



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GEOCIÊNCIAS



Alessandra Carla Oliveira Chagas-Spinelli

**BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO ARGILOSO CONTAMINADO
POR HIDROCARBONETOS POLIAROMÁTICOS
PROVENIENTES DE DERRAME DE ÓLEO DIESEL**

Tese de Doutorado
2007

ALESSANDRA CARLA OLIVEIRA CHAGAS-SPINELLI

Bióloga, Universidade Federal de Sergipe, 1997
Mestre em Oceanografia Química, Universidade Federal de Pernambuco, 2003

BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO ARGILOSO CONTAMINADO
POR HIDROCARBONETOS POLIAROMÁTICOS
PROVENIENTES DE DERRAME DE ÓLEO DIESEL

Tese que apresentou ao Programa de Pós-Graduação em Geociências do Centro de Tecnologia e Geociências da Universidade Federal de Pernambuco, orientada pelos Profs. Edmilson Santos de Lima e Sália Gavazza, como preenchimento parcial dos requisitos para obter o grau de Doutor em Geociências, área de concentração Geologia Sedimentar e Ambiental, defendida e aprovada com distinção em 21 de novembro de 2007.

RECIFE, PE

2007

C433b

Chagas-Spinelli, Alessandra Carla Oliveira.

Biorremediação de solo argiloso contaminado por hidrocarbonetos poliaromáticos provenientes de derrame de óleo diesel / Alessandra Carla Oliveira Chagas-Spinelli - Recife: O Autor, 2007.

174 folhas, il : figs., tabs.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Geociências, 2007.

Inclui Bibliografia e Anexo.

1. Geociências. 2. Hidrocarbonetos Poliaromáticos (HPAs). 3. Biorremediação. 4. Solo Argiloso. 5. Óleo Diesel. I. Título.

UFPE

551

CDD (22. ed.)

BCTG/2008-035

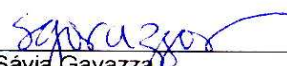
**BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO ARGILOSO CONTAMINADO POR HIDROCARBONETOS
POLIAROMÁTICOS PROVENIENTES DE DERRAME DE ÓLEO DIESEL**

ALESSANDRA CARLA O. CHAGAS-SPINELLI

Aprovada com distinção:



Prof. PhD. Edmilson Santos de Lima
(Orientador Presidente) Data



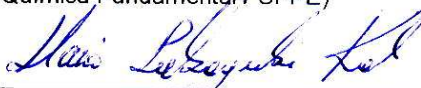
Profa. Dra. Sávila Gavazza
(Co-orientadora, Campus Avançado do Agreste / UFPE) Data



Profa. Dra. Adriana Ururahy Soriano
(CENPES / PETROBRÁS) Data



Profa. Dra. Ana Paula Paim
(Depto. Química Fundamental / UFPE) Data



Prof. Dr. Mário Takayuki Kato,
(Depto. Engenharia Civil / UFPE) Data



Prof. Dr. João Adatauto de Souza Neto
(Depto. Geologia / UFPE) Data

RECIFE, PE

2007

“Dixi et salvavi animam meam.”

Karl Marx

“Falei para salvar minha consciência (sem esperar convencer).”

*“O que me incomoda não é o barulho dos maus,
mas o silêncio dos bons.”*

M. Luther King

AGRADECIMENTOS

Esse é o grande momento do retrospecto... Foram muitas pessoas que fizeram parte dessa caminhada. Ao meu lado no dia a dia, pegando nos “erlenmeyer da vida” ou à distância, torcendo por cada bom passo.

Agradeço em primeiro lugar aos meus orientadores, Edmilson Santos de Lima e Sália Gavazza (mãe de Lili), que realmente me deram um grande voto de confiança e foram mais do que orientadores.

Ao Programa de Pós-graduação em Geociências e a bolsa da ANP através do PRH-26 que possibilitaram a execução desse trabalho.

Aos meus pais Luís e Cleides e a minha avó Elizete pelo eterno e compreensivo amor que eles sempre me dedicaram. Aos meus irmãos, Clay & Meire e Andrezza & Márcio, pelo amor incondicional e eterno e aos meus raios de alegria, Eduarda e Nanda.

Agradeço muitíssimo ao Laboratório de Saneamento Ambiental, especialmente na pessoa do Prof. Mário Kato, que permitiu o voto de confiança e que me possibilitou sentir parte integrante dessa grande família que é o LSA. A Ronaldo Melo que dispensa comentários e que é o acolhimento em pessoa.

E a um grande presente que apareceu na hora exata, a um super colega de trabalho, Luiz Galdino, que não deve ser por acaso que tem o nome do meu pai (tirando a idade é claro).

Agradeço aos meus colegas e amigos, todos... da Geologia, em especial a Ana Paula, Antônio, Sônia... que mesmo a distância me mandavam emails carinhosos e os do LSA para os quais nem tenho palavras. Estes estiveram ali sempre solícitos e dispostos a me socorrer, ah! E a rir e entrar em meus devaneios...

Agradeço em especial as minhas amigas Janaina e Christina e, aquisições recentes, Cristiane (Kika) e Rita, que sempre estiveram e sei que sempre estarão junto mesmo que nas adversidades. Agradeço a um anjo de pessoa que é Poliana a qual tenho um carinho imenso. A Daniela “Asinha” pelos cafés, por me aturar nas minhas horas mais chatas... Puxa, e a tantas pessoas... à Clara na minha introdução ao laboratório tornando tudo mais acessível; a André Felipe, pelas conversas tão conscientes e risadas no laboratório em plena 7, 8 horas da noite; a Marília por sua generosidade em ceder os meus doces e feis escudeiros das horas cruciais: Naara, que confiou sua monografia a mim, Rony, Érika, Larissa e Thiago.

A minha família Oliveira e Chagas, tios, tias, primos, tio Jorge, tia Hênia, que não sabem viver sem mim e me ligavam vários domingos pra que eu fizesse parte um pouquinho dos encontros em família que rolavam em Aracaju. A minha família Spinelli, meu sogro Neilan que me ama de paixão e não admite, a Zuleide, minha segunda mãe, cunhados, cunhadas cujo carinho não pode ser expresso em palavras.

E a pessoas que encontrei quase em todos os departamentos dessa universidade e em outras instituições que pareciam anjos facilitando minha caminhada.

Muitíssimo grata a todos.

DEDICATÓRIA

Dedico, com imenso e profundo agradecimento,
Ao meu grande amor, Alexandre, que esteve sempre de modo incansável
acreditando mais em mim do que eu mesma.

RESUMO

O óleo diesel tem sido usado amplamente no mundo inteiro, mas tem se tornado um dos mais comuns poluentes orgânicos do solo devido a vazamento de tanques de armazenamento e derrames acidentais. No Estado de Pernambuco, localizado no Nordeste do Brasil, existem evidências de contaminação por petroderivados por causa de vazamentos de postos de combustíveis. A preocupação tornou-se maior em função do crescimento da indústria petroquímica com a construção de uma refinaria de petróleo com capacidade de 200 mil barris diários, 60% dos quais serão de óleo diesel (operação prevista para 2011). O solo argiloso é muito comum no território brasileiro e em decorrência de suas características pedológicas e físico-químicas específicas é bastante utilizado como selante natural em postos de combustíveis e em aterros de áreas industriais. Entretanto, o solo argiloso é pouco estudado em relação aos tratamentos de biorremediação, além de pouco se conhecer sobre o comportamento sortivo de solos tropicais e das variáveis capazes de alterá-lo. O objetivo da presente pesquisa foi avaliar a eficiência de remoção de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) de um solo argiloso contaminado experimentalmente por óleo diesel através da comparação de diferentes técnicas de biorremediação. As técnicas de biorremediação testadas foram: *Landfarming* (LF), acréscimo de ar por revolvimento manual; Bioestímulo (BE), com acréscimo de nutrientes; e, Bioestímulo mais Bioaumento (BEBA), com acréscimo de nutrientes e microrganismos. Os experimentos de remoção foram conduzidos associados ao estudo do comportamento sortivo do solo e de possíveis alterações promovidas pelo uso de biotratamentos durante o período experimental (129 dias). Os 16 Hidrocarbonetos Poliaromáticos (HPAs) prioritários, indicados pela Agência Ambiental Americana, *United States Environmental Protection Agency* (USEPA), foram utilizados como principal parâmetro de avaliação dos tratamentos de biorremediação. O naftaleno, um dos 16 HPAs, foi utilizado como referência para avaliação de alterações sortivas do solo. O solo estudado foi identificado como um argissolo, tendo a caulinita como argilomineral característico. Bons resultados foram obtidos em todos os tratamentos e a opção por um desses tratamentos pareceu depender da finalidade desejada. Eficiência da remoção de O&G de 59%, 77% e 80% foi obtida em LF, BE e BEBA, respectivamente, indicando que o acréscimo de nutrientes e microrganismos (BEBA) tornou mais eficiente o tratamento. Também se observou dois padrões de remoção de O&G: um com taxa de remoção mais rápida nos primeiros 24 dias (P24) de experimento e outro com taxa mais lenta nos últimos 105 dias (U105). Os parâmetros cinéticos de ordem zero obtidos em P24, expressos por $\mu\text{g de O\&G.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, foram iguais a 0,89 para LF; 1,10 para BE e 1,21 para BEBA. Os valores em U105 foram 97%; 96% e 97% menores do que aqueles obtidos em P24, para LF, BE e BEBA, respectivamente. A eficiência de remoção dos HPAs totais foi de 87%, 89% e 87% no final do período experimental (129 dias), para LF, BE e BEBA, respectivamente. Aparentemente, não foi constatada diferença significativa entre as técnicas de tratamento usadas. A mais rápida remoção dos poliaromáticos ocorreu nos primeiros 17 dias (P17) e a mais lenta nos últimos 112 dias (U112). Neste caso, os parâmetros cinéticos de ordem zero foram iguais a $4,48 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ para LF; $4,62 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ para BE e $4,71 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ para BEBA. No segundo intervalo (112 dias), os parâmetros cinéticos também foram 97%; 97% e 98% inferiores do que aqueles obtidos em P17, para LF, BE e BEBA, respectivamente. No entanto, a análise dos HPAs individuais mostrou haver diferença entre os tratamentos de acordo com o composto investigado. Para o fenantreno os tratamentos BE e BEBA apresentaram eficiência de remoção em torno de 88%, enquanto que para LF a eficiência de remoção foi de 79%. O benzo(a)pireno (BaP) foi removido com eficiência de 95% em BEBA, 91% em LF e 83% em BE. A menor concentração de BaP foi igual a 0,26 $\mu\text{g/g}$ em BEBA. A redução significativa na velocidade de remoção no segundo intervalo de tempo para O&G, Σ HPAs e HPAs individuais pode ser atribuída, entre outros aspectos, a acumulação de intermediários tóxicos que podem ter interferido negativamente na atividade de degradação promovida pelos microrganismos. Os níveis de toxicidade se mantiveram altos, especialmente, para os tratamentos BE e BEBA até o fim do período de incubação. Quanto à capacidade sortiva do solo, esta se manteve praticamente constante em LF e foi reduzida ao longo do tempo de experimento em BE e BEBA, o que deve ter promovido nesses tratamentos maior disponibilidade dos contaminantes (O&G, HPAs), visto pelos significativos níveis de remoção alcançados. Desse modo, conclui-se que, de maneira geral, o acréscimo de nutrientes (BE) foi muito promissor entre os tratamentos testados para remoção da contaminação proveniente do óleo diesel.

Palavras-chave: biorremediação, HPAs, sorção, solo argiloso.

ABSTRACT

Diesel oil is used worldwide but has become one of the most common soil organic pollutants, mainly due to the spilling of storage tanks and accidental leaks. In Pernambuco State, Northeast Brazil, there are several evidences of soil contamination by petroleum derivatives because of gas station leakings. The concern increases because of the development of a new petrochemical industry pool headed by the construction of a refinery with the capacity of 200,000 barrels per day, 60% of which will be diesel oil (expected operation in 2011). Clay soil is very common in Brazil and due to the specific pedological and physicochemical characteristics, it is extensively used as a natural sealant in gas station and dumping industrial areas. However, there are few studies about bioremediation treatment of clay soil, the known on the sorptive behavior of tropical soil and the variable capable to modify it. The objective of this work was to evaluate the removal of polyaromatic hydrocarbons (PAH) from a clay soil experimentally contaminated with diesel oil, by comparing different bioremediation techniques. The treatments used were: landfarming (LF), air addition by hand mixing; Biostimulation (BS), air and nutrients addition; and, Biostimulation more Bioaugment (BSBA), air, nutrients and microorganisms addition. The removal experiments were conducted in parallel with the study of the sorptive behavior of the soil and of the possible alterations promoted because of the used biotreatments during the experimental period (129 days). The 16 Polyaromatic Hydrocarbons (PAHs) priorities for the American Environmental Agency (USEPA) were used as a reference on the bioremediation treatment evaluation. Naphthalene, one of them, was used as reference for the evaluation of soil sorption variations. The soil was identified as a clay soil where the kaolinit is the mainly mineral clay. Good results were obtained in all treatments and the choice of this treatment depends on the finality. G&O removal efficiencies of 59%, 77% and 80% were obtained for LF, BS and BSBA, respectively, indicating that nutrients and microorganism addition promoted higher improvements in the treatment process. It was also observed two patterns of O&G removal: a faster removal rate in the first 24 days (F24) and a slower rate in the last 105 days (L105). The kinetic parameters of zero order in F24, expressed in $\mu\text{g of O\&G.g}^{-1}.\text{day}^{-1}$, were 0.87 for LF; 1.10 for BS and 1.21 for BSBA. The values in L105 were 97%; 96% and 98% lower than those obtained in F24, for LF, BS and BSBA, respectively. Total PAH removal efficiency was 87%, 89% and 87% at the end of experimental period (129 days), for LF, BS and BSBA, respectively. Apparently, there were no significant differences between the used treatment techniques. The faster removal rate of the polyaromatics occurred in the first 17 days (F17) and slower rate in the last 112 days (L112). The kinetic parameters of zero order in F17, expressed in $\mu\text{g of HPA.g}^{-1}.\text{day}^{-1}$ were 4.48 for LF; 4.62 for BS and 4.71 for BSBA. The values in L112 were 97%; 97% and 98% lower than those obtained in F17, for LF, BS and BSBA, respectively. However, the analysis of the individual PAH showed that there are differences between the treatments according to the compound evaluated. For phenanthrene the treatments BS and BSBA showed removal efficiency of 88% while this efficiency was 79% for LF. The benzo(a)pyrene (BaP) was removed with 95% of efficiency in BSBA, 91% in FL and 83% in BS. The lower concentration of BaP observed was 0,26 $\mu\text{g/g}$ in BSBA. The significant reduction in the rate of removal in the last days for O&G, PAH and PAH individual can be attributed, among others aspects, the toxic intermediate accumulation that can have negative intervened with the activity of degradation promoted for the microorganisms. This probably happened because of the intermediary metabolites production. The toxicity levels were high, especially for BS and BSBA treatment. The soil sorptive capacity was constant in LF and was reduced during the experimental time in BS and BSBA. This behavior should have increased the availability of the contaminants (O&G, PAHs) as observed by their significant levels of removal. In this way, the addition of nutrients (BS) was very promising for the treatments essayed. This removal was associated with an increase in the availability of the contaminants.

