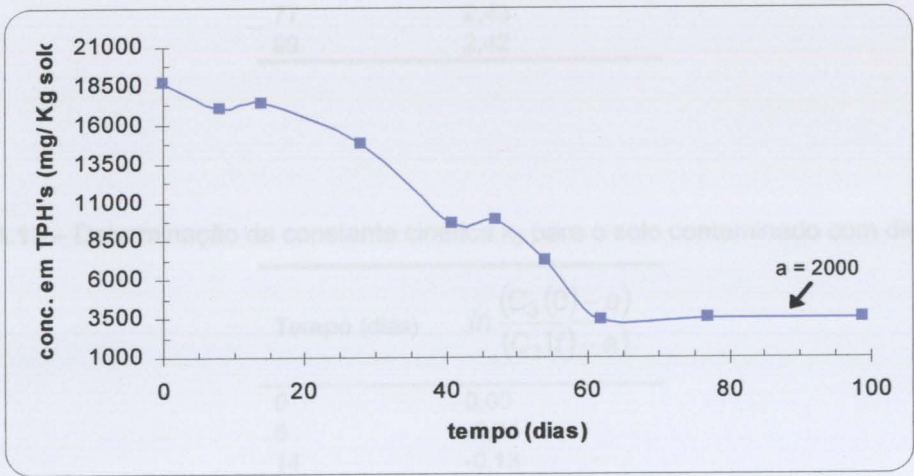


Figura A.1 – Determinação do parâmetro a para o solo contaminado com crude

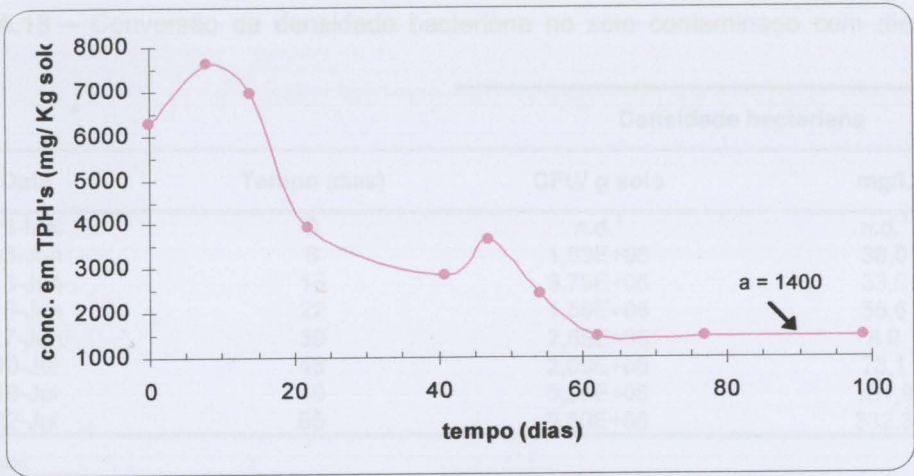


Figura A.2 – Determinação do parâmetro a para o solo contaminado com diesel

Tabela A.16 – Determinação da constante cinética k_3 para o solo contaminado com crude

Tempo (dias)	$\ln \frac{(C_3(0) - a)}{(C_3(t) - a)}$
0	0,00
8	0,10
14	0,08
28	0,27
41	0,79
47	0,75
54	1,16
62	2,45
77	2,43
99	2,42

Tabela A.17 – Determinação da constante cinética k_3 para o solo contaminado com diesel

Tempo (dias)	$\ln \frac{(C_3(0) - a)}{(C_3(t) - a)}$
0	0,00
8	-0,24
14	-0,13
22	0,65
41	1,20
47	0,78
54	1,57
62	4,58
77	4,26
99	4,48



Tabela A.18 – Conversão da densidade bacteriana no solo contaminado com diesel (meio Agar)

Densidade bacteriana			
Data	Tempo (dias)	CFU/ g solo	mg/L
28-Mai	0	n.d. ¹	n.d. ¹
03-Jun	6	1,03E+06	36,0
13-Jun	16	9,70E+05	33,9
19-Jun	22	1,59E+06	55,6
27-Jun	30	2,55E+05	8,9
10-Jul	43	2,09E+06	73,1
16-Jul	49	5,20E+06	181,9
22-Jul	55	9,50E+06	332,3

¹ não determinado

Anexo B

Integrações numéricas

B.1 Integração da equação logística

Pretende-se integrar a equação diferencial:

$$\frac{dX}{dt} = k * X - \lambda * X^2 \quad (\text{B.1})$$

Separando as variáveis obtém-se:

$$\frac{dX}{X(k - \lambda * X)} = dt \quad (\text{B.2})$$

Dividindo a fracção $\frac{1}{X(k - \lambda * X)}$ em elementos simples do tipo $\frac{A}{X} + \frac{B}{k - \lambda * X}$

vem:

$A = \frac{1}{k}$ para $x = 0$ e $B = \frac{\lambda}{X}$ para $X = \frac{k}{\lambda}$. Substituindo os valores de A e B,

$$\left(\frac{1}{k} * \frac{1}{X} + \frac{\lambda / k}{k - \lambda * X} \right) dX = dt \quad (\text{B.3})$$

Integrando a equação fica:

$$\frac{1}{k} * \ln \frac{X}{k - \lambda * X} = t + \ln I \quad (\text{B.4})$$

Por conseguinte, separando as variáveis e resolvendo em ordem a X,

$$X = I * e^{k*t} * (k - \lambda * X) \quad (\text{B.5a})$$

$$X = \frac{k * I * e^{k*t}}{1 + I * \lambda * e^{k*t}} \quad (\text{B.5b})$$

Quando $X(0) = X_0$,

$$X_0 = \frac{k * I * e^{k*t_0}}{1 + I * \lambda * e^{k*t_0}} \quad (\text{B.6})$$

De onde resulta a constante I,

$$I = \frac{X_0}{k * e^{k*t_0} - X_0 * \lambda * e^{k*t_0}} \quad (\text{B.7})$$

Substituindo na equação diferencial obtém-se a seguinte solução:

$$X = \frac{k * e^{k*t} * X_0}{e^{k*t_0} * (k - X_0 * \lambda) + \lambda * e^{k*t} * X_0} \quad (\text{B.8})$$

B.2 Integração da equação diferencial do modelo matemático de interacção substrato-biomassa

Pretende-se integrar a equação diferencial:

$$\frac{dC_3}{dt} = -k_3 * C_3 + k_4 \quad (\text{B.9})$$

É uma equação diferencial linear de 1ª ordem que se vai integrar pelo método de Lagrange. Considerando a equação homogénea:

$$\frac{dC_3}{dt} + k_3 * C_3 = 0 \quad (\text{B.10a})$$

Separando as variáveis obtém-se:

$$\frac{dC_3}{C_3} + k_3 * dt = 0 \quad (\text{B.10b})$$

integrando:

$$C_3 = K * e^{-k_3 * t} \quad (\text{B.9})$$

sendo K uma função de C. Derivando a Equação (B.9):

$$\frac{dC_3}{dt} = K' * e^{-k_3 * t} - K * k_3 * e^{-k_3 * t} \quad (\text{B.10})$$

Substituindo na equação diferencial obtém-se:

$$K' * e^{-k_3 * t} - K * k_3 * e^{-k_3 * t} + K * k_3 * e^{-k_3 * t} = k_4 \quad (\text{B.11a})$$

$$K' = k_4 * e^{-k_3 * t} \quad (\text{B.11b})$$

$$K = \frac{k_4}{k_1} * e^{k_3 * t} + I \quad (\text{B.11c})$$

representando I a constante de integração. Substituindo na solução da equação homogênea vem:

$$C_3 = e^{-k_3 * t} * \left[\frac{k_4}{k_1} * e^{k_3 * t} + I \right] = I * e^{-k_3 * t} + \frac{k_4}{k_3} \quad (\text{B.12})$$

A concentração inicial $C_3(0)$ admite-se como conhecida donde resulta:

$$C_3(0) = I + \frac{k_4}{k_3} \Rightarrow I = C_3(0) - \frac{k_4}{k_3} \quad (\text{B.13})$$

Substituindo:

$$C_3(t) = e^{-k_3 * t} * \left[C_3(0) - \frac{k_4}{k_3} \right] + \frac{k_4}{k_3} \quad (\text{B.14a})$$

$$C_3(t) = C_3(0) * e^{-k_3 * t} + \frac{k_4}{k_3} * (1 - e^{-k_3 * t}) \quad (\text{B.14b})$$

Quando o tempo tende para infinito, $C_3(t)$ tende para uma concentração assintótica: $a = \frac{k_4}{k_3}$. O parâmetro k_3 pode-se determinar fazendo uma regressão linear

entre $\ln \frac{(C_3(0) - a)}{(C_3(t) - a)}$ e tempo (t). Deve obter-se uma recta que passa pela origem cujo declive é k_3 .

