

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL
MESTRADO**

Marquion José Vaz

**BIODEGRADAÇÃO EX-SITU E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
SOLOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBONETOS**

Santa Cruz do Sul, Março de 2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Marquion José Vaz

**BIODEGRADAÇÃO EX-SITU E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
SOLOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBONETOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Tecnologia Ambiental – Mestrado, Área de Concentração em Gestão e Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Diosnel Antonio Rodriguez Lopez

Co-orientador: Prof. Dr. Valeriano A. Corbellini

Santa Cruz do Sul, Março de 2010

Marquion José Vaz

**BIODEGRADAÇÃO EX-SITU E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
SOLOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBONETOS**

Esta Dissertação foi submetida ao programa de Pós Graduação em Tecnologia Ambiental – Mestrado, Área de Concentração Gestão Ambiental e Tecnologia Ambiental, Unidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

COMISSÃO DA BANCA

Dra. Patrícia Valente da Silva
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Dr. Valeriano Antonio Corbellini
Universidade de Santa Cruz do Sul – UNICS

Dr. Diosnel Antonio Rodriguez Lopez
Universidade de Santa Cruz do Sul – UNICS
Orientador

"Não é a espécie mais forte que sobrevive,
Tampouco a mais inteligente.
É a mais adaptável às mudanças."

Charles Darwin

AGRADECIMENTO

Agradeço a DEUS por estar sempre comigo, e por esta oportunidade de compartilhar o conhecimento e o convívio com as pessoas.

A minha família pelo incentivo constante, Valeria, Vicente e Maitê. Dedico a vocês todo este trabalho.

Aos meus pais pelo exemplo de vida, honestidade que sempre me motivaram a ir mais longe.

Ao amigo e professor Diosnel pela sabedoria compartilhada, mostrando sempre o caminho a seguir. De coração agradeço por todo o empenho e dedicação.

Ao professor Valeriano pelo ensinamento da parte microbiológica deste trabalho.

A todos os professores do Mestrado em Tecnologia Ambiental, por compartilharem seu conhecimento e tempo. Em especial a Professora Adriane Lawisch pelo incentivo constante para a realização deste trabalho.

A todos os colegas, pela troca de experiência e pela amizade formada no decorrer das aulas.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

E a todos que colaboraram de certa forma para o êxito deste trabalho, um muito obrigado.

RESUMO

Neste trabalho foi realizada uma avaliação da biodegradação ex-situ de hidrocarbonetos e da atividade biológica em solos contaminados. Para a realização dos estudos foi utilizada uma biopilha, montada no Município de Duque de Caxias-RJ, com solo retirado de uma base de distribuição de combustíveis. A primeira parte do trabalho consistiu na remoção do solo, adição de compostos químicos para controle de pH e liberação de nutrientes. Com o solo preparado, foi montada a biopilha, equipada com sistema de injeção de ar, remoção de gases e sistema de irrigação para controle de umidade. O monitoramento da degradação dos hidrocarbonetos foi acompanhado por meio de análises químicas da concentração de hidrocarbonetos totais (TPH's) e do monitoramento dos parâmetros de temperatura, pH e umidade da biopilha. A atividade biológica foi monitorada por meio do isolamento e caracterização de linhagens de microrganismos, obtidos de amostras de solos retiradas durante três períodos diferentes de operação da biopilha. Os ensaios para caracterização da atividade microbiológica foram realizados por meio de análise macroscópica, teste de gram e testes bioquímicos de sensibilidade ao detergente catiônico, secreção de biosurfactantes e atividade proteolítica, lipolítica e celulolítica. Os resultados mostram que após 30 dias de operação da biopilha, a concentração de TPH's apresentou uma redução de 91%. Os resultados obtidos durante a segunda e terceira amostragens, realizadas aos 90 e 120 dias, mostraram um pequeno aumento da concentração dos TPH totais se comparados com os valores obtidos após 30 dias de operação. No final dos ensaios, após 120 dias de operação, a redução observada na concentração total de TPH's foi de 81%. A elevação da concentração de TPH verificada neste período pode ser atribuída ao método de análise, onde fontes biogênicas possam estar presentes nesta avaliação, bem como à heterogeneidade do solo. Os parâmetros de temperatura, umidade e pH se mantiveram dentro da faixa adequada para o crescimento dos microrganismos e manutenção do processo. Os resultados da atividade biológica mostraram que a população de microrganismos varia com o decorrer dos ensaios em função da mudança do substrato disponível para biodegradação, e de suas propriedades físico-químicas. Esta variação da população modifica a predominância dos grupos de microrganismos presentes durante a operação da biopilha. Os ensaios relacionados à atividade hidrolítica mostraram que há grupos de microrganismos versáteis que possuem propriedades de gerar vários tipos de enzimas, o que é muito importante para a degradação de contaminantes com composição tão variada como os hidrocarbonetos.

PALAVRAS-CHAVES: Biopilha, Biodegradação, Biodegradação de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo, Atividade biológica do solo.

ABSTRACT

In this work, an evaluation of the biological activities and ex-situ biodegradation of hydrocarbons in contaminated soils were performed. For this research, a biopile was mounted in the city of Duque de Caxias-RJ, with contaminated soil taken from a distribution base of fuel. The first part of this work involved the removal of soil, addition of chemicals to control pH and nutrient release. With the prepared soil, the biopile was mounted, equipped with air injection system, gas scrubber and irrigation system for humidity control. The hydrocarbons biodegradation was monitored through chemical analysis of the total hydrocarbons (TPHs) concentration. The temperature, pH and moisture of the biopile were also monitored. The biological activity was monitored by means of isolation and characterization of microorganisms obtained from soil samples taken during three different periods of biopile operation. The tests for characterization of microbial activity were performed by microscopic analysis of Gram test, and biochemical tests of sensitivity to cationic detergent, biosurfactants secretion capacities and proteolytic, lipolytic and cellulolytic activities. The results show that after 30 days of biopile operation, TPHs concentration were reduced by 91%. The results obtained during the second and third sampling, taken at 90 and 120 days, showed a small increase in total concentration of TPH compared with the values obtained after 30 days of operation. Once the tests ended, after 120 days of operation, the observed concentration reduction of total TPHs was 81%. The increase in concentration of TPH found in this period can be attributed to analysis method, where biogenic sources may be present in this evaluation, as well as the heterogeneity of the soil. The parameters of temperature, humidity and pH remained within the range suitable for the microorganism growth and maintenance process. The results of biological activity showed that the population of microorganisms varies with the course of the tests due to change of substrate available for degradation, and their physicochemical properties. This variation of the population changes the prevalence of groups of microorganisms present during the operation of the biopile. The tests related to hydrolytic activity showed that groups of microorganisms are versatile because they have capacities to generate different types of enzymes, which is very important for the degradation of contaminants in composition as varied as the hydrocarbons.

KEY-WORDS: Biopile; Biodegradation, Total Petroleum Hydrocarbons Biodegradation; Soil Biological Activities.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

BTEX	Hidrocarbonetos monoaromáticos: benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos
CETESB	Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COV's	Compostos Orgânicos Voláteis
DNALP	Fase líquida não aquosa mais densa que a água
USEPA	United States Environmental Protection Agency
FEPAM	Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HPA's	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HRP	Hidrocarbonetos Resolvidos do Petróleo
LNAPL	Fase líquida não aquosa menos densa que a água
MCNR	Mistura Complexa Não Resolvida
NBR	Norma Brasileira
PCB	Bifenilas Policlorados
pH	Potencial Hidrogênio Iônico
TPH	Hidrocarboneto Total de Petróleo
UCM	Unresolved Complex Mixture – Mistura complexa não resolvida
MCNR	Mistura Complexa Não Resolvida
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Diagrama esquemático do sistema bombeamento e tratamento.	26
FIGURA 2 - Diagrama do sistema de extração de vapores associado ao sistema de injeção de ar.	27
FIGURA 3 - Fotografia de um sistema de “landfarming”. Foto do autor.....	34
FIGURA 4 - Representação gráfica de uma biopilha.	36
FIGURA 5 - Vias de degradação de fluoranteno por bactérias (KANALY E HARAYAMA, 2000).	45
FIGURA 7: Diagrama esquemático da montagem e monitoramento da biopilha.....	52
FIGURA 8 – Fluxograma dos testes microbiológicos.....	58
FIGURA 9: Comportamento da temperatura a 15 cm de profundidade na biopilha.	59
FIGURA 10: Evolução da temperatura da biopilha a 60 cm de profundidade.	60
FIGURA 11: Comportamento das reduções de TPH total durante a operação da biopilha.	64
FIGURA 12: N° de linhagens de microrganismos encontrados em cada meio de cultura em cada etapa de amostragem.....	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Valores orientadores para solo e água subterrânea quanto a substâncias químicas.	22
TABELA 2 - Exemplos de técnicas de tratamento de solo e água subterrânea.	23
TABELA 3 - Vantagens e desvantagens das biopilhas.....	36
TABELA 4 - Condições necessárias para a boa operação de uma biopilha.	37
TABELA 5 - Estrutura química e biodegradabilidade dos contaminantes.	38
TABELA 6 - Comportamento do pH no solo da biopilha.	62
TABELA 7 - Resultados da emissão de VOC's da biopilha medidos em 02/03/2009.....	63
TABELA 8 - Resultados da emissão de compostos orgânicos voláteis na biopilha medidos em 05/04/2009.....	63
TABELA 9 - Número de bactérias isoladas nas placas com Agar nutriente.	71
TABELA 10 - Número de fungos e bolores isolados nas placas com Ágar Sabouraud.....	72
TABELA 11 - Resultados da atividade bioquímica dos microrganismos cultivados na primeira etapa em Ágar Nutriente.	73
TABELA 12 - Resultados da atividade bioquímica dos microrganismos cultivados na primeira etapa em Ágar Sabouraud.....	73
TABELA 13: Resultados da atividade bioquímica dos microrganismos cultivados na segunda etapa em Ágar Nutriente.	76
TABELA 14 - Resultados da atividade bioquímica dos microrganismos cultivados na segunda etapa em Ágar Sabouraud.....	76
TABELA 15 - Resultados da atividade bioquímica dos microrganismos cultivados na terceira etapa em Agar Nutriente.	80
TABELA 16 - Resultados da atividade bioquímica dos microrganismos cultivados na terceira etapa em Ágar Sabouraud.....	81
TABELA 17 - Resultados da atividade bioquímica dos microrganismos cultivados na terceira etapa em Ágar Caseinato.....	82

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	CONTAMINAÇÃO DO SOLO POR HIDROCARBONETOS	16
3.2	LEGISLAÇÃO	20
3.3	SISTEMAS DE REMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS	23
3.4	SISTEMA BOMBEAMENTO E TRATAMENTO	24
3.5	SISTEMA EXTRAÇÃO DE VAPOR DO SOLO	26
3.6	SISTEMA DE INJEÇÃO DE AR	27
3.7	SISTEMAS DE OXIDAÇÃO QUÍMICA IN SITU	28
3.8	SISTEMA LANDFARMING EX SITU	33
3.9	BIOPILHAS	35
3.10	BIORREMEDIAÇÃO	39
3.11	MICROORGANISMOS RELEVANTES À BIORREMEDIAÇÃO	43
3.12	ATIVIDADE BIOLÓGICA NOS SOLOS CONTAMINADOS	47
4	MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1	CONSTRUÇÃO DA BIOPILHA	49
4.2	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	53
4.2.1	ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS	53
4.2.2	ANÁLISE MICRO E MACROSCÓPICA	54
4.2.2.1	COLORAÇÃO DE GRAM	54
4.2.2.2	MICROCULTIVO	55
4.2.3	ENSAIOS BIOQUÍMICOS E FUNCIONAIS	55
4.2.3.1	PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE	55
4.2.3.2	SENSIBILIDADE A DETERGENTE ANIÔNICO	55

4.2.3.3	ATIVIDADE PROTEASE	56
4.2.3.4	ATIVIDADE LIPASE	56
4.2.3.5	ATIVIDADE β -1,4-EXOGLICANASE	56
4.2.3.6	ATIVIDADE β -1,4-ENDOGLICANASE.....	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	59
5.1	COMPORTAMENTO DA TEMPERATURA, pH E UMIDADE	59
5.4	RESULTADOS DOS ENSAIOS BIOQUÍMICOS E FUNCIONAIS	68
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
6	REFERÊNCIAS	87

1 INTRODUÇÃO

A contaminação do solo e de águas subterrâneas com compostos de hidrocarbonetos de petróleo provoca preocupações ambientais e de saúde pública. Ela é considerada um problema generalizado uma vez que os hidrocarbonetos são os contaminantes de ocorrência ambiental mais freqüente, um típico efeito colateral da atividade industrial. Entre as tecnologias disponíveis para lidar com os solos contaminados, a biorremediação com base na atividade metabólica dos microrganismos tem certas vantagens (VAN GESTEL et al., 2003).

A biorremediação de hidrocarbonetos derivados de petróleo é uma forma eficaz, econômica e tecnológica ambientalmente correta, que é considerada um método viável para o tratamento de hidrocarbonetos de petróleo em solos contaminados (ALEXANDER, 1999). Na última década, com a maior atenção para a preservação do meio ambiente, técnicas de biorremediação foram desenvolvidas e melhoradas para limpar solos contaminados com produtos químicos perigosos e se tornaram uma alternativa valiosa aos tratamentos químicos e físicos (MARGESIN & SCHINNER, 1999). Isto levou a uma maior atenção ao desenvolvimento de tecnologias inovadoras de remediação (WHANG, 2008).

A biorremediação é geralmente realizada por técnicas *in-situ* e *ex-situ*, através da bioampliação ou bioestimulação, ou ambos, dependendo das condições do solo e da estrutura da comunidade microbiana. As diretrizes da USEPA sugerem que a biorremediação é viável quando há cerca de 10^3 UFC/g de solo da população microbiana. No entanto, uma baixa população microbiana e diversidade microbiana insuficiente afetam a eficiência da biorremediação. De acordo com Alexander (1999), a eficiência da biorremediação é uma função da capacidade dos degradadores microbianos inoculados ou endógenos em permanecerem ativos no ambiente natural. Portanto, aumentar a capacidade dos microrganismos degradadores inoculados por meio da bioampliação ou promover a atividade dos microrganismos degradadores endógenos por bioestimulação poderia melhorar a eficiência da biorremediação. A bioampliação é a introdução de microrganismos em ambientes exógenos para acelerar a biorremediação (WATANABE, 2001). A bioampliação pode aumentar as taxas de remoção de poluentes através do aumento da população bacteriana (ATLAS, 1981). Na bioestimulação, o solo é alterado com nutrientes adicionados, contendo principalmente nitrogênio e fósforo ou fontes de biossurfactantes conhecidos para melhorar a

biodisponibilidade dos TPH no local, aumentando assim a eficiência de biorremediação (WHANG et al., 2008). Assim, a aplicação de bioampliação e bioestimulação é necessária para melhorar a eficiência da biorremediação, que é afetada pela concentração e o componente dos hidrocarbonetos (BAI, 1997).

Os hidrocarbonetos são degradados principalmente por bactérias e fungos e a adaptação destas comunidades microbianas, por exposição prévia aos hidrocarbonetos, aumenta as taxas de degradação dos mesmos. A adaptação é provocada por enriquecimento seletivo de microrganismos usuários dos hidrocarbonetos e a ampliação do conjunto de genes catabolizantes de hidrocarbonetos (JACKSON et al., 1996). A biodegradação de hidrocarbonetos geralmente requer a cooperação de mais de uma espécie (GHAZALI et al., 2004). Isto é particularmente verdadeiro em poluentes que possuem muitos compostos diferentes, tais como petróleo bruto ou derivados de petróleo. Microrganismos individuais podem metabolizar apenas uma gama limitada de substratos de hidrocarbonetos, de modo que conjuntos de populações mistas de microrganismos, com amplo conjunto de capacidades enzimáticas, são necessários para aumentar a taxa e a extensão da biodegradação de petróleo. Populações microbianas, que consistem em grupos que pertencem a diversos gêneros têm sido detectados em petróleo do solo ou água contaminada (SORKHOH et al., 1995).

A intensidade da biodegradação dos hidrocarbonetos no solo é influenciada por vários fatores ambientais, como qualidade e quantidade de contaminantes, populações microbianas endógenas, propriedades do solo, pH, temperatura, conteúdo de água e disponibilidade de nutrientes (WALWORTH et al., 2003).

Segundo Huesemann (1994) apud Márques-Rocha et al. (2001) a extensão da biodegradação dos hidrocarbonetos em solos contaminados é extremamente dependente de quatro fatores: a criação de condições ambientais ótimas para estimular a atividade biodegradativa, os tipos predominantes de hidrocarbonetos de petróleo na matriz contaminada e a biodisponibilidade dos contaminantes para os microrganismos. Este mesmo autor afirma que a degradação de hidrocarbonetos de petróleo é afetada também pela composição molecular dos hidrocarbonetos, característica que está diretamente relacionada com a biodisponibilidade destes compostos, e, como consequência, a taxa de biodegradação pode ser alterada.

A eficácia da biorremediação é muitas vezes uma função da população microbiana ou consórcio e como ela pode ser enriquecida e mantida em um ambiente. Microrganismos com a capacidade de degradar petróleo bruto estão ubiquamente distribuídos no solo e em ambientes marinhos (MÁRQUES-ROCHA, et al., 2000). Geralmente, a comunidade bacteriana é adaptada à presença do contaminante, mas outras condições ambientais tais como disponibilidade de nutrientes e concentração de oxigênio, podem ser desfavoráveis, e assim a degradação microbiana do contaminante é lenta; técnicas de biorremediação aceleraram a biodegradação natural, otimizando as condições com a adição de nutrientes, matéria orgânica, inóculos microbianos, surfactantes e também por aeração, controle de temperatura e teor de água (JORGENSEN et al., 2000).

A eficiência de remoção de óleo diesel em um processo de biorremediação é determinada principalmente pela atividade microbiana, que pode ser monitorada por meio de ferramentas moleculares ou pacotes de avaliação rápida (LETOWSKI, 2003). A biopilha é um método *ex-situ* utilizado na biorremediação de hidrocarbonetos derivados de petróleo de solos contaminados. Ela é uma forma eficaz, econômica e promissora tecnologia para a limpeza de solos contaminados com hidrocarbonetos (LOPEZ, et al., 2009). Na sua concepção, a biopilha recebe compostos químicos para ajuste de pH e de nutrientes para estimulação do crescimento biológico. A sua umidade interna é controlada por meio da adição de água por meio de um sistema de irrigação. Ainda, a injeção regular de ar de forma forçada dentro solo, prevê o transporte do oxigênio necessário para a bioestimulação e aumenta a oportunidade de contato com os micróbios através da mistura de óleo-polvente e da água.

Análises biológicas do solo (como a respiração do solo, biomassa, atividade enzimática e a contagem microbiana) podem dar informações sobre a presença de microrganismos viáveis para a biodegradação, bem como sobre a intensidade e sobre o tipo e a duração dos efeitos dos poluentes sobre as atividades metabólicas do solo, e são, portanto, bem adequadas para medir o impacto da poluição sobre a saúde do solo (SCHINNER et al., 1996). Os métodos biológicos utilizados para descrever a atividade microbiana do solo durante a biorremediação foram principalmente restritos a respiração do solo, atividade de hidrogenase e microbianas. Hoje em dias as técnicas de determinação biológicas permitem monitoramentos mais amplos e mais precisos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é analisar a atividade microbiológica de uma biopilha utilizada para a biodegradação de hidrocarbonetos derivados de petróleo em um solo argiloso.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a biodegradação de hidrocarbonetos derivados de petróleo numa biopilha;
- Isolar e selecionar microrganismos presentes no solo da biopilha e caracterizar a atividade bioquímica desses microrganismos isolados por meio de análise macroscópica e testes de sensibilidade ao detergente catiônico, secreção de biosurfactantes e atividade proteolítica, lipolítica e celulolítica.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CONTAMINAÇÃO DO SOLO POR HIDROCARBONETOS

O solo e a água têm papel fundamental para o desenvolvimento do homem e da natureza. A contaminação destes pode provocar um desequilíbrio da vida microbiana, bem como problemas à população e na fauna e flora presentes neste habitat.

Em maio de 2002, a CETESB divulgou pela primeira vez uma lista de áreas contaminadas, registrando a existência de 255 áreas no Estado de São Paulo. O registro vem sendo constantemente atualizado e em novembro de 2008 foram identificadas 2.514 áreas contaminadas. Os postos de distribuição de combustíveis destacam-se na lista de novembro de 2008, com 1.953 registros (78% do total), seguidos das atividades industriais com 337 (13%), das atividades comerciais com 150 (5%), das instalações para destinação de resíduos com 80 (3%) e dos casos de acidentes e fonte de contaminação de origem desconhecida com 22 (1%). No RS, a FEPAM não possui um levantamento tão detalhado quanto o da CETESB com relação às áreas contaminadas. Porém, a mesma cita em seu site a relação de acidentes envolvendo o transporte de cargas perigosas atendidos pelo serviço de emergência. Conforme os dados divulgados em 2009, houve nove ocorrências de acidentes rodoviários com derramamentos de combustíveis.

No Brasil, a contaminação do solo e da água subterrânea com hidrocarbonetos de petróleo tem sido relacionada a derramamentos acidentais ocasionados na extração, armazenamento, transporte e distribuição dos combustíveis. Porém, a contaminação por hidrocarbonetos pode se dar por muitas outras fontes. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) liberados no ambiente, por exemplo, decorrem principalmente de origem antropogênica. Eles são formados como subprodutos da combustão incompleta de materiais orgânicos. Os HPA's já foram identificados em muitas fontes de emissão, como escapamentos de veículos, usinas de energia, produtos químicos, coque de petróleo e indústrias de xisto, os esgotos urbanos, etc. As fontes primárias naturais de HPA's são os incêndios florestais e a atividade vulcânica (TRAPIDO, 1999). Os HPA's são ecologicamente importantes porque muitos HPA's individuais são genotóxicos e podem causar mutações e certos tipos de câncer (WHITE et al., 1998). A conversão de HPA's em compostos cancerígenos se dá através da ativação metabólica no organismo. Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são compostos

químicos constituídos unicamente de átomos de carbono e hidrogênio, arrançados na forma de dois ou mais anéis aromáticos. Jackson et al. (1996) citam que, devido à possibilidade da fusão de um número variável de anéis e das várias posições em que estes anéis podem se ligar entre si, há atualmente mais de 100 HAPs reconhecidos pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Apesar disso, somente 16 HAP's são considerados em função de sua importância industrial, ambiental e toxicológica. São eles: acenaftaleno, acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(g,h,i)-pireleno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, naftaleno e pireno (POTIN et al., 2004).

Os HPA's são bastante resistentes à degradação. O intervalo de variação da meia-vida para o HPA no solo, estimada por vários pesquisadores, é bastante grande. Eles variam, dependendo do composto, a partir de 2 meses a 2 anos (TRAPIDO, 1999) e de 8 a 28 anos (WILD et al., 1990). Quando a liberação de HPA no ambiente é superior à sua capacidade de degradação, uma acumulação significativa é observada. Dessa forma, a existência de fontes de poluição permanente resulta na acumulação de HPA no solo, plantas e corpos d'água.

De acordo com Jacques (2007), independentemente da atividade industrial, os centros urbanos são os locais com maior potencial de contaminação pelos HAP's, devido aos postos de combustíveis, que podem contaminar o ar, o solo, o subsolo e as águas subterrâneas com hidrocarbonetos resultantes dos vazamentos nos tanques subterrâneos de armazenamento de combustíveis. Além disso, motores veiculares, oficinas mecânicas e garagens de automóveis são também fontes geradoras de HAP's nas cidades (LIMA, 1998). Assim, devido a estas atividades, o solo recebe anualmente quantidades consideráveis dos HAP's que, em função da complexidade da sua estrutura química, da sua baixíssima solubilidade em água (como exemplo, a do antraceno é de somente $0,073\text{mg L}^{-1}$) e da forte tendência de sorção à fase sólida do solo, tornam-se recalcitrantes e permanecem por longos períodos no ambiente, o que aumenta a possibilidade de exposição de humanos e animais a esses compostos.

A contaminação do solo se origina também das emissões de HPA na atmosfera, que atingem o solo através da precipitação. Muitos HPA's gasosos e ligados a materiais particulados podem ser transportados por longas distâncias antes de deposição. As vias mais comuns de dissipação dos HPA's no solo contaminado podem ser a volatilização, a adsorção irreversível, a lixiviação, o acúmulo em plantas e a biodegradação (TRAPIDO, 1999). HPA

com três ou mais anéis tendem a ser fortemente adsorvidos pelo solo. Uma sorção forte juntamente com solubilidade em água e pressão de vapor muito baixo faz com que a via da lixiviação e da volatilização sejam insignificantes para a dissipação de HPA's no meio ambiente.

Outros tipos de contaminantes estão associados aos hidrocarbonetos derivados de petróleo. Aproximadamente 90% da composição do petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos, o restante é constituído por compostos orgânicos sulfurados, nitrogenados, oxigenados e organometálicos. A gasolina, por exemplo, é constituída de uma mistura de hidrocarbonetos voláteis, cujos componentes majoritários são cadeias ramificadas de parafinas, cicloparafinas e compostos aromáticos, incluindo benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX).

Segundo Finotti et al. (2009) citando o trabalho de Chiaranda (2006) a contaminação de solos e águas subterrâneas com BTEX é, normalmente, acompanhada pela liberação de vapores que migram da superfície para o ar. Estes vapores, quando inalados, podem oferecer riscos à saúde humana e dos animais. O benzeno é cancerígeno, podendo causar leucemia, vertigens e tremores. Além disso, o benzeno afeta o sistema nervoso central e, quando contamina os aquíferos, torna-os inúteis para consumo humano. Segundo a resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 357/2005, a concentração máxima para o benzeno em águas doces é de 0,005 mg/L. A inalação de altas concentrações dos vapores da gasolina, por exemplo, pode deprimir o sistema nervoso central, causando sensações de embriaguez, inconsciência e até mesmo levar à morte.

A questão da contaminação do solo e das águas subterrâneas por hidrocarbonetos tem sido objeto de grande preocupação nas duas últimas décadas no Brasil. Esse problema ambiental torna-se mais grave quando a contaminação está presente em centros urbanos. Os efeitos adversos desses compostos na saúde humana são causados pelo uso de fontes de água poluída e pela ingestão de alimentos contaminados com acúmulo de substâncias tóxicas.