Key-words: bioremediation, PAHs, sorption, soils clay.

RESUMO DOS CAPÍTULOS

O Capítulo 1 faz uma breve introdução do presente trabalho e justifica o interesse da pesquisa.

O Capítulo 2 apresenta os riscos ambientais da contaminação com óleo diesel e dos seus constituintes poliaromáticos. Discute o comportamento dos petroderivados e as suas características e interação com o solo, bem como as técnicas mais utilizadas de remediação e biodegradação dos HPAs. As nuances da legislação brasileira e os valores de referência também são abordados, bem como os modelos de sorção mais utilizados para compostos orgânicos hidrofóbicos, como é o caso dos hidrocarbonetos poliaromáticos em estudo.

Os objetivos são apresentados no Capítulo 3.

No Capítulo 4 estão apresentadas as metodologias analíticas empregadas para o desenvolvimento da presente pesquisa. Em um primeiro momento, estão detalhadas as etapas de amostragem e caracterização físico-química e microbiológica do solo estudado e a caracterização química do óleo diesel utilizado. Em seguida, estão descritos os procedimentos para a execução do experimento de remediação do solo argiloso contaminado por óleo diesel, bem como para obtenção dos parâmetros de avaliação da remoção alcançada. E na sequência, consta o segundo experimento cujo objetivo foi avaliar o comportamento sortivo do solo durante o processo de remediação propostos.

O Capítulo 5 traz os resultados e discute os principais parâmetros interferentes no processo de biorremediação. São abordadas as características do solo (*in natura* e contaminado com diesel) e do contaminante (óleo diesel), no que se referem às alterações microbiológicas, os níveis de metais-traços, com a introdução do diesel, e as principais adaptações do meio contaminado (solo) para resultados mais satisfatórios na biorremediação. Também estão descritos o processo de implantação do método de quantificação do naftaleno e os resultados pertinentes à mudança do comportamento sortivo do solo argiloso durante os tratamentos de remediação propostos no presente estudo (LF, BE e BEBA). Resultados sobre os níveis de toxicidade do óleo diesel, durante etapas do tratamento, também estão apresentadas no citado capítulo.

As conclusões estão relatadas no Capítulo 6.

No Capítulo 7 estão propostas algumas recomendações resultantes do presente estudo.

O Capítulo 8 lista as referências bibliográficas utilizadas para embasamento da pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	4
LISTA DE TABELAS.....	7
PRINCIPAIS SIGLAS E SÍMBOLOS UTILIZADOS NO TEXTO.....	9
Capítulo 1. INTRODUÇÃO.....	10
Capítulo 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Óleo diesel e a problemática ambiental dos constituintes poliaromáticos.....	13
2.2 Rota no ambiente: transporte e destino de petróleo e derivados.....	19
2.3 Solo: estrutura e características.....	23
2.3.1 Estrutura geral do solo.....	23
2.3.2 Características do solo.....	24
2.4 Degradação de HPAs.....	28
2.4.1 Biodegradação dos HPAs no solo: interferentes físico-químicos.....	34
2.4.2 Exemplos de técnicas de biorremediação aplicadas no tratamento de solo contaminado.....	37
2.5 Legislação: valores de referência para contaminação por HPAs.....	38
2.6 Desenvolvimento e validação do método para quantificação do naftaleno.....	41
2.7 Comportamento sortivo do solo nos tratamentos testados.....	44
2.8 Testes de toxicidade.....	49
Capítulo 3. OBJETIVOS.....	52
3.1 Objetivo geral.....	52
3.2 Objetivos específicos.....	52
Capítulo 4. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1 Caracterização físico-química e microbiológica do solo e química do óleo diesel.....	54
4.1.1 Amostragem do solo.....	54
4.1.2 Quantificação dos parâmetros físico-químicos da amostra de solo.....	54
4.1.3 Quantificação dos microrganismos heterotróficos totais.....	55
4.1.4 Amostragem e caracterização do óleo diesel.....	56
4.2 Tratamentos de remediação.....	56
4.2.1 Preparo das amostras de solo.....	56
Secagem do solo.....	58

	Verificação e ajuste do teor de umidade do solo.....	58
	Verificação da relação adequada de nutrientes (C:N:P).....	58
4.2.2	Preparo dos experimentos de remediação.....	59
4.2.2.1	Contaminação do solo com óleo diesel.....	60
4.2.2.2	Caracterização dos tratamentos.....	60
	<i>Landfarming</i>	60
	Bioestímulo.....	60
	Bioaumento.....	60
4.2.3	Monitoramento dos tratamentos de remediação: parâmetros analisados.....	62
4.3	Avaliação da capacidade sortiva do solo durante os tratamentos de remediação.....	63
4.3.1	Implantação do método para quantificação do naftaleno por CLAE.....	64
4.3.1.1	Procedimentos de validação.....	64
	Seletividade.....	64
	Linearidade e faixa de aplicação.....	65
	Precisão.....	66
	Exatidão.....	66
	Limite de detecção.....	66
	Limite de quantificação.....	66
4.3.2	Comportamento sortivo do naftaleno durante os tratamentos de remediação.....	67
4.3.2.1	Reagentes e preparo das soluções.....	68
4.3.2.2	Obtenção das isotermas de sorção.....	68
4.3.3	Estimativa do coeficiente de sorção.....	71
4.3.4	Estimativa dos coeficientes K_d e K_{oc}	72
4.4	Avaliação da toxicidade do solo durante os tratamentos de remediação.....	73
4.4.1	Procedimentos para execução do teste de toxicidade do solo.....	74
4.5	Tratamento estatístico dos dados experimentais.....	75
Capítulo 5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	76
5.1	Caracterizações físico-químicas e microbiológicas do solo e química do óleo diesel.....	76
5.1.1	Caracterização físico-química do solo.....	76
5.1.2	Caracterização química do óleo diesel.....	83
5.1.3	Níveis de metais pesados no solo.....	83
5.1.4	Caracterização microbiológica do solo.....	86
5.2	Biorremediação do solo contaminado.....	91
5.2.1	Comportamento dos microrganismos ao longo dos tratamentos.....	91
5.2.1.1	Avaliação da produção de biossurfactantes nos tratamentos.....	98
5.2.2	Eficiência dos tratamentos: remoção dos contaminantes.....	100
5.2.2.1	Remoção dos óleos e graxas (O&G).....	100
5.2.2.2	Remoção do carbono orgânico (C_{org}).....	107
5.2.2.3	Remoção dos hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs).....	111
	Remoção dos HPAs totais ($\sum$ HPAs).....	111
	Remoção dos HPAs individuais.....	118
	Concentração dos HPAs no solo após tratamentos.....	125
5.3	Sorção do naftaleno durante os tratamentos de remediação.....	126
5.3.1	Implantação da quantificação do naftaleno por CLAE.....	126

5.3.2	Validação do método para análise do naftaleno.....	127
	Seletividade.....	127
	Linearidade e faixa de aplicação.....	128
	Precisão.....	129
	Exatidão.....	130
	Limite de detecção.....	130
	Limite de quantificação.....	130
5.3.3	Comportamento sortivo do naftaleno durante os tratamentos de remediação.....	131
	5.3.3.1 Definição do modelo de sorção adequado para os tratamentos testados.....	131
	5.3.3.2 Coeficientes de sorção dos tratamentos testados.....	138
5.4	Teste de toxicidade durante os tratamentos de remediação.....	144
	5.4.1 Teste piloto: avaliação da adequação da matriz ao teste de toxicidade.....	144
	5.4.2 Teste de toxicidade no solo contaminado com óleo diesel.....	145
Capítulo 6.	CONCLUSÕES.....	150
Capítulo 7.	RECOMENDAÇÕES.....	154
Capítulo 8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155
	ANEXOS.....	169

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Número de carbonos e pontos de ebulição de frações do petróleo. Adaptada de Weisman (1998).....	14
Figura 2.	Exemplos de representações gráficas do composto aromático benzeno.....	15
Figura 3.	Esquema do destino de contaminantes orgânicos no ambiente. Adaptada de Semple <i>et al.</i> (2001).....	20
Figura 4.	Distribuição vertical no solo das fases dos hidrocarbonetos (HCs). Adaptada de USEPA (2004b).....	21
Figura 5.	Componentes da zona insaturada do solo. Adaptada de Grathwohl (1998).....	24
Figura 6.	Metabolismo microbiano da quebra de anel aromático pelo caminho <i>ORTO</i> e <i>META</i> . Adaptada de Cerniglia (1984).....	33
Figura 7.	Metabolismo dos fungos na quebra de anel aromático. Adaptada de Cerniglia (1984).....	34
Figura 8.	Fluxograma das atividades desenvolvidas na presente pesquisa.....	53
Figura 9.	Esquema experimental para os biotratamentos de remediação do solo argiloso contaminado com óleo diesel.....	57
Figura 10.	Esquema do procedimento adotado para validação do método de quantificação do naftaleno por CLAE.....	67
Figura 11.	Fluxograma do esquema experimental e procedimento analítico para quantificação da sorção de naftaleno (NAP) em solo.....	70
Figura 12.	Concentração em mg.kg ⁻¹ de alguns metais traços antes e após a contaminação com óleo diesel.....	85
Figura 13.	Ilustração de exemplares dos fungos presentes no solo argiloso contaminado com óleo diesel.....	90
Figura 14.	Características morfológicas do solo estudado: (a) 1º dia após o umedecimento e (b) após 3º dia de umedecimento e destorroamento.....	93
Figura 15.	Número de bactérias (log bactérias.g ⁻¹ de solo) ao longo dos dias de incubação e nos tratamentos testados em solo argiloso contaminado com óleo diesel.....	93
Figura 16.	Número de fungos (log fungos.g ⁻¹ de solo) ao longo dos dias de incubação e nos tratamentos testados em solo argiloso contaminado com óleo diesel.....	94
Figura 17.	Variação do pH nos tratamentos LF, BE e BEBA durante o experimento.....	96
Figura 18.	Relação entre a cinética de crescimento de bactérias e fungos (log microrganismos.g ⁻¹ de solo) e a variação de pH nos tratamentos LF, BE e BEBA durante os intervalos 0, 3º, 10º, 17º, 24º, 45º, 73º, 101º e 129º dias de incubação do experimento.....	97
Figura 19.	Variação da tensão superficial nos tratamentos LF, BE e BEBA durante o experimento.....	99
Figura 20.	Eficiências de remoção acoplada de O&G nos tratamentos adotados (LF, BE e BEBA).....	100

Figura 21.	Relação entre a cinética de crescimento de bactérias e de fungos ($\log$ microrganismos.g ⁻¹ de solo) e o percentual de remoção relativa e acumulada de O&G nos tratamentos LF, BE e BEBA durante os intervalos 0, 3º, 10º, 17º, 24º, 45º, 73º, 101º e 129º dias de incubação do experimento.....	103
Figura 22.	Eficiências de remoção de O&G (percentual) nos tratamentos adotados LF, BE e BEBA e os respectivos agrupamentos obtidos através do teste <i>Tukey</i>	105
Figura 23 (a, b, c).	Ajuste cinético de O&G nos tratamentos LF (a), BE (b) e BEBA (c) no tempo de incubação....	106
Figura 24.	Eficiências de remoção acumulada de C _{org} nos tratamentos adotados (LF, BE e BEBA).....	108
Figura 25.	Eficiências de remoção do C _{org} (percentual) nos tratamentos adotados LF, BE e BEBA e os respectivos agrupamentos obtidos através do teste <i>Tukey</i>	108
Figura 26.	Remoção relativa do teor de C _{org} nos tratamentos testados ao longo do experimento.....	109
Figura 27.	Relação entre eficiências de remoção de C _{org} e O&G para os tratamentos adotados LF, BE e BEBA.....	110
Figura 28.	Eficiências de remoção em percentual cumulativo de degradação de HPAs nos tratamentos adotados LF, BE e BEBA ao final dos 129 dias de incubação e os respectivos agrupamentos obtidos através do teste de <i>Tukey</i>	111
Figura 29.	Remediação dos Σ HPAs (somatório dos HPAs prioritários) nos tratamentos estudados (LF, BE e BEBA).....	112
Figura 30.	Perfis cromatográficos dos HPAs do solo contaminado com óleo diesel nos tratamentos LF, BE e BEBA no 3º e 129º dias.....	117
Figura 31 a.	Evolução da concentração de HPAs durante os 129 dias de incubação nos tratamentos LF, BE e BEBA.....	121
Figura 31 b.	Evolução da concentração de HPAs durante os 129 dias de incubação nos tratamentos LF, BE e BEBA.	122
Figura 32.	Cromatograma da solução-padrão de naftaleno por CLAE (FID).....	127
Figura 33.	Cromatograma obtido a partir da injeção de três amostras do branco do solo argiloso estudado (branco). As diferentes amostras estão indicadas pelas cores vermelho, azul e verde.....	127
Figura 34.	Reta analítica obtida da injeção de pontos da solução-padrão do naftaleno.....	128
Figura 35.	Determinação gráfica da curva de linearidade por meio da razão sinal/concentração <i>versus</i> a concentração em escala logarítmica obtida da injeção de pontos da solução-padrão do naftaleno.....	129
Figura 36a.	Isotermas de sorção do naftaleno obtidas no 10º e 45º dias dos tratamentos LF, BE e BEBA ajustadas pelo modelo de <i>Freundlich</i> linearizado.....	133
Figura 36b.	Isotermas de sorção do naftaleno obtidas no 129º dia dos tratamentos LF, BE e BEBA ajustadas pelo modelo de <i>Freundlich</i> linearizado.....	134
Figura 37a.	Isotermas de sorção do naftaleno obtidas no 10º e 45º dias dos tratamentos LF, BE e BEBA ajustadas pelo modelo de linear.....	136
Figura 37b.	Isotermas de sorção do naftaleno obtidas no 129º dia dos tratamentos LF, BE e BEBA ajustadas pelo modelo linear.....	137
Figura 38 (a, b, c)	Relação entre o C _{org} (g.kg ⁻¹) e o coeficiente de sorção (K _d) observada durante o 10º, 45º e 129º dias dos tratamentos LF (a), BE (b) e BEBA (c) aplicado ao solo argiloso contaminado por óleo diesel.....	141