Anexo C

Procedimentos experimentais

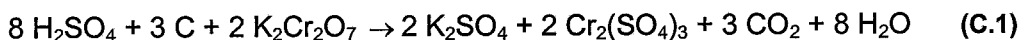
C.1 Análises químicas ao solo

C.1.1 Determinação do teor natural de matéria orgânica

Princípio:

A matéria orgânica total do solo pode estimar-se através de um método indirecto que consiste na determinação do carbono orgânico total, multiplicado o valor que lhe corresponde por 1,724. Este factor de conversão, o coeficiente de Van Bemmelen, foi estabelecido tendo em conta o teor médio de carbono da matéria orgânica, 58% e, por esta razão, pode não conduzir em todos os casos a uma avaliação correcta. Ainda assim, é o método que permite determinações mais rigorosas.

O teor de carbono orgânico é determinado pelo método de oxidação com dicromato de potássio em meio fortemente ácido por via húmida. A equação que representa a reacção é:



A quantidade de dicromato utilizada deve sempre exceder a quantidade necessária para a oxidação do carbono. Finda a reacção, doseia-se o excesso de dicromato utilizando uma solução de sulfato ferroso amoniacal (SFA). Esta titulação permite calcular a quantidade de dicromato neutralizada pelo carbono.

Reagentes:

a) Mistura Oxidante

Dissolver cerca de 20 g de dicromato de potássio em 300 mL de água. Arrefecer e juntar lentamente 400 mL de ácido sulfúrico concentrado, mexendo sempre. Deixar arrefecer novamente e adicionar 200 mL de ácido fosfórico concentrado. Diluir até 1 L.

b) Solução de SFA a 0,4 N

Dissolver 157 g de SFA num litro de ácido sulfúrico 0,75 N. Guardar em frasco escuro. O título diminui com o tempo.

c) Verificação do título do SFA

Colocar num erlenmeyer 20,00 mL de dicromato de potássio 0,2 N e adicionar 10 mL de ácido fosfórico concentrado, 50 mL de água destilada e 4 a 5 gotas de difenilamina. Adicionar o SFA até ao ponto de equivalência. A partir do volume gasto de SFA, calcular o seu título.

d) Solução de dicromato de potássio 0,2 N

Dissolver cerca de 9,8071 g de dicromato de potássio seco a 103° durante 2 horas, num litro de água destilada.

Procedimento:

1. Pesar num vidro de relógio entre 0,3 g a 0,4 g de solo moído;
2. Transferir a amostra para o tubo de digestão e adicionar 25 mL da mistura oxidante;
3. Ligar o digestor e regular a temperatura para 150°C durante 60 min, continuar a digestão a 420°C por mais 60 min;
4. Deixar arrefecer;
5. Transferir o conteúdo do digestor para o matraz e adicionar aproximadamente 100 mL de água destilada;
6. Titular com a solução de SFA usando difenilamina como indicador na presença de aproximadamente 1g de NaF;
7. Fazer um ensaio em branco utilizando, em vez do solo, esferas de vidro com um diâmetro de 3 mm.

Cálculos:

O teor em carbono orgânico pode ser calculado através da seguinte expressão:

$$\% f_{co} = \frac{(V_b - V_a) * M * 3 * 10^{-3} * 100}{m_m}$$

sendo,

% f_{co} – teor em carbono orgânico (%).

V_b – Volume da solução de SFA gasto para titular a amostra (mL)

V_a – Volume da solução de SFA gasto para titular o ensaio em branco (mL)

M – Molaridade da solução de SFA

m_m – massa de solo (g)

Conhecido o f_{co} , o teor natural de matéria orgânica (TNMO) pode ser calculado através de:

$$\% \text{ TNMO} = \% f_{co} * 1,724$$

C.1.2 Determinação do azoto de Kjeldahl

Princípio:

A amostra contendo compostos orgânicos azotados é digerida em presença de ácido sulfúrico concentrado e mineralizada com formação de água e dióxido de carbono. Para diminuir o tempo de digestão adiciona-se sulfato de potássio e um catalisador (ex. selénio).

O azoto amoniacal com compostos orgânicos é convertido em amónio que é fixado pelo ácido sulfúrico sob a forma de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Após a digestão os iões de amónio são deslocados por uma base forte em excesso (NaOH). O amoníaco é então destilado e absorvido numa solução de ácido bórico (H_3BO_3).

Como o ião borato (H_2BO_3^-), libertado na reacção do ácido bórico com o amoníaco, é a base conjugada de um ácido muito fraco, pode ser determinado por titulação com um ácido forte, por exemplo ácido sulfúrico, usando como indicador vermelho de metilo ou verde de bromocresol.

Reagentes:

- a) Reagente digestor

Ácido sulfúrico concentrado

Catalisador – pastilhas de sulfato de potássio e selénio

- b) Solução aquosa de hidróxido de sódio a 40%
- c) Solução de ácido bórico a 2% (preparar mensalmente)
- d) Indicador misto

Dissolver 200 g de vermelho de metilo em 100 mL de álcool etílico a 95%. Dissolver 100 mg de azul de metileno em 50 mL de álcool etílico a 95%. Juntar as duas soluções anteriormente mencionadas. Preparar mensalmente.

Procedimento:***Digestão***

1. Pesar rigorosamente entre 1,5 a 2,5 g de solo;
2. Colocar a amostra no tubo de digestão e adicionar 3 pastilhas de reagente catalisador (3,5 g K_2SO_4 + 3,5 mg Se);
3. Adicionar lentamente 12 mL de ácido sulfúrico concentrado de forma a “molhar” completamente a amostra e homogeneizar a mistura;
4. Colocar o tubo no digestor, adaptar o sistema de sucção. Ligar o digestor;
5. Regular a temperatura para 150°C durante 60 min. Continuar a digestão a 420°C por mais 60 min;
6. Digerir a amostra por mais 30 min até que a amostra apresente um aspecto de solução transparente (incolor ou cor de champanhe);
7. Retirar o tubo do digestor e deixar arrefecer até à temperatura ambiente;
8. Adicionar cuidadosamente à mistura, 75 mL de água destilada;
9. Homogeneizar o conteúdo do tubo;

Destilação e titulação

1. Verificar os níveis dos depósitos de NaOH e H_3BO_3 . Conferir se as bombas doseadoras debitam as quantidades adequadas (50 mL de NaOH a 40% e 25 mL de H_3BO_3);
2. Fazer o aquecimento prévio do aparelho na opção manual, destilando aproximadamente 100 mL de água destilada e o vaso de recolha vazio;
3. Seleccionar o tempo de destilação (10 min) de modo a recolher um volume de destilado de aproximadamente 200mL;
4. Seleccionar a opção de funcionamento automático;
5. Colocar o tubo da amostra e um matraz de 500 mL com 4 gotas de indicador misto, de modo a visualizar a mudança de cor de violeta a verde, nos locais apropriados;
6. Verificar se a torneira de água corrente está aberta;
7. Premir a tecla (H_3BO_3 /START) que iniciará a destilação;

8. Titular o NH_3 do destilado com HCl 0,1 N usando 4 gotas de indicador misto (o ponto de equivalência é detectado pela mudança de cor da solução de verde para alfazema claro);
9. Para o ensaio em branco, seguir todos os passos de igual modo.