A entrada de contaminantes no solo influencia diretamente a qualidade da água subterrânea adjacente ao derramamento. A água subterrânea serve de meio de transporte destes poluentes, espalhando-os durante seu deslocamento pelo solo. O fluxo das águas subterrâneas, uma vez existente uma fonte de contaminação, transporta seus produtos através

de correntes advectivas ao longo de seu deslocamento, gerando assim uma “pluma” poluente, que se move na direção das linhas de fluxo com uma velocidade, em princípio, igual à velocidade média linear da água (FETTER, 1988).

Segundo Fetter (1993), além da advecção, a dinâmica dos contaminantes no solo costuma ser explicada através de dois mecanismos de transferência de massa, que formam parte da dispersão. A dispersão consiste no mecanismo responsável pela diminuição da concentração de contaminantes no fluido de percolação e que pode se dar através de dois processos: dispersão hidrodinâmica e difusão molecular. A dispersão hidrodinâmica acontece pela restrição de fluxo nos poros do solo, que produz uma redução da velocidade da percolação dos componentes mais viscosos. A difusão molecular é, intrinsecamente, um fenômeno de diluição de componentes solúveis e é o principal processo formador da fase dissolvida, responsável pela maior mobilidade dos contaminantes.

As águas subterrâneas são muito suscetíveis à contaminação, a não ser que estejam protegidas por uma camada de baixa permeabilidade, tal como de argila. Os contaminantes orgânicos, como os hidrocarbonetos de petróleo, compostos orgânicos halogenados, HPA's e outros compostos orgânicos, são adsorvidos fortemente no interior da matriz do solo e ficam presentes por um longo tempo nos locais contaminados. Muitos desses hidrocarbonetos orgânicos são pouco solúveis em água, assim eles podem se misturar com a água durante o fluxo de água através da matriz do solo. Além disso, quando o derrame de hidrocarbonetos líquidos orgânicos é suficientemente grande, o líquido derramado pode atingir o solo ou lençol freático superficial. Se o líquido é um LNAPL (fase líquida não aquosa mais leve que a água), esta flutuará sobre a superfície da água e, lentamente, solubilizará nela. Mesmo quando a água superficial é contaminada e esta pode passar através da matriz do solo com baixo teor de matéria orgânica (menor capacidade de adsorção de matéria orgânica), a água contaminada chegará ao lençol freático e a contaminará. Uma vez que há também um fluxo de água subterrânea no subsolo, a água contaminada se move longe do local contaminado do derrame.

O transporte dos contaminantes pela água subterrânea promove modificações no perfil de concentrações dos contaminantes pelo espalhamento e pela diluição do contaminante. A modificação da concentração se dá também, entre outros, por meio da atenuação, que consiste na redução de contaminantes transportados pela advecção ou diluição através de reações químicas ou físico-químicas. A atenuação química é mais intensa em solos com maior

capacidade de troca catiônica e atua reduzindo os componentes da fase livre e adsorvida. Também nesse elenco de reações estão as reações de biodegradação, pelas quais parcelas de contaminantes orgânicos são transformadas em ácidos orgânicos ou mesmo totalmente oxidadas. A atenuação química é mais intensa na região com maior disponibilidade de oxigênio e está intimamente associada à ação biológica. A atenuação físico-química é a responsável pela formação da fase adsorvida e consiste no aprisionamento de contaminantes que se aderem aos grãos do solo, sobretudo aos grumos de argilas. Entretanto, associada com os mecanismos de atenuação química, é responsável pela formação da fase dissolvida (facilitada pela redução de pH) (FETTER, 1998).

Similarmente ao LNAPL, se o derrame de DNAPL (fase líquida não aquosa mais pesada que a água) for suficientemente grande, ele se moverá para baixo e, finalmente, se depositará no fundo do lençol freático. Muitos locais estão contaminados com outros tipos de DNAPLs incluindo alcatrão e creosotos (misturas de hidrocarbonetos complexos que consistem em hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e outros hidrocarbonetos aromáticos), bifenilos policlorados (PCB) e certos pesticidas. Estes DNAPLs não são somente tóxicos e põem em risco os recursos de água potável, mas eles também são muito difíceis de remediar com técnicas de remediação clássica.

3.2 LEGISLAÇÃO

Muitos fatores são responsáveis pelas diferentes abordagens nos países com relação a áreas contaminadas. Entre estes se destacam o sistema legal e administrativo, as responsabilidades, as regras de propriedade do solo, os históricos industriais, os aspectos culturais e sociais, que definem as atitudes em relação aos bens a proteger, a forma de uso e ocupação do solo, incluindo as pressões de reutilização, os aspectos econômicos e a disponibilidade de recursos e tecnologias (CASARINI, 2001). Dessa forma, o encaminhamento de soluções, por parte dos órgãos que possuem a atribuição de administrar os problemas ambientais, deve contemplar um conjunto de medidas, as quais devem assegurar tanto o conhecimento de suas características e dos impactos por elas causados quanto da criação e aplicação de instrumentos necessários à tomada de decisão, bem como às formas e níveis de intervenção mais adequados, buscando sempre minimizar os riscos à população e ao meio ambiente.

Até o ano de 2009, o único estado que possuía legislação própria que trata da contaminação do solo e das águas subterrâneas era São Paulo, tendo sido ela editado pela CETESB em 2005. Nesta legislação, o naftaleno, por exemplo, apresenta um Valor de Prevenção de $0,12\text{mg.kg}^{-1}$, o que significa que, em concentrações iguais ou superiores a esta, há riscos para a saúde humana e para o ambiente. Na água subterrânea uma concentração igual ou superior a $140\mu\text{g.L}^{-1}$ impõe a necessidade de remediação na área. Antes de 2005, a maioria dos outros estados, incluindo o RS, utilizava também os valores de referência da Lista de Holanda, cujos valores foram atualizados em 2000.

Recentemente o CONAMA publicou a RESOLUÇÃO n° 420, de 28 de dezembro de 2009, que dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Esta normatização vem a favorecer uma política nacional para áreas contaminadas, bem como estabelece um prazo de 4 anos para os órgãos estaduais determinem os Valores Orientadores de Referência de Qualidade (VRQs), de Prevenção e de Investigação baseados especificamente no tipo de solo de cada região. Segundo esta nova Legislação, fica estabelecida as seguintes classes de qualidade dos solos, segundo a concentração de substâncias químicas:

- Classe 1 - Solos que apresentam concentrações de substâncias químicas menores ou iguais ao VRQ; (Valor de Referência de Qualidade);
- Classe 2 - Solos que apresentam concentrações de pelo menos uma substância química maior do que o VRQ e menor ou igual ao VP; (Valor de Prevenção);
- Classe 3 - Solos que apresentam concentrações de pelo menos uma substância química maior que o VP e menor ou igual ao VI; (Valor de Intervenção);
- Classe 4 - Solos que apresentam concentrações de pelo menos uma substância química maior que o VI.

A TABELA 01 mostra alguns dos valores orientadores para solo e água detalhados na Resolução CONAMA n° 420. A nova resolução estabelece que a necessidade de remediação de uma determinada área contaminada por hidrocarbonetos ou metais pesados deve ser feita de forma conjunta pelo uso das concentrações dos contaminantes analisados na área e o risco que a mesma representa para o meio ambiente e para a saúde pública.

TABELA 1 - Valores orientadores para solo e água subterrânea quanto a substâncias químicas.

Substância	Solo (mg.kg ⁻¹ de peso seco) ⁽¹⁾					Água Subterrânea (µg.L ⁻¹)
	Referência de qualidade	Prevenção	Intervenção			Intervenção
			Agrícola	Residencial	Industrial	
Hidrocarbonetos aromáticos voláteis						
Benzeno	na	0,03	0,06	0,08	0,15	5
Estireno	na	0,2	15	35	80	20
Etilbenzeno	na	6,2	35	40	95	300
Tolueno	na	0,14	30	30	75	700
Xilenos	na	0,13	25	30	70	500
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos						
Antraceno	na	0,039	-	-	-	-
Benzo(a)antraceno	na	0,025	9	20	65	1,75
Benzo(a)fluoranteno	na	0,38	-	-	-	-
Benzo(g,h,i)perileno	na	0,57	-	-	-	-
Benzo(a)pireno	na	0,052	0,4	1,5	3,5	0,7
Criseno	na	8,1	-	-	-	-
Dibenzo(a,h)antraceno.	Na	0,08	0,15	0,6	1,3	0,18
Fenantreno	na	3,3	15	40	95	140
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	na	0,031	2	25	130	0,17
Naftaleno	na	0,12	30	60	90	140

Fonte: Resolução CONAMA n° 420.

No Brasil se adota para as substâncias que não constam na Resolução do CONAMA os valores orientadores da Lista Holandesa de 2000. Esta estipula os valores referenciais de qualidade para solo e água subterrânea para Hidrocarbonetos Totais de petróleo. Como exemplo podemos citar um solo com um teor de argila de 25,0% e de matéria orgânica de 10,0%, os Valores de Alerta (T) é 2.525 mg.kg⁻¹ e para o Valor de Intervenção (I) 5.000 mg.kg⁻¹ de referência para verificação da qualidade do solo.

Em termos mundiais, a legislação ambiental existente sobre contaminação por hidrocarbonetos está principalmente nos Estados Unidos, sob competência da Agência Americana de Proteção Ambiental (USEPA), e na União Européia, através da Comissão das Comunidades Européias e da Lista Holandesa de Valores de Qualidade do Solo e da Água Subterrânea, a qual era utilizada por alguns órgãos ambientais brasileiros.

3.3 SISTEMAS DE REMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS

Os solos e sedimentos contaminados por hidrocarbonetos podem ser remediados por métodos *in situ* e *ex situ*. Porém, desde o ponto de vista econômico e ambiental a descontaminação *in situ* está adquirindo uma elevada importância, de modo que, no presente momento, muitos esforços de investigação têm sido utilizados para encontrar métodos adequados para a descontaminação, utilizando técnicas não invasivas.

As tecnologias para descontaminação *in situ* do solo contaminado por hidrocarbonetos podem ser classificado principalmente em dois tipos: físico-químicas e biológicas. Os processos biológicos são baseados na capacidade de vários microrganismos para degradar compostos orgânicos e estes processos foram utilizados com sucesso em ambientes específicos (PENG et al., 2008).

No entanto, como resultado das propriedades dos hidrocarbonetos, muitas técnicas utilizadas para a descontaminação de solos são baseadas em tecnologias físico-químicas. Assim, a descontaminação de solos contaminados por hidrocarbonetos pode ser feita, por exemplo, por lixiviação com surfactante, extração por fluido supercrítico, extração com água quente e bombeamento e tratamento, entre outros (MATURI et al., 2008; RIVAS, 2009). Um resumo das técnicas *in situ* e *ex situ* para a zona não saturada e para a saturada está apresentada na TABELA 02.

TABELA 2 - Exemplos de técnicas de tratamento de solo e água subterrânea.

Exemplos de técnicas de remediação da zona não saturada	
Tratamentos “ <i>ex situ</i> ”:	Lavagem de solo (<i>soil wash</i>)
	Incineração
	Biorremediação: - reatores (<i>slurry phase</i>)
	Sistemas de tratamento de resíduos no solo (p.e. <i>landfarming</i> , biopilhas)
Tratamentos “ <i>in situ</i> ”:	Lavagem de solo (<i>soil flushing</i>)
	Extração de compostos orgânicos voláteis (<i>SVE</i> , <i>bioventing</i>)
	Biorremediação

Exemplos de técnicas de remediação da zona saturada	
Tratamentos “ <i>ex situ</i> ”	Carvão ativado
	Coluna de aeração (<i>air stripping</i>)
	Biorremediação
Tratamentos “ <i>in situ</i> ”	Bombeamento e tratamento (<i>pump and treat</i>), injeção de ar, injeção de vapor.
	Tratamentos químicos (injeção de oxidantes, barreiras reativas, etc.)
	Extração de compostos orgânicos voláteis (<i>air sparging, bioventing</i>)
	Biorremediação e processos eletroquímicos

Ainda, é possível fazer combinações destes processos. Com exemplo pode se citar o uso de nutrientes e uma fonte de oxigênio em conjunto com o sistema de bombeamento e tratamento, o uso de surfactantes para a dessorção de compostos adsorvidos em solo em processos de biorremediação, combinação de injeção de ar e extração de vapor do solo, etc.

3.4 SISTEMA BOMBEAMENTO E TRATAMENTO

De acordo com Langwaldt e Puhakka (2000) os sistemas de recuperação bombeamento e tratamento (Pump-and-treat) de solos e águas subterrâneas entraram em ampla utilização em meados da década de 1980. O sistema tradicional de bombeamento e tratamento contém uma série de poços de recuperação (extração) ou trincheiras interceptoras para bombear a água subterrânea contaminada da subsuperfície. A água subterrânea contaminada é geralmente tratada química, física ou biologicamente. A água subterrânea purificada é reinjetada através de poços de injeção dentro do aquífero. O bombeamento contínuo da água subterrânea contaminada oferece um controle hidráulico dos contaminantes no subsolo para evitar a sua migração.

A disponibilidade dos contaminantes na área remediada é limitada pela fração solúvel do contaminante na água. O bombeamento e tratamento de águas freáticas tem se mostrado muitas vezes ineficaz devido à lenta dessorção, difusão e processos de dissolução dos NAPLs e contaminantes residuais presos no solo (MACKAY e CHERRY, 1989; TRAVIS, 1990). A lenta dessorção dos contaminantes como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)

correlacionam-se com o teor de carbono orgânico do solo e as propriedades dos compostos orgânicos.

A difusão lenta dos contaminantes é preocupante, principalmente se as camadas de baixa permeabilidade ou lentes de argila estão presentes ou se o local foi contaminado por longos períodos antes do início da recuperação. A dissolução lenta, principalmente de substâncias químicas tais como HPAs e NAPLs levam à formação de plumas imiscíveis de contaminantes (MACKAY e CHERRY, 1989).

Em aquíferos heterogêneos, as águas subterrâneas fluem principalmente pelas zonas de alta permeabilidade e reduzem a descarga por camadas de baixa permeabilidade e lentes de argila (BERGLUND E CVETKOVIC, 1995). Esses processos limitantes de transferência de massa exigem que um grande volume de água subterrânea tenha que ser bombeada para atender aos requisitos de limpeza, resultando em longos tempos de bombeamento. Portanto, a maioria dos sítios com águas subterrâneas contaminadas não podem ser remediados com esta abordagem por si só e as os padrões exigidos pelas normas reguladoras de limpeza não podem ser alcançados em um tempo razoável e com custos competitivos.

A FIGURA 1 apresenta um diagrama esquemático do processo de bombeamento e tratamento.

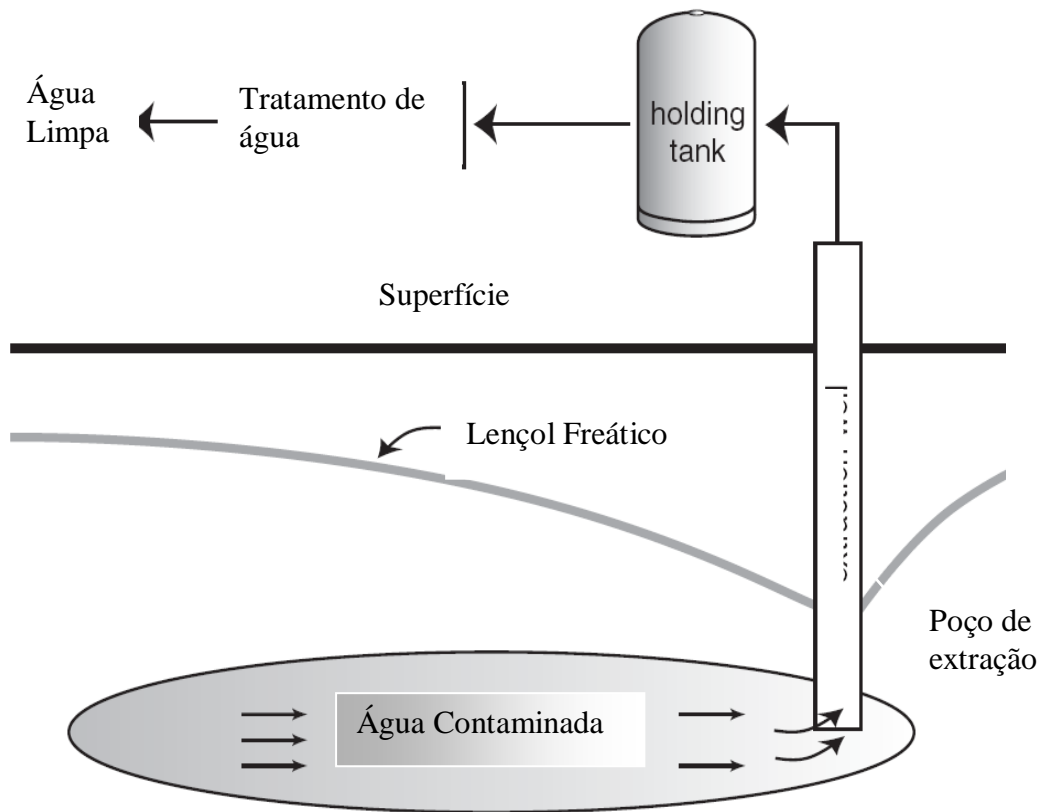


FIGURA 1 - Diagrama esquemático do sistema bombeamento e tratamento.

3.5 SISTEMA EXTRAÇÃO DE VAPOR DO SOLO

Outro processo *in situ* é o de extração de vapor do solo. O sistema de remediação *in situ* extração de vapor do solo (SVE), que normalmente é utilizado em associação com o sistema injeção de ar (*air sparging*), provou ser um meio eficaz de recuperação de solos não saturados que tenham sido contaminados com compostos orgânicos voláteis. Esta técnica consiste na aplicação de vácuo na matriz do solo, o qual produz um fluxo de ar dentro do solo, o qual, devido à volatilização livre, dessorção do solo e dissolução da fase aquosa, transporta os poluentes para os poços de extração. Antes de chegar à atmosfera, o gás geralmente precisa ser tratado, com o objetivo de proteger a qualidade do ar. A introdução de ar por meio de um sistema de injeção de ar no subsolo também aumenta a concentração de oxigênio da zona vadosa, que estimula a biodegradação aeróbia dos poluentes.

As vantagens dos sistemas de SVE sobre as outras tecnologias de recuperação podem ser atribuídas ao seu relativo baixo custo e relativa simplicidade de instalação, operação do

sistema e quantidade mínima de equipamentos necessários. Em todos os métodos *in situ* aplicados nos E.U.A. durante os anos 1980 e 1990, o SVE foi utilizado em 26% dos casos (MARLEY et al., 1992). Os métodos atuais de desenho dos sistemas de SVE são fortemente baseados em abordagens empíricas e limitados ao campo de experiências, em vez de uma base de design racional, porque muito pouco se sabe sobre os mecanismos de transferência de massa que ocorrem durante a utilização do SVE. Além disso, somente um pouco se sabe sobre os efeitos das variáveis de controle, incluindo a taxa de fluxo de vapor, a permeabilidade do solo e os teores de matéria orgânica do solo natural e água (vide FIGURA 2).

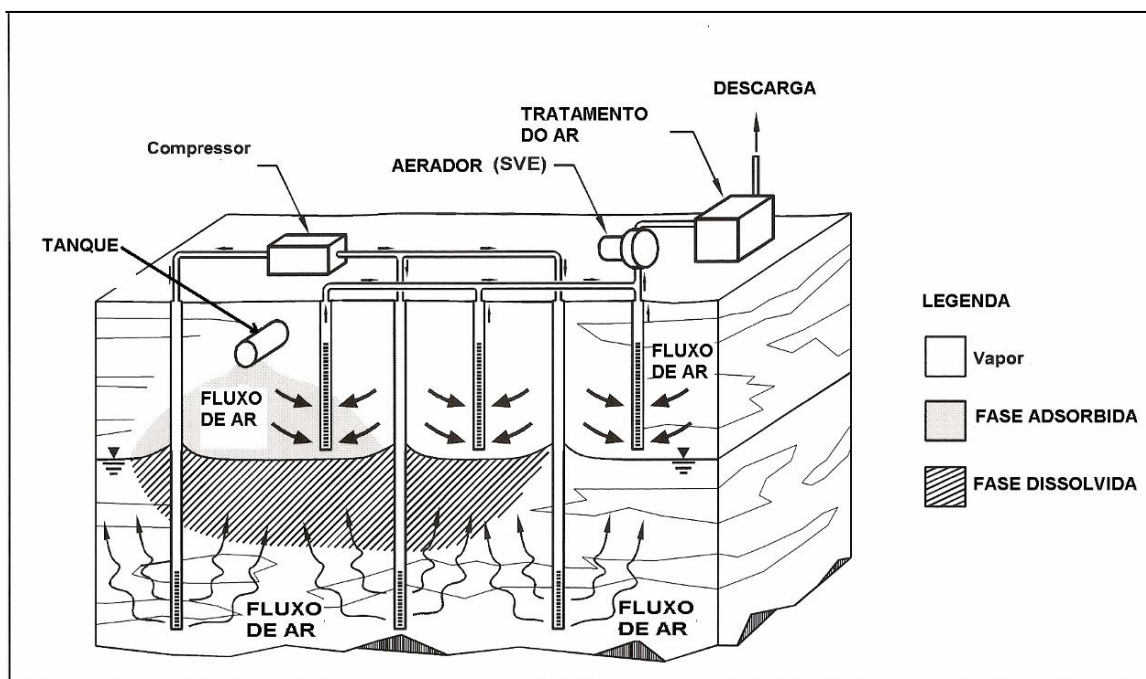


FIGURA 2 - Diagrama do sistema de extração de vapores associado ao sistema de injeção de ar.

3.6 SISTEMA DE INJEÇÃO DE AR

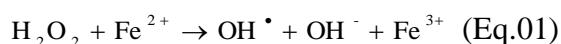
O processo de remediação por injeção de ar (*air sparging*) se tornou uma ferramenta popular para a remediação de águas subterrâneas contaminadas por compostos orgânicos voláteis (COV's), em especial hidrocarbonetos dissolvidos de petróleo (MARLEY e BRUELL, 1995). O sistema consiste em injetar ar abaixo do nível do lençol freático de modo a promover a remoção dos contaminantes dissolvidos na água. Em geral, a remediação por este método é atingida através de dois mecanismos: (a) volatilização, ou seja, transferência do COV dissolvido no ar que está sendo injetado no aquífero e (b) biodegradação do COV

dissolvido por microrganismos (JOHNSON et al., 1993). No entanto, a contribuição relativa da biodegradação é muito questionada. Algumas análises salientaram as vantagens do *air sparging* para introduzir oxigênio abaixo do lençol freático para uso na biodegradação aeróbia, uma vez que a biodegradação é vista como um complemento importante para compostos semi-voláteis e mesmo não voláteis. Alguns pesquisadores têm defendido o uso do sistema *biosparging* no lugar do *air sparging* (injeção de ar em quantidades apenas para promover a atividade microbiológica) que visa minimizar a volatilização em relação à biodegradação (CLARKE et al., 1996). No entanto, faltam estudos de processos detalhados que quantifiquem a contribuição da volatilização e, em particular, da biodegradação aeróbia, para a eficácia global do “air sparging”.

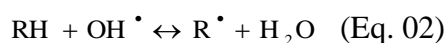
3.7 SISTEMAS DE OXIDAÇÃO QUÍMICA *IN SITU*

Os processos de oxidação *in situ* estão se tornando muito populares na remediação dos solos e águas contaminadas por hidrocarbonetos. De acordo com Gan et al. (2009) as reações de oxidação podem ser utilizadas para remediar solos contaminados com hidrocarbonetos. Diferentes tipos de oxidantes têm sido investigados desde os mais comumente estudados reagentes Fenton e ozônio até os oxidantes menos comuns tais como: permanganato de potássio, ácido peróxido, peróxido de hidrogênio e persulfato de sódio ativados.

O reagente de Fenton (Fe (II)-H₂O₂), desenvolvido em 1980 por Henry John Horstman Fenton, pode ser usado para tratar solos contaminados por hidrocarbonetos. Normalmente, as principais etapas envolvidas na reação de Fenton são os seguintes (FLOTRON et al. 2005): o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) se decompõe em radicais hidroxila (OH[•]) na presença de ferro ferroso (Fe²⁺) de acordo com a seguinte reação:



Os radicais hidroxilas instáveis formados são usados para degradar os compostos orgânicos (RH ou R), quer por abstração de hidrogênio (Eq. 02):



Ou por adição de hidroxila (Eq. 03):



Flotron et al. (2005) investigaram a utilização do reagente de Fenton para estudar possíveis processos de dessorção ou degradação do fluoranteno, benzo (b) fluoranteno e benzo (a) pireno em um solo contaminado. As amostras de solo foram misturadas com água para formar uma suspensão de sólidos antes da adição do Fe(II) e sucessivas adições de soluções de peróxido de hidrogênio para instigar a oxidação por Fenton. Os autores observaram que a degradação quase completa de benzo(a)pireno foi conseguida com uma redução significativa do fluoranteno enquanto que o benzo(b)fluoranteno persistiu à degradação quando usado um excesso na concentração de peróxido de hidrogênio. Também foi observado que vários subprodutos, alguns com uma possível elevada toxicidade, se formaram durante o curso do tratamento.

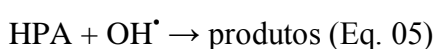
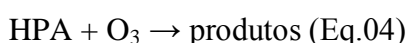
Em outro estudo realizado por Kawahara et al. 2005, o processo de oxidação com reagente Fenton foi utilizado para o tratamento de solos contaminados com creosoto num sítio de tratamento de madeira. Os resultados mostraram que um total de 12 HPA aumentaram suas concentrações numa faixa de 13-56% nas amostras de solo analisadas devido ao enfraquecimento dos laços de adsorção formados pelas complexas moléculas de HPA's com a superfície das partículas do solo. Isto sugere que o reagente de Fenton pode ser usado como um tratamento de remediação primário, que pode proporcionar posteriormente um aumento da eficiência de um tratamento secundário mais eficiente. Segundo Kuwahara et al (2005) trocas de elétrons pelo Ferro estrutural dos minerais da argila e o inchaço das camadas de argilas são os mecanismos de liberação dos HPA's fortemente adsorvidos no solo. Esta dessorção provocada pelo Fenton (e não oxidação como era seria esperada) pode levar a um aumento inconsistente nas análises das concentrações de hidrocarbonetos nas amostras de água subterrânea.