Figura 39 (a, b, c).	Relação entre o conteúdo de O&G e o coeficiente de sorção normalizado pelo C_{org} (K_{oc}) observada durante o 10º, 45º e 129º dias dos tratamentos LF (a), BE (b) e BEBA (c) aplicado ao solo argiloso contaminado por óleo diesel.....	142
Figura 40 (a, b, c, d).	Média $\pm$ desvio padrão da sobrevivência (a), fecundidade (b), número de náuplios (c) e copepoditos (d) medidos no final dos testes-piloto, utilizando fêmeas adultas do copépodo bentônico <i>Tisbe biminiensis</i> . Piloto 1 - sem a correção do pH e Piloto 2 - com a correção do pH.....	144
Figura 41 (a, b, c, d).	Média $\pm$ desvio padrão da sobrevivência (a), fecundidade (b), número de náuplios (c) e copepoditos (d) medidos no final do experimento com solo contaminado no 3º dia de incubação nos diferentes tratamentos (LF, BE e BEBA) e sedimento controle utilizando fêmeas adultas do copépodo bentônico <i>Tisbe biminiensis</i>	146
Figura 42 (a, b, c, d).	Média $\pm$ desvio padrão da sobrevivência (a), fecundidade (b), número de náuplios (c) e copepoditos (d) medidos no final do experimento com solo contaminado no 73º dia de incubação nos diferentes tratamentos (LF, BE e BEBA) e sedimento controle utilizando fêmeas adultas do copépodo bentônico <i>Tisbe biminiensis</i>	147
Figura 43 (a, b, c, d).	Média $\pm$ desvio padrão da sobrevivência (a), fecundidade (b), número de náuplios (c) e copepoditos (d) medidos no final do experimento com solo contaminado no 1293º dia de incubação nos diferentes tratamentos (LF, BE e BEBA) e sedimento controle utilizando fêmeas adultas do copépodo bentônico <i>Tisbe biminiensis</i>	148

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Classificação dos HPAs estudados quanto à sua carcinogenicidade (IARC), carcinogenicidade e ocorrência (USEPA) e periculosidade (ABNT).....	17
Tabela 2.	Concentração e fração molar para alguns HPAs de um óleo diesel comercial da PETROBRAS.....	18
Tabela 3.	Valores típicos de saturação residual do óleo diesel da zona insaturada em diferentes frações granulométricas do solo.....	22
Tabela 4.	Áreas específicas e CTCs de alguns argilominerais e frações granulométricas.....	26
Tabela 5.	Classificação quanto ao tamanho dos componentes (textura) da fase sólida do solo. Escala Internacional de Attenberg.....	27
Tabela 6.	Classificação da fase sólida do solo quanto à textura em função da proporção relativa das frações granulométricas (areia, silte e argila).....	27
Tabela 7.	Tecnologias de tratamento de compostos orgânicos.....	30
Tabela 8.	Exemplos de espécies de bactérias degradadoras de HPAs.....	31
Tabela 9.	Exemplos de espécies de fungos degradadoras de HPAs.....	31
Tabela 10.	Fatores ambientais críticos da atividade microbiana no solo.....	35
Tabela 11.	Valores orientadores de HPAs para solo e água subterrânea no Estado de São Paulo.....	39
Tabela 12.	Níveis genéricos de <i>Soil Screen Levels</i> (SSL's) para alguns contaminantes no solo ($\mu\text{g.g}^{-1}$).....	40
Tabela 13.	Valores de referência para Σ HPAs em solos segundo a Norma Holandesa.....	40
Tabela 14.	Níveis genéricos para os 16 HPAs prioritários ($\mu\text{g.g}^{-1}$) da USEPA em solo, segundo a <i>Generalitat da Catalunya</i> (segue o Níveis Genéricos de Referência da Norma Holandesa).....	41
Tabela 15.	HPAs prioritários da USEPA e suas principais características físico-químicas.....	48
Tabela 16.	Caracterização físico-química do solo em estudo e os respectivos métodos adotados.....	55
Tabela 17.	Constituição do meio mineral de <i>Büshnell-Haas</i> – BH.....	61
Tabela 18.	Parâmetros avaliados ao longo dos tratamentos.....	62
Tabela 19.	Descrição pedológica e características gerais do solo estudado.....	77
Tabela 20.	Caracterização física do solo estudado antes e após a contaminação com óleo diesel.....	78
Tabela 21.	Caracterização química do solo estudado antes e após a contaminação com óleo diesel.....	79
Tabela 22.	Variação da porosidade de acordo com o tipo de solo.....	81
Tabela 23.	Quantificação dos óleos e graxas no solo antes e pós-contaminação com óleo diesel.....	82
Tabela 24.	Caracterização físico-química do óleo diesel.....	83
Tabela 25.	Concentração de metais (mg.kg^{-1} de solo) no solo antes e após a contaminação por óleo diesel...	84
Tabela 26.	Cálculo dos teores naturais de metais em função das porcentagens de argila (L) e de matéria orgânica (H) no solo e os valores de referência - S obtidos (L=44,8% e H=1,68%).....	84
Tabela 27.	Quantificação dos microrganismos heterotróficos totais (UFC.g^{-1} de solo) do solo argiloso em estudo.....	87

Tabela 28.	Espécies de bactérias presentes no solo estudado (solo contaminado com óleo diesel após 30 dias) com os seus respectivos índices de similaridade.....	88
Tabela 29.	Espécies de fungos presentes no solo estudado (solo contaminado com óleo diesel após 30 dias).....	88
Tabela 30.	Microrganismos quantificados (UFC.g ⁻¹ de solo) nos tratamentos LF, BE e BEBA nos intervalos 0, 3º, 10º, 17º, 24º, 45º, 73º, 101º e 129º dias de incubação do experimento.....	91
Tabela 31.	Microrganismos quantificados (log microrganismos.g ⁻¹ de solo) nos tratamentos LF, BE e BEBA nos intervalos 0, 3º, 10º, 17º, 24º, 45º, 73º, 101º e 129º dias de incubação do experimento.....	92
Tabela 32.	Percentual de degradação relativa de O&G presente no solo contaminado com óleo diesel.....	101
Tabela 33.	Percentual de remoção de O&G dos tratamentos em relação ao seu respectivo controle.....	104
Tabela 34.	Velocidade de decaimento da remoção de O&G provenientes da contaminação do solo por óleo diesel nos diferentes tratamentos de biorremediação.....	107
Tabela 35.	Velocidade de decaimento da remoção de ΣHPAs provenientes da contaminação do solo por óleo diesel nos diferentes tratamentos de biorremediação.....	113
Tabela 36.	Percentual de degradação relativa de HPAs presente no solo contaminado com óleo diesel.....	114
Tabela 37.	Percentual de remoção dos HPAs presente no solo contaminado com óleo diesel diante dos diferentes tratamentos adotados nos 129 dias de incubação.....	118
Tabela 38.	Velocidade de decaimento da remoção dos HPAs individuais provenientes da contaminação do solo por óleo diesel nos diferentes tratamentos de biorremediação.....	123
Tabela 39.	Condições analíticas do CLAE para quantificação do naftaleno.....	126
Tabela 40.	Parâmetros para avaliação da precisão do método para quantificação do naftaleno.....	129
Tabela 41.	Parâmetros para avaliação da exatidão do método para quantificação do naftaleno.....	130
Tabela 42a.	Dados de regressão provenientes do ajuste de sorção do naftaleno (NAP) nos modelos linear, <i>Freundlich</i> e <i>Langmuir</i> no 10º dia de incubação nos tratamentos LF, BE e BEBA.....	131
Tabela 42b.	Dados de regressão provenientes do ajuste de sorção do naftaleno (NAP) nos modelos linear, <i>Freundlich</i> e <i>Langmuir</i> no 45º dia de incubação nos tratamentos LF, BE e BEBA.....	131
Tabela 42c.	Dados de regressão provenientes do ajuste de sorção do naftaleno (NAP) nos modelos linear, <i>Freundlich</i> e <i>Langmuir</i> no 129º dia de incubação nos tratamentos LF, BE e BEBA.....	132
Tabela 43a.	Valores experimentais do coeficiente de distribuição (K _d) do naftaleno (NAP), das amostras de solo nos tratamentos LF, BE e BEBA no 10º dia, e teóricos com base nos dados de K _{oc} da USEPA.....	139
Tabela 43b.	Valores experimentais do coeficiente de distribuição (K _d) do naftaleno (NAP), das amostras de solo nos tratamentos LF, BE e BEBA no 45º dia, e teóricos com base nos dados de K _{oc} da USEPA.....	139
Tabela 43c.	Valores experimentais do coeficiente de distribuição (K _d) do naftaleno (NAP), das amostras de solo nos tratamentos LF, BE e BEBA no 129º dia, e teóricos com base nos dados de K _{oc} da USEPA.....	139

PRINCIPAIS SIGLAS E SÍMBOLOS UTILIZADOS NO TEXTO

ACN	Acetonitrila
CC	Capacidade de campo
CG/EM	Cromatografia Gasosa por Espectrometria de Massa ou GC/MS (<i>Gas chromatography Mass Spectrometry</i>)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Resolução ou HPLC (<i>High Performance Liquid Chromatographic</i>)
C:N:P	Relação carbono, nitrogênio, fósforo
COH	Compostos orgânicos hidrofóbicos
C _{org}	Carbono orgânico
C _{ref} ou C ₀	Concentração inicial da substância-teste na fase aquosa (mg.L ⁻¹)
C _s	Concentração da substância-teste adsorvida por solo (mg.kg ⁻¹)
CTC	Capacidade de troca catiônica
C _w	Concentração de equilíbrio na fase aquosa (mg.L ⁻¹)
DCM	Diclorometano
Eh	Potencial redox
f _{oc}	Fração de massa de C _{org}
HPA	Hidrocarboneto poliaromático
HTP	Hidrocarboneto total de petróleo
ICP/AES	<i>Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry</i> (Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente)
K _d	Coeficiente de distribuição em equilíbrio linear
K _F	Coeficiente de distribuição de <i>Freundlich</i>
K _{oc}	Coeficiente de distribuição normalizado pelo teor de C _{org}
K _{OW}	Coeficiente de partição octanol-água
M.O.	Matéria orgânica
N	Constante empírica (equação de <i>Freundlich</i> , ordem da reação)
NAPL	<i>Non-Aqueous Phase Liquids</i> (Fase líquida não aquosa)
NMP	Número mais provável
OD	Oxigênio dissolvido
POPs	Poluentes Orgânicos Persistentes
UCM	<i>Unresolved Complex Mixture</i> (mistura complexa não resolvida)
UFC	Unidade formadora de colônia
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
V	Volume da solução (L)
W	Peso de solo (kg)

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O óleo diesel tem sido usado massivamente no mundo inteiro e, conseqüentemente, tem se tornado um dos mais comuns poluentes orgânicos da superfície do solo e eventualmente considerado um grande problema ambiental (Wang & Bartha, 1990; Bento *et al.*, 2005). É empregado em automóveis, furgões, ônibus, caminhões, em pequenas e grandes embarcações marítimas, locomotivas e aplicações estacionárias (máquinas de grande porte e geradores elétricos) (PETROBRAS, 2004).

Como derivado do petróleo, caracteriza-se por ser uma mistura complexa de destilados intermediários do óleo cru. É composto de aproximadamente 40% de n-alcanos, 40% de iso e cicloalcanos, 20% de hidrocarbonetos aromáticos, uma percentagem menor de isoprenóides e de compostos oxigenados, sulfurados e nitrogenados (Lee *et al.*, 2002). Atualmente, vem representando no mundo uma das principais preocupações ambientais. As principais formas de contaminação por óleo diesel se dão por vazamento de tanques de armazenamento, por bombas ou através de derrames acidentais (Gallego *et al.*, 2001).

Estima-se que só nos EUA, existam mais de 1,5 milhões de tanques de armazenamento subterrâneos de gasolina e que semanalmente mais de 1.000 novos casos de vazamentos são encontrados em todo o território norte-americano (Bratberg & Hopkins, 1995). No Brasil, esse dado provavelmente não é diferente, já que não há fiscalização e manutenção eficientes de tanques de armazenamento, principalmente em postos de combustíveis, representando assim enormes riscos de contaminação do lençol freático e, por conseguinte, riscos à saúde humana (Corseuil *et al.*, 1996).

Segundo órgãos ambientais brasileiros, mais da metade da contaminação de solo e do lençol freático por petroderivados é de responsabilidade de postos de combustíveis. Isso decorre do fato, que em média, a vida útil dos tanques subterrâneos é de 25 anos, portanto, supõe-se que boa parte desses já esteja comprometida. Em Recife (PE), há indícios da contaminação por derivados de petróleo nas circunvizinhanças dos postos de combustíveis. No Estado, existem cerca de 1.187 postos e apenas a metade possui licença ambiental e desse total, 480 estão na Região Metropolitana do Recife (RMR), com 263 na Capital (SECRETARIA DO GABINETE CIVIL DE PERNAMBUCO, 2005). De acordo com a Agência Nacional de Petróleo (ANP), o número de postos é ainda maior, chegando a 1.743, deixando Pernambuco entre os nove estados brasileiros com a maior quantidade de revendedores de combustíveis.

Para tratamento do óleo diesel, os processos de biorremediação têm sido atrativos, tanto *in situ* quanto *ex situ* e, segundo estudos, com bons resultados (Joner *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2004; Ghazali *et al.*, 2004; Bento *et al.*, 2005). No Brasil, o Plano de Contingência (TRANSPETRO, 2003) indica que o tratamento *in situ* é o mais utilizado, inclusive para o tratamento do óleo diesel. Dentre eles estão o processo de atenuação natural do solo e o bioestímulo que se dá através de diferentes incrementos, preferencialmente: adição de O₂ (aerificação) e fertilização. O tratamento *ex situ* é normalmente utilizado quando a contaminação ameaça alcançar o lençol freático e quando há como objetivo minimizar problemas associados com aplicação no campo e avaliar a redução do custo efetivo (Wilson & Jones, 1993; Balba *et al.*, 1998).

No entanto, há indicativos na literatura de limitações na remoção total dos contaminantes, principalmente, de hidrocarbonetos hidrofóbicos, como é o caso dos HPAs. Segundo Huang *et al.* (2004), o *landfarming* e a biorremediação, práticas usadas para remediação do petróleo e de HPAs em solos contaminados, têm indicado limitada eficiência na remoção dos recalcitrantes e hidrocarbonetos altamente hidrofóbicos. Segundo esses trabalhos, o *landfarming* estimula a volatilização dos HPAs de cadeias pequenas, a biodegradação aeróbia e a fotooxidação, só que apenas na superfície do solo. Dessa maneira, a combinação de diferentes processos vem sendo um indicativo mais promissor para tratar os diferentes HPAs no meio. No entanto, ainda são poucos os estudos nessa direção, especialmente, em condições tropicais, como é o caso do Brasil.

Além disso, outras considerações precisam ser feitas. Segundo estudos, o tratamento do óleo diesel apresenta resultados diferentes no campo e em laboratório. Cutright (1995) obteve resultados pouco satisfatórios no campo, mesmo após bem sucedidos experimentos em laboratório. Atlas (1995a) e Zytner (2002) indicam que essas divergências resultam de uma falta de compreensão de como algumas variáveis ambientais (transporte de massa nas fases sólida, líquida e gasosa; heterogeneidade espacial e competição dos microrganismos) interferem nos processos de biorremediação.