Cálculos:

O teor em azoto pode ser calculado através da seguinte expressão:

$$\text{mg N/L} = \frac{(V_a - V_b) * N * 14,007}{m}$$

sendo,

m – massa da toma de amostra usada (g)

N – normalidade do ácido clorídrico

V_a – volume do ácido titulante gasto na titulação da amostra (mL)

V_b – volume de ácido titulante gasto na titulação do branco (mL)

C.1.3 Determinação do fósforo total

Princípio:

A amostra contendo fósforo no solo é digerida por uma combinação de ácidos fortes (ácido nítrico e sulfúrico), de modo a oxidar toda a matéria orgânica e libertar o fósforo como ortofosfato. Por adição do reagente molibdato é formado ácido molibdofosfórico. Este ácido é reduzido pelo cloreto de estanho, produzindo uma coloração azul intensa. A intensidade da cor é medida num espectrofotometro a 690 nm.

Reagentes:

- a) Ácido sulfúrico concentrado
- b) Ácido nítrico concentrado
- c) Fenoftaleína (solução aquosa)

Dissolver 5 g de fenoftaleína em 500 mL de etanol e adicionar 500 mL de H₂O sob agitação constante.

- d) Hidróxido de sódio a 1N
- e) Solução de ácido forte

Adicionar lentamente 300 mL de H₂SO₄ conc a 600 mL de água destilada. Depois de arrefecer, adicionar 4,0 mL de HNO₃ conc e diluir a 1000 mL.

- f) Reagente molibdato de amónio

Dissolver 25 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O em 175 mL de água destilada. Cuidadosamente adicionar 280 mL H₂SO₄ conc a 400 mL de água destilada. Deixar arrefecer, adicionar a solução de molibdato e diluir a 1000 mL.

- g) Reagente cloreto de estanho

Dissolver 2,5 g de SnCl₂ · 2H₂O em 100 mL de glicerol. Aquecer num banho de água e agitar com uma barra magnética para acelerar a dissolução.

Este reagente é estável e não necessita de armazenamento especial

- h) Soluções padrão de fosfato

Dissolver em água destilada 219,5 mg de KH₂PO₄ anidro e diluir a 1000 mL.

1,00 mL = 50,0 µg PO₄³⁻P

Procedimento:***Digestão***

1. No tubo de digestão de Kjeldahl, medir uma amostra com a quantidade adequada de fósforo (suficiente para ser determinada pelo método colorimétrico);
2. Adicionar 1 mL H_2SO_4 conc e 5 mL HNO_3 conc;
3. Digerir até aproximadamente 1 mL, e continuar até que a solução fique incolor para remover todo o HNO_3 ;
4. Arrefecer e adicionar aproximadamente 20 mL de água destilada, 0,05 mL (1 gota) de fenoftaleína, e NaOH 1 N até a solução adquirir uma pálida tonalidade rosa;
5. Transferir a solução neutralizada, filtrar se necessário para remover material particulado ou turbidez, para um balão volumétrico de 100 mL;
6. Adicionar a água de lavagem da filtração ao balão e ajustar o volume a 100 mL com água destilada;
7. Determinar a quantidade de fósforo pelo método colorimétrico.

Método colorimétrico**1) Tratamento preliminar da amostra**

A 100 mL da solução contendo não mais de 200 μg P e livre de cor e turbidez, adicionar 0,05 mL de fenoftaleína. Se a amostra ficar rosa, adicionar uma solução de ácido forte para travar a mudança de coloração da solução. Se for necessário mais do que 0,25 mL (5 gotas) de fenoftaleína, retirar uma pequena amostra e diluir em 100 mL com água destilada após a adição do ácido forte.

2) Desenvolvimento da cor

Adicionar, agitando vigorosamente após cada adição, 4,0 mL de reagente molibdato I e adicionar 0,5 mL (10 gotas) de reagente cloreto de estanho I. A taxa de desenvolvimento da cor e a sua intensidade dependem da temperatura da solução final, cada 1°C produz um aumento de 1% na intensidade da cor. A partir deste passo procurar manter as amostras, padrões e reagentes a uma temperatura entre os 20 e os 30°C.

3) Determinação da cor

Depois 10 min, mas antes dos 12 min, usando o mesmo intervalo de tempo específico para todas as determinações, determinar a cor espectrofotometricamente a 690 nm e comparar com a curva de calibração, usando como branco água destilada.

Cálculos:

O teor em fósforo pode ser calculado através da seguinte expressão:

$$\text{mg P/L} = \frac{\text{mg P (em aproximadamente 104,5 mL de volume final)} * 1000}{\text{mL amostra}}$$

C.1.4 Determinação da concentração em TPH's

Princípio:

Uma amostra de solo de quantidade conhecida é adicionada a um tubo de reacção que contém sulfato de ferro anidro, usado para aumentar a eficiência da posterior extracção. Seguidamente é adicionado o conteúdo de uma ampola de 20 mL de diclorometano ao tubo de reacção. Este solvente orgânico extrai os hidrocarbonetos petrolíferos da amostra de solo. De modo a remover os hidrocarbonetos polares e interferências de cor, o extracto de solo é tratado com Florisil. Finalmente, uma ampola selada em vácuo contendo cloreto de alumínio extrai um volume pré-determinado de da solução que possui os hidrocarbonetos. O contacto entre a solução e o cloreto de alumínio desenvolve uma coloração que será directamente proporcional à concentração dos hidrocarbonetos petrolíferos presentes na amostra.

Procedimento:

1. Pesar 1 g de amostra de solo na balança para um recipiente apropriado;
2. Colocar a amostra no tubo de reacção. Tapar o tubo e agitar de modo a obter uma mistura homogénea;
3. Segurar a ampola de duas pontas verticalmente sobre o tubo e cortar a extremidade superior usando um dispositivo apropriado. Inverter cuidadosamente a ampola. Cortar o outro extremo. Deixar o líquido escorrer para o tubo de reacção;
4. Tapar o tubo. Agitar vigorosamente durante 3 minutos;
5. Deixar a mistura repousar, enquanto o solo sedimenta. Este passo deve ter uma duração de 2 minutos;
6. Decantar o sobrenadante para um tubo de extracção, evitando um possível arrastamento de solo. Tapar o tubo e agitar durante 1 minuto. Esperar 2 minutos para que o florisil sedimente;
7. Retirar a tampa do tubo de extracção. Colocar no seu lugar uma rolha com uma abertura no centro;
8. Colocar a coluna na extremidade da ampola selada em vácuo e enroscar;
9. Inserir o conjunto coluna-ampola na abertura do tubo de extracção, até à marcação azul existente na ampola. Segurar o tubo e ao mesmo tempo inclinar ligeiramente a

ampola para um dos lados de modo a quebrar a ponta da ampola. A fase líquida irá ser extraída lentamente para o interior da ampola. Quando o fluxo parar remover o conjunto coluna-ampola do tubo de extracção;

10. Com a ajuda de um pano, retirar cuidadosamente a coluna da extremidade da ampola. Limpar o líquido que possa existir no exterior da ampola;

11. Colocar uma tampa de silicone na ampola;

12. Inverter a ampola a cada 2 minutos durante um espaço de tempo de 10 minutos

13. Deixar repousar a ampola aproximadamente 10 minutos, de modo a que os cristais formados sedimentem;

14. Premir o botão “on-off” do colorímetro. Quando o ecrã mostrar “---”, o equipamento estará operacional;

15. Colocar o branco (solo sem qualquer contaminação submetido ao mesmo tratamento) no compartimento de leitura. Tapá-lo com uma cápsula. Pressionar o botão “ZERO”. No mostrador aparecerá “SIP” momentaneamente e seguidamente “0,0”;

16. Inserir a amostra na divisória apropriada. Tapar com uma cápsula. Carregar no botão “READ”. O ecrã mostrará “SIP” momentaneamente, e efectuará a leitura expressa em valores de absorvância.