O processo Fenton tradicional obriga a trabalhar em pH's muito ácidos para que o Ferro se mantenha na forma Fe(II). O processo do Fenton modificado utiliza um quelante do Fe(II) e pode trabalhar em pH mais neutros. Este processo também pode ser utilizado como um agente oxidante forte para tratar HPA's mais recalcitrantes. Aqui, além dos radicais hidroxilas, outros radicais altamente reativos são formados através da adição de produtos

químicos como agentes quelantes e/ou concentrações altas de peróxido (WATTS et al., 2000). O trabalho experimental, utilizando reagente de Fenton modificado (catecol como agente quelante) para tratar sedimentos fortemente contaminados, mostrou que a degradação de HAP total foi superior a 95%.

Durante a análise do papel das características do solo no tratamento com o reagente Fenton, Bogan e Trbovic (2003) concluíram que a susceptibilidade de HPA's à oxidação química era função do conteúdo orgânico total (COT) acima do valor de referência de 5%. Para solos com baixo teor de COT, a oxidação depende fortemente da porosidade do solo. Além disso, os HPA's de maior peso molecular tendem a ter mais afinidades pelos ácidos húmicos do solo, deixando-os menos suscetíveis à oxidação pelo reagente Fenton. Os resultados estão de acordo com outro trabalho em que foi demonstrado que a eficiência da oxidação química dos HPA's nos solos é dependente das características do solo e das propriedades dos HPA's (JONSSON et al., 2007). Nesse trabalho, HPA de baixa massa molecular com solubilidades relativamente elevadas na água eram geralmente considerados mais suscetíveis ao tratamento por Fenton do que os seus homólogos mais pesados e altamente hidrofóbicos. Para HPAs de dois ou três anéis, a matéria orgânica, o teor de óxido e a superfície específica do solo afetam negativamente o processo de degradação. Por outro lado, a eficiência de degradação dos HPA de 5 e 6-anéis foram negativamente afetados pela idade da contaminação e pelo pH, mas positivamente correlacionados à matéria orgânica degradada. Isto indica que estes HPA's são liberados e degradados quando a matéria orgânica do solo já sofreu oxidação.

Outro oxidante, o ozônio (O₃) também pode iniciar reações de oxidação indireta pela decomposição em radicais OH. Na oxidação por ozônio, os HPAs sofrem degradação através da reação direta ou através da reação radical, como mostrado pelas equações a seguir, respectivamente (MILLER E OLEJNIK, 2004):



Em um estudo realizado por O'Mahony et al. (2006), ozônio gerado a partir do ar por descargas elétricas foi utilizado para remover vários tipos de fenantreno em solos agrícolas. O

tratamento de solos foi realizado em uma câmara de ozônio em uma temperatura constante de 13 ° C. As análises dos solos tratados mostraram mais de 50% de redução nas concentrações de fenantreno em todos os solos após o tratamento com ozônio por 6 h, numa concentração de 20 ppm. Eles também demonstraram que uma remoção de 85% do fenantreno pode ser alcançada em solos arenosos, se comparado à remoção em solos argilosos, devido aos maiores espaços de poros no solo arenoso, proporcionando melhores condições de transporte do ozônio gasoso através da matriz de solo. O aumentar a umidade demonstrou ter um efeito adverso sobre o tratamento de ozônio já que os HPA's presentes no solo tornam-se menos acessíveis ao ozônio quando a água ocupa os espaços dos poros. Masten e Davies (1997), que também trabalharam com ozônio como agente oxidante de HPA, relataram uma remoção de 95% do fenantreno, 91% do pireno, enquanto que o criseno foi reduzido apenas em 50%, devido à sua natureza mais hidrofóbica. Parecido com o efeito do reagente Fenton, um número não identificado de subprodutos foram simultaneamente descobertos os quais se mostraram ser mais polares do que os compostos iniciais, tendo eles, dessa forma, uma melhor biodegradabilidade e solubilidade em água.

Uma comparação da efetividade do reagente Fenton e da oxidação por ozônio de HPA's intemperizados no tratamento de solos contaminados foi realizada por Jonsson et al. (2006). Eles relataram que o reagente Fenton degradaria de forma mais efetiva os HPAs (eficiência de degradação de 40-86%) se comparado ao ozônio (eficiência de degradação de 10-70%). A degradação dos HPAs de baixa massa molecular foi mais eficiente utilizando ozônio como agente oxidante, enquanto que um padrão de degradação mais uniforme para todas as faixas de HPAs resultou da utilização do reagente Fenton.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um oxidante líquido amplamente utilizado em aplicações ambientais, geralmente em concentrações que variam de 3 a 35% (Rivas, 2006). A dosagem de peróxido de hidrogênio leva à produção de radicais hidroxila OH^\bullet , que são agentes oxidantes não selectivos muito fortes (potencial de oxidação padrão de cerca de 2,8 V), capazes de reagir com alcanos e compostos aromáticos. O peróxido de hidrogênio pode ser usado sozinho, mas não é considerado cineticamente rápido o suficiente para degradar a maioria dos contaminantes orgânicos, antes da sua decomposição ocorrer (FERRARESE et al., 2008).

Como a oxidação do peróxido é exotérmica, estas podem reforçar a dessorção e dissolução de poluentes sorvidos na matriz do solo, tornando-os mais disponíveis para o tratamento por oxidação. Por outro lado, o aumento da temperatura pode causar a migração ou volatilização da contaminação, difundindo-os para o ambiente, o que deve ser levado em consideração na concepção de uma ação de remediação.

Experimentos de laboratório mostraram que os HPAs degradados podem ser mais facilmente oxidados que os poluentes originais, que estão geralmente mais sorvidos nas matrizes sólidas (KONG et al., 1998). Além disso, estudos recentes têm demonstrado que há concorrência entre os HPA's, sendo que as misturas de HPA's apresentam uma cinética de oxidação mais lenta, em comparação com soluções simples de HPA's. Por esta razão, quando se trata de uma matriz com muitos poluentes, uma quantidade maior de reagente do que a necessária para degradar o somatório dos compostos isolados deve ser utilizada. Também foi observado que em casos de baixos teores de contaminação, uma grande quantidade de oxidantes é necessária para oxidar os HPA's fortemente sorvidos com a matriz do solo, o que pode reduzir o custo-eficiência do processo de remediação. Portanto, o tratamento por oxidação parece ser mais indicado às matrizes ambientais altamente contaminadas, como as fontes de contaminação das zonas industriais.

O permanganato (MnO_4^-) é outro agente oxidante, com um potencial de oxidação padrão de cerca de 1,7 V. Ele é efetivo na remediação de muitos hidrocarbonetos de petróleo e tem sido amplamente aplicado em ações de remediação *in situ* e *ex situ* nos últimos anos (HULING & PIVETZ, 2006). Em um sistema aquoso, sais de permanganato geram íons permanganato (MnO_4^-), os quais sofrem a seguinte reação de decomposição:



Tanto o permanganato de potássio (KMnO_4) quanto o permanganato de sódio (NaMnO_4) podem ser usados para aplicações ambientais, com resultados semelhantes. Independente do seu potencial de oxidação Standard (potencial redox padrão) relativamente baixo, os sais de permanganato são considerados agentes oxidantes fortes, capazes de quebrar as moléculas orgânicas que contenham ligações duplas de carbono-carbono, grupos aldeído ou grupos hidroxila (HULING & PIVETZ, 2006). Os mecanismos de oxidação do permanganato em locais contaminados são bastante complexos, uma vez que há numerosas

reações em que o manganês pode participar devido a seus múltiplos estados de valência e formas minerais (BROWN et al., 2003).

Até agora, o permanganato tem recebido pouca atenção como oxidante de HPAs, provavelmente devido à sua incapacidade de atacar o anel de benzeno. No entanto, estudos em escala de bancada têm demonstrado que a oxidação química dos HPAs por permanganato pode ocorrer com reatividade química diferente para diferentes espécies de hidrocarbonetos policíclicos, dependendo da estrutura molecular (isto é, da presença de anéis aromáticos e duplas ligações carbono-carbono).

O persulfato é a forma mais recente de agente oxidante e vem sendo usado para aplicações ambientais. O persulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$) é a forma mais comumente utilizada de sais de persulfato, uma vez que a baixa solubilidade de persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) limita a sua aplicação como agente de remediação (HULING e PIVETZ, 2006). Sais de persulfato se dissociam na água em ânions persulfato (S_2O_8^-), que, apesar de serem oxidantes fortes (potencial redox padrão de cerca de 2,0 V), são cineticamente lentos em destruir a maioria dos contaminantes orgânicos. Como no caso do reagente Fenton, a adição de íons de metais de transição (como íons ferrosos) poderia ativar o ânion persulfato ($\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$) para produzir um poderoso antioxidante conhecido como o sulfato de radicais livres (SO_4^-):



Os radicais livres de sulfato têm um potencial redox padrão de 2,6 V e podem ser capazes de oxidar poluentes orgânicos de forma eficiente.

3.8 SISTEMA LANDFARMING *EX SITU*

Convencionalmente, técnicas *ex situ* como o landfarming, compostagem e pilhas têm sido empregadas para o tratamento de solos em grande escala, enquanto os mais avançados métodos *ex situ*, como o uso de biorreatores, proporcionam um controle da temperatura e pressão favorecendo a processo de biodegradação (ALEXANDER, 1999). Segundo Gan et al., (2009), no processo de *landfarming* o solo é revolvido periodicamente, melhorando assim a aeração e a homogeneidade biológica do solo para a degradação do contaminante. Em outro

estudo Hawthorne et al., (2000), o solo contaminado de uma fábrica de gás manufacturado foi tratado pelo processo de *landfarming*. O solo foi revolvido a uma profundidade de aproximadamente 30 centímetros. O tratamento biológico após 1 ano revelou que foram removidos cerca de 90% dos HPA de baixo peso molecular, enquanto não houve redução de HPA contendo 5 – 6 anéis.

Embora o processo de *landfarming* seja uma técnica simples que exige um custo baixo, pouca manutenção, e monitoramento mínimo, o grau de biodegradação dos hidrocarbonetos não é eficaz em solos contaminados que são altamente tóxicos (WANG et al., 1990). O tratamento é limitado à camada superficial de 10 - 35 centímetros do solo e existe a possibilidade de movimentação do contaminante da área de tratamento devido principalmente às precipitações pluviométricas. A FIGURA 3 apresenta uma fotografia do sistema de *landfarming* utilizado para degradação de borras de petróleo.



FIGURA 3 - Fotografia de um sistema de “landfarming”. Foto do autor.

Segundo Nakatani, (2008) a eficiência do “landfarming” pode ser elevada com a utilização de plantas que estimulam a degradação dos contaminantes, contribuindo para aumentar a eficiência do tratamento de HAPs, de pesticidas, de solventes clorados e de explosivos no solo (SUSARLA et al., 2002), degradando certas frações de hidrocarbonetos

mais resistentes à biodegradação e de elevado risco à saúde humana e ambiental. O efeito estimulante das raízes resulta, em parte, da modificação dos atributos físicos, químicos e biológicos do solo, estimulando as populações microbianas a degradar contaminantes (KIRK et al., 2005).

3.9 BIOPILHAS

O processo de tratamento por meio de biopilha para solos contaminados vem sendo utilizado em escala industrial. O solo retirado é colocado em pilhas e o contaminante presente é reduzido por biodegradação. Segundo Seabra (2005), os parâmetros como umidade, nutrientes, oxigênio, temperatura e pH podem ser controlados para estimular a atividade metabólica dos microrganismos presentes no solo. Se ao composto preparado é adicionada matéria orgânica, o mesmo é considerado um processo de compostagem (JØRGENSEN et al., 2000)

A biopilha é composta por uma base impermeável para reduzir o potencial de migração dos lixiviados. A distribuição do ar é realizada por tubos perfurados instalados na parte interna inferior da pilha, e conectados a um compressor que permite o suprimento de ar no processo. Em alguns casos, o lixiviado pode ser recirculado, principalmente quando se utiliza o sistema de controle da umidade. As pilhas são, geralmente, cobertas por plástico para evitar a liberação de contaminantes para a atmosfera, bem como, para protegê-la das intempéries (USEPA, 1994). A FIGURA 4 mostra um diagrama de uma biopilha. Na TABELA 3 se apresentam as vantagens e desvantagens do uso de biopilhas.

A temperatura do solo é considerada um dos parâmetros fundamentais para o monitoramento da biodegradação dos compostos orgânicos. Segundo USEPA (2004), os microrganismos dobram sua atividade metabólica e enzimática, teoricamente, a cada aumento de 10 °C de temperatura, até atingir temperaturas inibitórias, usualmente, em torno de 40-50°C, para a maioria dos microrganismos. A diminuição da temperatura pode influenciar indiretamente a biodegradação de um componente ou mistura, pela mudança de suas propriedades físicas, químicas ou toxicidade à microflora.

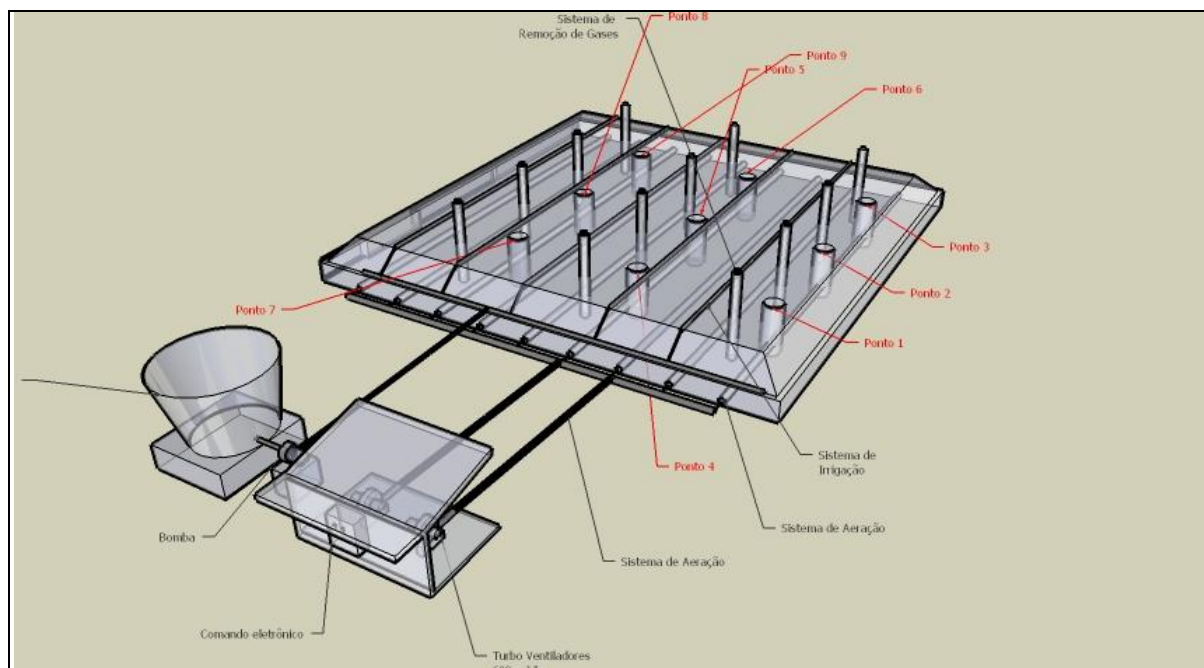


FIGURA 4 - Representação gráfica de uma biopilha.

TABELA 3 - Vantagens e desvantagens das biopilhas.

VANTAGENS	DESVANTAGENS
Projeto e implementação relativamente simples	Diminuição da concentração > 90% e concentração de contaminantes < 0,1 ppm são muito difíceis de atingir
Curtos períodos de tratamento	A efetividade pode ser reduzida para altas concentrações dos contaminantes > 50.000 ppm de HTP)
Efetiva em constituintes orgânicos com baixa taxa de biodegradação	Concentrações de metais pesados > 2.500 ppm podem dificultar o crescimento microbiano
Necessita menor área do que “landfarms”	Substâncias voláteis tendem a evaporar, sem serem biodegradados durante o tratamento
Possibilidade de projetar o sistema sem emissões de vapores que podem ser controladas	Necessita de área considerável para tratamento embora menor que “landfarms”
	A geração de vapor durante a aeração pode requerer tratamento antes do descarte
	Pode requerer piso especial se o lixiviado da biopilha for um problema

Fonte: USEPA, 2004.

Segundo um estudo de Jørgensen et al., (2000), as medidas da temperatura durante o tratamento de um solo contaminado com óleo lubrificante mostrou claramente um aumento da temperatura da pilha durante o primeiro mês de compostagem. Nesse trabalho, as temperaturas máximas nas biopilhas com solo, inóculo e nutrientes ficaram entre 35°- 40°C.

Para atingir o desenvolvimento os microrganismos do solo requerem condições de umidade adequadas ao processo de biopilhas. Segundo Silva (2004), a umidade excessiva no

solo, contudo, restringe o movimento do ar através do subsolo reduzindo, assim, a disponibilidade de oxigênio, o qual é essencial para os processos metabólicos aeróbios das bactérias. Em geral, os solos devem ser úmidos, mas não devem ser molhados. A faixa ideal para a umidade do solo deve estar entre 40 e 70% da capacidade de retenção de água (capacidade do campo) do solo ou de aproximadamente 12 a 30 % em peso. Periodicamente, umidade deve ser adicionada à biopilha porque o solo se torna seco como resultado da evaporação, que é aumentada durante as operações de aeração. Um acúmulo excessivo de umidade pode ocorrer dentro das biopilhas em áreas com alta precipitação ou drenagem pobre. Estas condições devem ser consideradas no projeto da biopilha. Por exemplo, uma capa impermeável pode mitigar o excesso de infiltração e o potencial de erosão da biopilha. A TABELA 4 mostra a faixa ótima para o teor de umidade (LOPEZ et al.,2009).

TABELA 4 - Condições necessárias para a boa operação de uma biopilha.

Fator Ambiental	Condições Ótimas
Umidade do solo	25-85% (use 60-70%)
Oxigênio	>0,2 mg/l OD; >10% de espaço de poro preenchido com ar para degradação aeróbica.
Potencial Redox Padrão	Eh> 50 mV
Nutrientes	C:N:P = 100-150:10:1
pH	5,5 – 8,5
Temperatura	15-50 °C

Fonte: Lopez et al., 2009

O pH do solo influencia os processos de biorremediação. Segundo Seabra (1998), a maioria das bactérias vive na faixa de pH de 6 a 8, com um valor ótimo, em geral, um pouco acima de 7. Uma mudança no pH pode causar alteração na comunidade microbiana, uma vez que cada espécie possui um pH ótimo específico. De modo geral, poucos são os solos que necessitam de ajuste radical de pH antes da preparação de uma biopilha. Se o pH é muito ácido, adiciona-se cal para aumentá-lo. No caso de o pH ser muito básico, pode-se adicionar sulfato de amônia ou sulfato de alumínio para reduzi-lo (HUESEMANN, 1994).

Os microrganismos do solo necessitam de nutrientes tais como Nitrogênio e Fósforo para promover o crescimento celular e manter os processos de biodegradação. Segundo Silva

(2004), estes nutrientes podem estar disponíveis em quantidades suficientes no local, porém, freqüentemente, precisam ser adicionados à biopilha para manter as populações microbianas. Contudo, quantidades excessivas de certos nutrientes (por exemplo, fosfato e sulfato) podem reprimir o metabolismo microbiano. A relação típica Carbono: Nitrogênio: Fósforo necessária para a biodegradação está na faixa de 100:10:1 a 100:1:0,5; dependendo dos constituintes específicos e dos microrganismos envolvidos nos processos de biodegradação (USEPA, 1994). Lopez et al. (2009) introduziram inovações na construção de biopilhas para remediação de solos contaminados por hidrocarbonetos. Os mesmos adicionaram dejetos retirados da criação de animais, ricos em N e P. Esses autores ainda constataram que os dejetos, além de serem ricos em nutrientes, continham uma grande quantidade de microrganismos (fungos e bactérias) com capacidade de degradar hidrocarbonetos. A TABELA 5 mostra a estrutura química dos contaminantes e a sua biodegradabilidade.

TABELA 5 - Estrutura química e biodegradabilidade dos contaminantes.

Biodegradabilidade	Constituintes	Produtos
Mais degradável	n-butano, l-pentano, n-octano,	Gasolina
	Nonano	Diesel
	Metil butano, Dimetilpentanos,	Gasolina
	Metiloctanos	
	Benzeno, tolueno, Etilbenzeno, xilenos	Gasolina
	Propilbenzenos	Diesel, Querosene
	Decanos	Diesel
	Dodecanos	Querosene
	Tridecanos	Comb. de aquecimento
	Tetradecanos	Óleos lubrificantes
Menos degradável	Naftalenos	Diesel
	Fluorantenos	Querosene
	Pirenos	Óleo de aquecimento
	Acenaftenos	Óleos lubrificantes

Fonte: EPA, 2004.

A adição de materiais estruturantes ao solo torna suas características físicas mais propícias a biorremediação. Segundo Santos et al., (2007), solos com uma baixa permeabilidade, por exemplo, são difíceis de arejar, e freqüentemente formam aglomerados, tornando difícil a distribuição de umidade, ar, adição de nutrientes (bioestimulação) e de microrganismos (bioampliação). Desta forma, materiais de baixa densidade (agentes estruturantes) são adicionados ao solo para reduzir a sua densidade bruta, aumentar a

porosidade e possibilitar maior difusão de oxigênio. Alguns trabalhos encontrados na literatura reportam o aumento da degradação de compostos orgânicos em sistemas de compostagem ou de *landfarming*, utilizando agentes estruturantes, como cavacos de madeira, palha, feno de grama, diferentes tipos de resíduos agroindustriais, além de materiais inorgânicos como avermiculita (RHYKERD *et al.*, 1999; MOLINA-BARAHONA *et al.*, 2004).

3.10 BIORREMEDIAÇÃO

Segundo Alexander (1999), os processos biológicos podem modificar as moléculas orgânicas no local da sua descarga ou durante o seu transporte. Tais transformações biológicas, as quais envolvem enzimas e catalisadores, freqüentemente acarretam modificações extensas na estrutura e nas propriedades toxicológicas dos poluentes. Estes processos bióticos podem resultar na completa conversão das moléculas orgânicas em produtos inorgânicos, causando mudanças que resultam em novos compostos químicos, ou ocasionalmente levam apenas a pequenas modificações. As plantas, e os animais em menor escala, podem causar numerosas mudanças numa ampla gama de compostos químicos, as quais são de enorme importância, reduzindo, e algumas vezes, aumentando a toxicidade dos compostos químicos aos quais as plantas e animais estão expostos. Porém, a maior parte das informações existentes na bibliografia sugere que os maiores agentes causadores de transformações biológicas nos solos, sedimentos, efluentes, águas superficiais e subterrâneas são os microrganismos que habitam estes ambientes. Para Alexander (1999), esta microflora presente é o maior agente que afeta o destino dos compostos químicos nos locais em que são liberados ou pelos locais por onde passam.

Dessa forma, a biodegradação pode ser definida como a redução biologicamente catalisada da complexidade dos compostos químicos, na presença de oxigênio (processo aeróbio) ou na ausência deste (processo anaeróbio). No caso dos compostos orgânicos, a biodegradação leva, embora não necessariamente, à conversão do C, N, P, S e outros elementos de seus compostos orgânicos originais em produtos inorgânicos. A conversão de um substrato orgânico em produtos inorgânicos é denominada de *mineralização*.

Para Neilson e Allard (2000), em condições aeróbicas, a biodegradação resulta na mineralização de compostos orgânicos a dióxido de carbono e água e, se o composto contém

nitrogênio, enxofre, fósforo ou cloro, com a liberação de amônio (ou nitrito), sulfato, fosfato ou cloreto. Estes produtos inorgânicos podem então entrar novamente nos seus ciclos biogeoquímicos já bem estabelecidos. Sob condições anaeróbicas, o metano pode ser formado, além de dióxido de carbono, e o sulfato pode ser reduzido a sulfito. É importante não confundir a biorremediação com a biotransformação. Em contraste à biorremediação, a biotransformação envolve apenas um número restrito de reações metabólicas, e a estrutura básica da molécula pode permanecer essencialmente intacta. Embora a biodegradação e a biotransformação sejam duas alternativas diferentes, elas não são mutuamente excludentes.

Para que aconteça a biodegradação dos compostos orgânicos, muitas condições devem ser satisfeitas em um determinado ambiente. Segundo Neilson e Allard (2000), estas incluem: (a) um microrganismo que tenha a enzima adequada para que a biodegradação tenha início. A mera existência de um microrganismo com o potencial catabólico apropriado é necessária, mas não suficiente para que a biodegradação ocorra. (b) Este organismo deve estar presente no ambiente que contenha o contaminante. Embora muitos organismos estejam presentes essencialmente em cada ambiente perto da superfície da terra, ambientes particulares podem não conter o microrganismo com as enzimas necessárias. (c) O composto químico deve estar acessível ao organismo que tenha as enzimas necessárias. Muitos compostos químicos persistem mesmo em ambientes que tenham as espécies biodegradantes, simplesmente porque o organismo não teve acesso ao composto que ele poderia, de outra forma, metabolizar. A inacessibilidade pode se dar pelo fato de que o substrato se encontra em outro microambiente que o organismo, está em uma fase solvente imiscível com a água ou adsorvida numa superfície sólida. (d) Presença de uma população de bactérias e fungos em números adequados para realizar a biodegradação.

Uma vez que um microrganismo não pode realizar a biodegradação sozinho, consórcios de microrganismos são mais efetivos por causa da interação entre eles. Todavia, a competição entre os microrganismos pelos recursos disponíveis é intensa; os resultados dependem de vários fatores, incluindo as taxas de captação de nutrientes, as taxas metabólicas inerentes e, finalmente, as taxas de crescimento. Em vez de competir diretamente pelos mesmos recursos, alguns microrganismos trabalham em conjunto para realizar uma transformação específica, a qual nenhum dos organismos seria capaz de realizar individualmente. Esses tipos de interações microbianas, denominadas sintrofia, são cruciais ao sucesso competitivo de determinadas bactérias anaeróbicas. A cooperação metabólica pode

também ser observada nas atividades de organismos que realizam metabolismos complementares. Por exemplo, as transformações metabólicas envolvendo dois grupos distintos de organismos, tais como as bactérias nitrosificantes e as nitrificantes, as quais se associam para oxidar NH_3 a NO_3^- , embora nenhum grupo seja capaz de realizar tais reações individualmente. Uma vez que o produto das bactérias nitrosificantes (NO_2^-) corresponde ao substrato das bactérias nitrificantes, tais organismos vivem tipicamente em estreita associação (MADIGAN et al., 2004).

A biorremediação *in situ*, que envolve o uso de microrganismos naturais para degradar o composto-alvo do aquífero, vem recebendo crescente atenção por sua efetividade e reduzidos custos comparados a outras técnicas de remediação. Outras vantagens da biorremediação incluem o mínimo distúrbio da área, o volume reduzido de geração de resíduos, reduzido potencial de exposição humana a meios contaminados e conversão de BTEX e outros hidrocarbonetos em produtos inofensivos tais como CO_2 e H_2O (ALVAREZ, 2004).