A escolha do solo argiloso, como objeto de estudo, se deve ao fato deste ser muito comum no território brasileiro (solos tropicais, intemperizados); pouco estudado na literatura; e um dos mais representativos na Região Metropolitana da Grande Recife, onde está instalada boa parte dos postos de combustíveis. Além disso, é um tipo de solo muito utilizado para aterro, tendo como exemplo a Zona Industrial Portuária (ZIP) de Suape – PE, aonde vem sendo ampliado o número de empreendimentos, entre elas a refinaria de petróleo que terá, a partir de 2011, 200 mil barris processados por dia, sendo 60% de óleo diesel. No entanto, apesar dessa abrangência e uso, o solo argiloso é pouco estudado no que tange a tratamentos de biorremediação. Outro aspecto que merece atenção é que pouco se conhece sobre o comportamento sortivo de solos tropicais e das variáveis capaz de alterá-lo.

Desse modo, a presente pesquisa traz como objetivo, e caráter inovador, a proposta de avaliação da eficiência de diferentes tratamentos de biorremediação, quando aplicados a solo argiloso contaminado por óleo diesel, associada ao estudo do comportamento sortivo do solo local e de possíveis alterações promovidas pelo uso de biotratamentos. Para a execução da pesquisa esta foi dividida em dois aspectos: os testes de remediação que abordaram os procedimentos de

biorremediação do solo contaminado, bem como o percentual de degradação alcançado por indicadores específicos (óleos e graxas, carbono orgânico, hidrocarbonetos poliaromáticos) em diferentes intervalos do processo; e, o teste de sorção aplicado durante a execução dos tratamentos de biorremediação propostos. Para permitir a execução do teste de sorção, foi desenvolvido o método para quantificação do naftaleno por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE (*High Performance Liquid Chromatographic - HPLC*).

CAPÍTULO 2.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ÓLEO DIESEL E A PROBLEMÁTICA AMBIENTAL DOS CONSTITUINTES POLIAROMÁTICOS

O óleo diesel é um combustível utilizado nos motores de combustão interna e ignição por compressão, os chamados Motores do Ciclo Diesel (PETROBRAS, 2004). Em função da gama de aplicações, o óleo diesel se destaca como uma importante preocupação nos índices de contaminação ambiental por petroderivados (Wang & Bartha, 1990; Gallego *et al.*, 2001).

Há diferentes tipos de diesel e esta variação decorre do número de carbonos predominantes em sua constituição. A escala típica de carbonos para a Classe Diesel 1 é de C8 a C17, com a maioria na escala C10 a C14 (similar ao combustível de jato e o querosene); e o Diesel 2, com número de carbonos variando de C8 a C26, com a maioria na escala C10 a C20 (similar ao óleo combustível). De modo amplo, os componentes principais do óleo diesel são similares àqueles presentes no óleo cru, sendo constituído, em sua maioria, por hidrocarbonetos alifáticos contendo de 9 a 28 átomos de carbono (Figura 1), mas diferenciando-se por possuir uma fração elevada dos compostos aromáticos (de 30 a 40%) (Weisman, 1998).

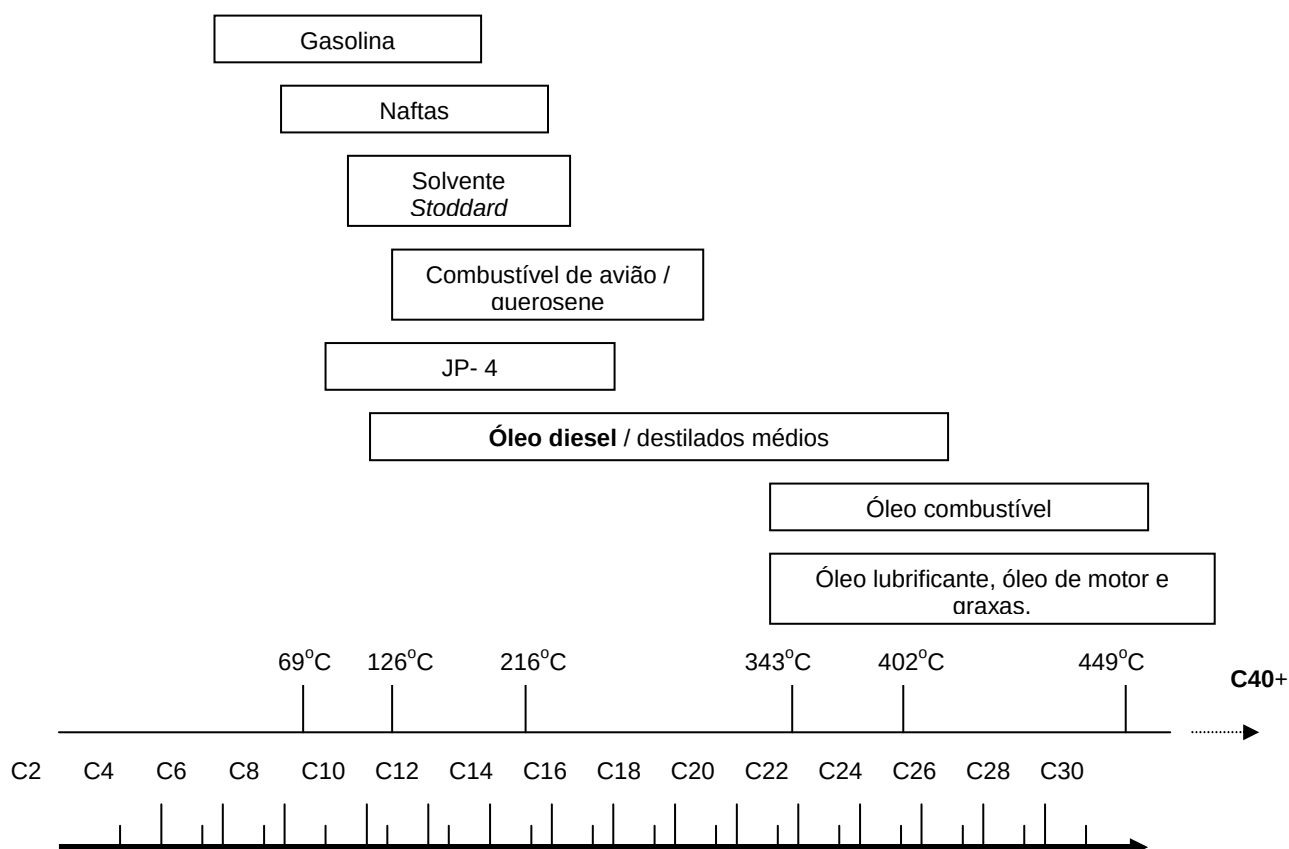


Figura 1. Número de carbonos e pontos de ebulição de frações do petróleo. Adaptada de Weisman (1998).

A alta concentração de aromáticos no óleo diesel é decorrente do seu processo de produção. Este é destilado em uma faixa de temperatura similar àquela em que são destilados os hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) e os derivados alquílicos (de 160 a 410 °C). A gasolina, por exemplo, é deionizada na faixa de 80 a 120 °C, apresentando uma menor fração de HPAs quando comparado ao diesel.

Estas características específicas para qualquer petroderivado, no entanto, podem apresentar variações uma vez que são dependentes da origem do óleo cru, do grau de modificação química, tal como o craqueamento, do método de produção e dos processos de destilação (Lee *et al.*, 2002), podendo, conseqüentemente, trazer variações físico-químicas aos óleos produzidos.

De modo geral, a constituição química do óleo diesel é bastante complexa. É formado aproximadamente de 40% de n-alcanos, 40% de iso e ciclo-alcanos, 20% de hidrocarbonetos aromáticos e de uma percentagem menor de isoprenóides, compostos oxigenados, sulfurados e nitrogenados (Lee *et al.*, 2002). Possui também um alto teor de enxofre, normalmente, variando entre 0,1 a 0,5% (Braun & Schmal, 2003).

O risco de contaminação por óleo diesel reside no fato desse combustível incluir essa complexa mistura de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP), onde estão incluídos os HPAs, que são na sua maioria, recalcitrantes e carcinogênicos (Lee *et al.*, 2002). Esses compostos fazem parte

dos chamados Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs), substâncias resistente à degradação que se bioacumulam e representam risco à saúde humana e ambiental.

Estudos indicam que os HPAs formam, provavelmente, o grupo de contaminantes ambientais mais comum no nosso planeta e vem merecendo redobrada atenção. Segundo Pereira Netto *et al.* (2000) e Mesquita (2004), a relação entre a incidência de câncer, nos últimos 3 séculos, e a exposição de seres humanos a HPAs, especialmente, em áreas urbanas e industriais, vem estimulando uma série de pesquisas sobre fontes geradoras, bioacumulação, metabolismo e disposição em ecossistemas aquáticos e terrestres.

Os hidrocarbonetos aromáticos, do qual fazem parte os HPAs, são aqueles que possuem um ou mais anéis benzênicos em sua estrutura química. O benzeno é o hidrocarboneto aromático mais simples (C_6H_6), sendo composto por um anel com a forma de um hexágono (Figura 2).

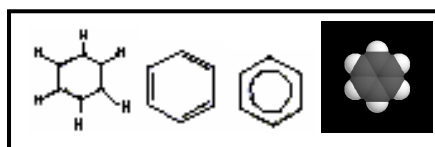


Figura 2. Exemplos de representações gráficas do composto aromático benzeno.

Os hidrocarbonetos aromáticos são estáveis quimicamente e essa estabilidade é atribuída a uma disposição particular das nuvens eletrônicas e das formas de ressonância do anel benzênico. Essa característica implica na participação preferencial desses compostos em reações de substituição, podendo então persistir no ambiente (Pine, 1987).

Os hidrocarbonetos poliaromáticos, os HPAs, por sua vez, é a classe mais perigosa dos compostos aromáticos e das espécies químicas orgânicas em geral. Estes são constituídos de dois ou mais anéis benzênicos arranjados de modo linear, angular ou em cacho. Por definição, eles contêm átomos de C e H, embora possam ser facilmente substituídos no anel benzênico por alguns átomos como, por exemplo, N, S e O para formar compostos aromáticos heterocíclicos (Pine, 1987).

Estes hidrocarbonetos apresentam também um caráter hidrofóbico, ou seja, pouca afinidade com a água e solúveis apenas em solventes orgânicos, como boa parte dos aromáticos. Em condições naturais, sua solubilidade efetiva no ambiente depende da transferência facilitada por um composto mais miscível, através de um processo chamado “efeito de co-solvência”. Esse efeito permite que, mesmo com baixa solubilidade, os aromáticos possam ser lixiviados junto a um composto químico que age como solvente. A combinação de álcool com compostos aromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) da gasolina é um exemplo clássico da elevação de risco de contaminação ambiental (Cordazzo *et al.*, 1999).

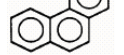
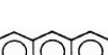
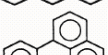
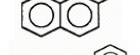
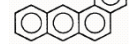
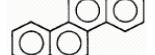
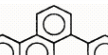
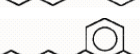
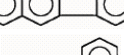
Existem mais de 100 diferentes tipos de HPAs e são geralmente encontrados como misturas, não como simples componentes. Dentre as inúmeras origens dos HPAs, as emissões antropogênicas

são estimadas em aproximadamente 90% da liberação total como, por exemplo, podem ser citados os processos de combustão de material orgânico, especialmente, a exaustão de motores a diesel ou a gasolina, a queima de carvão, as fotocopiadoras, a exaustão de fábricas de incineração de rejeitos, a fumaça de cigarro, além de vários processos industriais como, por exemplo, a produção de alumínio e gaseificação do coque, etc. Desse modo, os HPAs são sempre formados quando materiais orgânicos são queimados e a composição e a complexidade de seus constituintes dependem das fontes emissoras e das condições de queima (Pereira Netto *et al.*, 2000; Brändli *et al.*, 2004).

Em condições naturais, os HPAs são formados durante reações geológicas associadas à produção de combustíveis fósseis minerais, durante a queima de vegetação em floresta e também como resultado de algumas reações de plantas e de bactérias (Blumer, 1976 *apud* Wilson & Jones, 1993). Entretanto, são as origens antropogênicas, particularmente, a queima de combustíveis fósseis, as fontes mais significativas de HPAs para o ambiente (Wilson & Jones, 1993).

Os HPAs, baseado em pesquisas mundiais, foram avaliados quanto aos seus riscos à saúde humana e 16 destes foram classificados pela USEPA como prioritários para o monitoramento ambiental (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação dos HPAs estudados no presente trabalho quanto à sua carcinogenicidade (IARC), carcinogenicidade e ocorrência (USEPA) e periculosidade (ABNT).

HPAS	SIMBOLO	IARC	USEPA	ABNT	ESTRUTURA QUÍMICA
Naftaleno	NAP	Possível carcinogênico	Prioritário	Não citado	
Acenafteno	ACE	Não citado	Prioritário	Não citado	
Acenaftileno	ACY	Não citado	Prioritário	Não citado	
Fluoreno	FLU	Não carcinogênico	Prioritário	Não citado	
Fenantreno	PHE	Não carcinogênico	Prioritário	Não citado	
Antraceno	ANT	Não carcinogênico	Prioritário	Não citado	
Fluoranteno	FLT	Não carcinogênico	Prioritário	Confere Periculosidade	
Pireno	PYR	Não carcinogênico	Prioritário	Não citado	
Benzo(a)antraceno	BaA	Provável carcinogênico	Prioritário	Confere Periculosidade	
Criseno	CHR	Não carcinogênico	Prioritário	Confere Periculosidade	
Benzo(b)fluoranteno	BbF	Possível carcinogênico	Prioritário	Confere Periculosidade	
Benzo(k)fluoranteno	BkF	Possível carcinogênico	Prioritário	Não citado	
Benzo(a)pireno	BaP	Provável carcinogênico	Prioritário	Confere Periculosidade	
Dibenzo(a,h)antraceno	DBA	Provável carcinogênico	Prioritário	Confere Periculosidade	
Benzo(g,h,i)perileno	DGP	Não carcinogênico	Prioritário	Não citado	
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	IND	Possível carcinogênico	Prioritário	Confere Periculosidade	

FONTE: Tabela adaptada de ABNT (1987); Costa (2001); Sisinno *et al.* (2003); Brändli *et al.* (2004) e IARC (2006).

NOTA: IARC – *International Agency for Research on Cancer*: Provável carcinogênico em humanos – limitada evidência em humanos e suficiente em animais; Possível carcinogênico em humanos – limitada evidência em humanos e insuficiente em animais; Não carcinogênico para humanos. USEPA – *United States Environmental Protection Agency*. ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR 10.004). Não citado - refere-se aos HPAs não mencionados nas fontes pesquisadas.

Os danos à saúde humana dependem, freqüentemente, do tipo de exposição ou do caminho pelo qual o contaminante entra no corpo humano. Absorções através da pele, pelo contato direto e por ingestão acidental através do trato gastrointestinal são geralmente os caminhos de exposição de maior preocupação quando o indivíduo entra em contato com água e com solos/sedimentos contaminados. Os efeitos mais comuns são: alterações do DNA, troca de cromátides irmãs, aberrações cromossômicas e síntese descontrolada do DNA.