Cálculos:

O valor da concentração de TPH é dado pela seguinte fórmula:

$$\text{mg TPH/ Kg} = [(A * S) - I] * 20$$

sendo,

A – absorvância

S – declive específico do hidrocarboneto (Tabela C.1)

I – ordenada na origem específica do hidrocarboneto (Tabela C.1)

Tabela C.1 – Factores de resposta para os hidrocarbonetos petrolíferos mais comuns

Hidrocarboneto	Declive	Ordenada na Origem
Gasolina sem chumbo	113,5	3,0
Gasolina meteorada	108,0	2,4
Diesel	274,5	5,2
Crude	223,5	4,3
Óleo lubrificante	703,3	25,1
BTEX	87,5	8,1
Gasolina com chumbo	197,7	8,4
PAH	0,975	0,009

C.2 Análises microbiológicas ao solo

C.2.1 Preparação do meio mineral

Procedimento:

O meio mineral é constituído por macronutrientes, micronutrientes, fonte de azoto [(NH₄)₂SO₄] e soluções tampão (KH₂PO₄ e NaHPO₄). A preparação de um litro de uma solução de macronutrientes e de um litro de micronutrientes faz-se com os seguintes compostos:

Tabela C.2 – Preparação da solução de macro e micronutrientes

Macronutrientes		Micronutrientes	
Composição	Peso (g)	Composição	Peso (mg)
CaCl ₂ .H ₂ O	0,696	FeSO ₄ , 7H ₂ O	200
NaCl	0,08	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	10
KNO ₃	1,03	MnSO ₄ , 5H ₂ O	4,3
NaNO ₃	6,98	H ₃ BO ₃	30
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1,00	CoSO ₄ , 7H ₂ O	24
NTA	1,00	CuSO ₄ , 5H ₂ O	1
		NiSO ₄ , 7H ₂ O	2
		NaMoO ₄ , 2H ₂ O	3
		Ca(OH) ₂	50
		EDTA	500

1. Num frasco Schott de 1 litro prepara-se 1 litro de uma de macronutrientes com a composição da tabela acima mencionada;
2. Num frasco Schott de 1 litro de uma solução de micronutrientes com a composição da tabela acima mencionada;
3. Prepare-se 100 mL de solução tampão: KH₂PO₄ = 27,22 g/L;
4. Prepare-se 100 mL de solução tampão: NaHPO₄,12H₂O = 71,63 g/L;

5. Prepare-se 50 mL de solução fonte de azoto. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 10\%$ (p/v);
6. Num frasco Schott de 1 litro, juntar 100 mL de macronutrientes, 10 mL de micronutrientes, 20 mL de solução de fosfato de potássio, 30 mL de solução de hidrogenofosfato de sódio hidratado, 5 mL de solução de sulfato de amónia e 800 mL de água destilada;
7. Num frasco Schott de um litro deitar água destilada;
8. Autoclavar (121° , 15 min), os frascos de macronutrientes, micronutrientes, meio mineral e de água, devidamente rotulados;
9. Perfazer um litro de meio mineral com água estéril;
10. Guardar o meio mineral e o restante das soluções suas componentes no frigorífico a 4°C .

C.2.2 Determinação da densidade bacteriana no solo (meio Agar)

Procedimento:

Preparação do meio LB

1. Pesar 10 g de triptona, 5 g de extracto de levedura, 10 g de cloreto de sódio;
2. Deitar num frasco Schott de 1 L com uma barra magnética no interior;
3. Deitar água destilada até quase perfazer um litro;
4. Ajustar o pH até 7 (corrigir com HCl ou NaOH 0,1M);
5. Juntar 20 g de Agar-Agar;
6. Autoclavar a 121°C durante 15 min,
7. Retirar do autoclave e ainda quente, na câmara de fluxo laminar, junto da chama, distribuir por placas de Petri. (Um litro dá para aproximadamente 40 placas de 9 cm de diâmetro).

Preparação de solução salina (0,85%), para as diluições das culturas

1. Pesar 8,5 g de cloreto de sódio;
2. Juntar água destilada até perfazer 1 L;
3. Autoclavar;
4. Distribuir 9 mL por cada tubo de ensaio previamente esterilizado e tapado;
5. Conservar no frigorífico até ser usado.

Extracção dos microorganismos do solo

1. Pesar 10 g de solo;
2. Juntar 100 mL solução salina;
3. Colocar em agitação constante durante 3 horas.

Espalhamento

1. Colocar os tubos de ensaio, contendo 9 mL de salina cada um, num suporte próximo da chama;
2. Pipetar 1 mL da cultura líquida para o primeiro tubo;
3. Rotular com a indicação 10^{-1} ;
4. Agitar no vortex;
5. Com outra pipeta estéril transferir 1 mL deste, para o tubo seguinte e rotulá-lo com a indicação 10^{-2} ;
6. Agitar no vortex;
7. Com outra pipeta estéril transferir 1 mL deste tubo, para o tubo seguinte e rotulá-lo com a indicação 10^{-3} ;
8. Agitar no vortex;
9. Repetir os passos anteriores até ao tubo correspondente à diluição de 10^{-8} ;
10. Com a micropipeta de 100 μm e pontas estéreis, pipetar 2 vezes 100 μm do primeiro tubo para duas placas de Petri. Estas duas placas devem ser rotuladas com a referência 10^{-2} ;
11. Com a micropipeta de 100 μm e pontas estéreis, pipetar 2 vezes 100 μm do segundo tubo para duas placas de Petri. Estas duas placas devem ser rotuladas com a referência 10^{-3} ;
12. Repetir até à transferência do último tubo para as placas que deverão ter a referência 10^{-9} ;
13. Levar à incubadora a 30-34°C.

C.2.3 Determinação da densidade bacteriana no solo (método MPN)

Procedimento:

Preparação do meio Bushnell-Haas:

- 1. Dissolver em água desionizada: 0,2 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1,0 g/L de K_2HPO_4 ; 1,0 g/L de KH_2PO_4 ; 0,05 g/L de $FeCl_3$; 1,0 g/L de NH_4NO_3 e 0,02 g/L de $CaCl_2$;
- 2. Ajustar o pH a 7-7,2 com HCl;
- 3. Esterilizar no autoclave a 15 psi durante 15 min.

Preparação do meio Trypticase Soy Broth :

- 1. Dissolver em água desionizada: 17 g/L de *Trypticase peptone*; 3 g/L de *Phytone peptone*; 5 g/L de NaCl; 2,5 g/L de K_2HPO_4 e 2,5 g/L de glucose;
- 2. Aquecer com agitação suave para dissolver;
- 3. Colocar 225 mL em erlenmeyers de 500 mL;
- 4. O pH final deve ser $7,3 \pm 0,2$;
- 6. Esterilizar no autoclave a 15 psi durante 15 min.