De acordo com Frankenberger (1992) apud Bento et al. (2005), a biorremediação é uma abordagem atraente para a remoção de hidrocarbonetos de petróleo, porque é simples de manter, aplicável em grandes áreas, boa relação custo-benefício e leva à destruição total do contaminante. Para garantir uma aplicação prática, qualquer processo de biorremediação deve demonstrar que a remoção de contaminantes é o principal efeito da biodegradação, e que a taxa de degradação é maior do que a taxa natural de descontaminação. Uma das dificuldades de desenvolver estratégias de biorremediação é conseguir resultados tão bons ou melhores em campo como no laboratório (JUHASZ et al., 2001).

As estratégias para uma biorremediação a custo reduzido e natural incluem: atenuação natural, a bioestimulação, bioventilação, bioampliação, *landfarming*, compostagem e fitorremediação (SKIPPER, 1999). A biorremediação de óleo diesel no solo pode ser promovida pela estimulação dos microrganismos endógenos, através da introdução de nutrientes e oxigênio no solo (bioestimulação) ou através de inoculação no solo de um consórcio microbiano enriquecido (bioampliação) dependendo das condições do solo e da estrutura da comunidade microbiana (SEKLEMOVA et al., 2001). As diretrizes da USEPA sugerem que a biorremediação é viável quando há cerca de 10^3 UFC/g de solo da população microbiana. No entanto, uma baixa população microbiana e diversidade microbiana

insuficiente afetam a eficiência da biorremediação. De acordo com Alexander (1999), a eficiência da biorremediação é uma função da capacidade dos degradadores microbianos inoculados ou endógenos em permanecerem ativos no ambiente natural. Portanto, aumentar a capacidade dos microrganismos degradadores inoculados por meio da bioampliação ou promover a atividade dos microrganismos degradadores endógenos por bioestimulação poderia melhorar a eficiência da biorremediação.

Para se obter ótimas condições de biodegradação é importante conhecer as características do local contaminado, antes de iniciar os tratamentos. Informações básicas, como a concentração de óleo residual, a densidade populacional dos microrganismos degradadores de petróleo e do potencial de biodegradação, são fatores fundamentais a considerar para a biorremediação de petróleo em locais poluídos. Na maioria dos estudos de campo, a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo depende da população microbiana específica presente. A composição da população microbiana é afetada pelas condições ambientais e pela composição dos hidrocarbonetos (ADMEN et al., 2001).

De acordo com Bennet et al. (2001), duas grandes estratégias biológicas têm sido empregadas para aumentar a eficácia da biorremediação em ensaios de campo. A primeira é a estimulação da população endógena, geralmente através da adição de nutrientes. Esta prática é chamada bioestimulação, e as aplicações bem sucedidas incluem o seu uso em derramamentos marinho de óleo e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). Nitrogênio e fósforo são os nutrientes mais comumente adicionados. A compostagem e a biopilha são outra forma de bioestimulação. Nesta prática, misturas de palha, esterco, resíduos agrícolas e similares são misturadas com o solo contaminado, estimulando o crescimento de vários consórcios de bactérias e fungos (BENNET et al., 2001).

A segunda estratégia biológica é a adição controlada de determinados microrganismos para o ambiente (BENNET et al., 2001). Esta prática é chamada de bioampliação; os microrganismos introduzidos não substituem a população residente. As espécies introduzidas podem ou não já estar presentes no local contaminado. Em alguns casos, a bioampliação é complementada com um nutriente, em outros casos a complementação não é utilizada. Seja qual for a abordagem, a conclusão geral é que os organismos que são eficientes em condições de laboratório não se saem tão bem no mundo real. Em condições naturais, os microrganismos de laboratório têm de competir com os microrganismos já estabelecidos das comunidades

endógenas e podem sucumbir a uma variedade de predadores. Além disso, muitas vezes há um descompasso entre o habitat normal das espécies introduzidas e os nichos ecológicos em que é colocado. Os microrganismos criados em laboratório são produzidos em ambientes séptico-esterilizados, enquanto que no solo as condições são totalmente diferentes. Finalmente, quando a bioestimulação e a bioampliação são usadas simultaneamente, é comum que os nutrientes adicionados favoreçam as populações endógenas.

3.11 MICRORGANISMOS RELEVANTES À BIORREMEDIAÇÃO

Como já foi exposto anteriormente, a biorremediação é uma tecnologia que utiliza o potencial metabólico dos microrganismos para limpar ambientes contaminados. Uma característica importante da biorremediação é que ela é realizada em ambientes abertos não-estéreis, que contêm uma variedade de organismos. Destes, as bactérias capazes de degradar poluentes, geralmente têm um papel central na biorremediação, enquanto que outros organismos (por exemplo, fungos e protozoários), também afetam o processo. Uma compreensão mais profunda da ecologia de sítios contaminados é, dessa forma, necessária para melhorar os processos de biorremediação.

Microbiologistas perceberam que as populações microbianas são muito mais diversificadas do que as estudadas e detalhadas nos catálogos de microrganismos isolados. Este é também o caso de microrganismos degradadores de poluentes, o que implica que o ambiente natural abriga uma grande variedade de microrganismos não identificados, que têm um papel crucial na biorremediação.

Curiosamente, apesar de que na literatura se afirma que os consórcios locais são geralmente mais eficazes do que a única espécie exógena, tem havido relativamente pouca pesquisa sobre bioampliação com culturas mistas. O uso de culturas mistas de microrganismos eucariotos e procariotos pode ser mais eficiente na biodegradação do petróleo, por ser este uma mistura complexa de compostos (BALBA et al., 1998). Muitos trabalhos quanto à biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo demonstraram o uso de consórcio de microrganismos (LAZAR et al., 1999; JØRGENSEN et al. 2000; LI et al., 2000; VASUDEVAN e RAJARAM, 2001), pois, a capacidade biodegradativa deste é maior quantitativamente e qualitativamente quando comparado com a cultura pura. Em ecossistemas naturais, a capacidade dos fungos de biorremediar os solos é através da colaboração com

bactérias. Seigle-Murandi et al. (1996) mostraram que entre 10 isolados naturais de *P. chrysosporium*, uma ou mais espécies bacterianas estiveram sempre presentes. A natureza específica da relação entre fungo e bactéria não foi elucidada, mas parece provável que eles trabalham juntos em habitat naturais (SEIGLE-MURANDI et al., 1996).

A comunidade mista pode também apresentar maior resistência frente às substâncias tóxicas, pois é maior a probabilidade de que um organismo que tenha a capacidade de detoxificá-las estar presente. Finalmente, sendo o petróleo e seus resíduos macromoléculas, a utilização de culturas mistas permite uma sucessão de ataques aos mesmos, proporcionando no final uma completa degradação do poluente (KATAOKA, 2001).

O primeiro passo para a degradação microbiana de HPAs é a ação da dioxigenase, que incorpora átomos de oxigênio a dois átomos de carbono de um anel de benzeno no HPA, resultando na formação de cis-Di-hidrodiol (KANALY e HARAYAMA, 2000), que por sua vez sofre um processo de re-aromatização por meio de desidrogenases para formar intermediários di-hidroxiolados. A FIGURA 5 mostra os caminhos da biodegradação de fluoranteno por bactérias.

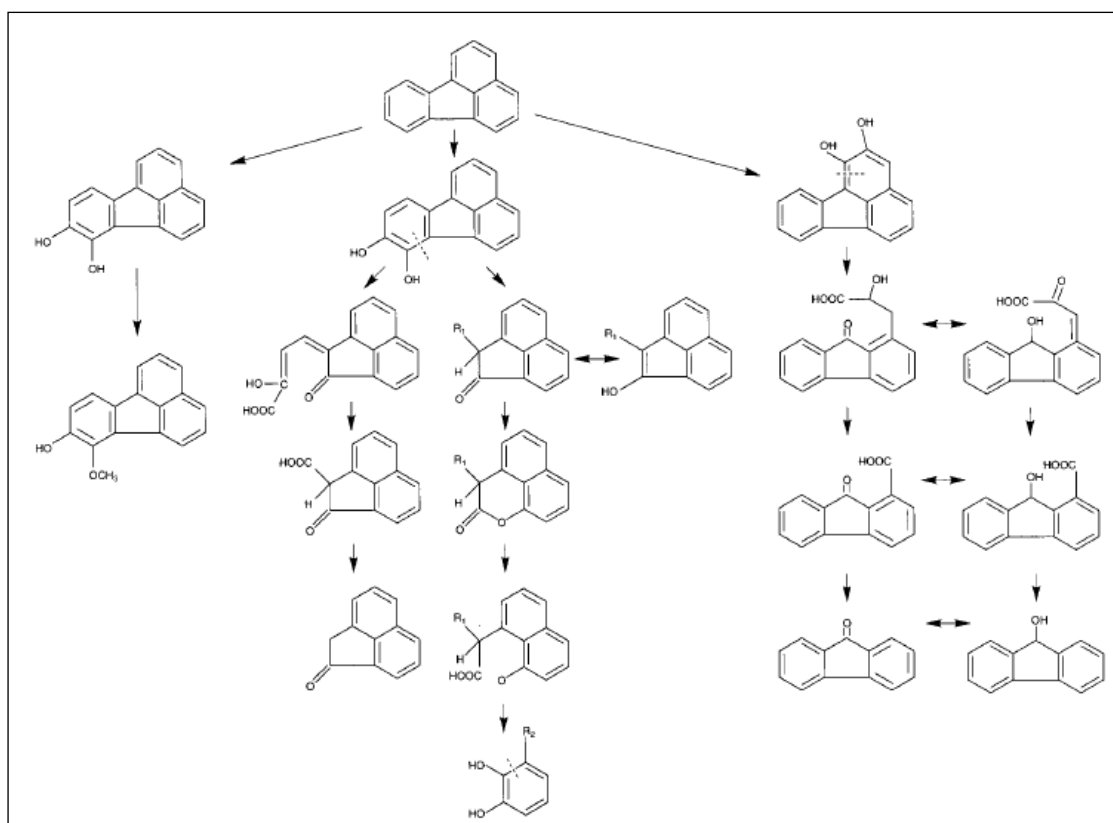


FIGURA 5 - Vias de degradação de fluoranteno por bactérias (KANALY E HARAYAMA, 2000).

Um grande número de microrganismos degradadores de naftaleno- (incluindo *Alcaligenes denitrificans*, *Mycobacterium sp.*, *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *P. paucimobilis*, *P. vesicularis*, *P. cepacia*, *P. testosteroni*, *Rhodococcus sp.*, *Corynebacterium venale*, *Bacillus cereus*, *Moraxella sp.*, *Streptomyces sp.*, *Vibrio sp.* e *Cyclotrophicus sp.*) foi isolado e estudado para a mineralização de compostos orgânicos (HEDLUND A JAMES, 2001; SAMANTA et al. 2001). Tem havido muitos relatos de degradação de fenantreno por diferentes bactérias, incluindo *Aeromonas sp.*, *Alcaligenes faecalis*, *A. denitrificans*, *Arthrobacter polychromogenes*, *Beijerinckia sp.*, *Micrococcus sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Pseudomonas putida*, *P. paucimobilis*, *Rhodococcus sp.*, *Vibrio sp.*, *Nocardia sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Streptomyces sp.* e *Bacillus sp.* (SAMANTA et al. 2001; JOHR et al., 1999).

Nas últimas décadas, a investigação sobre a biodegradação bacteriana de compostos HPAs com mais de três anéis tem avançado significativamente. Dos HPAs com quatro anéis aromáticos, a biodegradação de fluoranteno, pireno, criseno e benzo[a]antraceno foi investigada em vários níveis (KANALY E HARAYAMA, 2000 e JUHASZ et al., 2001). A *Stenotrophomonas* VUN 10 003 foi estudada para a degradação do fluoranteno e co-metabolização de outros HPA's, incluindo pireno, benzo[a]antraceno e coroneno em um meio líquido. Metabólitos de fluoranteno resultantes da degradação por *Mycobacterium sp.* têm sido notificados e demonstraram que > 95% do fluoranteno podem ser degradados se nutrientes orgânicos eficientes são fornecidos a eles em um meio mineral. Vários actinomicetos, como *Mycobacterium SP.*, *Gardona Sp.* e *Rhodococcus sp.*, foram isolados em diferentes solos contaminados com hidrocarbonetos e cada uma delas utilizava fluoranteno, pireno e criseno como sua única fonte de carbono e de energia (BASTIAENS et al. 2000). Uma variedade de bactérias, como *P. putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium sp.* e *Cycloclasticus sp.*, tem sido investigada para ver se conseguem metabolizar benzo(a)antraceno, criseno, fluoranteno e pireno (KANALY e HARAYAMA, 2000; WATANABE, 2001). Alguns estudos também documentaram a degradação bacteriana de compostos com cinco ou mais anéis em amostras ambientais e de culturas puras ou mistas. No entanto, a maioria das pesquisas tem sido orientada no sentido do benzo[a]pireno, uma molécula de cinco anéis, abundantemente presente como um componente ativo do alcatrão de carvão. Embora BaP fosse detectado em uma variedade de amostras ambientais (KANALY e

HARAYAMA, 2000), até agora, nenhum microrganismo foi identificado como podendo usar BaP como única fonte de carbono e energia. A ligeira deterioração do BaP em uma mistura de seis componente de HPAs foi relatada com *Mycobacterium sp.* (KELLY E CERNIGILIA, 1995).

Nas últimas décadas, uma variedade de microrganismos foi isolada e caracterizada de acordo com a sua capacidade de degradar diferentes HPAs, e novos caminhos para a degradação destes compostos foram elucidados. Porém, mais pesquisas são necessárias para explorar as interações microbianas dentro de consórcios degradadores de hidrocarbonetos, os mecanismos que controlam a biodegradação de HPA's estruturados de vários anéis, bem como a biodegradação co-metabólica de HPA's.

Os fungos desempenham um papel importante na bioremediação. Suas características morfológicas, estratégias fisiológicas e reprodutivas tornam adequados para os habitats terrestres. No entanto, o fato é que a maioria das aplicações bem sucedidas tem sido realizada em laboratório, e que os ensaios de campo têm sido afetados por resultados abaixo do ideal. Parâmetros físicos, tais como aeração, umidade, nutrientes, pH, temperatura e nível de contaminantes tóxicos interagem com os sistemas de forma imprevisível. Parâmetros biológicos, como a predação e a concorrência das populações microbianas também contribuem à variabilidade de resultados nos processos de biorremediação *in situ* (BENNET et al., 2001).

Os fungos são capazes de degradar os contaminantes ambientais, tanto em cultura pura e em solo esterilizado. O potencial de biorremediação pode ser aumentado com a otimização dos parâmetros ambientais, juntamente com a seleção de cepas com características desejáveis como: rápido crescimento, alta taxas de sobrevivência em altas concentrações de contaminantes. (BENNET et al, 2001).

Schaeffer et al. (1979) apud Morais (2005) isolaram 27 linhagens microbianas com a capacidade de degradar octano. Destas, apenas 9 conseguiram degradar o composto ramificado dimetiloctano como única fonte de carbono e energia, revelando que hidrocarbonetos ramificados podem inibir a biodegradação. Estes microrganismos com esta habilidade em degradar compostos ramificados pertenceram aos gêneros bacterianos

Brevibacterium, Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia e Pseudomonas e aos gêneros fúngicos *Aspergillus, Cunninghamella e Eupenicilium*.

Bactérias, fungos e bolores são os principais agentes biotransformadores devido à habilidade em degradar uma ampla variedade de substâncias xenobióticas, normalmente encontradas em resíduos de indústrias de óleo (URURAHY et al., 1998). Bactérias e leveduras aparentam ser os principais responsáveis pela degradação dos hidrocarbonetos em ambientes aquáticos enquanto que fungos e bactérias são dominantes no solo (MORAIS, 2005).

3.12 ATIVIDADE BIOLÓGICA NOS SOLOS CONTAMINADOS

O derramamento de derivados de petróleo (principalmente de hidrocarbonetos alifáticos) produz uma deterioração importante das propriedades físicas do solo e uma grande variação na diversidade microbiana do solo, (MALISZEWSKA-KORDYBACH e SMRECZAK, 2000; GIANFREDA et al., 2005), com um aumento considerável na presença de microrganismos que degradam os hidrocarbonetos (AISLABIE et al., 2004). Este fato se reflete pelas variações observadas nos níveis de diferentes atividades enzimáticas no solo (BARAN et al., 2004).

Os microrganismos do solo, estando em contato íntimo com esse ambiente, são muito sensíveis a qualquer perturbação do ecossistema, e são, portanto, considerados os melhores indicadores de poluição do solo (ANDREONI et al., 2004) devido a que: (i) são uma medida da atividade microbiana do solo e, portanto, estão estritamente ligados aos ciclos dos nutrientes e transformações, (ii) podem responder rapidamente às mudanças causadas por fatores naturais e antrópicos e (iii) são fáceis de medir. Por estas razões, as atividades enzimáticas do solo podem ser consideradas indicadores precoces e sensíveis para medir o grau de degradação do solo em ecossistemas naturais e agrícolas, sendo, portanto, bem adequado para avaliar o impacto da poluição sobre a qualidade do solo (BARAN et al. 2004; LABUD et al., 2007).

As análises de hidrocarbonetos alifáticos podem ser utilizadas para identificar um derrame de óleos e para fornecer informações adicionais sobre a fonte de contaminação de hidrocarbonetos e ao grau de degradação do óleo derramado (WANG et al., 1990) e (ZHU et

al., 2005). O monitoramento de indicadores de biodegradação tais como o n-C17/pristano e n-C18/fitano fornece por um período de tempo, uma medida dos efeitos da degradação microbiana sobre a perda de hidrocarbonetos no local do derramamento (WANG et al., 1990). Estes indicadores são utilizados uma vez que a degradação do pristano e o fitano serão geralmente consideradas desprezíveis quando os n-alcenos ainda estão disponíveis como substratos. Essa resistência à degradação pode ser o resultado da maior complexidade das estruturas moleculares dos compostos ramificados (ou seja pristano e fitano) em comparação com alcenos lineares (POND et al., 2002; HEJAZI e HUSAIN, 2004).

Os poluentes introduzidos no solo têm influência sobre a microbiota, que se manifesta em mudanças na sua atividade enzimática, respiração do solo, biomassa e contagem microbiana. Estes parâmetros são mais frequentemente utilizados para a descrição do estado geral de microrganismos do solo (SCHINNER et al. 1996; MARGESIN e SCHINNER, 1999; VAN BEELEN e DOELMAN, 1997).

As enzimas do solo são as catalisadoras de importantes processos metabólicos, incluindo a decomposição de compostos orgânicos introduzidos e a desintoxicação de xenobióticos (MARGESIN et al., 2000a). Vários autores realizaram estudos da influência dos pesticidas, metais pesados (BROOKES, 1995; LEIROS et al., 1999) e de outros poluentes (FRANKENBERGER e JOHANSON, 1982) sobre a atividade enzimática do solo. Testes enzimáticos são usados também quando a intensidade dos processos de remediação em solos deve ser determinada (MARGESIN et al., 2000b).

Trabalhos de pesquisa de Margesin et al., (2000b) se concentraram na relação entre atividade enzimática e degradação de HPAs. Esta é uma questão muito interessante porque leva em consideração a diferenciação das propriedades físico-químicas destes compostos (resultantes principalmente da relação número de anéis da molécula / peso molecular). Alguns dos compostos pertencentes ao grupo com ≤ 4 anéis são moderadamente tóxicos e biodegradáveis por microrganismos, enquanto o grupo restante (> 4 anéis) tem um caráter fortemente tóxico, mutagênico e cancerígeno, e sua decomposição só é possível através de co-metabolismo (KANALY e HARAYAMA, 2000).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONSTRUÇÃO DA BIOPILHA

O presente trabalho foi realizado em uma Base de Distribuição de combustíveis no Estado do Rio de Janeiro. Neste local em 2008 foi realizada uma avaliação ambiental da contaminação do solo e da água subterrânea ao redor da área. Estes levantamentos consistiram na retirada de amostras de solo e água subterrânea de diferentes pontos de amostragem para posterior análise das concentrações de hidrocarbonetos.

Os trabalhos na área objeto deste estudo foram iniciados em Dezembro de 2009 com a retirada do solo da área contaminada. Durante a retirada do solo, foi realizada uma avaliação do nível de contaminação do solo por meio da medição dos compostos orgânicos voláteis (VOC's). O monitor portátil de gases modelo - GASTECH INNOVA armazena continuamente leituras de níveis de Limites de Exposição a Curto Prazo (STEL) e Médias (TWA), além das leituras de pico. O equipamento determina a concentração em ppm dos VOC's, com exclusão do metano, necessária para a quantificação total dos hidrocarbonetos voláteis.

As medições dos VOC's têm como finalidade, determinar e quantificar a presença de gases junto ao solo da área. Para realização das medições, foi seguida a metodologia *Head Space*, que consiste no armazenamento das amostras de solo em sacos plásticos, que em seguida são rompidos pelo tubo do analisador portátil de vapores orgânicos para obtenção das concentrações de VOC's. A remoção do solo foi realizada com o auxílio de uma escavadeira hidráulica e dois caminhões com capacidade para 10 toneladas. O solo considerado contaminado foi encaminhado para uma área específica com piso impermeável e mureta de contenção.

O solo disposto na área foi primeiramente acondicionado em pilhas. Posteriormente, o solo recebeu a aplicação de adubo orgânico (fonte de nutrientes e microrganismos), calcário (corretor de pH) e areia (para elevar a porosidade e permeabilidade do solo). O solo retirado era predominantemente argiloso, de cor avermelhada.

O composto formado pelo solo contaminado, adubo orgânico, calcário e areia foi homogeneizado por meio de revolvimentos com auxílio de uma retro-escavadeira. O processo de mistura é importante para a estabilidade e distribuição total dos insumos.

Posteriormente, o material foi disposto em camadas por toda a extensão da área destinada para montagem da biopilha. Inicialmente foi depositada uma camada de 40 cm, acima da qual foi colocado o sistema injeção de ar. Este sistema é composto por tubos de drenagens perfurados (100 mm). Esses tubos foram envolvidos por uma geomembrana (bidim) de modo a impedir que o solo pudesse obstruir a passagem de ar pelos furos.

Na extremidade foi instalado o sistema de ligação dos tubos de drenagem ao tubo de PVC (110 mm). Estes tubos de PVC foram posteriormente conectados ao manifold de injeção de ar que faz a distribuição do ar proveniente dos aeradores. Para promover as condições ideais de oxigênio na pilha foram instalados dois sopradores de ar com uma vazão de 600 m³ de ar/hora respectivamente.

Os tubos do sistema de aeração foram instalados em intervalos de 1,5 metros. Após a colocação da primeira linha de injeção de ar, composta por 6 tubos de distribuição, a mesma foi coberta com uma camada de solo preparado de 1,3 m de altura. Acima desta foi instalada a segunda linha de injeção de ar, composta por 5 tubos, acima dos quais foi depositado o restante do solo preparado, atingido uma altura total de 1,8 m.

Na biopilha foi instalado um sistema vertical de drenagem dos gases. Estes drenos foram instalados acima do sistema inferior de injeção de ar, com um distanciamento de 1 metro da base da biopilha. As tubulações foram distribuídas na biopilha a cada 3 m, totalizando 28 drenos. O objetivo destes drenos de gases é permitir a saída dos gases de dentro da pilha, uma vez que a mesma recebeu uma cobertura com lona de PEAD de 1,0 mm de espessura. A lona tem por objetivo evitar a entrada de água na pilha, que possa levar a uma lixiviação dos poluentes contidos na mesma.

Os trabalhos foram repetidos até que todo o composto preparado fosse colocado na biopilha. Posterior à acomodação, o sistema de injeção de ar foi finalizado. Os tubos de PVC foram unidos ao manifold de injeção de ar, constituído também de tubos de PVC de 110 mm de diâmetro. Este manifold permitirá a distribuição do ar a partir dos aeradores até os tubos de

injeção localizados na parte interna da biopilha. O manifold foi instalado sobre a mureta de contenção existente na área. O mesmo possui uma válvula que permite o fechamento da canalização e que possibilita operar o sistema de aeração apenas com um ou com dois aeradores funcionando simultaneamente. O sistema de aeração ainda permite injetar ar nos tubos de injeção inferior e superior simultaneamente ou apenas no sistema inferior

Posteriormente á montagem da biopilha foi instalado o sistema de irrigação sobre a parte superior da mesma. Este sistema possibilita o controle da umidade, assim como também a adição de nutrientes, caso seja necessário. A colocação dos tubos de irrigação segue o mesmo sistema de espaçamento utilizado na colocação dos tubos de injeção de ar dentro da biopilha. O sistema de irrigação foi construído com o uso de tubos de PVC perfurados de 20 mm de diâmetro.

Para avaliar as concentrações dos contaminantes durante o processo de monitoramento da biopilha foram realizadas três amostragem de solo em seis pontos da biopilha. A primeira coleta foi realizada após 30 dias de funcionamento do processo de biorremediação. A segunda amostragem foi aos 90 dias e a terceira aos 150 dias. As análises foram realizadas para verificar as concentrações de TPH (Hidrocarbonetos Totais de Petróleo). A coleta e análise foram realizadas por um laboratório credenciado na Rede INMETRO de Qualidade. A amostragem do solo consistiu na retirada de uma amostra composta com auxílio de um trado manual. As amostras coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos apropriados, etiquetados, armazenados em *cooler* com gelo a $<4^{\circ}\text{C}$ e destinadas para o laboratório.

Os resultados analíticos serão comparados tendo como referência a RESOLUÇÃO n° 420, de 28 de dezembro de 2009, que dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas, e a Lista Holandesa de 2000. Esta estipula os valores referenciais de qualidade para solo e água subterrânea para Hidrocarbonetos Totais de petróleo, considerando um teor de argila de 25,0% e de matéria orgânica de 10,0%.

O monitoramento semanal da biopilha contemplou a caracterização dos parâmetros de umidade e temperatura do solo. No monitoramento mensal foi realizada a análise das emissões de gases (VOC's - compostos orgânicos voláteis) e do pH do solo.