A Tabela 2 apresenta a concentração de alguns dos HPAs encontrados no óleo diesel comercial da PETROBRAS. Percebe-se a alta representatividade do naftalenos, fenantrenos e fluorenos.

Tabela 2. Concentração e fração molar de alguns HPAs de um óleo diesel comercial da PETROBRAS.

HPAS	CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	FRAÇÃO MOLAR
Naftaleno	622,40	$9,71 \times 10^{-4}$
2-metil naftaleno	2.341,10	$3,29 \times 10^{-3}$
1-metil naftaleno	1.496,70	$2,11 \times 10^{-3}$
C2 naftalenos	3.534,50	$4,53 \times 10^{-3}$
C3 naftalenos	3.677,20	$4,53 \times 10^{-3}$
C4 naftalenos	1.430,60	$1,55 \times 10^{-3}$
SOMA naftalenos	13.102,50	$1,70 \times 10^{-2}$
Acenafteno	14,80	$1,92 \times 10^{-5}$
Acenaftileno	5,40	$7,10 \times 10^{-6}$
Fluoreno	76,40	$9,19 \times 10^{-5}$
C1 fluorenos	129,00	$1,43 \times 10^{-4}$
C2 fluorenos	193,10	$1,99 \times 10^{-4}$
C3 fluorenos	212,10	$2,04 \times 10^{-4}$
Fenantreno	265,50	$2,98 \times 10^{-4}$
C1 fenantrenos	758,20	$7,89 \times 10^{-4}$
C2 fenantrenos	691,00	$6,70 \times 10^{-4}$
C3 fenantrenos	603,40	$5,48 \times 10^{-4}$
C4 fenantrenos	182,60	$1,56 \times 10^{-4}$
Antraceno	6,90	$7,74 \times 10^{-6}$
Fluoranteno	10,70	$1,06 \times 10^{-5}$
Pireno	18,20	$1,80 \times 10^{-5}$
C1 pirenos	58,30	$5,40 \times 10^{-5}$
C2 pirenos	129,20	$1,12 \times 10^{-5}$
Benzo(a)antraceno	3,50	$3,06 \times 10^{-6}$
Criseno	16,30	$1,43 \times 10^{-5}$
C1 crisenos	63,60	$5,30 \times 10^{-5}$
C2 crisenos	75,50	$5,89 \times 10^{-5}$
Benzo(b)fluoranteno	1,50	$1,19 \times 10^{-6}$
Benzo(k)fluoranteno	nd	-
Benzo(a)pireno	1,70	$1,35 \times 10^{-6}$
Indeno(1,2,3-cd)pireno	nd	-
Dibenzo(a,h)antraceno	nd	-
Benzo(ghi)perileno	0,20	$1,45 \times 10^{-7}$
Total de HPAs	16.620,00	$2,04 \times 10^{-2}$

FONTE: Kaipper (2003).

NOTA: Dado obtido no CENPES (Laboratório de Espectrometria de Massas / LABEM – Método 8270B USEPA). C1, C2, C3, C4 correspondem ao número de carbonos que podem ser grupos metil, etil, propil ou butil em diferentes posições.

Segundo estudos, a persistência no ambiente e o grau de periculosidade costumam ser agravados à medida que o número de anéis aromáticos aumenta na molécula (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2003). Segundo Brändli *et al.* (2004), o número dos anéis tende a provocar variações importantes nas propriedades físico-químicas desses compostos.

A solubilidade em água e a volatilidade, por exemplo, tendem a diminuir com número crescente de anéis aromáticos. O naftaleno (NAP), HPA com 2 anéis, exibe uma solubilidade em água de 31 mg.L^{-1} e uma pressão do vapor de 10,4 Pa (em 25°C). Os valores correspondentes para benzo(g)pireno (BGP), com 6 anéis, são de $2,6 \times 10^{-3} \text{ mg.L}^{-1}$ e de $1,39 \times 10^{-10} \text{ Pa}$ (em 25°C), respectivamente (Brändli *et al.*, 2004).

O número crescente de anéis também acompanha a capacidade crescente de sorção sobre partículas (K_{ow} do NAP: 3,37; K_{ow} do BGP: 7,10) com conseqüente crescimento do potencial para a acumulação e decréscimo do potencial de biodegradabilidade desses compostos. Na atmosfera, a sorção aos aerossóis é importante, particularmente, para HPAs de 4 a 6 anéis (Smith *et al.*, 2001).

A persistência dos HPAs, de acordo com estudos, está relacionada à baixa solubilidade em água e, principalmente, ao tamanho da molécula (Amellal *et al.*, 2001; Zytner, 2002 e Potin *et al.*, 2004). Moléculas com mais de três ou quatro anéis benzênicos fundidos tendem a ser mais persistentes (Amellal *et al.*, 2001 e Zytner, 2002). Esta persistência deve ser atribuída à própria dificuldade do transporte de moléculas maiores através da membrana celular e à alta hidrofobicidade, característica dos poliaromáticos de alto peso molecular (Zytner, 2002). Essa limitação costuma aumentar a sorção na matriz do solo e, conseqüentemente, diminuir o acesso desses contaminantes à biodegradação.

Além dessa tendência dos HPAs ficarem presos em partículas sólidas, tais como solo e sedimento, e poderem assentar no fundo de rios, lagos, há também um grande risco à saúde humana e ambiental. Há a possibilidade de esses compostos serem carregados junto com o contaminante de origem, como exemplo o óleo diesel, que liberado na superfície ou subsuperfície pode alcançar o lençol freático ou podem ainda ser assimilados pela biota e entrar na cadeia alimentar por meio de bioacumulação e bioconcentração (Finotti *et al.*, 2001; Karthikeyan & Bhandari, 2001; U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2003; Oros & Ross, 2004).

Desse modo, os estudos de contaminação exigem um conhecimento amplo das particularidades do próprio contaminante, das propriedades da matriz em questão e as relações possíveis entre estes.

2.2 ROTA NO AMBIENTE: TRANSPORTE E DESTINO DE PETRÓLEO E DERIVADOS

O petróleo e seus derivados são compostos altamente disponíveis no ambiente e sua entrada não garante um confinamento apenas no compartimento ambiental de exposição (atmosfera, superfície ou subsuperfície, no meio aquoso ou solo/sedimento), podendo seguir ou percolar para outros compartimentos, ficando então sujeitos a diversas reações (Figura 3).

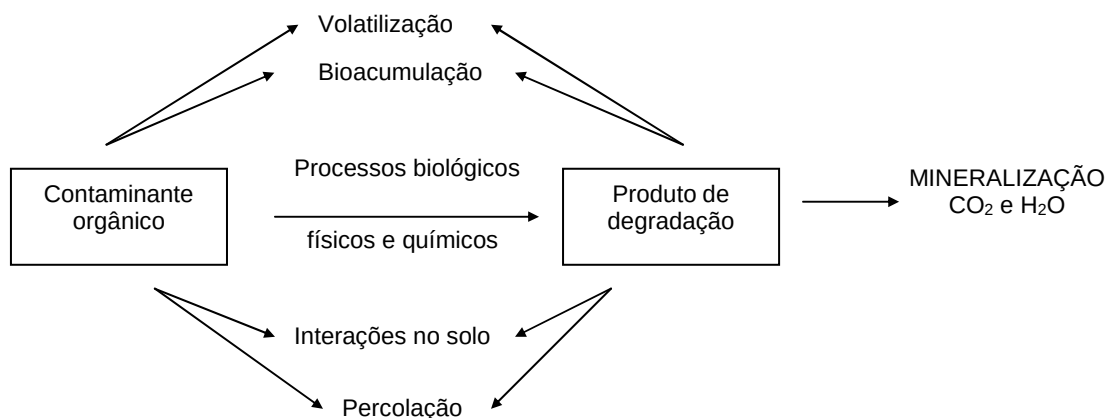


Figura 3. Esquema do destino de contaminantes orgânicos no ambiente. Adaptado de Semple *et al.* (2001).

A principal rota de transporte dos HPAs é feita através da atmosfera. Concentrações de HPAs são da ordem de poucos nanogramas por metro cúbico (ng.m^{-3}) de ar. Os veículos motorizados (automóveis, caminhões e ônibus) contribuem significativamente para o aumento da poluição atmosférica com HPAs através da exaustão de gases, partículas de pneu e óleo lubrificante. Durante o processo de combustão, os veículos que utilizam o óleo diesel constituem a maior fonte de HPAs de baixo peso molecular para a atmosfera, enquanto os veículos movidos à gasolina são fonte de HPAs de alto peso molecular (Holliger *et al.*, 1997).

No entanto, como os HPAs são caracterizados por sua baixa solubilidade em água e alto coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), ou seja, devido à sua hidrofobicidade natural, estes tendem a se acumular nas partículas finas e na matéria orgânica (M.O.) do solo ou sedimento, tornando-os assim os principais reservatórios de hidrocarbonetos poliaromáticos. Atualmente, a concentração de HPAs nos sedimentos marinhos, por exemplo, é da ordem de alguns ng.kg^{-1} até g.kg^{-1} (Mesquita, 2004). O acúmulo nesses compartimentos pode ser proveniente de várias fontes, incluindo a própria deposição atmosférica, a produção *off-shore*, o transporte de petróleo, o armazenamento de combustíveis e o lançamento de esgoto.

As diferentes frações dos hidrocarbonetos do petróleo quando livres no solo, superficial e subsuperficial, podem se apresentar de quatro maneiras: (i) as mais leves podem se distribuir na fase de vapor subsuperficial (no gás do solo); (ii) as mais densas, no meio residual (sorvido em partículas do solo, incluindo a matéria orgânica), (iii) no meio aquoso (dissolvido na água) ou (iv) individualizadas (hidrocarbonetos líquidos) (Figura 4).

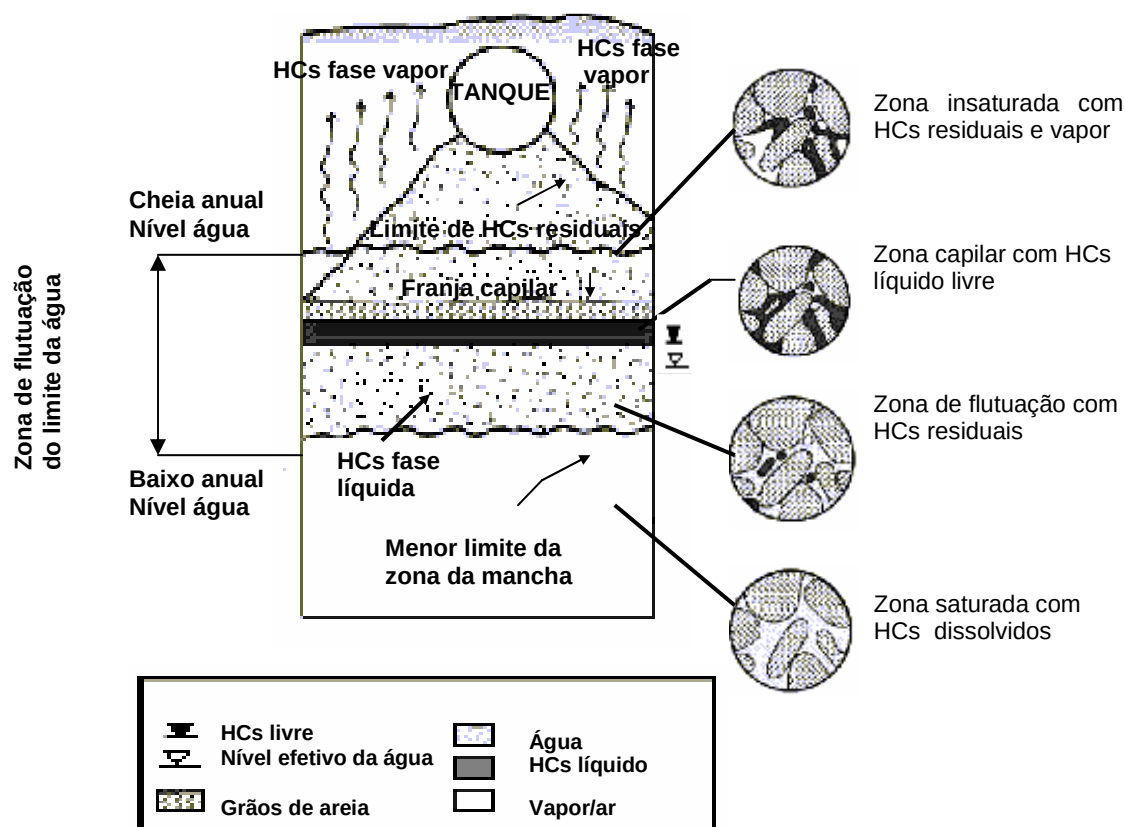


Figura 4. Distribuição vertical no solo das fases dos hidrocarbonetos (HCs). Adaptada de USEPA (2004b).

Os hidrocarbonetos leves estando na fase de vapor subsuperficial são muito mais móveis. De maneira geral, as velocidades e as distâncias de alcance de difusão e de advecção do vapor no solo podem ser influenciadas por vários fatores: gradientes de concentração química, permeabilidade do solo, conteúdo de umidade, gradientes de pressão, temperatura, gravidade e pelas propriedades físico-químicas dos HCs (USEPA, 1993). Além disso, podem migrar por distâncias relativamente grandes, quando próximos a trajetórias preferenciais, como: fraturas, camadas de areia e linha de canalização do serviço público ou podem volatilizar para o ambiente (USEPA, 2004b).

No caso específico do óleo diesel, quando este é derramado no solo, os componentes voláteis também são removidos rapidamente (Cunningham *et al.*, 2004). No entanto, boa parte das frações de HPAs, que são por natureza semivoláteis e hidrofóbicos, tende a permanecer no meio sólido.

Quando liberados no ambiente subsuperficial, como a partir de tanques de armazenamento em postos de combustíveis, os hidrocarbonetos líquidos tendem a migrar para baixo sob a influência de forças de gravidade e capilar. O efeito da gravidade é mais pronunciado em líquidos com densidade mais elevada. O efeito das forças capilares é similar a um líquido extraído de uma esponja seca: quando a fonte libera líquidos do petróleo, o solo subjacente se torna saturado e a borda principal do líquido migra mais profundamente, deixando um nível residual de hidrocarbonetos imóvel no solo e acima da origem do derrame (USEPA, 2004b).

Caso o volume dos hidrocarbonetos do petróleo liberado na superfície seja pequeno, relativo à capacidade da retenção do solo, então os hidrocarbonetos tenderão a sorver em partículas deste e a massa inteira fica imobilizada. Para que os hidrocarbonetos do petróleo se acumulem como produto livre no meio, um volume da liberação deve ser suficiente para superar a capacidade de retenção do solo, entre o ponto de derrame e o nível do lençol freático (USEPA, 2004b). No caso de solos argilosos, que possuem predominantemente uma alta capacidade de sorver compostos, os petroderivados tendem a ficar imobilizados. Isso também decorre da própria particularidade dos compostos orgânicos hidrofóbicos (COHs), como é o caso dos HPAs dos combustíveis, que quando no meio ambiente, por serem freqüentemente imiscíveis em água, ficam presentes como uma fase líquida não aquosa (NAPL, *Non-Aqueous Phase Liquids*), com maior dificuldade de percolação.