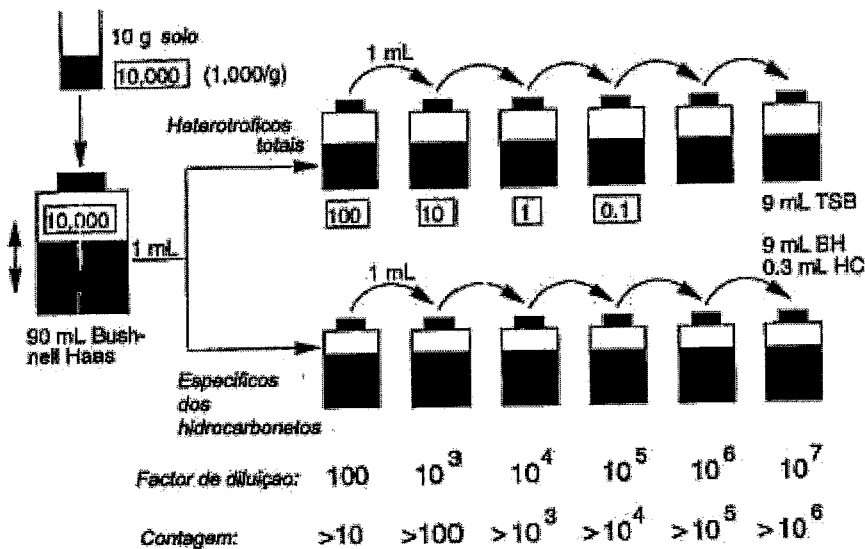


Figura C.1 – Determinação do número de microorganismos

A Figura C.1 representa esquematicamente dois métodos para estimar o número de microorganismos de acordo com o método das diluições.

Extracção dos microorganismos do solo

1. Transferir 10 g de solo para um recipiente estéril de 250 mL;
2. Misturar 90 mL de meio Bushnell Hass (BH) estéril;
3. Agitar a mistura durante 60 min.

Determinação do número de bactérias heterotróficas aeróbias totais

1. Colocar 9 mL do meio Trypticase Soy Broth (TSB) estéril nos tubos de ensaio;
2. Pipetar 1 mL da cultura líquida para o primeiro tubo;
3. Efectuar diluições sucessivas desde 10^{-1} a 10^{-12} ;
4. Todos os tubos de diluição são incubados durante 7 dias a 20-30°C;
5. O crescimento bacteriano é detectado por um aumento da turbidez.

Determinação do número de bactérias heterotróficas aeróbias específicas dos hidrocarbonetos

1. Colocar 9 mL do meio BH estéril nos tubos de ensaio;
2. Pipetar 1 mL da cultura líquida para o primeiro tubo;
3. Efectuar diluições sucessivas desde 10^{-1} a 10^{-12} ;
4. Adicionar aproximadamente 0.3 mL do hidrocarboneto em estudo a cada tubo e agitar;
5. Todos os tubos de diluição são incubados durante 7 dias a 20-30°C;
6. O crescimento bacteriano é detectado por um aumento da turbidez.

Anexo D

Publicações efectuadas sobre o tema proposto a
dissertação

RESPIROMETRIC TECHNIQUES IN A LANDFARMING STUDY

Maria José Padrão* and António Fiúza

FEUP – Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto - Dep. Minas

(*author for correspondence, e-mail: mariajosepadrao@portugalmail.pt; phone.351 22 508 1240, fax. 351 22 508 1448; address: R. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal)

ABSTRACT

The technology known as *landfarming* has been widely and successfully used for removing petroleum hydrocarbons from contaminated soils.

Laboratory experiments were conducted to study the bioremediation potential of a sandy soil contaminated with crude. The sample was collected from the local of occurrence of existing spillage. The microbial activity was stimulated through aeration and the addition of a solution enriched in nutrients. The soil was sampled weekly in order to determine the pH, the moisture, the bacterial population, the nutrients content and the contaminant concentration.

One innovative step in our methodology was the performance of an uncommon respirometric test - the SOUR (Specific Oxygen Uptake Rate), as proposed by Lasaridi and Stentiford. The procedure makes use of a dissolved oxygen meter to measure the changes in the oxygen concentration of an aqueous soil suspension, at 30°C. The alteration in the microbial respiration activity reflects the progress of the landfarming process. As the biodegradation occurs, less substrate is available to the microorganisms and this is reflected in their respiratory activity.

The SOUR test revealed to be a simple, reliable and fast method to quantify indirectly the evolution of the biodegradation.

1. INTRODUCTION

Landfarming is a technology that reduces the concentration of petroleum constituents through biodegradation. During this process, the hydrocarbons are converted by indigenous soil microorganisms under ideal conditions to carbon dioxide, water, and biomass [3,5,6,7,9].

The effectiveness of landfarming depends on many parameters, such as soil pH, soil temperature, moisture content, microbial population density, aeration, nutrient concentration (e.g., nitrogen and phosphorus) and contaminant characteristics such as chemical structure and toxicity to microbes [5,6,7,9].

The evolution of the biodegradation process is essential to determine the extent to which readily biodegradable organic matter has decomposed. The most promising parameter to monitor the progress of the bioremediation seems to be the change in microbial respiration activity. As the biodegradation occurs, less substrate is available to the microorganisms and this reflects in their respiratory activity.

This study proposed a respirometric test – the SOUR (Specific Oxygen Uptake Rate), to measure changes in the oxygen concentration of an aqueous soil suspension. The method quantifies the maximum microbial activity that could be supported by the amount of biodegradable organic matter in the sample [8].

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Characterization of the soil samples

The experimental work begins with the characterization of the baseline physical and chemical proprieties of the soil to be treated. The contaminated soil sample was collected near a crude oil storage tank in an oil refinery situated in the northern part of Portugal. The soil characteristics are summarized in Table 1.

TABLE 1. Soil Properties

Soil property	Value
pH	6,22
Texture	
Sand, wt. %	84,68
Gravel, wt. %	8,75
Clay+Silt, wt. %	6,57
Soil moisture, wt. %	5,00
Total nitrogen, mg N/g soil	0,71
Phosphorus, mg P/g soil	0,048
Microbial population density, CFU/g soil	10 ⁵
TPH, mg/Kg soil	2895

2.2 Soil Treatments

The soil was sieved prior to use in the respirometric experiments to minimize soil sampling errors. Distilled water was added in order to adjust the moisture levels required for optimal biodegradation activity (12 wt.% to 30 wt.%) [9]. The soil was amended with varying concentrations of nitrogen and phosphorus based on the amount of crude oil in the soil. For each gram of crude oil, 107 mg NH₄NO₃ and 42 mg K₂HPO₄ were added to provide the nitrogen and phosphorus required for stimulating microbial growth of hydrocarbon degraders [6,7]. This is equivalent to a C:N:P ratio (wt) of 100:5:1, assuming that 75% (wt) of crude oil consists of carbon (C) [6,7]. The pH of the soil was adjusted to around 7,0 by adding diluted NaOH solution where necessary [9].

2.3 Aqueous phase respiration – SOUR test

A sample of 3-12 g, of sieved soil and 500 mL distilled water were mixed for about 30 s, and placed in a Duran bottle, in a water bath held at 30°C. 12mL of phosphate buffer and 5 mL each of the CaCl₂, FeCl₃ and MgSO₄ nutrient solutions made up per Standard Methods BOD test procedures [2] were added to the suspension. The DO probe was placed in the bottle, its sensor being at a depth of 5-6 cm bellow the surface. The suspension was continuously stirred by means of a magnetic stirrer and periodically aerated with a porous ceramic diffuser, to replenish the oxygen consumed by the microorganisms. This method recommended a repeating sequence of 20 minutes aeration followed by 15 minutes measurement of the oxygen concentration [8].

The DO concentration data, expressed as mg/L, were analysed using EXCEL. For each measuring interval (15 min) the first four readings (2 min) where discarded, as they usually reflected a supersaturated state of the suspension, and a linear regression was performed for DO concentration versus real time, which gave the slope $|S|$ (mg O₂/L/min). The correlation coefficient r^2 exceeded 0,98. The *maximum slope value* $|S|_{max}$ was used for the calculation of SOUR, expressed as mg O₂/g VS/h according to the equation [8]:

$$SOUR = (60 * |S|_{max} * V_s) / (m * DS * VS)$$

where:
60= factor change from minutes to hours
V_s= volume of the suspension (L)

m= mass of the soil sample (g, wet weight)
DS= fraction of dry solids (from 0 to 1,0)
VS=fraction of volatile solids (from 0 to 1,0)

3. RESULTS AND DISCUSSION

The variation of the respiration rate with time (0, 3, 8, 12 days) is presented in Figure 1 to 4.