O processo de avaliação, retirada do solo, bem como a montagem da biopilha, monitoramento e avaliação do processo seguiu as etapas descritas na

FIGURA 6

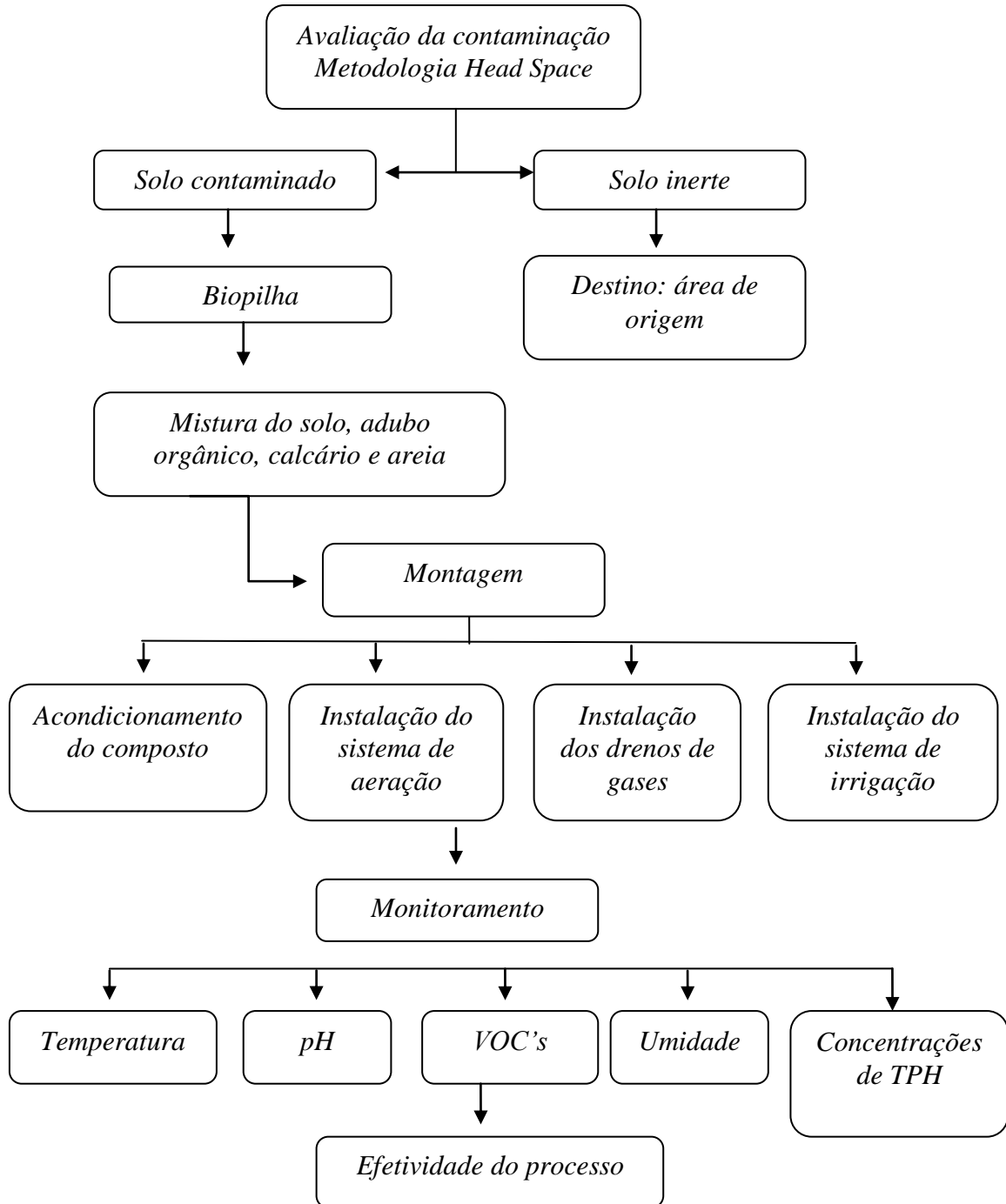


FIGURA 6: Diagrama esquemático da montagem e monitoramento da biopilha.

Para a caracterização do pH foi utilizado um equipamento composto por uma sonda para solos e um leitor digital da marca UNITY. Para a medição da umidade se utilizou um

equipamento - marca Eijelkamp - composto de uma Unidade de leitura digital para medição de umidade do solo por meio de blocos de gesso, escala de 0 a 100% (volume de água por volume de solo), sensibilidade 1% e precisão 2%. Esta unidade mede a umidade em blocos previamente enterrados nos locais de interesse, procedência holandesa.

A medição da temperatura da biopilha foi realizada com um equipamento da marca Soloterm MOD.1500 – composto por uma unidade de leitura digital, com escala de - 40°C a 200°C, que acompanham uma sonda de penetração de diâmetro 6,3 x 150 mm, e outra sonda de penetração de diâmetro 6,3 x 600 mm. A medição dos compostos orgânicos voláteis (VOC's) foi realizada diretamente nos 24 tubos de drenagem dos gases. O equipamento utilizado foi um monitor de gases modelo INNOVA-SV com exclusão do metano para a quantificação total dos hidrocarbonetos voláteis. A faixa de leitura de 0 a 10.000 ppm em incrementos de 20 ppm.

4.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

A análise microbiológica consistiu, num primeiro momento no isolamento e seleção de microrganismos presentes nas amostras de solo coletadas durante o monitoramento da biopilha. Posteriormente, foi feita análise microscópica por coloração de Gram. Seguidamente, foram feitos ensaios de avaliação dos microrganismos frente à sensibilidade ao detergente aniônico, bem como da secreção de biossurfactantes e da atividade proteolítica, lipolítica e celulolítica.

4.2.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS

A coleta das amostras de solo foi realizada em quatro diferentes profundidades da biopilha (na superfície, aos 0,6, 1,2 e 1,8 m) e em três momentos diferentes (após 30, 90 e 150 dias do monitoramento da biopilha) usando frascos plásticos de 200 gr previamente esterilizados em uma solução de hipoclorito de sódio 30% por 24 horas e lavados com água estéril. As amostras foram coletadas com o auxílio de um trado manual (10 cm de diâmetro).

Cada amostra de solo foi suspensa em água estéril na proporção 1:10 e inoculada em triplicata por estriamento em placas de Petri de 8 cm de diâmetro contendo 10 mL dos

seguintes meios de cultura: Ágar Nutriente (Marca); Ágar Sabouraud (marca) ou ágar Caseinato (g L^{-1} : glicose 2; caseína 0,2; KH_2PO_4 0,5; $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ 0,2 ; FeCl_3 0,02; ágar bacteriológico 20, água destilada 1L). O material foi incubado a 30°C por até sete dias.

Para obtenção das culturas puras as colônias crescidas nas placas foram inoculadas em tubo de ensaio contendo 10 ml dos referidos meios de cultura. As cepas coletadas nas três etapas foram mantidas sobre refrigeração. As mesmas foram cultivadas novamente em placas de Petri e incubadas sete dias para posterior análise e identificação macroscópica dos microrganismos. As placas foram caracterizadas morfolologicamente quanto aos aspectos de tamanho, forma e cor.

4.2.2 ANÁLISE MICRO E MACROSCÓPICA

4.2.2.1 COLORAÇÃO DE GRAM

Os isolados com aspecto de colônia viscosa foram submetidos ao teste por coloração de Gram (NEDER, 2000). Para tanto, esfregaço de cultura de 24 h em ágar nutriente (para isolados em ágar nutriente e caseinato) ou em ágar Sabouraud (para culturas presumíveis de bolores) foram preparados em lâminas de vidro contendo uma gota d'água. Posteriormente foi realizada a secagem e fixação do material, sendo adotado o seguinte procedimento para coloração em cada uma das lâminas:

- a) cobriu-se a lâmina com solução de cristal violeta e aguardou-se 1 minuto, depois se desprezou o corante;
- b) cobriu-se a lâmina com lugol, aguardou-se 30 segundos e desprezou-se o corante;
- c) inclinou-se a lâmina e aplicou-se acetona até que não houvesse mais desprendimento de corante. Lavou-se a lâmina rapidamente em água corrente;
- d) cobriu-se com safranina e aguardou-se 30 segundos. Lavou-se a lâmina e aguardou-se a secagem.

Posteriormente as lâminas foram observadas em microscópio para identificação de gram por meio da coloração característica em sua estrutura celular.

4.2.2.2 MICROCULTIVO

Culturas com aspecto filamentosas isoladas em Ágar Sabouraud foram inoculadas em lâmina de microcultivo com ágar Sabouraud, cobertas com outra lâmina e incubadas a 30 °C por uma semana.

4.2.3 ENSAIOS BIOQUÍMICOS E FUNCIONAIS

As cepas mantidas sob refrigeração das três etapas foram cultivadas com auxílio de uma alça de platina em uma solução contendo 3 mL de água estéril em tubos de 5 mL. O material foi mantido por 48 horas e após foram realizados os testes de produção de biossurfactante, sensibilidade a detergente aniônico, atividade lipase, atividade β – 1,4 enxoglicanase, atividade β – 1,4 endoglicanase e atividade protease.

4.2.3.1 PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE

Uma amostra de cada cultura foi inoculada em tubo de ensaio com 5 mL de caldo com a seguinte composição (gL^{-1}): NH_4NO_3 1,0; KH_2PO_4 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2; extrato de levedura 1,0; querosene 10,0; água destilada 1 L. Os materiais utilizados neste ensaio foram autoclavados a 150 °C por 15 minutos. Os tubos foram incubados a 35-37 °C por 7 dias. Dos cultivos cultivados em meio de querosene como única fonte de carbono, foram retirados 2 mL e transferidos para tubos de ensaio. Adicionou-se 2 mL de querosene. Agitou-se no vórtex durante 2 minutos. Os tubos foram mantidos em repouso durante 5 min. Verificou-se a altura da camada emulsificada e a altura total da coluna líquida.

4.2.3.2 SENSIBILIDADE A DETERGENTE ANIÔNICO

Para o teste foram preparados tubos contendo 10 mL de ágar nutriente. Os materiais utilizados no experimento foram autoclavados. Posteriormente foi aplicado em cada tubo 5 μL da suspensão de microrganismos, sendo então vertido nas placas de Petri. Sobre o ágar foi adicionado de forma trigonal três discos de papel filtro Whatman nº 1 de 5 mm de diâmetro previamente umedecidos com 3 μL de solução a 1% de brometo de cetiltrimetilamônio. As

placas foram incubadas a 30 °C por 2-3 dias até observar a formação de halos de inibição de crescimento.

4.2.3.3 ATIVIDADE PROTEASE

Os tubos contendo a suspensão de microrganismos foram inoculados com um suábe, conforme disposição trigonal em placas de Petri contendo 10 mL de ágar com a seguinte composição (g L^{-1}): leite desnatado UHT 0,5 L; ágar bacteriológico 20, água 0,5 L. O ágar e a água foram autoclavados a 150 °C por 15 minutos. Após foi misturado o leite desnatado aquecido em erlenmeyer estéril com o ágar estéril. Foram colocados 10 mL em cada placa de Petri e as mesmas mantidas a 25°C por 2-3 dias até observar a formação de halos.

4.2.3.4 ATIVIDADE LIPASE

Para a realização do ensaio foi inoculado com um suábe, cada amostra da suspensão de microrganismos em formato trigonal em placas de Petri contendo 10 mL de ágar com a seguinte composição (g L^{-1}): peptona 10,0; cloreto de sódio 5,0; cloreto de cálcio anidro 0,5; Tween 80 10,0 g; ágar bacteriológico 20,0; água destilada 1 L. As placas foram incubadas a 30 °C por 7 dias e após foi observado a formação de halo de precipitado branco em torno das colônias.

4.2.3.5 ATIVIDADE β -1,4-EXOGLICANASE

A solução contendo amostras dos microrganismos foi inoculada, com um suábe em formato trigonal nas placas de Petri contendo 10 mL de ágar com a seguinte composição (g L^{-1}): celulose microcristalina 10; extrato de bolor 0,6; sulfato de magnésio hepta-hidratado 0,25; fosfato monobásico de potássio 0,7; fosfato dibásico de potássio 0,2; sulfato de amônio 1; ágar bacteriológico 20; água destilada 1 L. As placas foram incubadas a 30 °C por 7 dias. Para obter-se o resultado foi preparada uma solução a 1% de vermelho neutro em etanol 95%, e posteriormente as superfícies das placas foram cobertas por cerca de meia hora com a solução. O resíduo da solução foi escorrido em um recipiente e as placas foram lavadas com 10 mL de solução de cloreto de sódio a 5 %. Nas placas foi observada a formação de halos claros em torno das culturas.

4.2.3.6 ATIVIDADE β -1,4-ENDOGLICANASE

Para a realização do ensaio foi inoculado com um suábe, cada amostra de microrganismo conforme formato trigonal em placas de Petri contendo 10 mL de ágar com a seguinte composição (g L^{-1}): carboximetilcelulose 10; extrato de bolor 0,6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25; KH_2PO_4 0,7; K_2HPO_4 0,2; NH_4SO_4 1; ágar bacteriológico 20; água destilada 1 L. As placas foram incubadas a 30 °C por 7 dias. Para observar a formação de halos em torno das culturas foi preparada uma solução a 1% de vermelho neutro em etanol 95%. Esta solução foi adicionada nas superfícies das placas deixando cobertas por cerca 30 minutos. Posteriormente foi escorrido o excesso, sendo então novamente lavado com 10 mL de uma solução de cloreto de sódio a 5 %. As placas foram observadas quanto a formação de halos claros em torno das culturas.

A FIGURA 8 mostra de forma sucinta a metodologia aplicada nos testes microbiológicos.

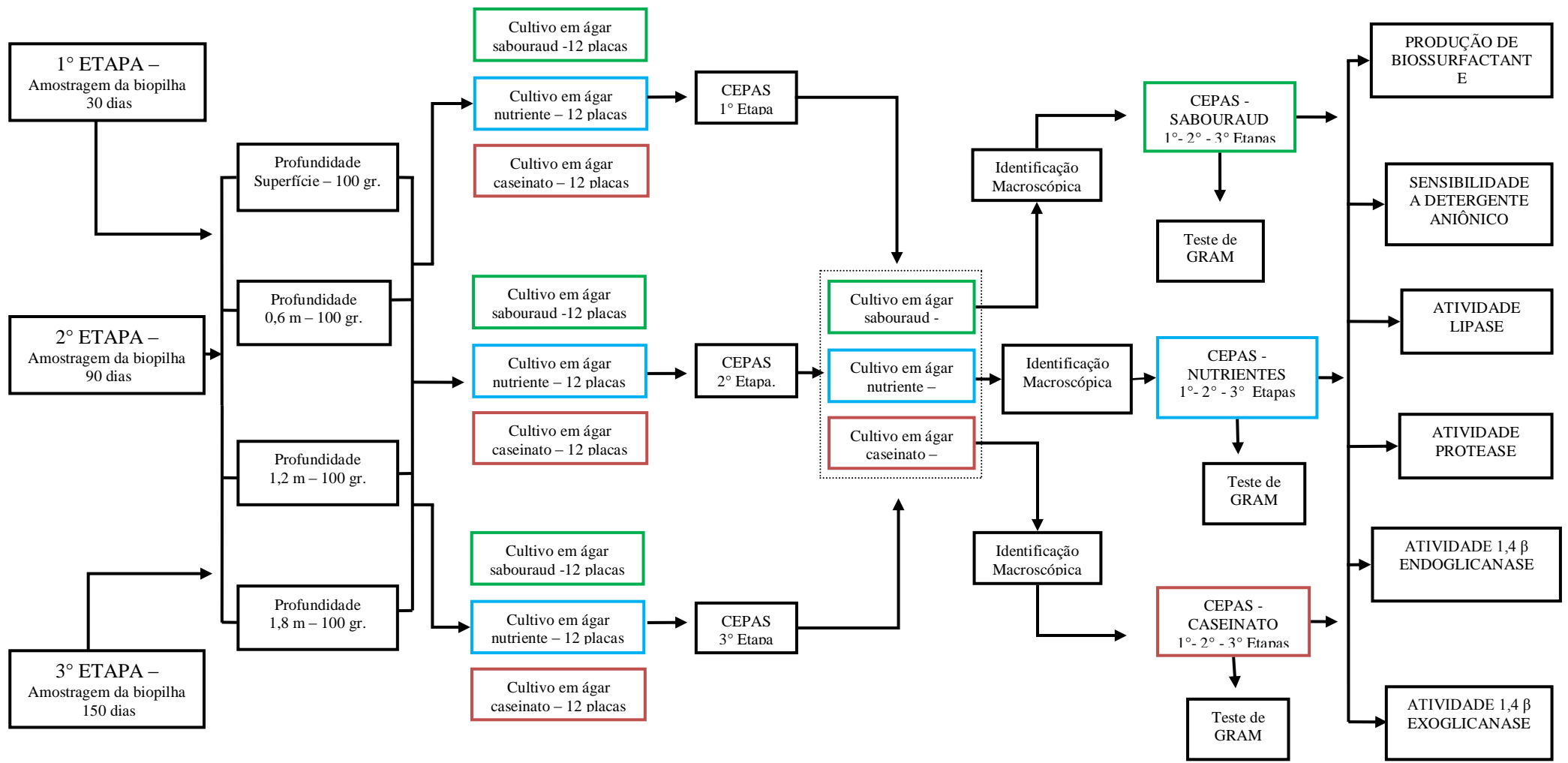


FIGURA 7 – Fluxograma dos testes microbiológicos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados primeiramente enfocando os parâmetros monitorados durante o processo de monitoramento da biopilha com relação à temperatura, pH, umidade e emissões de VOC's. Posteriormente será descrito as concentrações de TPH's e finalmente a caracterização microbiológica realizada nas amostras de solo coletadas na biopilha.

5.1 COMPORTAMENTO DA TEMPERATURA, pH E UMIDADE

As FIGURAS 9 - 10 apresentam os resultados do monitoramento da temperatura na biopilha realizado durante os primeiros 150 dias nas profundidades de 15 cm e 60 cm. No total foram 15 pontos de avaliação da temperatura. Os valores apresentados correspondem à media dos 15 pontos, com seus valores máximos e mínimos medidos. O monitoramento foi realizado até a biopilha atingir uma temperatura interna estável.

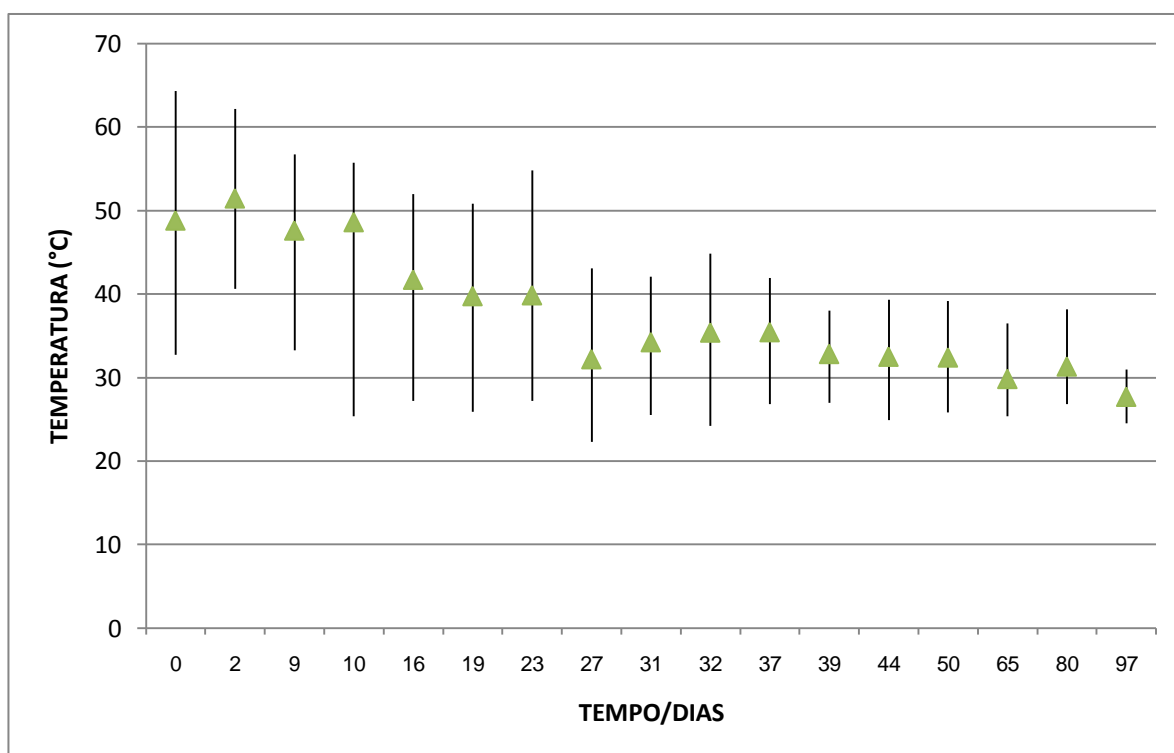


FIGURA 8: Comportamento da temperatura a 15 cm de profundidade na biopilha.

A temperatura média da biopilha a 15 cm de profundidade foi de 48,8 °C na primeira amostragem. A temperatura máxima e mínima verificada foi de 64,3°C e de 33°C

respectivamente. O gráfico mostra que na primeira semana a temperatura média atingiu os 50°C e com o decorrer do processo houve a diminuição gradual da mesma. A temperatura média mostra duas etapas de variação de temperatura. Na primeira etapa, nos primeiros 30 dias a mesma diminui de 50°C para 30°C. A partir deste ponto, a temperatura da biopilha a 15 cm de profundidade se manteve praticamente constante neste valor. A heterogeneidade na fase inicial com temperaturas elevadas em alguns pontos não comprometeu o processo, pois o controle foi realizado com a retirada da lona de proteção e o acionamento do sistema de aeração. Desta forma a temperatura média foi controlada acima dos 40°C nas primeiras semanas de operação. Na FIGURA 9 está apresentada a evolução da temperatura interna da biopilha a 60 cm de profundidade.

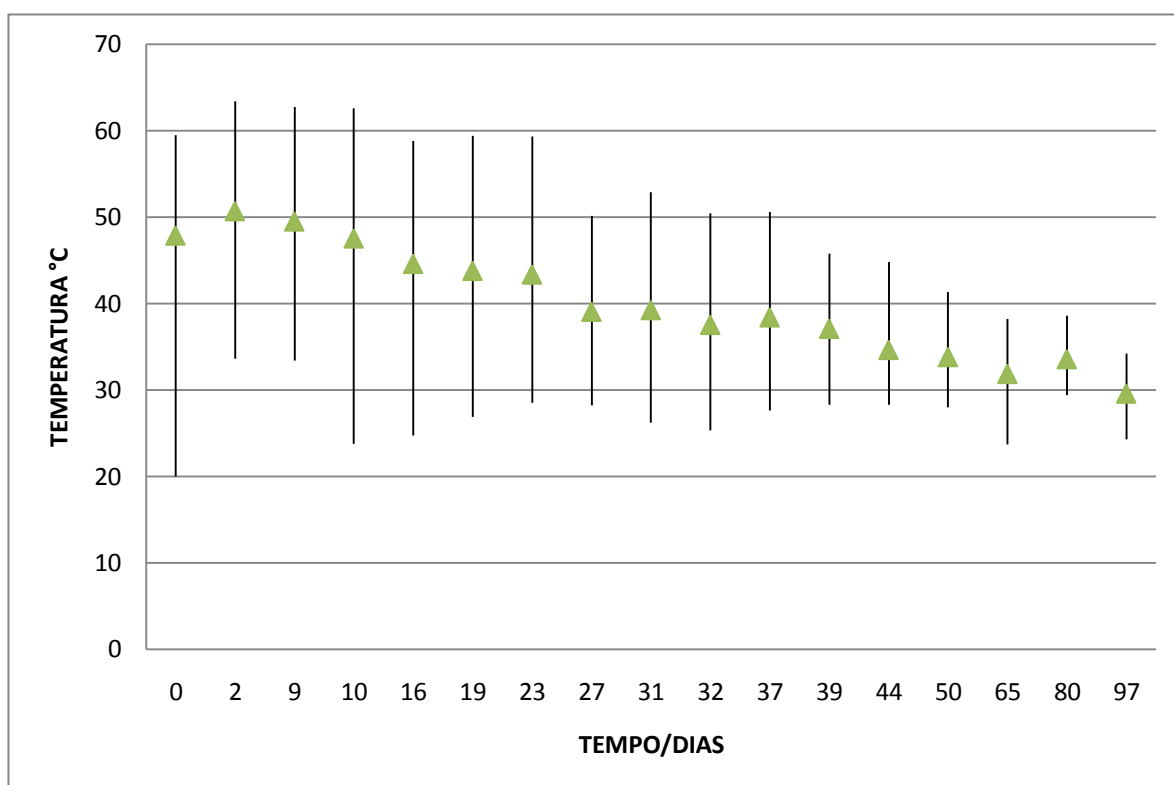


FIGURA 9: Evolução da temperatura da biopilha a 60 cm de profundidade.

A temperatura na parte interna da biopilha se manteve próxima a verificada na parte superficial. Assim como os valores médios medidos a 15 cm de profundidade, os valores da FIGURA 10 mostram duas etapas de redução de temperatura. A primeira acontece nos primeiros 30 dias, onde a temperatura decresce de um valor de 48°C para 30 °C. Depois dos 60 dias, a temperatura média se mantém no patamar dos 30°C. A diminuição mais lenta da

temperatura mostrada na FIGURA 10 se deve a que a troca de calor entre a camada superior da biopilha e o meio ambiente é muito mais rápido do que entre a camada de 60 cm.

A temperatura do solo é um dos parâmetros fundamentais para o controle da biodegradação da matéria orgânica e da atividade microbiana. Segundo o USEPA, o incremento de 10°C na temperatura proporciona uma maior atividade enzimática e microbiana. O aumento da temperatura na etapa inicial pode estar associado à atividade microbiológica mais intensa nesta etapa, assim como a processos de compostagem que poderiam estar acontecendo dentro da biopilha.

Segundo Seabra (2005), é possível encontrar uma grande variedade de microrganismos durante o processo de compostagem. Mantendo-se as condições aeróbias, a temperatura é o fator determinante da população microbiana durante a compostagem e pode apresentar três fases distintas: mesófila, termófila e de maturação. Na fase inicial ou mesofílica, os microrganismos digerem os compostos solúveis de fácil degradação e através do seu metabolismo exotérmico, proporcionam um aumento da temperatura no interior das leiras. Este aumento de temperatura leva ao desenvolvimento de uma fase termofílica. Nesta etapa a temperatura excede o limite de tolerância dos microrganismos mesofílicos e promove o desenvolvimento de microrganismos termófilos. Dessa forma, o aumento da temperatura da biopilha na primeira etapa poderia acontecer pelo mecanismo descrito anteriormente. Este processo de compostagem seria em decorrência do material orgânico adicionado junto com o adubo, o qual seria responsável pelo aumento da temperatura.