Assim, vários são os fatores que influenciam o comportamento e o destino do contaminante no ambiente. Estes fatores podem ser físicos, químicos ou biológicos e são vários os processos envolvidos, entre eles: advecção, difusão, adsorção, dessorção, volatilização e degradação química ou biológica. A importância de cada processo depende do local, tipo e características do solo, do contaminante e das interações entre estes (Carlson, 1999; Zytner, 2002).

A Tabela 3 apresenta valores típicos de saturação residual do óleo diesel observados na zona insaturada em diferentes tipos de solos. Esse valor é obtido a partir de um valor específico para cada tipo de solo, multiplicado pelo fator de correção da viscosidade do hidrocarboneto em questão.

No caso de produtos de baixa viscosidade, como a gasolina, o fator de correção é 0,5; para compostos mais viscosos como querosene e óleo diesel é de 1,0 e 2,0, respectivamente (Oliveira, 1992). No caso em estudo, a capacidade de retenção do óleo diesel em solo argiloso fica em torno de 60 L.m^{-3} (Tabela 3).

Tabela 3. Valores típicos de saturação residual do óleo diesel da zona insaturada em diferentes frações granulométricas do solo.

FRAÇÕES GRANULOMÉTRICAS DO SOLO	CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÓLEO (L.m^{-3})
Cascalho grosso	5
Cascalho, areia grossa	8
Areia grossa a média	15
Areia média a fina	25
Areia fina a silte	40
Argila	60

FONTE: Oliveira (1992).

Além do ar, sedimento marinho e solo, como já citado, os HPAs podem atingir a biota. A sua entrada nos organismos está ligada à biodisponibilidade (Ex.: partição entre sedimento, água e alimento), e à fisiologia do organismo, sendo influenciada também pelo tamanho do organismo, taxa de ingestão, taxa de crescimento, permeabilidade da membrana, taxa de ventilação, tempo de

residência no intestino e regulação osmótica. Uma vez nos organismos, o xenobionte pode ser apenas eliminado, acumulado em seus tecidos, transformado ou degradado por completo.

A eliminação de HPAs pelos organismos pode ocorrer por difusão passiva ou por excreção durante o seu processo metabólico. A acumulação se dá quando, em contato com a biota, o contaminante é incorporado se ligando a moléculas protéicas e ao tecido gorduroso por um processo denominado de bioconcentração. Assim, o mesmo pode ser transferido ou não através da cadeia alimentar, por um outro processo conhecido como bioacumulação. Isso traz sérias implicações para a pesca, por exemplo, e conseqüentemente à saúde pública.

A bioconcentração ou bioacumulação dos HPAs decorre especialmente da baixa distribuição desses poliaromáticos em água, em função de sua hidrofobicidade e grande afinidade lipofílica, melhor discutidas na seção 2.5. Esta afinidade tende a ser maior com o aumento do número de anéis aromáticos, o que acarreta uma fácil adsorção desses contaminantes pelos organismos vivos (Kaipper, 2003).

2.3 SOLO: ESTRUTURA E CARACTERÍSTICAS

2.3.1 Estrutura geral do solo

O solo consiste de fases, gasosa, líquida e sólida, que combinadas formam vários ambientes físicos, biológicos e químicos, com diferentes interfaces (gás-líquido, líquido-sólido e sólido-gás), o que aumenta a complexidade desse sistema (Zytner, 2002).

A fase gasosa na matriz do solo é composta, principalmente, de CO_2 e O_2 e estes apresentam concentrações diferentes daquelas encontradas na atmosfera, variando, inclusive, através do perfil do solo. O conteúdo de O_2 decresce com o aumento da profundidade no solo e o CO_2 tem comportamento inverso.

A fase líquida consiste de água de gravitação e da água capilar. A água de gravitação é afetada somente pela gravidade e a água capilar depende da natureza polar das moléculas de água e das pontes de hidrogênio com a superfície polar das partículas do solo. A fase sólida é composta de minerais, materiais precipitados amorfos e de partículas orgânicas. Esses constituintes da fase sólida do solo variam em composição, distribuição e área superficial da partícula e tendem a variar também com a profundidade.

A Figura 5 apresenta as fases do solo e uma breve descrição dos seus constituintes.

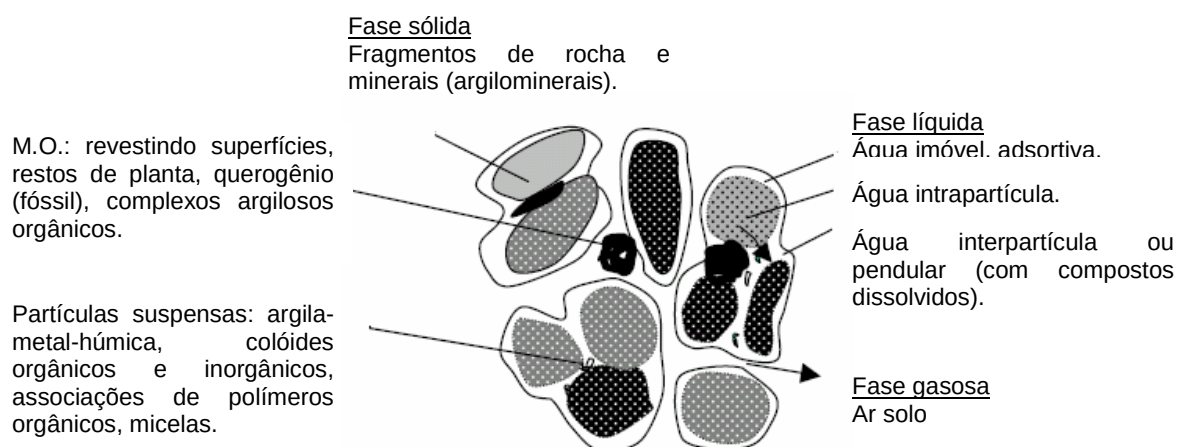


Figura 5. Componentes da zona insaturada do solo. Adaptada de Grathwohl (1998).

2.3.2 Características do solo

O solo pode ser conceituado como um corpo natural, complexo e dinâmico, formado na superfície da crosta terrestre, como resultado da fragmentação e decomposição (química) de rochas através da ação conjugada de diferentes fatores de formação (fatores pedogênicos) (EMBRAPA, 2002).

A natureza do solo e suas propriedades podem variar amplamente, sendo determinadas, principalmente, pela extensão dos minerais presentes e pela ação do intemperismo. Os principais fatores que influenciam a natureza e as propriedades do solo são: (i) o tipo de rocha-mãe, que determina o conteúdo mineral e as proporções relativas das frações areia, silte e argila; (ii) o ajuste geomorfológico (inclinação e drenagem), que tem relação direta sobre a distribuição do tamanho do grão; (iii) o tempo, interferindo no período de exposição ao intemperismo e na extensão da formação do solo; (iv) os organismos, que influenciam a fertilidade do solo, a ciclagem de nutrientes, etc.; e (v) pode ainda ser incluída a ação humana (Aswathanarayana, 1995).

A rocha-mãe fornece os constituintes minerais do perfil do solo e a vegetação presente dá origem à acumulação de matéria orgânica no solo. Os componentes da rocha e o material orgânico, sujeitos a variadas reações físicas, químicas e bioquímicas, são transformados e misturados com maior ou menor intensidade, conduzindo à diferenciação dos horizontes e às características do solo.

O solo, desse modo, é uma mistura complexa de materiais orgânicos e inorgânicos (minerais) que, como se sabe, são os principais responsáveis por sua atividade química (Lopes & Guilherme, 1992), e, inclusive, pelo efeito aprisionador de contaminantes. Essa capacidade é influenciada pelas propriedades do solo e pela relação destas com as características do contaminante (Zytner, 2002).

Conceitualmente, as frações do solo que aprisionam contaminantes podem ser classificadas em dois grupos principais: a superfície mineral, diretamente influenciada pela textura, e a matéria orgânica (Harayama, 1997).

A superfície mineral sólida do solo é constituída por minerais primários e por minerais resultantes da alteração destes, designados por minerais secundários. Os minerais primários encontrados no solo provêm da rocha a partir da qual esse solo se originou, persistindo mais ou menos inalterados na sua composição. São portanto herdados da rocha-mãe e dão origem as frações de granulometria mais grosseira, que são relativamente inertes quimicamente.

Os minerais secundários, podem ocorrer no solo principalmente por 3 processos: (i) resultantes da meteorização dos minerais primários menos resistentes; (ii) por simples alteração da estrutura de determinados minerais primários verificada *in situ*; e (iii) herdados diretamente da rocha-mãe. Fazem parte desse grupo os minerais de argila ou argilominerais e os óxidos e hidróxidos de alumínio, manganês e ferro, sendo o minerais de argilas os principais reponsáveis pelo aprisionamento de contaminantes organicos hidrofóbicos (COHs) (Costa, 2004).

Os argilominerais são essencialmente compostos por partículas cristalinas extremamente pequenas de um grupo relativamente restrito de minerais, para o qual se adaptou a designação genérica de minerais de argila. São essencialmente silicatos de alumínio hidratados, com magnésio ou ferro substituindo parcialmente o alumínio em alguns minerais e que, em alguns casos, incluem elementos alcalinos ou alcalino-terrosos como constituintes essenciais. Pertencem todos ao grupo dos filossilicatos (Costa, 2004).

São formadas por dois tipos de unidades, octaédricas e tetraédricas, que unem-se entre si por fortes ligações covalentes formando camadas. No entanto, em vários minerais de argila, essa estrutura está eletrostaticamente desequilibrada, como resultado da substituição de íons durante a formação dos minerais, sem alteração das dimensões das unidades estruturais (substituições isomórficas). Por isso, no geral, os minerais de argila são eletronegativos e é essa diferença de carga que permite a troca iônica e, conseqüentemente, o aprisionamento de compostos.

Essa capacidade de trocar íons é chamada de capacidade de troca iônica (CTI) ou catiônica (CTC), já que a troca ocorre principalmente com cátions. A mais alta CTC é dos argilominerais e decorre de sua estrutura reticular e de sua maior área superficial (Aswathanarayana, 1995; Zytner, 2002).

O balanço de carga negativa desenvolvido no processo de formação de argilominerais e M.O. são divididas em cargas permanentes e dependentes do pH. As primeiras existem nas estruturas dos minerais e, portanto, estão sempre operantes. As cargas dependentes, por sua vez, são efetivas ou não, dependendo do pH do meio: à medida que se aumenta o pH, a dissociação é favorecida, sendo geralmente originárias da substituição isomórficas e da dissociação do grupo OH⁻ (Lopes & Guilherme, 1992). Desse modo, a influência do pH do meio sobre a CTC será tanto maior, quanto maior for à presença de espécies argilominerais com dominância de cargas dependentes do pH e, ou, de M.O..

Os minerais de argila mais frequentes nos solos são principalmente minerais dos grupos da caulinita, da montmorilonita e das ilitas. Os tipos dependem principalmente: (i) da razão Si:Al; (ii) da proporção de elementos alcalinos e alcalino-terrosos da rocha-mãe; (iii) das duração do período em que os elementos liberados da rocha-mãe se mantêm na zona de alteração; (iv) duração do período da alteração.

A caulinita tem uma razão entre Si e Al de 1:1, em camadas estruturais mais robustas e não expansíveis nas CNTP, que proporciona menor área superficial e menor capacidade de sorção. Na caulinita, só ocorre sorção na superfície externa. A montmorilonita apresenta uma razão de 2:1 entre Si e Al e sua estrutura cristalina pode se expandir, de modo que, compostos orgânicos podem ser sorvidos, dentro ou fora da superfície (Carlson, 1999).

A unidade estrutural das ilitas é, à semelhança da da montmorilonita, composta por duas camadas tetraédricas de sílica com uma camada octaédrica de alumina (Al_2O_3) central. São também minerais do tipo 2:1 e, tal como na montmorilonita, há sempre consideráveis substituições isomórficas. No entanto, nas ilitas estas substituições dão-se principalmente nas camadas tetraédricas, onde há sempre substituição de sílica por alumínio. Essa disponibilidade de superfícies internas nos argilominerais tipo 2:1 também influencia a capacidade de aprisionar água e de penetração de nutrientes inorgânicos, além das reações de sorção (Tabela 4). Essas propriedades dos argilominerais se tornam mais importantes quando o conteúdo de carbono orgânico (C_{org}) se torna baixo (Aswathanarayana, 1995; Zytner, 2002).

Tabela 4. Áreas específicas e CTCs de alguns argilominerais e frações granulométricas.

MINERAL E TAMANHO DA PARTÍCULA		ESTRUTURA	ÁREA ESPECÍFICA ($\text{m}^2.\text{g}^{-1}$)	CAPACIDADE DE TROCA CATIONICA (CTC) ($\text{cmol}_c.\text{kg}^{-1}$)
ARGILOMINERAIS	Caulinita	1:1	10-20	3-15
	Haloisita	1:1	21-43	5-50
	Ilita	2:1	70-120	10-40
	Clorita	2:1	79-150	10-40
	Vermiculita	2:1	300-500	100-150
	Montmorilonita	2:1	800	80 – 120
	Esmectita	2:1	700-800	60-150
	Alofana	amorfa	70-300	25-70
FRAÇÕES GRANULOMÉTRICAS	Silte		< 0,1	Muito pequena
	Areia fina		< 0,1	Muito pequena
	Areia grossa		< 0,1	Muito pequena

FONTE: Picarelli (2003).

A textura, outra importante propriedade do solo, refere-se à distribuição do tamanho dos grãos. Dentre as frações mais finas, três tamanhos de partículas são reconhecidos: argila, de textura fina (< 0,002 mm); silte, de textura média (0,002 – 0,05 mm) e areia, textura grossa (> 0,05 mm) (Tabela 5). A textura do solo é determinada, portanto, pela proporção relativa dessas três frações granulométricas e tem uma profunda influência sobre o *status* do nutriente e a capacidade de retenção da umidade do solo (Aswathanarayana, 1995), bem como de contaminantes.

Tabela 5. Classificação quanto ao tamanho das partículas (textura) da fase sólida do solo. Escala Internacional de Attenberg.

TAMANHO DA PARTÍCULA	DIMENSÃO
Blocos	> 200 mm
Calhaus	200 - 100 mm
Seixos	100 - 50 mm
Seixos médios	50 - 20 mm
Cascalho	20 - 5 mm
Grânulo	5 - 2 mm
Areia grossa	2 - 0,2 mm
Areia fina	0,2 - 0,02 mm
Silte	0,02 - 0,002 mm
Argila	< 0,002 mm

FONTE: Suguio (1973).

A Tabela 6 descreve a textura do solo a partir da proporção entre as frações granulométricas.

Tabela 6. Classificação da fase sólida do solo quanto à textura em função da proporção relativa das frações granulométricas (areia, silte e argila).