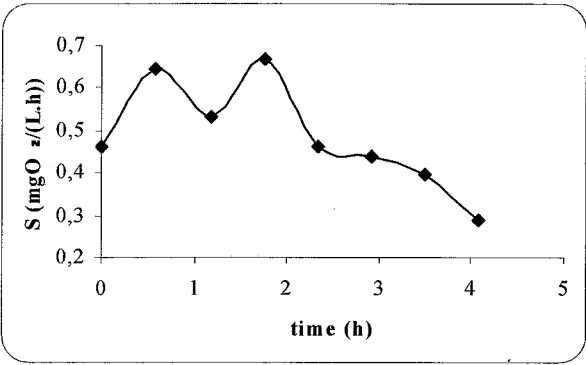


Figure 1 – Variation of the respiration rate with time (0 days) (3 days)

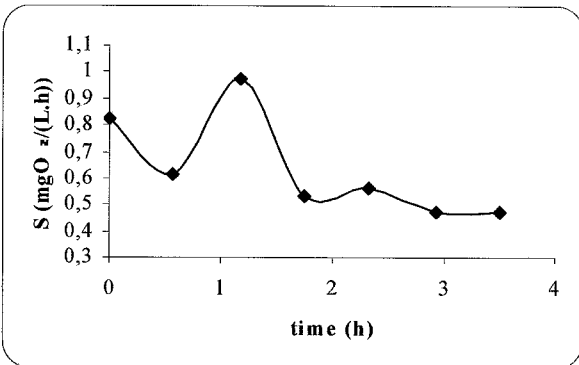


Figure 2 – Variation of the respiration rate with time

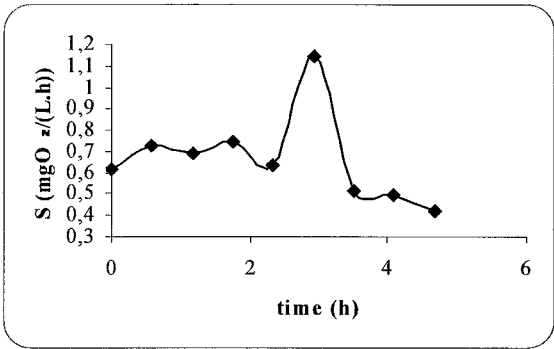


Figure 3 – Variation of the respiration rate with time (8 days) (12 days)

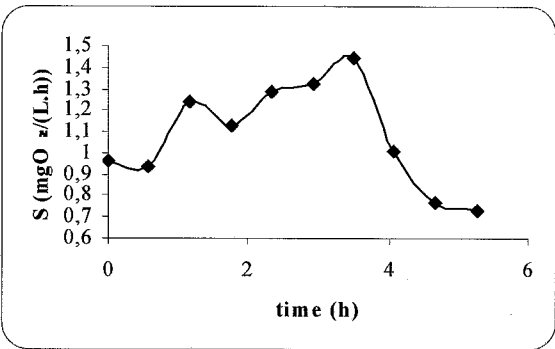


Figure 4 – Variation of the respiration rate with time

The results obtained show an increase on the maximum respiration rate during the study time. This is expected because as the biodegradation occurs, large molecules are broken down to smaller soluble ones and temporarily more substrate becomes available to the microorganisms enhancing their activity. Through, the quantitative results shows a low value for the respiration rate present in all the studies, which may be explain with the low initial biomass.

The time required before maximum activity was reached is although rise with the experimental time. It is depend on the age of the soil and the nature of the contamination.

In the Figure 5 is possibly observed the time evolution of the specific oxygen uptake rate.

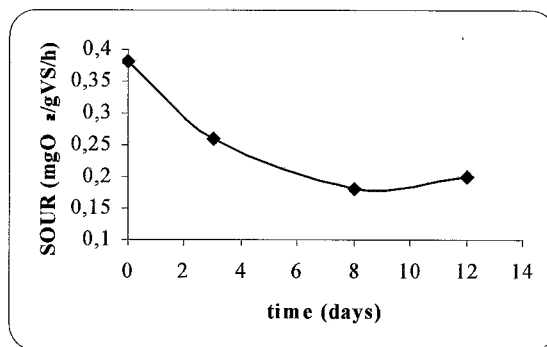


Figure 5 – Variation of the SOUR with time during the landfarming

4. CONCLUSIONS

This respirometric technique is an extremely useful and economical way of assessing the biodegradability of a given soil, and helps a better understanding of the effect of changing conditions on landfarming process. The respiration analysis gives the dynamic of biodegradation that can be manipulated to get the desired results.

It is suggested for future research a longer experimental time for a better knowledge of all the bioremediation process.

5. REFERENCES

- [1] Al-Daher, R., N. Al-Awadhi, A. Yateem, A. ElNawawy and M.T. Balba (2001) "Compost Soil Piles for Treatment of Oil-Contaminated Soil", *Soil and Sediment Contamination*, 10(2):197-209.
- [2] American Public Health Association (1992) *Standard Methods for the Examination Water and Wastewater*, 18th ed., Washington DC, Publication Office.
- [3] Atlas, R.M. (1981) "Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective", *Microbial Reviews*, 180-209.
- [4] Casarini, D.C.P., R.M. de Macedo, R.C. de A. Cunha, and J.C.O. Mauger (1988) "The Development of Assessment Techniques to Evaluate the Biodegradation of Oily Sludge in a Landfarming System", *Wat. Sci. Tech.*, 20(10):231-236.
- [5] Eweis, J.B., S.J. Ergas, D.P.Y. Chang and E.D. Schoeder (1998) *Bioremediation Principles*, McGraw-Hill, NY, NY.
- [6] Huesemann, M.H. and K.O. Moore (1994) "Guidelines for Land-Treating Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soils", *Journal of Soil Contamination*, 3(3):299-318.
- [7] Huesemann, M.H. and K.O. Moore (1994) "The Effects of Soil Type, Crude Oil Type and Loading, Oxygen, and Commercial Bacteria on Crude Oil Bioremediation Kinetics as Measured by Soil Respirometry", in *Hydrocarbon Bioremediation*, Eds. R.E. Hinchee, B.C. Alleman, R.E. Hoeppele and R.N. Miller, Lewis Publishers, 58-71.
- [8] Lasaridi, K.E. and E.I. Stentiford (1996) "Respirometric Techniques in the Context of Compost Stability Assessment: Principles and Practice", in *The Science of Composting*, Eds. Marco de Bertoli, Paolo et al Sequi, Blackie Academic & Professional, London, 274-285.
- [9] U.S. Environmental Protection Agency (1994) "Landfarming", in *How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tanks*, chapter V, EPA Document 510-B-95-007.

REMEDICATION OF A SANDY SOIL CONTAMINATED WITH PETROLEUM PRODUCTS BY LANDFARMING

Maria J. Padrão (mariajosepadrao@portugalmail.pt) and
A. Fiúza (FEUP, Porto, Portugal)

ABSTRACT: The knowledge of the biodegradation kinetics of petroleum products in a contaminated soil is very important for the comprehension of the mechanisms involved, as well as for an effective design of the selected technologic variant. Laboratory studies were conducted using bioreactors containing two types of sandy soil contaminated samples: one with diesel and another with crude oil. Both were collected from the spillage local of occurrence. The microbial activity was stimulated through aeration and addition of a solution enriched in nutrients. The soils were sampled every week in order to determine the pH, moisture content, bacterial population, nutrients content and the contaminant concentration. The degradation rates were quantified based on changes in the total petroleum hydrocarbons (TPH) concentrations. The experimental data provided the basis for the development of a comprehensive model describing simultaneously the time evolution of biomass and contaminant degradation. Several phenomena were globally taken into account in the kinetic models: the volatilisation, a fast kinetics component, a slow kinetic component and the refractory hydrocarbons for the time scale used in the experiments. This model is in turn linked to the kinetics of the biomass evolution.