A manutenção da temperatura acima de 45°C pode ser prejudicial ao processo. De acordo com EPA (1994) a atividade microbiana da maioria das bactérias importantes para a biodegradação dos hidrocarbonetos do petróleo diminui a temperaturas maiores do que 45 °C. Outro fator importante foi a temperatura externa da biopilha. A época de montagem e os primeiros meses de operação da biopilha correspondem ao verão no Rio de Janeiro, onde a temperatura se manteve acima dos 30°C.

A TABELA 6 mostra os resultados do pH medidos durante o processo de monitoramento da biopilha. Estes valores correspondem às medições realizadas em março, maio e julho de 2009. Os resultados mostram que o pH do solo se encontra numa condição

levemente alcalina na fase inicial. A estabilidade na fase final demonstra uma característica de neutralidade em todos os monitoramentos, não sendo necessário ajuste no processo. Estas condições foram adequadas para a atividade microbiana de biodegradação dos contaminantes.

TABELA 6 - Comportamento do pH no solo da biopilha.

	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
05/03/2009	7,4	8,17	7,6	8,06	7,96
25/03/2009	8,01	7,97	7,91	8,18	8,04
13/05/2009	6,86	7,47	7,68	7,45	7,49
15/07/2009	7,75	7,23	7,42	7,40	7,28

O pH do solo pode influenciar o processo de biorremediação, pois os microrganismos do solo requerem uma pH específico para desenvolver suas atividades. A maioria das bactérias requerem uma faixa de pH entre 5 e 9, com melhor desempenho na faixa de 7 (DRAGUN, 1988). Uma mudança de pH pode resultar em uma mudança na população microbiana, pois cada espécie apresenta crescimento ótimo em um pH específico.

A medição da umidade realizada na biopilha apresentou valores na faixa de 70% na fase inicial e no decorrer do monitoramento foi verificada uma redução para a faixa entre 50% e 60 %. O sistema de irrigação foi acionado na fase inicial devido à temperatura média elevada nos primeiros 30 dias, o que favoreceu a evaporação da água contida no solo. Esse valor se manteve durante todo o tempo de operação da biopilha.

Os microrganismos exigem um solo úmido para o seu crescimento. Excesso de umidade do solo, no entanto, restringe a circulação de ar através de o subsolo reduzindo assim a disponibilidade de oxigênio, que é essencial para processos metabólicos das bactérias aeróbicas. Em geral, a faixa ideal para umidade dos solos está entre 40% e 70% (USEPA, 2004).

5.2 EMISSÃO DE VOC's

O monitoramento das medições de VOCs realizadas nos dias 02/03/09 e 05/04/2009 respectivamente estão detalhados nas TABELAS 6 e 7 . Num terceiro monitoramento realizado em 01/06/2009 não foi possível detectar emissões de VOC's em nenhum dos

pontos. No total foram monitorados 30 pontos. Os valores máximos de emissões de VOC's medidos foram menores que 200 ppm durante os dois primeiros monitoramentos realizados, indicando que a geração de gases foi baixa na fase inicial.

TABELA 7 - Resultados da emissão de VOC's da biopilha medidos em 02/03/2009.

Dreno	VOC's (ppm)	Dreno	VOC's (ppm)	Dreno	VOC's (ppm)
1-	0	11-	40	21-	0
2-	40	12-	40	22-	20
3-	150	13-	80	23-	0
4-	100	14-	0	24-	0
5-	40	15-	150	25-	40
6-	60	16-	80	26--	100
7-	160	17-	180	27-	60
8-	40	18-	40	28-	200
9-	60	19-	180	29-	100
10-	20	20-	100	30-	0

TABELA 8 - Resultados da emissão de compostos orgânicos voláteis na biopilha medidos em 05/04/2009.

Dreno	VOC's (ppm)	Dreno	VOC's (ppm)	Dreno	VOC's (ppm)
1-	0	11-	20	21-	0
2-	20	12-	20	22-	20
3-	100	13-	60	23-	0
4-	150	14-	0	24-	0
5-	20	15-	140	25-	40
6-	20	16-	60	26--	100
7-	140	17-	160	27-	60
8-	0	18-	60	28-	160
9-	0	19-	180	29-	0
10-	20	20-	80	30-	0

Comparando o comportamento das emissões com o comportamento da temperatura interna da biopilha pode se observar que as maiores emissões ocorreram quando foram medidas as temperaturas mais elevadas dentro da mesma. Isso demonstra que a temperatura interna da biopilha é um parâmetro importante para a volatilização dos componentes contaminantes do solo. Esse mesmo comportamento foi observado por Alves (2009) trabalhando com biorremediação de solos em biopilhas.

5.3 VARIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE TPH

A FIGURA 11 apresenta os resultados da variação das concentrações de TPH total durante a operação da biopilha. Os valores apresentados correspondem a uma média de 6 análises realizadas em amostras de solos de diferentes pontos retirados da biopilha. Os resultados da avaliação ambiental realizada na área objeto deste estudo mostraram que a concentração média de TPH total no solo (encontrada em quatro pontos de amostragem) foi de 11975 mg/kg.

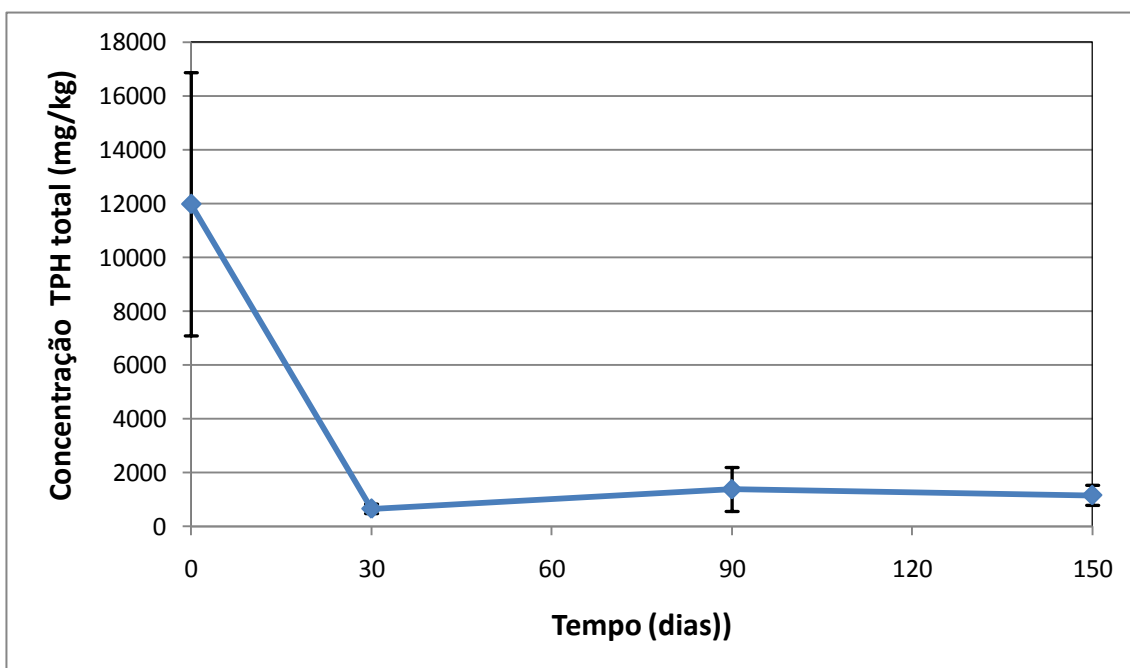


FIGURA 10: Comportamento das reduções de TPH total durante a operação da biopilha.

A primeira amostragem, realizada em seis pontos da biopilha após 30 dias de monitoramento, indica que a concentração média de TPH foi de 659,66 mg/kg. Este valor representa uma redução de 91% comparada com a concentração inicial de TPH. Esta redução

se atribui principalmente à efetividade do processo de biodegradação e à volatilização na etapa inicial de operação da biopilha. Os resultados da segunda e terceira amostragens realizadas aos 90 e 150 dias mostraram um pequeno aumento da concentração dos TPH totais se comparados com os valores obtidos após 30 dias de operação. Esses valores, porém, se encontram dentro dos intervalos de desvio padrão verificados nestes testes. A elevação da concentração verificada neste período de TPH com relação aos primeiros 30 dias de operação, também pode ser atribuída ao método de análise, onde fontes biogênicas possam estar presentes nesta avaliação e à heterogeneidade do solo. Levando em conta a concentração média obtida após 150 dias de operação, verificou-se que a redução da concentração do TPH total foi de 81% se comparado com a concentração inicial.

Ao analisar o comportamento da curva de degradação do TPH total pode-se ver que há duas etapas diferentes de degradação. A primeira acontece nos primeiros 30 dias de operação da biopilha, onde a concentração do TPH total é reduzida de 11975 mg/kg para um valor médio de 659,7 mg/kg. A segunda etapa ocorre entre os 30 e 150 dias, onde os valores de TPH medidos são reduzidos muito lentamente. Na primeira etapa a taxa de redução do TPH é de 377,2 mg/kg.dia. Seabra (2005) observou taxas de degradação de TPHs semelhantes em ensaios de degradação de hidrocarbonetos em biopilhas de laboratório.

Ao comparar a taxa de degradação do TPH total com o comportamento da temperatura da biopilha, pode-se observar que a taxa de degradação apresentada anteriormente acontece no intervalo de maior temperatura interna da biopilha. As duas taxas diferentes de degradação observadas antes e depois dos 30 dias de operação da biopilha podem indicar a existência de dois mecanismos diferentes de biodegradação que podem envolver a concentração e os componentes de TPH presentes no solo da biopilha. A primeira fase de degradação, que ocorre entre o zero e 30 dias, mostra uma eficiência de biodegradação mais alta que na segunda etapa, que acontece entre os 30 e 150 dias. Essa elevada eficiência observada entre os primeiros 30 dias estaria associada à degradação de compostos TPH de baixo peso molecular, enquanto que a segunda etapa com menor eficiência estaria associada à degradação de compostos TPH de elevado peso molecular, que são por natureza, mais refratários ao processo de degradação. O TPH total é composto por 3 tipos de TPH: TPH GRO (C_5-C_{10}), TPH-DRO, típicos no óleo diesel, com $C_{11}-C_{28}$ e o TPH-ORO ($>C_{20}-C_{36}$). Ainda, levando em conta o exposto com relação à temperatura, na primeira etapa de operação da biopilha poderia se

afirmar que o aumento desta poderia estar proporcionando a volatilização de compostos voláteis, cujos vapores estariam sendo absorvidos e consumidos pelos microrganismos degradantes de hidrocarbonetos.

Observando o comportamento da curva do TPH é razoável assumir que o tempo e o grau da biodegradação foram afetados pela fração dos componentes TPH e suas concentrações. Na segunda etapa, menos eficiente, a baixa concentração e a presença de compostos TPH com maiores pesos moleculares estaria limitando o processo de biorremediação. Lin et al. (2009) fizeram a mesma observação ao estudar a biorremediação *ex situ* de solos contaminados por óleo diesel.

Outra possível explicação para o baixo rendimento da biodegradação na segunda etapa (entre os 30 e 150 dias de tratamento) seria a baixa capacidade dos microrganismos presentes na biopilha de degradar hidrocarbonetos particulares presentes no solo contaminado na forma uma mistura complexa não resolvida (UCM – unresolved complex mixture). Esta mesma observação foi feita por Oudot et al. (1998). Outra razão para a baixa capacidade dos microrganismos de atacar os poluentes adsorvidos no solo seria que os hidrocarbonetos se ligam fortemente a substâncias húmicas e aos minerais argilosos (RICHNOW et al., 1995; LÖSER et al., 1999).

As análises da concentração de TPH realizadas aos 90 e 150 dias indicaram uma concentração média de 1378,3 mg.kg e 1161,64 mg.kg respectivamente, o que representou um pequeno aumento se comparado aos valores dos 30 dias de operação. Em função do exposto na literatura sobre as análises de TPH segundo a norma *EPA5021A/8015D e EPA 8015D*, foi decidido realizar uma análise tipo “fingerprint” com as amostras de solo retiradas aos 150 dias. Neste método constam nos resultados a concentração dos HRP-(Hidrocarbonetos Resolvidos do Petróleo) e da MCNR – (Mistura Complexa Não Resolvida ou UCM). O HRP é constituído pelas frações reais de derivados de petróleo, enquanto que o MCNR pode estar constituído de massa biológica com características semelhante aos hidrocarbonetos, compostos orgânicos discretos não halogenados, incluindo compostos polares tais como alcoóis, cetonas e aldeídos. A soma destes dois HRP + MCNR é que constitui o valor de TPH Total. A média das concentrações de HRP verificadas nesta amostragem foi de 322,24 mg/kg, e de MCNR foi de 839,40 mg/kg. Se fosse considerado apenas o valor do HRP como sendo a

fração composta por hidrocarbonetos de petróleo, isso demonstraria que o processo de biodegradação dentro da biopilha foi muito efetivo. Tendo em vista os resultados aos 150 dias das concentrações de HRP a redução da contaminação foi de 98% se comparadas com a concentração inicial de TPH-Total. A redução verificada em todas as amostragens acima dos 90% mostra que o processo foi efetivo na redução da contaminação.

De acordo com o Boletim Técnico N° 10 da Regenesi (www.regenesis.com), processos de volatilização, biodegradação, partição na água e a fotodegradação alteram o perfil dos componentes dos hidrocarbonetos derivados de petróleo e do óleo diesel. O efeito deste intemperismo é que o perfil dos componentes do óleo diesel (observados nos cromatogramas obtidos por cromatografia gasosa) é transferido para a faixa dos componentes com maior ponto de ebulição e perde os picos dos alcanos regularmente separados. Por outro lado, vários autores criticam o uso da análise de TPH por cromatografia gasosa devido às limitações que este método pode ter.

Zemo e Foote (2003) descrevem que os maiores problemas com o uso das análises típicas de TPH são: (1) componentes não dissolvidos do petróleo ficam geralmente retidos dentro das amostras de solo (o qual pode comprometer as análises da água subterrânea) e (2) hidrocarbonetos apolares que estão presentes nas amostras do subsolo, derivados de fontes naturais e de processos de oxidação química e biológica. Eles afirmam que as análises dos TPHs devem ser realizadas por meio de picos discretos e não devem possuir nenhuma mistura de complexos não identificados (denominado de “hump” ou elevação da linha de base nos cromatogramas). A maioria das análises de TPH deste trabalho foi realizada por GC-FID, o qual é uma modificação do método EPA 8015, designado para medir compostos orgânicos discretos não halogenados, incluindo compostos polares tais como alcoóis, cetonas e aldeídos. A não utilização de uma limpeza da solução com sílica gel transforma a análise de TPH numa medida de compostos orgânicos totais antes do que na medida hidrocarbonetos totais de petróleo.

Outros pesquisadores como Mariano et al. (2008), trabalhando com biodegradação de óleo diesel comercial e intemperizado, constataram que a não consideração dos efeitos do intemperismo, biodegradação e oxidação química ou biológica pode levar a um erro de análise, principalmente quando se utiliza TPH como forma de monitorar o processo. Estes

autores preconizam que os processos de intemperismo podem ser avaliados pela análise dos TPH. Neste caso, os perfis cromatográficos do óleo diesel comercial geralmente apresentam uma resolução satisfatória para os n-alcenos e alguns alcenos isoprenoides, como o pristano. Porém, a fração majoritária dos componentes não pode ser identificada e eles aparecem nos cromatogramas como elevação da linha de base (hump), que é denominada de MCNR – (Mistura Complexa Não Resolvida) ou UCM (unresolved complex mixture), a qual presumivelmente inclui alcenos cíclicos e ramificados e produtos polares de transformação. Esta mesma observação foi realizada por Marchal et al. (2003) e Bregnard et al. (1996).

5.4 RESULTADOS DOS ENSAIOS BIOQUÍMICOS E FUNCIONAIS

Com a utilização da técnica de isolamento aplicada neste trabalho, 77 morfotipos de grupos microbianos foram encontrados, dos quais resultaram 40 linhagens diferentes de microrganismos. A FIGURA 12 apresenta um resumo dos microrganismos encontrados nas três etapas e seu respectivo meio de cultura utilizado. De todas as linhagens de microrganismos isolados, apenas uma apresentou características Gram-negativas.

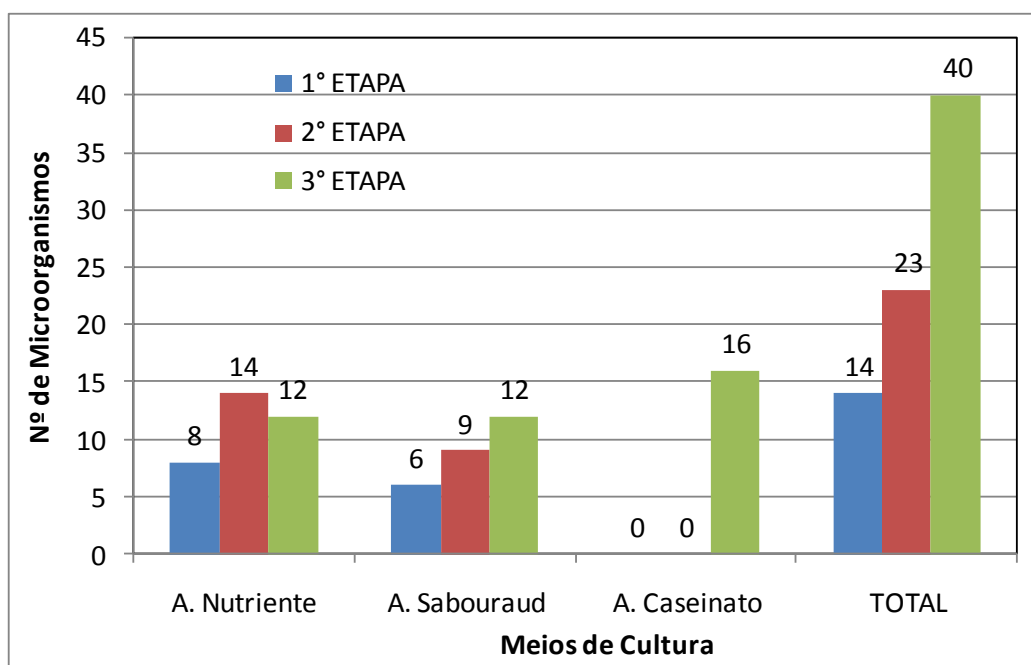


FIGURA 11: Nº de linhagens de microrganismos encontrados em cada meio de cultura em cada etapa de amostragem.

A quantidade de microrganismos encontrados em cada etapa do processo de biodegradação mostra que os mesmos têm comportamentos diferentes em função do tempo de operação e do tipo de composto TPH remanescentes no solo da biopilha. No ágar nutriente foram identificados um total de 34 morfotipos de grupos microbianos, sendo 24 considerados linhagens com características macroscópicas diferentes. De acordo com a diversidade de bactérias encontradas no meio nutriente pode ser visto que o seu número aumenta de 8 para 14 entre os 30 e 90 dias de operação da biopilha. Comparando com a variação das concentrações de TPH pode se observar que a diversidade de bactérias aumenta com a diminuição da concentração destes compostos até um valor máximo, a partir da qual, o começa a diminuir novamente. A diminuição do número de diferentes morfotipos coincide com o início da etapa com a menor taxa de degradação dos TPHs. Levando em conta o descrito com relação aos tipos de componentes de TPH que degradam, poderia-se afirmar que as bactérias proliferam nas etapas em que os TPH com menores pesos moleculares são degradados. A sua diversidade diminui quando o substrato é composto por componentes TPH de elevados pesos moleculares.

De acordo com Bento et al. (2005), que trabalharam com biodegradação de solos contaminados por óleo diesel, no início do processo microrganismos degradantes de óleo diesel são estimulados por fontes instáveis de hidrocarbonetos (provavelmente hidrocarbonetos de cadeias abertas ou lineares) que induzem a uma elevada biodegradação. Assim que estas formas decrescem, a população de microrganismos tem que usar hidrocarbonetos mais recalcitrantes (provavelmente hidrocarbonetos aromáticos com elevados pesos moleculares) menos eficientemente. De acordo com estes mesmos autores, é possível que a degradação de hidrocarbonetos de elevados pesos moleculares possa produzir compostos orgânicos intermediários tóxicos, que podem inibir os microrganismos degradadores do óleo diesel.

Contrariamente ao comportamento das bactérias, a diversidade de fungos filamentosos e leveduras que cresceram no meio de cultura Ágar Sabouraud apresentou um crescimento constante ao longo do tempo de realização dos ensaios. Neste ensaio foram identificados 18 morfotipos de leveduras, sendo 15 linhagens com diferentes características macroscópicas. No total foram verificados 9 morfotipos de fungos e 8 com diferenças macroscópicas. Os fungos e bactérias são microrganismos que degradam compostos orgânicos de moléculas grandes.

Dessa forma, o seu número começa a aumentar conforme o substrato vai sendo composto preferencialmente de componentes TPH de elevados pesos moleculares.

No meio caseinato foram identificados 16 morfotipos de grupos microbianos caracterizados como actinomicetos e destes, 13 linhagens com características macroscópicas diferentes, os quais só aparecem em números significativos na terceira etapa do processo. Os actinomicetos, juntamente com os fungos, são os principais responsáveis pela degradação de substâncias de pesos moleculares elevados e de difícil decomposição na natureza. Dessa forma, sua proliferação acontece simultaneamente com a dos fungos em função do tipo de substrato disponível para degradação na última etapa (SEABRA, 2005).

Em relação ao número total de microrganismos morfológicamente diferentes, pode se observar que há uma relação direta entre o aumento deste e o tempo de duração dos ensaios. O aumento do número de microrganismos pode ser um indicativo de um processo estimulante da biodegradação, uma vez que é sabido que apenas um número pequeno de microrganismos pode ser isolado e cultivado em laboratório.

Os resultados da FIGURA 12 mostram também que a predominância do tipo de microrganismo presentes muda ao longo do teste. Na primeira etapa (até os 90 dias) há uma predominância de fungos e bactérias. Chaillan et al. (2004) obtiveram o mesmo resultado trabalhando com solos contaminados por hidrocarbonetos derivados de petróleo. Eles isolaram 61 linhagens, sendo destas 90% fungos e bactérias. Na etapa final do processo de degradação, predominam os fungos e actinomicetos. Essa mudança do tipo de microrganismo predominante pode ser associada à variação do tipo de substrato a ser degradado. Enquanto que na primeira etapa, há compostos TPHs de baixo peso molecular que são degradados preferencialmente por bactérias, na etapa final, predominam os compostos TPH de elevado peso molecular, de baixa solubilidade e hidrofóbicos, que são degradados pelos fungos e actinomicetos. Ainda, o aparecimento dos actinomicetos na etapa final pode ser indicativo de um processo de cometabolismo, onde o substrato biológico existente estariam sendo consumido pelos actinomicetos.

A TABELA 9 apresenta o número de bactérias isoladas nas placas com Ágar nutriente em cada etapa nas amostras de solo retiradas em 4 profundidades diferentes.

TABELA 9 - Número de bactérias isoladas nas placas com Agar nutriente.

Etapas de amostragens			
Profundidade de coleta (m)	1ª. Etapa (30 dias)	2ª. Etapa (90 dias)	3ª. Etapa (150 dias)
Superfície	3	7	0
0,6	4	2	6
1,2	1	4	3
1,8	0	1	3

Os resultados da TABELA 9 mostram que as bactérias encontradas na biopilha se concentraram na parte superficial da mesma na etapa inicial do processo de degradação. Conforme aumentava o tempo de tratamento, elas se espalharam até ocupar toda a coluna da biopilha aos 90 dias de degradação. No final do processo, elas se concentraram na parte inferior da mesma. Esse comportamento poderia ser associado à diminuição de componentes TPH de baixo peso molecular que serve de alimento para as bactérias, fazendo com que elas proliferem nas partes onde há substrato remanescente. Ainda, como consequência do processo de transferência e absorção de calor, a parte superior da biopilha aquece e resfria mais rápido que a sua parte interna. Com isto, essa parte da biopilha perde umidade mais rapidamente que a parte inferior. Dessa forma, a falta de umidade necessária, pode levar a que as bactérias desapareçam dessa parte da biopilha uma vez que as mesmas não tinham as condições ideais e necessárias para degradar os compostos orgânicos.

A TABELA 10 apresenta o número de fungos filamentosos e leveduras isolados, respectivamente, nas placas com Ágar Sabouraud em cada etapa nas amostras de solo retiradas em quatro profundidades diferentes. Diferente do comportamento das bactérias, a maior parte dos fungos filamentosos e leveduras se concentram na parte superficial (0-1,20 m de profundidade). Essa tendência é mais clara no final do processo, onde os mesmos não foram mais detectados nas camadas inferiores da biopilha (abaixo de 1,2 m de profundidade).



TABELA 10 - Número de fungos filamentosos e leveduras isoladas nas placas com Ágar Sabouraud.

Etapas de amostragens			
Profundidade de coleta (m)	1ª. Etapa (30 dias)	2ª. Etapa (90 dias)	3ª. Etapa (150 dias)
Superfície	2	0	1
0,6	3	3	6
1,2	1	3	0
1,8	0	1	0

As TABELAS 11 - 12 apresentam os resultados dos ensaios bioquímicos realizados com os microrganismos cultivados na primeira etapa de amostragem (30 dias de operação). A numeração colocada na primeira coluna das TABELAS representa a identificação usada para o respectivo microrganismo, seguido de uma abreviação do meio de cultura utilizado. As seguintes denominações foram utilizadas para cada coluna das TABELAS 11 -17:

Assimilação de Querosene: Positivo:  Negativo: 

Produção de biosurfactante: Positivo:  Negativo: 

Sensibilidade ao detergente aniônico: Positivo:  Negativo: *: Colônia Satélite

Atividade lipase, β -1,4-exoglicanase, β -1,4-endoglicanase, protease:

Positivo- com halo : 

Negativo: sem halo: 


Sem Crescimento do microrganismo: 

TABELA 11 - Resultados da atividade bioquímica dos microrganismos cultivados na primeira etapa em Ágar Nutriente.

1ª. ETAPA: ÁGAR NUTRIENTE								
Isolado	Profundidade de coleta (m)	Assimilação de Querosene	Produção de Biossurfactante	Sensibilidade det. Aniônico	Atividade Lipase	Atividade B - 1,4 Exoglicanase	Atividade B - 1,4 Endoglicanase	Atividade Protease
22NUT	superfície			*				
21NUT	superfície							
23NUT	superfície							
21NUT	0,6							
25NUT	0,6			*				
26NUT	0,6							
27NUT	0,6							
30NUT	1,2			*				

* Colônia Satélite

TABELA 12 - Resultados da atividade bioquímica dos microrganismos cultivados na primeira etapa em Ágar Sabouraud.