TEXTURA	RELAÇÃO ENTRE AS FRAÇÕES GRANULOMÉTRICAS DO SOLO
Arenosa	Argila + silte $\leq$ 15%
Média	35% > argila + silte $\geq$ 15%
Argilosa	35% < Argila < 60%
Muito argilosa	Argila > 60%

FONTE: Prado (1991).

A fração argila do solo, isto é, o conjunto de partículas minerais de diâmetro inferior a 0,002 mm, pode incluir na sua parte menos fina certa proporção de minerais primários, mas é constituída essencialmente por minerais secundários: minerais de argila, óxidos e hidróxidos de alumínio, manganês e ferro. Desse modo, tem uma superfície específica extraordinariamente elevada e é, por excelência, a parte quimicamente activa da fração mineral dos solos, além de apresentar influência significativa em suas propriedades físicas.

Desse modo, os solos argilosos, normalmente, apresentam uma maior capacidade de adsorver compostos a ele adicionados, em função do grande número de sítios de troca iônica em aberto, resultado dos argilominerais presentes.

A porosidade do solo também tem uma relação direta com o aprisionamento de contaminantes. A alta porosidade observada em solos argilosos, especialmente naqueles ricos em M.O., aumenta a capacidade de reter água e aprisionar contaminantes em um chamado domínio imóvel.

O conteúdo orgânico ou de matéria orgânica (M.O.) no solo também é uma importante propriedade para compreender as relações estabelecidas entre o solo e o contaminante orgânico. A matéria orgânica corresponde às partículas produzidas pela decomposição de restos de plantas e animais e apresenta estrutura constituída por grupos funcionais complexos (anéis aromáticos, insaturados, carboxil, hidroxil fenólico, etc.). Por causa desses grupos funcionais, a matéria orgânica também contribui com a capacidade de troca iônica do solo, podendo corresponder de 25 a 90% da CTC em muitos casos (Felsot & Dahm, 1979 *apud* Zytner, 2002).

É valendo-se dessas propriedades reativas e da capacidade de compressibilidade, que os argilominerais são usados para diminuir a condutividade hidráulica e formar uma barreira de contenção em aterros sanitários, aterros para resíduos perigosos e diques de contenção (Picarelli, 2003). No entanto, as barreiras argilosas apresentam limitações quanto à contenção de substâncias apolares e podem ser ineficientes na contenção de líquidos orgânicos como os hidrocarbonetos. As características dos argilominerais e as características físico-químicas dos líquidos percolantes influenciam na condutividade hidráulica dos solos, mas dependendo do tipo dos argilominerais, a condutividade hidráulica pode ser reduzida somente até certo ponto.

Desse modo, ao estudar a distribuição de um elemento químico entre as fases sólida e líquida do solo e a capacidade de aprisionamento, uma série de fatores precisa ser considerada, entre estes (OECD TG 106, 2001): (i) natureza química da substância; (ii) fatores climáticos tais como chuva, temperatura, luz solar e vento; e (iii) características do solo (conteúdo de C_{org} ; textura do solo, em especial; conteúdo de argila e pH).

A sorção e dessorção de contaminantes no solo estão entre os principais mecanismos envolvidos na disponibilidade dos mesmos. Por isso, estudar esses processos é também importante para entender o transporte de substâncias através do solo (Barizon, 2004).

2.4 DEGRADAÇÃO DE HPAS

A persistência é a medida de como, ao longo do tempo, uma substância química existirá no ambiente antes de ser degradada ou transformada, química ou biologicamente, para alguma outra substância (Renzoni, 1994).

Alguns dos fatores que afetam a sua persistência são: o seu estado químico ou físico; a sua disponibilidade; os tipos e a quantidade de microrganismos presentes no ambiente; a exposição à luz, a disponibilidade de oxigênio e de nutrientes; a temperatura; o pH, bem como, a presença de outras substâncias químicas que possam inibir ou potencializar a degradação. Usualmente, a persistência é expressa em termos de meia-vida química, a qual pode ser da ordem de dias, semanas ou anos (USEPA, 2004c).

A degradação potencial de cada contaminante segue, geralmente, três vias ambientais (USEPA, 2004c): (i) degradação atmosférica – uma substância química dispersa na atmosfera pode ser degradada por processos como fotólise e/ou reações com radical $OH^\cdot$, ozônio (O_3) ou por outras

substâncias presente; (ii) degradação aquática – uma substância química dispersa na água doce, marinha ou água da superfície estuarina pode ser degradada por processos como fotólise, hidrólise, oxidação e/ou biodegradação; e, (iii) degradação terrestre – uma substância química dispersa no solo ou aquífero pode ser degradada por processos como hidrólise, oxidação e/ou biodegradação.

No entanto, principalmente no caso de compostos persistentes, o tratamento dentro de condições naturais pode ser muito demorado e pouco eficiente. Existem várias formas de atenuar os riscos de áreas contaminadas, inclusive quando a contaminação se dá por óleo e petroderivados, sendo eles: remoção mecânica, química ou manual. Dentre as mais recentes estratégias, o tratamento biológico ou biorremediação surge como o menos agressivo ao meio ambiente e mais adequado para manter o equilíbrio ecológico, desde que resulte na transformação parcial ou completa do xenobionte orgânico em biomassa microbiana e em subprodutos inócuos, além de ter um custo mais baixo. Muitas técnicas, como exemplo, o aterro de disposição e a incineração, apenas diluem ou seqüestram o contaminante, ou o transferem para outro ambiente (Semple *et al.*, 2001).

A Tabela 7 apresenta alguns dos métodos não biológicos e biológicos, suas principais vantagens e desvantagens e custo aproximado.

Tabela 7. Tecnologias de tratamento de compostos orgânicos.

TECNOLOGIAS	TIPO	PROCESSO	FASES	CUSTO (US\$)
Biorremediação de Solo	<i>In Situ</i>	B	Todas	30 a 100 /m ³
Biorremediação Superficial	<i>In Situ</i>	B	Adsorvida Condensada	30 a 70/m ³
Bioventilação	<i>In Situ</i>	B	Adsorvida Livre	10 a 70/ m ³
Extração de Vapor	<i>In Situ</i>	F	Adsorvida Livre	65 a 130/ m ³
Atenuação Natural	<i>In Situ</i>	BFQ	Todas	NC
<i>Landfarming</i>	<i>Ex Situ</i>	B	Adsorvida, Vapor condensado	135 a 270/m ³
Biopilha	<i>Ex Situ</i>	B	Adsorvida, Vapor condensado	40 a 200/ton
Bio-reator	<i>Ex Situ</i>	B (Adsorvida)	Vapor condensado	130 a 200/m ³
Incineração	<i>Ex Situ</i>	T	Adsorvida Vapor condensado	200 a 1000/ton
Aterro de Cobertura	<i>Ex Situ</i>	D	Adsorvida Vapor condensado	25 a 30/ m ²
Injeção em poços profundos	<i>Ex Situ</i>	D	Adsorvida Vapor condensado	Não citado
Solidificação / Estabilização	<i>Ex Situ</i> <i>In Situ</i>	QF	Todas	170 a 340/m ³
Biorremediação de aquíferos	<i>In Situ</i>	B	Livre Dissolvida	10 a 20/m ³
<i>Air Sparging</i>	<i>In Situ</i>	F	Todas	100 a 160/m ³
<i>Bioslurping</i>	<i>In Situ</i>	B	Todas, exceto Dissolvida	225.000/m ³
Fitorremediação	<i>In Situ</i>	B	Todas	30 a 50/m ³
Paredes de Lama (Barreiras)	<i>In Situ</i>	F	Livre Dissolvida	450 a 750/m ²
Extração de fases (Bombeamento)	<i>In Situ</i> <i>Ex Situ</i>	BQ	Livre Dissolvida	85.000 a 500.000/m ³
Lavagem do solo	<i>In Situ</i> <i>Ex Situ</i>	F	Vapor condensado	100 a 160/m ³

FONTE: Adaptada de Mesquita (2004).

NOTA: Processos: B (biológico), F (físico), Q (químico), T (térmico), D (disposição). NC – não calculado.

Apesar dos estudos sobre biorremediação serem relativamente recentes, o conhecimento quanto à habilidade da microbiota degradar contaminantes é antiga. Desde a década de 1970, pesquisas vêm sendo realizadas sobre a capacidade catabólica de microrganismos como bactérias, fungos e algas na degradação de grupos de contaminantes específicos, como, por exemplo, os HPAs (Cerniglia, 1992; Mesquita, 2004).

As Tabelas 8 e 9 apresentam, respectivamente, as bactérias e fungos degradadores de alguns tipos de HPAs. Vale destacar que os microrganismos citados abaixo pertencem tanto ao grupo dos aeróbicos quanto anaeróbicos.

Tabela 8. Exemplo de espécies de bactérias degradadoras de HPAs.

SUBSTÂNCIA	MICROORGANISMO
Naftaleno	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Alcaligenes denitrificans</i> , <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Pseudomonas putida</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. paucimobilis</i> , <i>P. vesicularis</i> , <i>P. cepacia</i> , <i>P. testosteroni</i> , <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Corynebacterium renale</i> , <i>Moraxella</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp., <i>Bacillus cereus</i>
Acenafteno	<i>Beijernickia</i> sp., <i>P. putida</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. cepacia</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.
Fenantreno	<i>Aeromonas</i> sp., <i>A. faecalis</i> , <i>A. denitrificans</i> , <i>Arthrobacter polychromogenes</i> , <i>Beijernickia</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>P. putida</i> , <i>P. paucimobilis</i> , <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Vibrio</i> sp., <i>Nocardia</i> sp., <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp., <i>S. griseus</i> , <i>Acinetobacter</i> sp.
Antraceno	<i>Beijernickia</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>P. putida</i> , <i>P. paucimobilis</i> , <i>P. cepacia</i> , <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp.
Fluoranteno	<i>Alcaligenes denitrificans</i> , <i>Mycobacterium</i> sp., <i>P. putida</i> , <i>P. paucimobilis</i> , <i>P. cepacia</i> , <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.
Pireno	<i>Alcaligenes denitrificans</i> , <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Rhodococcus</i> sp.
Criseno	<i>Rhodococcus</i> sp.
Benzo[a]antraceno	<i>Alcaligenes denitrificans</i> , <i>Beijernickia</i> sp., <i>P. putida</i>
Benzo[a]pireno	<i>Beijernickia</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp.

FONTE: Cerniglia (1992).

Tabela 9. Exemplo de espécies de fungos degradadores de alguns tipos de HPAs.

SUBSTÂNCIA	MICROORGANISMO
Naftaleno	<i>Absida glauca</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Basidiobolus ranarum</i> , <i>Candida utilis</i> , <i>Choanephora campincta</i> , <i>Circinella</i> sp., <i>Claviceps paspali</i> , <i>Cokeromyces poitrassi</i> , <i>Conidiobolus gonimodes</i> , <i>Cunninghamella bainieri</i> , <i>C. elegans</i> , <i>C. japonica</i> , <i>Emericellopsis</i> sp., <i>Epicoccum nigrum</i> , <i>Gilbertella persicaria</i> , <i>Gliocladium</i> sp., <i>Helicostylum piriforme</i> , <i>Hyphochytrium catenoides</i> , <i>Linderina pennispora</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>Panaeolus cambodginsensis</i> , <i>Panaeolus subbalteatus</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Pestalotia</i> sp., <i>Phlyctochytrium reinboldtae</i> , <i>Phycomyces blakesleeanae</i> , <i>Phytophthora cinnamomi</i> , <i>Psilocybe cubensis</i> , <i>Psilocybe strictipes</i> , <i>Psilocybe stuntzii</i> , <i>Psilocybe subaeruginascens</i> , <i>Rhizophlyctis harderi</i> , <i>Rhizophlyctis rosea</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Saprolegnia parasitica</i> , <i>Smittium culicis</i> , <i>Smittium culisetae</i> , <i>Smittium simulii</i> , <i>Sordaria fimicola</i> , <i>Syncephalastrum racemosum</i> , <i>Thamnidium anomalum</i> , <i>Zygorhynchus moelleri</i>
Fenantreno	<i>C. elegans</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Trametes versicolor</i>
Antraceno	<i>Bjerkandera</i> sp., <i>C. elegans</i> , <i>P. chrysosporium</i> , <i>Ramaria</i> sp., <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Trametes versicolor</i>
Fluoranteno	<i>C. elegans</i>
Pireno	<i>C. elegans</i> , <i>P. chrysosporium</i>
Criseno	<i>P. janthinellum</i> , <i>Syncephalastrum racemosum</i> , <i>Penicillium</i> sp.
Benzo[a]antraceno	<i>C. elegans</i>
Benzo[a]pireno	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Bjerkandera adusta</i> , <i>Bjerkandera</i> sp., <i>Candida maltosa</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Chrysosporium pannorum</i> , <i>C. elegans</i> , <i>Mortierella verrucosa</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Ramaria</i> sp., <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Trametes versicolor</i> , <i>Trichoderma viride</i>

FONTE: Cerniglia (1992).

Segundo os estudos atuais, os resultados mais efetivos sobre a biorremediação de solos contaminados com HPAs tem ocorrido especialmente naqueles de baixo peso molecular. De acordo com o observado, há certa limitação da atividade microbiológica sobre os HPAs de alto peso molecular que pode estar atrelada a fatores específicos de campo, como biodisponibilidade do contaminante, de nutrientes, condições do potencial redox, etc. Ou mesmo, o fator limitante pode ser atribuído à falta de microrganismos, no ambiente, capazes de degradar os compostos com mais de quatro anéis aromáticos (Boopathy, 2000; Bento *et al.*, 2003; Mesquita, 2004).

Realmente existe uma grande diversidade de organismos capazes de degradar HPAs de baixo peso molecular, como naftaleno (2 anéis), acenafteno (3 anéis) e fenantreno (3 anéis). E, na maioria das vezes, existem poucos gêneros capazes de degradar eficientemente HPAs de alto peso molecular. Acredita-se que as bactérias oxidem, preferencialmente, hidrocarbonetos aromáticos que vão do benzeno (1 anel) ao benzo[a]pireno (5 anéis) (Mesquita, 2004).

Isso explica o grande número de estudos que encontram o cometabolismo como a alternativa encontrada pelos microrganismos para a utilização do xenobionte de maior peso molecular como fonte de carbono (Huang *et al.*, 2004).

As Figuras 6 e 7 apresentam os processos metabólitos desenvolvidos pelas bactérias e fungos para degradação dos anéis aromáticos.