INTRODUCTION

The technology known as *landfarming* has been widely and successfully used to provide an effective reduction in the concentration of petroleum hydrocarbons promoting the biodegradation of contaminated soils. This process stimulates the aerobic microbial activity of the indigenous soil microorganisms; under ideal conditions the final step of their metabolic process consists in carbon dioxide, water, and biomass (Atlas, 1981).

The effectiveness of landfarming depends on many parameters, such as soil pH, temperature, moisture content, microbial population density, oxygen supply, nutrient concentrations (e.g., nitrogen and phosphorus) and on the contaminant characteristics such as its chemical structure and toxicity to microorganisms (US EPA; 1994).

This study focuses on the biodegradation kinetics not only to predict the time evolution of biomass and the contaminant degradation, but also as a mean to achieve a better understanding of the biodegradation mechanisms.

MATERIALS AND METHODS

Characterization of the soil samples. As a first step laboratory tests were conducted in order to determine the baseline physical and chemical proprieties of the soils to be treated. Each contaminated soil sample (two were selected, one of crude oil and another of diesel) was collected near their storage tanks in an oil refinery, located in the northern part of Portugal. The soil characteristics are summarized in Table 1.

TABLE 1. Soils properties

Soil property	Type of samples	
	Crude Oil	Diesel
pH	6,79	4,43
Texture		
Sand, wt. %	69,30	49,50
Gravel, wt. %	23,0	28,40
Clay+Silt, wt. %	7,70	22,0
Soil moisture, wt. %	8,9	14,3
Organic Matter , wt. %	0,05	N.d.
Total nitrogen, mg N/L	2,0	3,5
Phosphorus, mg P/kg soil	7,0	6,9
Microbial population density, CFU/g soil	10 ⁶	10 ⁶
TPH, mg/Kg soil	17700,13	6261,66

Experimental procedures. The experiments were carried out in open trays (100*33*25 cm). For each type of soil another tray was filled up with material from the same sample that was not submitted to any biological treatment, thus allowing the measurement of the degradation rate due to the abiotic processes. This permits quantifying the separate contributions of the biological degradation and of the abiotic processes, such as volatilization. The contaminated soils were sieved (maximum particle size 4,67 mm) to minimize soil sampling errors in the later stages of the experiments. Once a day, the soils were vigorously tilted to enhance oxygen transfer to the lower soil layers. Distilled water was added, when necessary, to maintain the required moisture content level for optimal biodegradation activity (between 12 wt.% to 30 wt.%) (US EPA, 1994). To increase and stabilize the soil pH, calcium hydroxide (Ca(OH)₂) was added to both soils under treatment (Eweis, 1998). Ammonium nitrate (NH₄NO₃) was amended in a quantity based on the amount of the existing petroleum hydrocarbons. The laboratory experiments were programmed in order to adopt a C:N:P ratio (wt) of 100:10:1 (Eweis, 1998), assuming that the carbon content in the petroleum hydrocarbons was 90% (wt) (US EPA, 1994). The total number of heterotrophic microorganisms was estimated using one gram of soil; after a first contact with a saline solution, the liquid phase was successively diluted in sterile saline solutions (NaCl 0,85%, w/v), spread into medium agar (LB) and incubated for 5 days at 30°C (APHA, 1992). To stimulate the biodegradation potential, a mineral medium (Vila, 2001), was added every week to each soil under treatment. The composition of the medium was (NH₄)₂SO₄ 10% (w/v), as well as Na₂HPO₄, 12H₂O (71,63 g/L), and KH₂PO₄ (27,22 g/L). Furthermore, the mineral medium contained CaCl₂, H₂O (0,696 g/L); NaCl (0,08 g/L); KNO₃ (1,03 g/L); NaNO₃ (6,98 g/L); MgSO₄, 7H₂O (1,00 g/L); NTA (1,00 g/L); FeSO₄, 7H₂O (2 mg/L); ZnSO₄, 7H₂O (0,1 mg/L); MnSO₄, H₂O (0,043 mg/L); H₃BO₃ (0,3 mg/L); CoSO₄, 7H₂O (0,24 mg/L); CuSO₄, 5H₂O (0,01 mg/L); NiSO₄, 7H₂O (0,02 mg/L); NaMoO₄, 2H₂O (0,03 mg/L); Ca(OH)₂ (0,5 mg/L) and EDTA (5 mg/L). The TPH analyses were obtained using a test kit based on a combination of the modified Friedel-Crafts alkylation reaction with colorimetry. The development of the colour depends on the concentration and on the type of hydrocarbon present. The measurement is done in a photometer at a wavelenght of 430 nm. This test kit is well correlated with the reference EPA Method 8015B (modified) (US EPA, 2001).

RESULTS AND DISCUSSION

Biodegradation model. The global model suggested by Vila and Fiúza (Vila, 2001) was selected. The degradation process is described by three ordinary differential equations. An additional algebraic equation completes the model.

$$\frac{dx_1}{dt} = k_1 \cdot x_1 \cdot x_2 - k_2 \cdot x_1^2 \quad (1)$$

$$\frac{dx_2}{dt} = -\frac{1}{Y} \cdot k_1 \cdot x_1 \cdot x_2 \quad (2)$$

$$\frac{dx_3}{dt} = -k_3 \cdot x_3 \cdot k_4 \quad (3)$$

$$S = x_2 + x_3 \quad (4)$$

where t represents time; x_1 is the biomass concentration [ML^{-3}]; x_2 is the concentration of the biodegradable component in petroleum hydrocarbon; x_3 is the concentration of the petroleum hydrocarbon where abiotic degradation is prevailing; S is the total TPH concentration (abiotic + biotic); Y is the yield coefficient; k_1 [$\text{M}^{-1}\text{L}^3\text{T}^{-1}$], k_2 [$\text{M}^{-1}\text{L}^3\text{T}^{-1}$] and k_3 [T^{-1}] are the kinetic parameters and k_4 [$\text{M}^{-1}\text{L}^3\text{T}^{-1}$] is a constant.

The proposed model branches into two major sections based on the abiotic and biodegradable component. The branching is due the fact that biodegradation rates can vary from slow to fast, depending of the existing conditions and petroleum constituents.

The abiotic component (x_3) is composed by the volatile and semi-volatile organic compounds, with low solubility and fast degradation rate, and by the non-volatile compounds with slow degradation rate. Based in these considerations the decay model exhibits an exponential decrease which trends to an asymptotic concentration different from zero when time tends to infinite. In this case the transformation rate is not a straight line passing through the origin but a line with a positive non-zero ordinate.

When the Eq. (3) is integrated with an initial condition $x_3(0)$, the result obtained is

$$x_3 = x_3(0) \cdot e^{-k_3 \cdot t} + \frac{k_4}{k_3} \cdot (1 - e^{-k_3 \cdot t})$$

(5)

As time tends to infinite, $x_3(t)$ tends to an asymptotic concentration $a=k_4/k_3$. A linear regression between $\ln \frac{(x_3(0)-a)}{(x_3(t)-a)}$ and the time (t) allows for determining the parameter k_3 .

The methodology is exemplified by applying it to the results obtained with the soil contaminated with crude. The parameter was direct estimated from a probable asymptote to the curve representing the temporal evolution of the total concentrations. The kinetic constant, k_3 , was estimated as described.