1ª. ETAPA - ÁGAR SABOURAUD								
Isolado	Profundidade de coleta (m)	Assimilação de Querosene	Produção de Biossurfactante	Sensibilidade det. Aniônico	Atividade Lipase	Atividade B - 1,4 Exoglicanase	Atividade B - 1,4 Endoglicanase	Atividade Protease
Leveduras								
39SAB	superfície							
42SAB	superfície			*				
39SAB	1,2							
Fungos filamentosos								
36SAB	0,6							
37SAB	0,6							
38SAB	0,6							

* Colônia Satélite

Os resultados das duas TABELAS anteriores mostram que, de todas as linhagens isoladas e testadas nos dois meios de cultura, nenhuma delas utilizou o querosene como fonte de carbono. Este resultado negativo, em relação à assimilação do querosene, não implica em que estas bactérias não tenham potencial de degradação dos derivados de petróleo. Esse resultado negativo pode ser consequência da forma de adição desta fonte de carbono nos ensaios. Souza et al. (2005) obtiveram também resultados negativos de assimilação de

querosene pesquisando 86 linhagens de microrganismos isolados de solos contaminados por hidrocarbonetos. Segundo estes autores, a forma de incorporação das fontes de carbonos (derivados de petróleo) nos testes pode influenciar a sua assimilação. Nos testes realizados por esses pesquisadores, oito linhagens de microrganismos se desenvolveram na presença de querosene nebulizado, enquanto que nenhuma delas se desenvolveu quando o mesmo foi adicionado por técnicas de incorporação.

Similarmente ao observado nos ensaios de assimilação de querosene, nenhum microrganismo isolado produziu biossurfactante durante a primeira etapa. A não geração de biossurfactante poderia indicar que a degradação observada dos TPHs nestes experimentos foi realizada por bactérias e outros microrganismos que utilizaram HPAs solubilizados na fase aquosa (umidade do solo), ou seja, o mecanismo predominante de biodisponibilização dos TPHs é a hidrólise dos mesmos. Este seria o mecanismo dominante na primeira fase de degradação dos TPHs (até 30 dias de operação da biopilha) apresentada na FIGURA 11. Das 8 bactérias, 3 fungos filamentosos e 3 leveduras isoladas na primeira etapa, apenas um fungo mostrou-se sensível ao detergente aniônico. A não sensibilidade ao detergente indica que os microrganismos se adaptaram à estrutura do detergente. Isso pode ser associado à capacidade que estes microrganismos têm para degradar hidrocarbonetos com cadeias intermediárias lineares (C₁₂).

Associando a não produção de biossurfactantes e a não sensibilidade desses microrganismos ao detergente aniônico, poderia-se afirmar que os mesmos degradam os hidrocarbonetos solubilizados na água (umidade) presente na biopilha. Ainda, essas propriedades poderiam indicar um desequilíbrio da relação C:N dentro da biopilha (excesso de N), fazendo com que na primeira etapa houvesse uma proliferação de microrganismos com capacidade de degradação do substrato orgânico, conforme mostra os resultados dos testes de exoglicanase e endoglicanase.

Porém, considerando a similaridade do processo desta biopilha com uma compostagem, a degradação dos compostos hidrocarbonetos poderia estar acontecendo por cometabolismo, onde os microrganismos da biopilha utilizariam a matéria orgânica da biopilha como um substrato secundário mais rapidamente biodegradável, como fonte de

energia e carbono, e com o decorrer do processo com a deficiência deste substrato os hidrocarbonetos seriam então incorporados na biodegradação.

Analisando a atividade hidrolítica (produção de lipase, β 1,4 Exoglicanase e β 1,4 Endoglicanase e protease) dos microrganismos isolados na primeira etapa pode se observar que todas as leveduras e um fungo filamentosos, assim como três bactérias apresentaram atividade lipásica. A lipase está associada à capacidade dos microrganismos de hidrolisarem gordura saponificável liberando ácidos graxos. A produção de lipases pode ser influenciada por diferentes variáveis, como o microrganismo produtor da enzima, as fontes de carbono e nitrogênio, a concentração de oxigênio dissolvido, a composição, temperatura e pH do meio, as condições de aeração e agitação e até mesmo a geometria do biorreator. A baixa atividade lipásica observada neste trabalho pode ser efeito da elevada concentração de TPH presente neste solo contaminado nesta etapa. Margesin et al. (2000a) concluíram que a atividade lipolítica é inversamente proporcional à concentração de hidrocarbonetos.

As leveduras e os fungos filamentosos desta etapa apresentaram atividade glicanase positiva, tanto exo como endo. Isto demonstra que estes microrganismos geram enzimas que podem conduzir à degradação de hidrocarbonetos com elevados pesos moleculares. Dentre as bactérias, cinco apresentaram capacidade de geração de β -1,4-exoglicanase e três com capacidade de geração de β -1,4-endoglicanase. Porém, duas mostraram capacidade de geração de β -1,4-exoglicanase e endoglicanase. Isso demonstra que estas duas poderiam ser utilizadas na degradação de TPH com elevados pesos moleculares. As enzimas glicanases são geradas pelos fungos para a degradação de celulose. A exoglicanase é utilizada para fazer a primeira degradação da celulose. A degradação do subproduto do processo anterior é realizada com ajuda da endoglicanase.

Nas TABELAs 13 -14 estão apresentados os resultados da atividade bioquímica dos microrganismos na segunda etapa de amostragem (90 dias de teste).

TABELA 13: Resultados da atividade bioquímica dos microrganismos cultivados na segunda etapa em Ágar Nutriente.

2º ETAPA - ÁGAR NUTRIENTE								
Isolado	Profundidade	Assimilação de Querosene	Produção de Biossurfactante	Sensibilidade e Det. Aniônico	Atividade Lipase	Atividade B - 1,4 Exoglicanase	Atividade B - 1,4 Endoglicanase	Atividade Protease
1NUT	superfície							
32NUT	superfície			*				
4NUT	superfície							
17NUT	superfície			*				
7NUT	superfície							
44NUT	superfície							
10NUT	superfície							
17NUT	0,6			*				
18NUT	0,6							
13NUT	1,2			*				
7NUT	1,2							
33NUT	1,2							
16NUT	1,2							
44NUT	1,8							

* Colônia Satélite

TABELA 14 - Resultados da atividade bioquímica dos microrganismos cultivados na segunda etapa em Ágar Sabouraud.

2º ETAPA - ÁGAR SABOURAUD								
Isolado	Profundidade	Assimilação de Querosene	Produção de Biossurfactante	Sensibilidade e Det. Aniônico	Atividade Lipase	Atividade B - 1,4 Exoglicanase	Atividade B - 1,4 Endoglicanase	Atividade Protease
Leveduras								
21SAB	0,6							
22SAB	0,6							
23SAB	0,6							
39SAB	1,2							
27SAB	1,2			*				
31SAB	1,2							
Fungos filamentosos								
37SAB	superfície							
35SAB	1,2							
34SAB	1,8							

* Colônia Satélite

Os resultados das TABELAS 13 - 14 mostram uma mudança no comportamento dos microrganismos cultivados na segunda etapa (90 dias de testes). Poucos microrganismos encontrados na primeira etapa foram isolados novamente na segunda etapa. Essa mudança, principalmente no tipo de bactéria, pode estar associada à mudança do tipo de contaminante

presente e de seus componentes. Na segunda etapa, os TPHs intemperizados e os com pesos moleculares maiores estariam disponíveis para a degradação, obrigando com isso as bactérias a se adaptarem ao processo ou ao aumento da população de outras bactérias com capacidade de assimilar essas moléculas maiores ou envelhecidas. Já entre as leveduras e os fungos filamentosos, as linhagens 39SAB e 37SAB foram novamente detectadas após 90 dias de testes, mostrando que elas se adaptaram às novas características do substrato existente. Ainda pode se dizer que a comunidade biológica apresentou uma evolução com o decorrer do tempo de ensaio. Esta evolução subsequente foi constatada na segunda amostragem, a qual mostra grupos de microrganismos diferentes, ilustrando a transição da comunidade biológica e, portanto, uma mudança na atividade biológica. O padrão da comunidade inicial de microrganismos foi estabelecido pela comunidade existente no solo e pelos microrganismos presentes no adubo orgânico adicionado. Os resultados apresentados nas TABELAS anteriores indicam que, durante a biorremediação, a comunidade biológica do solo contaminado exibiu um padrão, que era definido pela reatividade das fontes de carbono e pelos outros fatores físico-químicos da biopilha. Com a mudança na concentração e tipo de TPH remanescente na biopilha com o decorrer da remediação, o padrão das comunidades biológicas foi mudando para se adaptar às novas condições do meio.

Outro fator importante para a evolução das comunidades biológicas é o comportamento da temperatura no interior da biopilha, o que se assemelha bastante ao comportamento deste parâmetro dentro de uma pilha de compostagem. Na primeira etapa, a temperatura da biopilha variou entre 45 e 55°C, a qual promove o desenvolvimento de microrganismos termofílicos. A alta temperatura desta etapa pode ter influenciado também as características dos contaminantes, aumentando, por exemplo, a sua solubilidade. Dessa forma, o aumento da temperatura nesta primeira etapa teria disponibilizado uma maior quantidade de hidrocarbonetos para a degradação biológica ou abiótica, fazendo com que a taxa de degradação destes compostos seja elevada nesta etapa, como pode ser visto nas tabelas. Esta mesma observação é citada por Seabra (2005). Ele descreve que a temperatura pode influenciar indiretamente a biodegradação de um componente ou mistura, pela mudança de suas propriedades físicas, composição química ou toxicidade à microflora. Em baixas temperaturas, a viscosidade do óleo aumenta e sua solubilidade em água diminui, a volatilização dos alcanos tóxicos de baixo peso molecular é reduzida, adiando o início da biodegradação. Na segunda etapa, a temperatura varia entre 30 e 40°C, o que corresponde a

uma etapa mesofílica, com desenvolvimento de comunidades de microrganismos adaptados a esta temperatura. Esta comunidade se mantém até o fim do teste.

Os resultados observados na etapa dois mostram que a gradual adaptação dos microrganismos aos poluentes presentes como fontes de carbono e de energia levou a um aumento da atividade enzimática e bioquímica, ao crescimento de outros microrganismos presentes e à decomposição gradual dos poluentes.

Dentre as bactérias, duas delas (7NUT e 44NUT) apresentaram capacidade de assimilação do querosene, mas nenhuma das linhagens produziu biossurfactante. Na TABELA 12 se observa também que várias bactérias (ex. 7NUT, 44NUT) foram identificadas em dois níveis de profundidade diferente. Entre os fungos filamentosos e leveduras, a levedura 27SAB e o fungo filamentoso 35SAB apresentaram capacidade de assimilação do querosene. Com relação à geração de biossurfactante, apenas uma levedura (22SAB) apresentou capacidade para isso.

Com relação à sensibilidade ao detergente aniônico, duas bactérias (33NUT e 16NUT), um fungo (35SAB) e uma levedura (31SAB) mostraram sensibilidade ao detergente aniônico. Para a atividade lipolítica, cinco bactérias (32NUT, 4NUT, 7NUT, 33NUT e 16NUT), três leveduras (39SAB, 27SAB e 31SAB) e dois fungos filamentosos apresentaram (35SAB e 34SAB) capacidade de gerar lipases. Esta característica pode estar associada com a diminuição da concentração de TPH, vindo de encontro ao observado por Margesin et al. (2000b), os quais concluíram que a atividade lipolítica é inversamente proporcional à concentração de hidrocarbonetos.

A atividade β -glicanase (endo e exo) foi positiva para todos os fungos filamentosos. Para as leveduras se observaram linhagens que foram positivas para a exoglicanase (23SAB) e outras para a endoglicanase (21SAB e 27SAB). Já as bactérias, apenas a 1NUT se mostrou negativa para a produção de exoglicanase. Porém, seis linhagens foram negativas para a produção de endoglicanase. Em relação à atividade protease, os fungos filamentosos e bolores apresentaram maior frequência de expressão desta atividade que as bactérias.

A comparação das TABELAS 13 - 14 demonstra de uma maneira geral que muitos microrganismos apresentam versatilidade para degradar diferentes substratos e se adaptar aos meios presentes em função dos diferentes comportamentos mostrados por muitos perante os testes realizados. Dentre os observados, aparentemente os fungos e as leveduras são mais adaptáveis que as bactérias.

Nas TABELAS 15 - 16 - 17 estão apresentados os resultados da atividade bioquímica dos microrganismos na terceira etapa de amostragem (150 dias de teste). Os testes de assimilação de querosene mostram que na 3ª etapa no meio nutriente foram verificados 12 morfotipos de bactérias, com 11 linhagens diferentes. Podemos destacar as bactérias: 30NUT que também foi identificada na 1ª Etapa; 32NUT na profundidade de 0,6 m e 1,8 m, bem como na superfície da 2ª etapa; 33NUT foi verificada na 2ª etapa a 1,2 m e na 3ª a 0,6 m; 44-NUT na profundidade de 1,8 m e na 2ª etapa na superfície e 1,8 m. Isso demonstra a versatilidade destas bactérias em realizar o processo de degradação dos hidrocarbonetos. A grande presença de grupos de bactérias, verificada na 2ª e 3ª etapas, demonstra uma estabilidade do processo, onde elas são mantidas apenas devido ao crescimento contínuo das populações microbianas (MADIGAN et al., 2004). Os resultados mostraram que estas bactérias não apresentaram capacidade de assimilação de querosene e de produção de biossurfactante. Porém, duas bactérias apresentaram sensibilidade ao detergente aniônico, dessas a 33NUT já tinha apresentado o mesmo comportamento na 2ª etapa, mas ela tinha sido detectada numa profundidade maior.

As atividades lipolíticas e proteolíticas apresentaram mesmo comportamento já verificado na segunda etapa, embora uma nova microbiota estivesse estabelecida nesta etapa. Em relação à atividade β -glicanase (exo e endo) foi verificada uma atividade maior na produção de exoglicanase. A TABELA 15 também mostra que houve microrganismos que não se desenvolveram nesses substratos.

A TABELA 16 mostra a atividade bioquímica dos fungos filamentosos e leveduras isoladas na terceira etapa no meio Ágar Sabouraud. Os testes de assimilação de querosene mostram que duas leveduras e um fungo filamentoso têm capacidade de se desenvolver neste meio, destacando a levedura 8SAB que demonstrou capacidade de produção de biossurfactante. Este microrganismo apresenta uma capacidade específica de converter os

contaminantes intermediários em compostos que possam ser utilizados nas vias comuns de geração de carbono e energia para outras bactérias. Uma das propriedades das moléculas biossurfactantes é a redução da tensão superficial da água devido à formação de uma camada molecular ordenada na interface, promovem a formação de microemulsões, onde os HPAs são incorporados no centro hidrofóbico das micelas e, desta forma, podem penetrar numa solução aquosa.

TABELA 15 - Resultados da atividade bioquímica dos microrganismos cultivados na terceira etapa em Agar Nutriente.

3º ETAPA - ÁGAR NUTRIENTE								
Isolado	Profundidade	Assimilação de Querosene	Produção de Biossurfactante	Sensibilidade Det. Aniônico	Atividade Lipase	Atividade β - 1,4 Exoglicanase	Atividade β - 1,4 Endoglicanase	Atividade Protease
19NUT	0,6							
39NUT	0,6							
30 NUT	0,6			*				
32 NUT	0,6			*				
33 NUT	0,6							
17 NUT	0,6			*				
49 NUT	1,2							
51 NUT	1,2							
52 NUT	1,2			*				
32 NUT	1,8			*				
44 NUT	1,8							
43 NUT	1,8							

* Colônia Satélite

Entre os isolados apenas três leveduras e um fungo filamentosos apresentaram sensibilidade ao detergente aniônico dodecilsulfato de sódio. As leveduras aqui isolados mostraram uma frequência de expressão de atividade lipase e diminuição da atividade proteolítica em relação a primeira e segunda etapa. A maior capacidade de expressão de β -glicanase foi verificada na população de fungos filamentosos. Porém, chama a atenção o aparecimento de uma linhagem de fungos filamentosos que não cresceu neste substrato.

TABELA 16 - Resultados da atividade bioquímica dos microrganismos cultivados na terceira etapa em Ágar Sabouraud.

3° ETAPA - ÁGAR SABOURAUD								
Isolados	Profundidade	Assimilação de Querosene	Produção de Biossurfactante	Sensibilidade Det. Aniônico	Atividade Lipase	Atividade B - 1,4 Exoglicanase	Atividade B - 1,4 Endoglicanase	Atividade Protease
Leveduras								
1SAB	superfície							
8 SAB	0,6			*				
11 SAB	0,6							
11 SAB	1,2							
12 SAB	1,2							
13 SAB	1,2			*				
16 SAB	1,2							
18 SAB	1,8							
19 SAB	1,8							
Fungos Filamentosos								
3 SAB	superfície			*				
10 SAB	0,6							
6 SAB	0,6							
7 SAB	0,6							

* Colônia Satélite

Diferente do observado nas duas etapas anteriores, nesta etapa se verificou a presença de actinomicetos que se desenvolveram no Ágar Caseinato, cujos resultados de atividade bioquímica estão apresentados na TABELA 17.

Nos testes de assimilação de querosene e produção de biossurfactante os resultados foram negativos. Os resultados de sensibilidade ao detergente aniônico mostram, por outro lado, que os actinomicetos possuem uma elevada capacidade de assimilação ao detergente. Isso indica que estas bactérias têm capacidade de degradação de compostos com cadeias lineares previamente funcionalizadas em uma de suas extremidades e que o dodecilsulfato de sódio pode ser usado com certa segurança como adjuvante para facilitar a assimilação de hidrocarbonetos em processos de biorremediação. A manutenção dos parâmetros de umidade e temperatura nesta etapa contribuiu para biodegradação dos hidrocarbonetos por estes microrganismos. Os dados obtidos por BOSSERT e BARTHA (1986) demonstram que a máxima taxa de biodegradação ocorre entre 20°C e 30°C.

TABELA 17 - Resultados da atividade bioquímica dos microrganismos cultivados na terceira etapa em Ágar Caseinato.

3º ETAPA- ÁGAR CASEINATO								
Isolados	Profundidade	Assimilação de Querosene	Produção de Biossurfactante	Sensibilidade Det. Aniônico	Atividade Lipase	Atividade B - 1,4 Exoglicanase	Atividade B - 1,4 Endoglicanase	Atividade Protease
15CAS	superfície							
8 CAS	superfície							
17 CAS	0,6			*				
2 CAS	0,6							
3 CAS	0,6							
4 CAS	0,6							
9 CS	0,6							
10 CAS	0,6							
11 CAS	0,6							
15 CAS	1,2							
13 CAS	1,2							
12 CAS	1,8							
15 CAS	1,8							
18 CAS	1,8							
17 CAS	1,8			*				
19 CAS	1,8							

* Colônia Satélite

As enzimas que catalisam a hidrólise de triglicerídeos para glicerol e ácidos graxos livres na interface óleo-água foram mantidas na terceira etapa pelas bactérias, fungos filamentosos e leveduras, conforme os resultados da atividade lipolítica. Os actinomicetos demonstraram uma freqüência de expressão de atividade lipolítica reduzida, sendo verificada só em cinco linhagens. Os testes de atividade exoglicanase e endoglicanase indicam que os microrganismos desta etapa apresentam capacidade de geração de complexos celulásicos (celulolíticos), ou seja, eles possuem capacidade de atacar aleatoriamente a cadeia celulósica por meio da enzima endoglicanase e os terminais da cadeia celulósica, por meio da enzima exoglicanase. Na atividade protease foi verificada uma redução nesta capacidade. Isto pode estar associado a uma redução na relação carbono/nitrogênio, ou ainda a produção excessiva de enzimas por outro microrganismo.

A presença dos actinomicetos nesta etapa mostra que as condições nutricionais da biopilha estão estabilizando e se tornando mais próximas da condição encontrada em solos não contaminados, uma vez que há um empobrecimento do substrato que serve de fonte de

carbono e energia para os microrganismos. Estes microrganismos se caracterizam por serem bactérias menos exigentes em relação a nutrientes, umidade, aeração e pH. Eles são ativos na decomposição de materiais orgânicos no solo, incluindo lignina e outros polímeros recalcitrantes. Estes microrganismos são metabolicamente diversos e são capazes de utilizar fontes variadas de carbono e energia. Eles estão adaptados para crescer sobre substratos sólidos. Segundo McCarthy e Willians (1992) os substratos insolúveis e poliméricos são as fontes primárias de carbono no solo, desta forma eles necessitam da secreção de uma variedade de enzimas extracelulares e hifas penetrando e colonizando o substrato. Estes microrganismos podem estar naturalmente presentes em ambientes contaminados com hidrocarbonetos e outros produtos químicos, podem persistir nestes solos por períodos longos e podem degradar os poluentes mesmo na presença de fontes de carbono mais facilmente assimiláveis. Estas bactérias conseguem degradar poluentes hidrofóbicos por que as suas células conseguem se aderir à interface água/óleo, e esta capacidade é decorrente do fato destes microrganismos possuírem cadeias alifáticas de ácidos micólicos na sua parede celular, o que lhes conferem natureza hidrofóbica. Dessa forma, a presença dos actinomicetos pode estar relacionada à predominância de um substrato mais empobrecido, hidrofóbico e constituído, principalmente, por hidrocarbonetos de elevado pesos moleculares. A presença destas bactérias também pode explicar a redução das atividades hidrolíticas, especialmente, a proteolítica, uma vez que os actinomicetos podem ser inibidores desta atividade (MARGESIN et al., 1999).

Na terceira etapa, podemos destacar dentre os isolados: 19NUT, 32NUT, como microrganismos versáteis que possuem várias atividades enzimáticas. Nas leveduras, destacam-se: 8-SAB com atividade lipolítica; 11SAB, com destaque para atividade lipolítica, exoglicanase, e proteolítica; 13SAB, com atividade lipolítica, endoglicanase, exoglicanase. Nos actinomicetos, podemos verificar o 8CAS com atividade lipase, protease e endoglicanase. Neste meio ainda podemos destacar o 9CAS, 11CAS com atividade lipase, endoglicanase e exoglicanase.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi avaliada a biodegradação *ex-situ* e a atividade biológica de solos contaminados com hidrocarbonetos. Os resultados obtidos permitem concluir:

Os ensaios de biodegradação mostram uma redução de 81% na concentração de TPH's no solo utilizado após 150 dias de testes. A degradação dos TPHs ocorreu em duas etapas. Uma primeira etapa (entre 0-30 dias de testes), corresponde à etapa com maior disponibilidade de compostos de baixo peso molecular, onde se verificou uma maior taxa de degradação. A segunda etapa (30-150 dias) apresenta uma taxa de degradação muito mais lenta, a qual estaria associada à presença de TPHs com maior peso molecular.

Os resultados da remoção dos TPH's do solo contaminado permitem também concluir que o tempo e o grau de biodegradação foram afetados pela fração dos componentes TPH's e suas concentrações. Na segunda etapa, com menor taxa de degradação, a biodegradação pode ser afetada pela baixa concentração dos contaminantes e pela presença de compostos TPH's com maiores pesos moleculares. Esses compostos de elevados pesos moleculares e suas propriedades também estariam influenciando o processo, uma vez que TPH's de elevados pesos moleculares se caracterizam pela sua baixa solubilidade e biodisponibilidade, o que dificulta sua biodegradação.

Parte dos hidrocarbonetos pode ter sido removida por meio de processos abióticos, como a volatilização. As emissões de VOC's da pilha de solo aconteceram na parte inicial do processo, as quais estariam associadas à disponibilidade de compostos mais voláteis, assim como pela elevada temperatura registrada na etapa inicial na biopilha.

O monitoramento da microbiota do solo demonstrou que as bactérias desempenham sua atividade principalmente na fase inicial, decompondo hidrocarbonetos de baixos pesos moleculares, açúcares, amidos, proteínas e outros compostos de fácil digestão e disponibilizando nutrientes para outros microrganismos. A redução do número de bactérias na segunda para a terceira etapa está associada à elevação do número de fungos filamentosos, cujos filamentos auxiliam na biodegradação de compostos de elevados pesos moleculares. Já a presença dos actinomicetos, verificados na terceira etapa, indicam também um ambiente

sem competição, desempenhando também a decomposição de resíduos resistentes a biodegradação.

Os resultados dos ensaios bioquímicos e funcionais mostraram que há elevada atividade hidrolítica, com predomínio da atividade celulolítica ou celulásica, a qual é evidenciada pela presença de atividade exo e endoglicanase. Os resultados também demonstraram que há uma relação direta entre número de diferentes morfotipos de microrganismos e tempo de duração dos ensaios. Esta evolução subsequente mostra grupos de microrganismos diferentes nas três etapas, ilustrando a transição da comunidade biológica e, portanto, uma mudança na atividade biológica. O padrão da comunidade inicial pode ter sido estabelecido pela comunidade existente no solo ou pelos microrganismos presentes no adubo orgânico adicionado. Durante a biorremediação, a comunidade biológica do solo contaminado exibiu um padrão, que era definido pela reatividade das fontes de carbono e por outros fatores físico-químicos da biopilha. Com a mudança na concentração e tipo de TPH remanescente na biopilha no decorrer da remediação, o padrão das comunidades biológicas foi mudando para se adaptar às novas condições do meio.

A mudança dos tipos de componentes TPH's remanescentes no solo contaminado, poderia também promover a mudança do tipo de microrganismos presentes na biopilha. Na etapa inicial, há predominância de bactérias e fungos que se alimentam de um substrato mais facilmente degradável, que estariam compostos por hidrocarbonetos de baixo peso molecular. Na etapa final, onde um substrato mais pobre e mais difícil de biodegradar, há predominância de fungos, leveduras e actinomicetos. Outro fator importante para esta evolução seria a evolução da temperatura interna da biopilha, onde inicialmente se desenvolveriam microrganismos termofílicos e posteriormente mesofílicos.

A atividade lipásica dos microrganismos pode ter sido afetada pela concentração de hidrocarbonetos presentes. Houve um aumento desta atividade com a redução da diversidade de microrganismos. Com relação à capacidade de produção de biosurfactantes, apenas os leveduras 22SAB e 8SAB mostraram esta capacidade. Estas duas linhagens só foram isoladas na segunda e terceira etapas do processo.

Em todas as etapas do processo de biodegradação os fungos e leveduras foram os microrganismos que mostraram atividade β 1,4 exoglicanase e endoglicanase em todas as etapas.