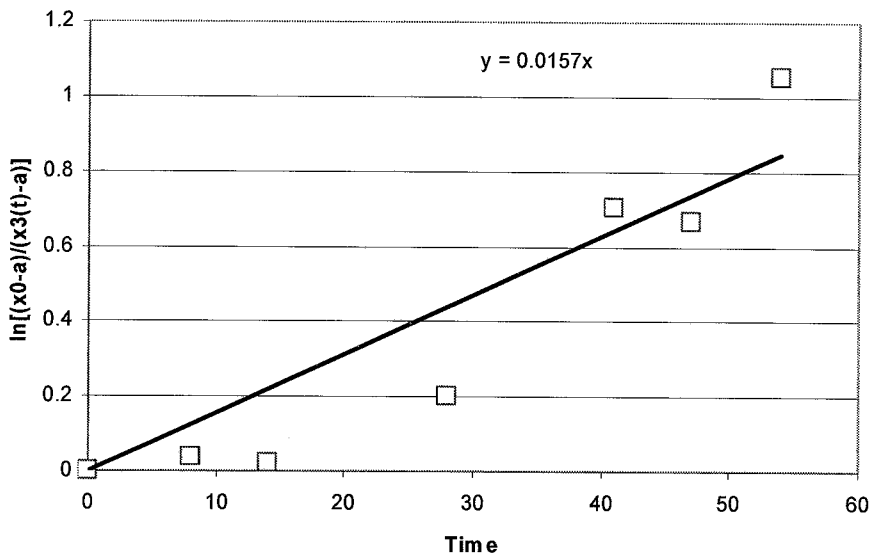


FIGURE 1. Determination of the parameter k_3 .

The other assumption admitted is that the biomass follows a modified Monod kinetics (the degradation rate is proportional to the product of the biomass and substrate concentrations) with a logistic component – the rate decreases proportionally to the square of the biomass concentration. The equation for the subtract decay exhibits only a Monod component, and a constant yield coefficient Y (biomass mass/substrate mass) is presumed (Eqs. (1) and (2)).

It is possible to measure experimentally the initial concentrations of the biomass $x_1(0)$ as well as to estimate the initial concentration of the biodegradable component $x_2(0)$ from the measurements. The kinetic rate k_1 can be estimated taking into account the fact that for a second order kinetics the initial half-life is inversely proportional to the initial concentration

$$k_1 = \frac{1}{T_{1/2} \cdot x_2(0)} \tag{6}$$

Fitting the experimental data. The parameters k_1 , k_3 and k_4 were estimated from the experimental data. As there was no possibility to quantify the time evolution of the biomass it was not possible to estimate the parameter k_2 . However, its influence on the results derived from the global model only are significant when the available subtract has low concentrations, then being a limitative factor to the biomass development. It was admitted in this model, after a sensibility study of the parameter effects, that k_2 was 50 times lower than k_1 .

In order to simulate the behaviour of the model, the system of the three ordinary differential equations, the first two non-linear, a fourth order Range-Kutta algorithm was applied.

The results show a reasonable adjustment between theoretical previsions and the experimental results, both for the total concentrations and the abiotic component. This last concentration is indirectly quantified from the comparison between the trays, one submitted to both biotic and abiotic degradation and the other only to abiotic degradation.

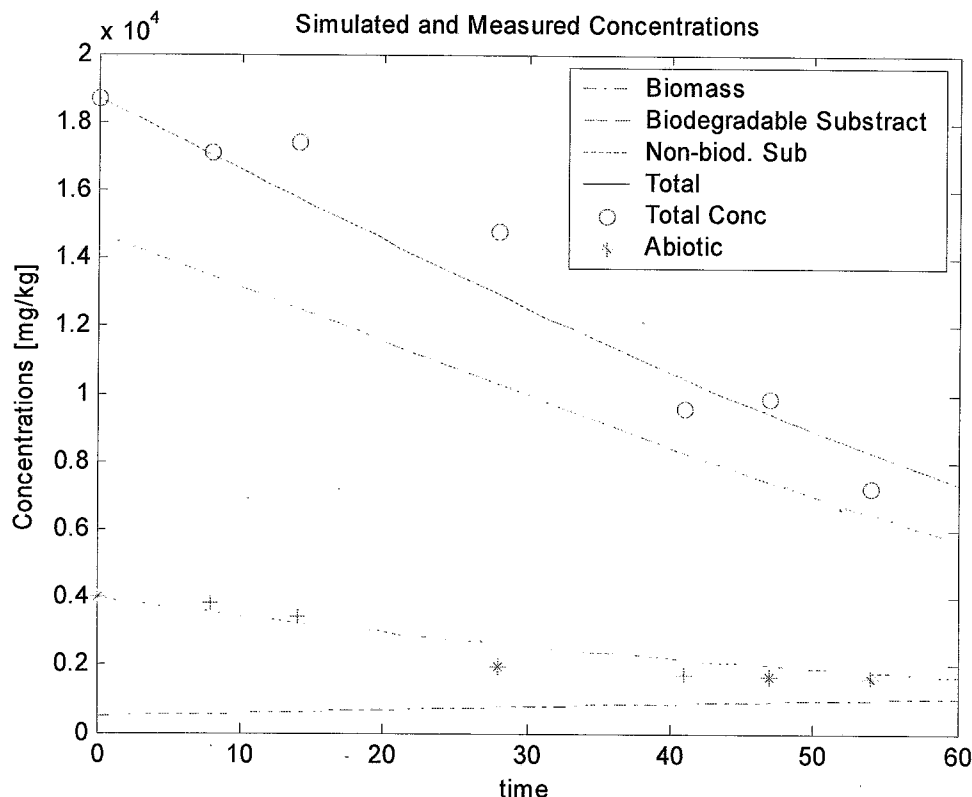


FIGURE 2. Model results for the degradation of crude oil.

CONCLUSIONS

The experimental data provided the basis for the development of a comprehensive model describing simultaneously the time evolution of biomass and contaminant degradation. Several phenomena were globally taken into account in the kinetic models: the volatilisation, a fast kinetics component, a slow kinetic component and the refractory hydrocarbons for the time scale used in the experiments.

The mathematical model describes in this work show an effective approach to a better understanding of the biodegradation process in a landfarming study. This model clearly demonstrated its versatility and robustness.

REFERENCES

- Admon, S., M. Green, and Y. Avnimelech. 2001. "Biodegradation Kinetics of Hydrocarbons in Soil during Land Treatment of Oily Sludge". *Bioremediation Journal*. 5(3):193-209.
- American Public Health Association. 1992. *Standard Methods for the Examination Water and Wastewater*. 18th ed., Washington DC, Publication Office.
- Atlas, R.M. 1981. "Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective". *Microbial Reviews*. 180-209.
- Eweis, J.B., S.J. Ergas, D.P.Y. Chang and E.D. Schoeder. 1998. *Bioremediation Principles*. McGraw-Hill, NY, NY.
- Huesemann, M.H. and K.O. Moore. 1994. "Guidelines for Land-Treating Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soils". *Journal of Soil Contamination*. 3(3):299-318.
- Huesemann, M.H. and K.O. Moore. 1994. "The Effects of Soil Type, Crude Oil Type and Loading, Oxygen, and Commercial Bacteria on Crude Oil Bioremediation Kinetics as Measured



by Soil Respirometry". In: R.E. Hinchee, B.C. Alleman, R.E. Hoeppel and R.N. Miller (Eds.), *Hydrocarbon Bioremediation*, pp. 58-71. Lewis Publishers.

Löser, C., H. Seidel, P. Hoffmann, and A. Zehnsdorf. 1999. "Bioavailability of Hydrocarbons During Microbial Remediation of a Sandy Soil. *Applied Microbiological Biotechnology*. 51:105-111.

Rashid, M. and J.J. Kaluarachchid. 1999. "A Simplified Numerical Algorithm for Oxygen- and Nitrate- based Biodegradation of Hydrocarbons using Monod Expressions". *Journal of Contaminant Hydrology*. 40:53-77.

U.S. Environmental Protection Agency. 1994. "Landfarming", In: *How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tanks*. chapter V, EPA Document 510-B-95-007.

U.S. Environmental Protection Agency. 2001. *Innovative Technology Verification Report*. EPA/600/R-01/082.

Vila, C., O. Nunes and A. Fiúza. 2001. "A Model of Biodegradation of Crude Oil in Soils". In: *Proceedings of the First European Bioremediation Conference*, pp 1-4. Technical University of Crete.



FACULDADE DE ENGENHARIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

BIBLIOTECA



0000079701