De uma forma geral, os resultados das atividades bioquímicas mostraram que há grupos de microrganismos versáteis dentro da biopilha. Isso se dá pela capacidade de algumas linhagens de produzirem enzimas lipásicas, proteásicas, e mostrarem atividades β 1,4 exoglicanase e endoglicanase. As linhagens 19NUT, 25NUT, 39 SAB, 36SAB, 34SAB e 35SAB são alguns destes microrganismos.

Com relação ao uso da biopilha, com cama de aviário como fonte de nutrientes, os resultados mostram que é possível a utilização de mesma para a biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos. A redução nas concentrações do contaminante em um período de 150 dias demonstra que o processo pode ser aplicado para o tratamento de quantidades elevadas de solo, ocupando uma área menor que a adotada para o *landfarming*.

Por sua vez, o perfil de temperatura desenvolvido no interior da biopilha mostra que este processo se assemelha a um processo de compostagem, uma vez que a mesma apresenta um aumento de temperatura na etapa inicial, passando de uma condição mesofílica para termofílica num curto espaço de tempo. Após 30 dias de operação, a temperatura interna da biopilha diminui novamente para uma etapa mesofílica. A maior parte da degradação ou remoção dos hidrocarbonetos acontece na etapa termofílica.

6 REFERÊNCIAS

- ADMON, S.; GREEN, M.; AVNIMELECH, Y. Biodegradation kinetics of hydrocarbons in soil during land treatment of oily sludge. *Bioremed. J.* 5, 193–209 p., 2001.
- AISLABIE, J.M.; BALKS, M.R.; FOGHT, J.M.; WATERHOUSE, E.J. Hydrocarbon spills on Antarctic soils: effects and management, *Environ Sci Technol* 38, 1265–1274 p., 2004.
- ALEXANDER, M. *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press, San Diego, USA, 453 p., 1999.
- ALVAREZ, P.J. *Remediação e revitalização de áreas contaminadas*. São Paulo: Signus Editora, 231 p., 2004.
- ALVES, A. *Uso de biopilhas para degradação de hidrocarbonetos derivados de petróleo em solos contaminados*. Dissertação de Mestrado. PPGTA-UNISC. 110 p., 2009.
- ANDREONI, V.; CAVALCA, L.; RAO, M.A.; NOCERINO, G.; BERNASCONI, S.; DELL'AMICO, E.; COLOMBO, M.; GIANFREDA, L. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere* 57, 401–412 p. 2004.
- ATLAS, R.M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective, *Microbiol. Rev.* 45, 180–209 p., 1981.
- BAI, G.; BRUSSEAU, M.L.; MILLER, R.M. Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. *J. Contam. Hydrol.* 25, 157–170 p., 1997.
- BALBA, M.T.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *J. Microbiol. Methods*, Amsterdam. v.32, 155-164 p., 1998.
- BARAN, S.; BIELINSKA, J.E.; OLESZCZUK, P. Enzymatic activity in an airfield soil polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Geoderma* 118, 221–232 p., 2004.

BASTIAENS, L.; SPRINGAEL, D.; WATTIAU, P.; HARMS, H.; DEWACHTER, R.; VERACHTERT, H.; AND DIELS, L. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (HPA)-degrading bacteria using HPA-sorbing carriers. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1834–1843 p., 2000.

BENNETT, J.W.; CONNICK, W.J.; DAIGLE, JR.D.; WUNCH, K. *Fungi in Bioremediation. Formulation of fungi for in situ bioremediation.* Cambridge University Press. 935 p., 2001.

BENTO, F. M.; CAMARGO F. A.O.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, W.T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, Volume 96, Issue 9, 1049-1055 p., June 2005.

BERGLUND, S.; CVETKOVIC, V. Pump-and-treat remediação de aquíferos heterogêneos: efeitos da taxa de transferência de massa limitada. *Ground Water*. 33, 675-685 p., 1995.

BOGAN, B.W.; TRBOVIC, V. Effect of sequestration on HPA degradability with Fenton's reagent: roles of total organic carbon, humin, and soil porosity, *J. Hazard. Mater.* B100, pp. 285–300 p., 2003.

BOSSERT, I.P. BARTHA, R. Structure-biodegradability relationships of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 37 – 490-495, 1986.

BREGNARD, T.P.A.; HÖHENER, P.; HÄNER, A.; ZEYER, J.: Degradation of weathered diesel fuel by microorganisms from a contaminated aquifer in aerobic and anaerobic microcosms. *Env. Tox. Chem.*, 15, 299-307 p., 1996.

BROOKES, P.C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biol. Fertil. Soils* 19. 269–279 p, 1995.

BROWN, G.S.; BARTON, L.L.; THOMSON, B.M. Permanganate oxidation of sorbed polycyclic aromatic hydrocarbons. *Waste Manage.* 23, 737–740 p., 2003.

CASARINI, D.C.P. et al. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo - São Paulo: CETESB, 2001.

CERNIGLIA, C.E.; Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv. Appl. Microbiol.* 30. 31–71 p, 1984.

CETESB. Companhia de tecnologia e saneamento ambiental. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/manual.asp. Acesso em: 02 Jan. 2009.

CHIARANDA, H.S. Volatilização dos compostos BTEX em ambientes subsuperficiais contaminados com gasolina e etanol: comparação entre concentrações medidas e simuladas. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 145 p., 2006.

CLARKE, A.N.; WILSON, D.J; and NORRIS, R.D. Using models for improving *in situ* cleanup of groundwater. *Environ. Technol.* 6 4, 34 – 41 p., 1996.

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), 2009. Resolução n° 420, de 28 de dezembro de 2009. Disponível em: www.mma.gov.br/conama

DRAGUN, J. *The Soil Chemistry of Hazardous Materials*, Second Edition. Amherst Scientific Publisher, Amherst, MA, 1998.

FEPAM. Fundação Estadual de Proteção Ambiental. Disponível em <http://www.fepam.rs.gov.br> Acesso em 12 de Dez. 2008.

FERRARESE, E., ANDREOTTOLA. G. OPREA, I.: Remediation of HPA-contaminated sediments by chemical oxidation. *Journal of Hazardous Materials*, Volume 152, Issue 1, 128-139 p., 2008.

FETTER, C. W. *Applied Hydrogeology*. 3 ed: Prentice Hall, New Jersey. 691 p., 1988.

FETTER, C. W. Contaminant hydrogeology. New York: Macmillian Publish Company. 458 p. , 1993

FINOTTI, A.R.; TEIXEIRA, C.E.; FEDRIZZI, F.; CALGLIARI, J.; FILHO, I.N. Avaliação da influência do etanol sobre o grau de volatilização BTEX em solos impactados por derrames de gasolina/etanol. Engenharia Sanitária e Ambiental v.14 n.4. 443-448 p., 2009.

FLOTRON, V.; DELTEIL C.; PADELLEC, Y.; CAMEL, V. Removal of sorbed polycyclic aromatic hydrocarbons from soil, sludge and sediment samples using the Fenton's reagent process, Chemosphere 59, 1427–1437 p., 2005.

FRANKENBERGER, W.T.; JOHANSON, J.B. Influence of crude oil and refined petroleum products on soil dehydrogenase activity. J. Environ. Qual. 11. 602–607 p,1982.

FRANKENBERGER, Jr. W.T. The need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons In: E.J. Calabrese and P.T. Kostecki, Editors, Hydrocarbon contaminated soils and groundwater, Lewis, Boca Raton, FL, 237–293 p.,1992.

GAN, S.; LAU, E.V.; NG, H.K. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. Journal of Hazardous Materials, Vol.172, Issues 2-3, 532-549 p., 2009.

GHAZALI, F; RAHMAN, R. N. Z. A.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. International Biodeterioration & Biodegradation. 54, 62-67 p., 2004.

GIANFREDA, L.; RAO,M.A.; PIOTROWSKA, A.; PALUMBO, G.; COLOMBO, C. Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practices and organic pollution, Sci Total Environ 341, 265–279 p., 2005.

HAWTHORNE, S.B.; GRABANSKI, C.B. Correlating selective supercritical fluid extraction with bioremediation behaviour of HPAs in a field treatment plot, Environ. Sci. Technol. 34, 4103–4110 p., 2000.

HEDLUND, B.P.; JAMES, T.S.; *Vibrio cyclotrophicus* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (HPA)-degrading marine bacterium. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 51, 61–66 p., 2001.

HEJAZI, R.F.; HUSAIN, T. Landfarm performance under arid conditions. 1. Conceptual framework, *Environ Sci Technol* 38, 2449–2456 p., 2004.

HUESEMANN, M.H.; “Guidelines for Land-Treating Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soils”, *Journal of Soil Contamination*, v. 3, n.3, 229-318 p., 1994.

HULING S.G.; PIVETZ, B.E. In-situ chemical oxidation. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, National Risk Management Research Laboratory, EPA/600/R-06/072, 2006.

JACKSON, A.W.; PARDUE, J. H.; ARAUJO, R. Monitoring crude oil mineralization in salt marshes: use of stable carbon isotope ratios. *Environ. Sci. Techn.* 30, 1139-1144 p., 1996.

JACQUES, R.J.S. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.37, n.4, 192-1501 p., 2007.

JOHNSON, R.L.; JOHNSON, P.C.; MCWHORTER, D.B.; HINCHEE, R.E.; GOODMAN, I. An overview of *in situ* air sparging. *Ground Water Monitoring Remediation* 13, 127–135 p., 1993.

JOHR. A.K.; DUA, M. , SINGH, A.; SETHUNATHAN, N.; LEGGE, R.L. Characterization and regulation of catabolic genes. *Crit. Rev. Microbiol.* 25, 245–273 p., 1999.

JONSSON, S.; PERSSON, Y.; FRANKKI, S.; BAVEL, B.V.; LUNDSTEDT, S.; HAGLUND, P.; TYSKLIND, M. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (HPAs) in contaminated soils by Fenton's reagent: a multivariate evaluation of the importance of soil characteristics and HPA properties, *J. Hazard. Mater.* 149 , 86–96 p., 2007.

JONSSON, S.; PERSSON, Y.; FRANKKI, S.; BAVEL, B.V.; LUNDSTEDT, S.; HAGLUND, P.; TYSKLIND, M. Comparison of Fenton's reagent and ozone oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aged contaminated soils, *J. of Soils Sediments* 6 (4), 208–214 p., 2006.

JØRGENSEN, K.S.; PUUSTINEN, J.; SUORTTI, A.M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil by composting in biopile. *Environ. Pollut.* 107, 245-254 p., 2000.

JUHASZ, A.L.; STANLEY, G.A.; BRITZ, M.L. Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 396–401 p., 2001.

KANALY, R.A.; HARAYAMA, S. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* 182, 2059–2067 p., 2000.

KATAOKA, A.P.A.G. Biodegradação de resíduos oleosos de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de “landfarming”.. 202f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 167 p., 2001.

KAWAHARA, F.K. DAVILA, B. AL-ABED, S.R., VESPER, S.J., IRELAND, J.C. Rock, S., Polynuclear aromatic hydrocarbon (HPA) release from soil during treatment with Fenton's reagent, *Chemosphere.* 31 (9), 4131–4142 p., 2005.

KELLY, I. CERNIGILIA, C.E. Degradation of a mixture of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Mycobacterium* strain PYR-1. *J. Soil Contam.* 4, 77–91 p., 1995.

KIRK, J.L.; KLIRONOMOS, J.N.; LEE, H. TREVORS, J.T. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environ. Pollut.*, 133, 455-465 p., 2005.

KONG, S.; WATTS, R.J.; CHOI, J. Treatment of petroleum-contaminated soils using iron mineral catalyzed hydrogen peroxide, *Chemosphere* 37 (8), 1473–1482 p., 1998.

LABUD, V.; GARCÍA, C.; HERNÁNDEZ, T. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil, *Chemosphere* 66, 1863–1871 p. 2007.

LANGWALDT, J.H.; PUHAKKA, J.A., On-site biological remediation of contaminated groundwater: a review. *Environ. Pollut.* 107 (2), 187–197p. 2000.

LAZAR, I.; DOBROTA, S.; VOICU, A.; STEFANESCU, M.; SANDULESCU, L.; PETRISOR, I. G. Microbial degradation of waste hydrocarbons in oily sludge from some Romanian oil fields. *J. Petrol. Sci. Eng., Amsterdam*, v. 22, n.1-3, 151-160 p., 1999.

LEIRÓS, M.C.; TRASAR-CEPEDA, C.; GARCÍA-FERNANDEZ, F.; GIL-SOTRES, F. Defining the validity of a biochemical index of soil quality. *Biol. Fertil. Soils* 30. 140–146 p., 1999.

LETOWSKI, J.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L. DNA microarray applications in environmental microbiology, *Anal. Lett.* 36, 3165–3184 p., 2003.

LI, G.; HUANG, D. N.; LERNER, D. N.; ZHANG, X. Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. *Water Res., New York*, v.34, n.15, 3845-3853 p., 2000.

LIN, T.C., SHENB, F., CHANGA, J., YOUNG, C., ARUMB, A.B., LIMB, S. e CHEND, T. Hydrocarbon degrading potential of bacteria isolated from oil-contaminated soil. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. Volume 40, Issue 5, 580-582 p., 2009.

LIMA, C.B.S. Efluentes: a qualidade da água comprometida. In: MENEGAT, R. et al. (Ed). *Atlas ambiental de Porto Alegre*. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, 157-158 p., 1998.

LISTA HOLANDESA. Projeto CETESB – GTZ atualizado 11/1999. Lista holandesa de valores de qualidade do solo e da água. Disponível em: www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/.../6530.pdf . 2000.

LOPEZ, D.R., VAZ, M. SANTETTI, V.: Biorremediação de solo contaminado com hidrocarbonetos através do processo de biopilha. 25º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2009.

LÖSER, C.; SEIDEL, H.; HOFFMANN, P.; ZEHNSDORF, A. Bioavailability of hydrocarbons during microbial remediation of a sandy soil, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 105–111 P., 1999.

MACKAY, D.M.; CHERRY, J.A. Groundwater contamination: pump-and-treat remediation. *Environ. Sci. Technol.* 23 (6), 630–636 P., 1989.

MCCARTHY, A.J.; WILLIAMS, S.T. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environmental – a review. *Gene, Viena*, v.115, p.189-192, 1992.

MADIGAN, M.T. MARTINKO, J.M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MALISZEWSKA-KORDYBACH, B.; SMRE CZAK, B.; MARTYNIUK, S. The effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (HPAs) on microbial properties of soils of different acidity and organic matter content. *Rocz. Glebozn.* , 35, 5–18 P., 2000.

MARCHAL, R.; PENET, S.; SOLANO-SERENA, F.; VANDECASTEELE, J.P. Gasoline and diesel oil biodegradation. *Oil & Gas Science Technology*, 58, 441-448 p., 2003.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Biological decontamination of oil spills in cold environments. *J Chem. Technol. Biotechnol.* 74, 1-9 p., 1999.

MARGESIN, R.; WALDER, G.; SCHINNER, F. The impact of hydrocarbon remediation (diesel oil and polycyclic aromatic hydrocarbons) on enzyme activities and microbial properties of soil. *Acta Biotechnol.* 20. 313–333 p, 2000a.

MARGESIN, R.; ZIMMERBAUER, A.; SCHINNER, F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere* 40. 339–346 p, 2000b.

MARIANO, A.; BONOTTO, D.; ANGELIS, D.; PIRÔLLO, M.; CONTIERO, J. Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39. 133-142 p., 2008.

MARKKOLA, A.M.; TARVAINEN, O.; AHONEN-JONNARTH; U.; STRÖMMER. R. Urban polluted forest soils induce elevated root peroxidase activity in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Environ. Pollut.* 116. 273–278 p, 2002.

MARLEY, M.C., BRUELL, C.J. *In situ* air sparging: evaluation of petroleum industry sites and considerations for applicability, design and operation. API Publication No. 4609. American Petroleum Institute. Health and Environmental Sciences Department. 1995.

MARLEY, M.C., HAZEBROUCK, D.J. WALSH, M.T. The application of *in situ* air sparging as an innovative soils and ground water remediation technology. *Ground Water Monitoring Rev.* 12 (2), 137–145 p., 1992.

MÁRQUEZ-ROCHA, F.J.; HERNÁNDEZ-RODRÍ, V.; LAMELA, M.T. Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium, *Water Air Soil Pollut.* **128**, 313–320 p., 2000.

MASTEN, S.J. DAVIES, S.H.R. Efficacy of in-situ ozonation for the remediation of PAH contaminated soils, *J. Contam. Hydrol.* 28, 327–335, 1997.

MATURI, K.; REDDY, K.R. Extractants for the removal of mixed contaminants from soils, *Soil Sediment Contam.* 17, 586–608 p., 2008.

MILLER, J.S. OLEJNIK, D. Ozonation of polycyclic aromatic hydrocarbons in water solution, *Ozone Sci. Eng.* 26, 453–464 p., 2004.

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

MORAIS, E. Biodegradação de resíduos oleosos provenientes de refinaria de petróleo através do sistemas de biopilhas. Dissertação de Mestrado. UNESP. 2005.

MURPHY, E.M.; ZACHARA, J.M.; SMITH, S.C. Influence of mineral-bound humic substances on the sorption of hydrophobic organic contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 24, 1507–1516 p., 1990.

NAKATANI, A.S.; SIQUEIRA, J.O.; CLÁUDIO C.R.F.S.; LAMBAIS, M.R. Comunidades Microbianas, Atividade Enzimática e Fungos Micorrízicos em Solo Rizosférico de “Landfarming” de Resíduos Petroquímicos. *R. Bras. Ci. Solo*, 32, 1501-1512 p., 2008.

NEDER, R.N.; *Microbiologia: manual de laboratório*. São Paulo: Nobel, 2000.

NEILSON, A.; ALLARD, A. *Degradation and Transformation of Organic Chemicals*, CRC Press, Boca Raton, 738 p., 2000.

O’MAHONY, M.M. DOBSON, A.D.W., BARNES, J.D. SINGLETON, I. The use of ozone in the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil, *Chemosphere* 63, 307–314 p., 2006.

OLIVEIRA, M.F. Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processo de compostagem. Dissertação de mestrado. (UFRGS) Universidade do Rio Grande do Sul, 2003.

OU DOT, J.; MERLIN, F.X.; PINVIDIC, P. Weathering rates of oil component in a bioremediation experiment in Estuarine sediments, *Mar. Environ. Res.* 45, 113–125 p., 1998.

PARIA, S. Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water, *Adv. Colloid Interface Sci.* 138, 24–58 p., 2008.

PENG, R.H.; XIONG, A.; XUE, Y.; FU, X.; GAO, F.; ZHAO, W.; TIAN, Y.; YAO, Q. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Reviews.* 32, 927–955 p., 2008.

POND, K.L.; HUANG, Y.; WANG, Y.; KULPA, C.F. Hydrogen Isotopic Composition of Individual n-alkanes as an intrinsic tracer for bioremediation and source identification of petroleum contamination, *Environ Sci Technol* 36, 724–728 p., 2002.

POTIN, O.; RAFIN, C.; VEIGNIE, E. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (HPAs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, Oxford, v.54, nº1, 45-52 p., 2004.

Regenesis Advanced Technologies for Contaminated Site Remediation. Disponível em: <<http://www.regenesis.com/products/enhAna/hrc/>> Acesso em: 20 de janeiro de 2010.

RESOLUÇÃO CONAMA nº 420, DE 28 DE DEZEMBRO DE 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas.

RHYKERD, R. L. CREWS, B.; MCINNES, K. J.; WEAVER, R. W. Impact of bulking agents, forced aeration, and tillage on remediation of oilcontaminated soil. *Bioresource Technology*, 67, 279-285 p., 1999.

RICHNOW, H.H.; SEIFERT, R.; KÄSTNER, M.; MAHRO, B.; HORSFIELD, B.; TIEDGEN, U.; BÖHM, S.; MICHAELIS, W. Rapid screening of HPA-residues in bioremediated soils, *Chemosphere* 31, 3991–3999 p., 1995.

RIVAS, F.J. Polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed on soils: a short review of chemical oxidation based treatments, *J. Hazard. Mater.* 138 (2), 234–251 p., 2006.

RIVAS, J.; GIMENO, O.; CALLE, R.G.; PORTELA, J.R.; OSSA, E.M. Remediation of HPA spiked soils: concentrated H₂O₂ treatment/continuous hot water extraction–oxidation, *J. Hazard. Mater.* 168, 1359–1365 p., 2009.

SAMANTA, S.K.; BHUSHAN, B.; JAIN, R.K. Efficiency of naphthalene and salicylate degradation by a recombinant *Pseudomonas putida* mutant strain defective in glucose metabolism. *Appl. Microbiology. and Biotechnology.* 55, 627–631 p., 2001.

SANTOS, R.M.; LEITE, S.G.F.; SOBRAL, L.G.S.; RIZZO, A.C.L. Remediação de solo contaminado por petróleo em biopilhas – escala piloto. 4º PDPETRO, Campinas, SP 6.2.0321-1– 1 21- 2007.

SCHAEFFER, T. L.; CANTWELL, S. G.; BROWN, J. L.; WATT, D. S.; FALL, R. Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.38, n.4, p.742-746, 1979.

SCHINNER, F.; ÖHLINGER R.; KANDELER, E.; MARGESIN, R. *Methods in Soil Biology.* Springer. Heidelberg (1996).

SEABRA, P.N.C. Aplicação de biopilha na biorremediação de solos argilosos contaminados com petróleo. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2005.

SEIGLE-MURANDI, F.; LIÈVREMONT, D.; BENOIT-GUYOD, J.; STEIMAN, R. Biotransformation and biosorption of pentachloronitrobenzene by fungal mycelia. *Mycal. Res.*, 100 (8): 948-954 p., 1996.

SEKLEMOVA, E.; PAVLOVA, A.; KOVACHEVA, K., Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel: field demonstration, *Biodegradation* 12 , pp. 311–316, 2001.

SERRANO, A.; GALLEGO, M.; GONZÁLEZ, J.L. Assessment of natural attenuation of volatile aromatic hydrocarbons in agricultural soil contaminated with diesel fuel, *Environ Pollut* 144, 203–209 p., 2006.

SILVA, E. P. Avaliação Preliminar do Potencial de Aplicação da Tecnologia de Biopilhas para a Biorremediação do Solo de Guamaré – RN. Tese de mestrado. Universidade Federal Do Rio Grande Do Norte – UFRN. 2004.

SKIPPER, H.D. Bioremediation of contaminated soils In: D.M. Sylvia, Editors, Principles and Applications of Soil Microbiology, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ , pp. 469–48, 1999.

SORKHOH, N.A. AL-HASAN, R.H.; KHANAFER, M.; RADWAN, S.S. Establishment of oil-degrading bacteria associated with cyanobacteria in oil-polluted soil. J. Appl. Bact. 78, 194-199 p., 1995.

SUSARLA, S.; MEDINA, V.F.; MCCUTCHEON, S.C. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. Ecol. Eng., 18:647-658, 2002.

TEJADA, M.; GONZÁLEZ, J.L. Application of different organic wastes on soil properties and wheat yield, Agron J 99, 597–1606 p. 2007.

TRAPIDO, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Estonian soil: contamination and profiles Environmental Pollution 105, 67-74 p., 1999.

TRAVIS, C. DOTY, C. Can contaminated aquifers at Superfund sites be remediated. Environ. Sci. Technol. 24 10, pp. 1464–1466, 1990.

URURAHY, A. F. P.; MARINS, M. D. M.; VITAL, R. L.; GABARDO, I. T. PEREIRA Jr, N. Effect of aeration on biodegradation of petroleum waste. Rev. Microbiol., São Paulo, v.29, p.254-258, 1998.

USEPA (United States Environmental Protection Agency) 2004. Disponível em: <http://www.epa.gov/oust/pubs/tums.htm>. Acesso em 03/03/2009.

VAN BEELEN, P.V.; DOELMAN, P. Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. *Chemosphere* 34, 455–499 p. 1997.

VAN GESTEL, K. MERGAERT, J.; SWINGS, J.; COOSEMANS, J.; RYCKEBOE, J. Bioremediation of diesel oil contaminated soil by composting with biowaste. *Environ. Pollut.* 125, 361-368, 2003.

VASUDEVAN, N.; RAJARAM, P. Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. *Environ. Int.*, Elmsford, v.26, p.409-411, 2001.

WALWORTH, J.L.; WOOLARD C. R.; HARRIS K. C. Nutrient amendments for contaminated peri-glacial soils: use of cod bone meal as a controlled release nutrient source. *Cold Regions Science and Technology*. 37, 81-88, 2003.

WANG, X.; YU, X.; BARTHA, R. Effect of bioremediation on polycyclic aromatic hydrocarbon residues in soil, *Environ. Sci. Technol.* 24 (7) 1086–1089,1990.

WATANABE, K. Microorganisms relevant to bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, pp. 237–241, 2001.

WATTS, R.J., HALLER, D.R., JONES, A.P. TEEL, A.L. A foundation for the risk-based treatment of gasoline-contaminated soils using modified Fenton's reactions, *J. Hazard. Mater.* B76, pp. 73–89. 2000.

WHANG, L.M. LIU, P.G.; CHIH-CHUNG, M.; CHENG, S. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *Journal Hazard. Mater.* 151. 155-163, 2008.

WHITE, P.A., RASMUSSEN, J. B.; BLAISE, C. Genotoxic substances in the St. Lawrence system I: industrial genotoxins sorbed to particulate matter in the St. Lawrence, St. Maurice and Saguenay Rivers, Canada. *Environ. Toxicological Chemistry* 17, 286-303, 1998.

WILD, S.R., WATERHOUSE, K.S., MCGRATH, S.P., JONES, K.C. Organic contaminants in an agricultural soil with a known history of sewage sludge amendments: polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Technology* 24, 1706-1711, 1990.

YE, D. SIDDIQI, M.A.; MACCUBBIN, A.E.; KUMAR, S.; SIKKA, H.C. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. *Environ. Sci. Technol.* 30, pp. 136–142, 1996.

ZEMO, D. & FOOTE, G. The technical case for eliminating the use of the TPH analysis in assessing and regulating dissolved petroleum hydrocarbons in ground water. *Groundwater Monitoring & Remediation*. 23 (3), 95-104, 2003.

ZHOU, Q.X. SONG, Y.F. *Remediation of Contaminated Soils Principles and Methods*, Science Press, China (2004).

ZHU, Y.; LIU, H.; CHENG, H.; XI, Z.; LIU, X.; XU, X. The distribution and source apportionment of aliphatic hydrocarbons in soils from the outskirts of Beijing. *Org Geochem* 36, 475–483 p., 2005.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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