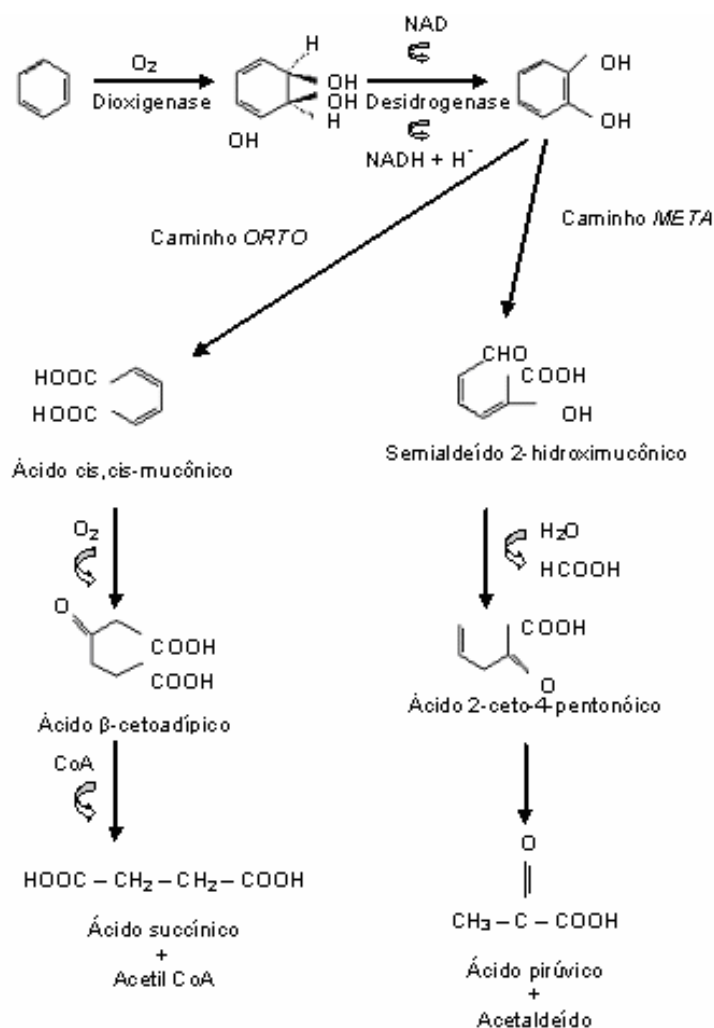


Figura 6. Metabolismo bacteriano da quebra de anel aromático pelo caminho *ORTO* e *META*. Adaptado de Cerniglia (1984).

A primeira etapa do metabolismo aeróbio dos compostos aromáticos, e mesmo poliaromáticos, executado pelas bactérias se dá pela modificação ou remoção dos substituintes do anel benzênico para um intermediário que, posteriormente, é clivado na posição *orto* ou *meta* (Cerniglia, 1984; Baker & Herson, 1994).

O processo de modificação ou remoção se dá de modo oxidativo, onde são gerados cis-dihidrodióis através da incorporação de átomos de oxigênio ao anel aromático. Nesse processo as dioxigenases são utilizadas como os catalisadores. Os cis-dihidrodióis são rearomatizados pela ação da enzima cis-diidrodiol desidrogenase. Em seguida, o cis-diidrodiol é oxidado e o substrato fica sujeito a dioxigenases que levam à quebra do anel aromático.

O caminho oxidativo *orto* ocorre através da quebra entre os átomos de carbono ligados a dois grupos hidroxílicos, por meio da 1,2 – catecol dioxigenase. Esse processo dá origem ao ácido *cis,cis*-mucônico, que posteriormente forma o ácido succínico e a acetil-coenzima A (acetil CoA).

No caminho oxidativo *meta*, a quebra da ligação ocorre entre o carbono adjacente ao grupo hidroxila do catecol, formando o intermediário 2-hidroximucônico semialdeído, e na sequência, o ácido pirúvico e o acetaldeído.

O ácido succínico, a acetil CoA, o ácido pirúvico e o acetaldeído são todos produtos desse processo degradativo e são utilizados pelos microrganismos na síntese de constituintes celulares e de energia por meio do Ciclo do Ácido Tricarboxílico. Os subprodutos dessas reações são CO₂ e água.

O processo de degradação do segundo anel aromático é processado enzimaticamente da mesma forma do primeiro. No entanto, as moléculas de alto peso molecular, com a presença de mais anéis benzênicos, são degradadas com maior dificuldade em função de sua baixa solubilidade, grande energia de ressonância e efeito tóxico (Mesquita, 2004).

Os fungos, por sua vez, oxidam os HPAs em *trans*-dihidrodióis (Figura 7). E, segundo estudos realizados com organismos procarióticos e eucarióticos, microrganismos fotossintéticos também são capazes de metabolizar compostos aromáticos (Cerniglia, 1984).

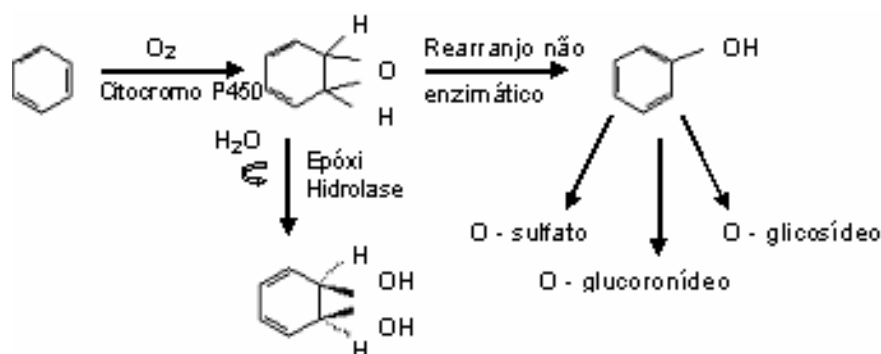


Figura 7. Metabolismo dos fungos na quebra de anel aromático. Adaptado de Cerniglia (1984).

2.4.1 Biodegradação dos HPAs no solo: interferentes físico-químicos

Como citado, a biodegradação é o meio mais importante para a atenuação natural de poluentes orgânicos no solo. Consiste de um processo no qual, microrganismos que possuem a capacidade de degradar poluentes, transformam estes contaminantes em biomassa e subprodutos. Quando a degradação se dá de forma completa, ou seja, quando há a chamada mineralização são gerados produtos inorgânicos inertes (CO₂, H₂O, sais minerais); quando a degradação é parcial, a transformação incompleta pode resultar em intermediários, inclusive, mais tóxicos que os contaminantes originais (USEPA, 1996a; 2003)

Desse modo, vale ressaltar, que o processo de biodegradação é um processo complexo onde se faz necessária à compreensão de uma série de características ambientais que podem limitá-lo, para que assim se possa inferir sobre o destino dos poluentes orgânicos. A Tabela 10 apresenta os

principais fatores que afetam a atividade microbiana no solo e, por consequência, os pontos críticos para o desenvolvimento de um processo de biodegradação.

Tabela 10. Fatores ambientais críticos da atividade microbiana no solo.

FATOR AMBIENTAL	NÍVEIS ÓTIMOS
Oxigênio	Metabolismo aeróbio: maior do que $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de oxigênio dissolvido (OD), porosidade mínima de 10%. Metabolismo anaeróbio: menor do que $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de OD, porosidade menor do que 1%.
Nutrientes	Nitrogênio e outros nutrientes suficientes para não limitar o crescimento microbiano (C:N:P relação sugerida de 120:10:1).
Umidade	Solo insaturado: 25-85% de capacidade de campo; fósforo afetará a transferência de oxigênio dentro do solo (status aeróbio); Zona saturada: água afetará a taxa de transporte de oxigênio e conseqüentemente irá afetar a taxa de remediação aeróbica.
pH	5,5-8,5
Potencial redox	Aeróbios e anaeróbios facultativos: maior do que 50 mV; Anaeróbios: menor do que 50 mV.
Temperatura	15-45°C

FONTE: USEPA (1996 a, b).

Os aceptores de elétrons, por exemplo, são essenciais no processo de degradação dos compostos químicos. Desse modo, o tipo e a disponibilidade deles no meio são importantes para a redução de xenobiontes.

O oxigênio, quando presente, é o principalceptor de elétrons na degradação da M.O. e de contaminantes (Mesquita, 2004). Na sua ausência, entretanto, o potencial redox se torna um fator crítico na determinação da diversidade metabólica nos solos, sedimentos e aquíferos. Isso decorre uma vez que a transformação aeróbia de HPAs, no solo e mesmo na água subterrânea, leva freqüentemente a um rápido esgotamento do oxigênio dissolvido (OD) e esse, eventualmente, decresce o potencial redox. Tal decréscimo nesse potencial pode resultar em favorável acréscimo de populações microbianas desnitrificantes, sulfato-redutoras ou metanogênicas nos ambientes ($E_h < -300 \text{ mV}$), portanto, populações que alteram as reações originais de biotransformação aeróbia (Karthikeyan & Bhandari, 2001).

Outro aspecto importante para o processo de biodegradação é o nível de nutrientes no solo, uma vez que o crescimento e a atividade microbiológica exigem fornecimento quantitativo e qualitativo destes. A relação ideal de carbono, nitrogênio e fósforo (C:N:P) no solo, de acordo com a maioria dos estudos, deve ser da ordem de 100:10:1, apesar de outros autores terem obtidos resultados mais favoráveis do processo degradativo em uma proporção de 120:10:1 (Wilson & Jones, 1993; Ghazali *et al.*, 2004). No presente trabalho, optou-se pela relação de nutrientes mais usual (100:10:1).

Há também uma série de controvérsias a respeito da forma pelo qual o nutriente deve estar disponibilizado. O nitrogênio (N), por exemplo, é o nutriente mais comumente introduzido nos projetos

de biorremediação. É primariamente usado para crescimento celular (NH_4^+ ou NO_3^-) e como um aceceptor alternativo de elétron (NO_3^-). As principais formas de disponibilização é como uréia ou como cloreto de amônio (NH_4Cl), mas também pode ser suplementado como algum sal, como o nitrato de amônio (NH_4NO_3). Todas essas formas são assimiladas pelo metabolismo microbiano (Liebeg & Cutright, 1999). Estudos atuais, no entanto, destacam que a forma NH_4Cl parece permitir um aumento da atividade microbiana de degradadores de derivados de petróleo (Zytner, 2002).

O fósforo (P), também importante para o crescimento dos microrganismos, é o segundo nutriente mais comumente utilizado em processo de biorremediação e é importante para o crescimento celular. Este elemento químico pode ser acrescentado como fosfato de potássio (K_2PO_4), fosfato de sódio (Na_2PO_4) ou ácido orto-fosfórico (H_3PO_4) e sais de polifosfato (Liebeg & Cutright, 1999).

Os níveis de cada nutriente dependem da razão e da extensão da degradação das substâncias químicas presentes, da biodisponibilidade dos nutrientes do solo, do tipo de solo, etc. Desse modo, o conhecimento desses efeitos interativos aumentará o sucesso na implementação da biorremediação (Liebeg & Cutright, 1999), bem como no andamento do tratamento.

A água, ou umidade do solo, é o veículo de transporte dos nutrientes e do oxigênio para fora e dentro das células dos microrganismos. Pode estar presente em três formas no solo: livre, aquela que se move livremente no solo e transporta o oxigênio; capilar, presente nos poros da matriz do solo quando este não está saturado e é a água disponível para os microrganismos; e, a água higroscópica, que é aquela que interage com a superfície da matriz do solo e não está normalmente biodisponível (King *et al.*, 1992). É sabido que não apenas a escassez, mas também o excesso de água no solo é um fator limitante, uma vez que as reações metabólicas dependem desta para ocorrer e o seu excesso pode inibir a passagem de oxigênio através do solo. Para o crescimento favorável da microbiota, a umidade do solo deve estar em torno dos 50% de sua capacidade de campo (CC) (Trindade, 2002).

O pH tem relação direta com a solubilidade dos nutrientes e a atividade dos microrganismos. Bactérias heterotróficas dependem de um pH neutro ou próximo disso para biodegradar xenobiontes de modo eficiente. Os fungos, por sua vez, dependem de um meio mais ácido. Tem sido relatado que o pH ideal para ação dos microrganismos presentes no solo deve estar entre 5,5 e 8,5 (Cardoso, 1992).

A temperatura do solo é também outro parâmetro muito importante para a atividade microbiana. As reações metabólicas tendem a aumentar com o aumento da temperatura, uma vez que esta última promove uma redução da viscosidade do composto, tornando-o mais disponível ao processo degradativo. No entanto, existe uma faixa ótima situada entre 20 e 30°C onde a degradação é mais eficiente. Com o aumento da temperatura também é possível observar o aumento da volatilização, especialmente dos contaminantes mais leves, e perda do oxigênio do meio, fator este limitante para o processo oxidativo (Atlas, 1977; Song *et al.*, 1990).

Destaca-se, desse modo, que o processo de biodegradação é um conjunto complexo que depende de uma microbiota, com especificidade enzimática para esses tipos de compostos orgânicos, e das condições ambientais que favoreçam o processo. A biodegradação integral dos

HPAs, principalmente, os de alto peso molecular, pode ser lenta uma vez que estes HPAs são componentes muito estáveis e com uma oxidação inicial biologicamente lenta e metabolicamente onerosa (Huang *et al.*, 2004).

No presente estudo, alguns dos principais fatores limitantes (nutrientes, umidade, etc.) foram avaliados e monitorados, bem como foram realizadas algumas correções do solo para as condições ótimas. Estas alterações estão apresentadas na seção 4.2, em Materiais e Métodos.

2.4.2 Exemplos de técnicas de biorremediação aplicadas no tratamento de solo contaminado

As chamadas técnicas de biorremediação vêm sendo amplamente estudadas e utilizadas para remediação de ambientes contaminados com substâncias orgânicas. Essas técnicas têm como pré-requisito básico o aumento da eficiência da remoção natural feita pelos microrganismos. Os processos utilizados podem ser classificados como: *in situ*, quando o tratamento é efetuado no próprio local contaminado, e *ex situ*, quando o procedimento se dá fora do local impactado. Nestes processos podem ser aplicadas diferentes técnicas e estratégias, como as que seguem.

O bioestímulo é um tipo de remediação natural que pode promover a degradação de poluentes pelas condições otimizadas de aeração, adição de nutrientes, controle do pH e temperatura. Essa técnica pode ser considerada como uma forma de remediação apropriada para a remoção de diesel no solo e requer a avaliação das capacidades de degradação intrínseca da microbiota autóctone (local) e dos parâmetros ambientais (teor de M.O., C_{org}, pH, relação C:N:P, etc.) envolvidos na cinética do processo *in situ* (Barahona *et al.*, 2004).

O bioaumento é uma técnica em que linhagens microbianas, com a potencialidade para degradar o poluente, são introduzidas no meio impactado. Inicialmente, no uso dessa técnica, os consórcios alóctones (estrangeiros) foram introduzidos para aumentar o efeito da remediação, no entanto, os microrganismos consorciados pareciam competir com a população autóctone restringindo a eficiência do processo degradativo (Liebeg & Cutright, 1999). Desse modo, estudos mais recentes têm indicado o aumento da biomassa de microrganismos autóctones e a reintrodução destes no local de origem para tratamento da contaminação (Bento *et al.*, 2005). Vale ressaltar que a legislação no Brasil, que dispõe sobre os processos de remediação, só permite a inoculação de microrganismos autóctones, considerando que, em função de suas peculiaridades ou de um uso inadequado, os remediadores podem acarretar desequilíbrio no ecossistema e danos ao meio ambiente (CONAMA, 2002).

Outros estudos também têm sugerido, e com resultados bastante satisfatórios, a junção do acréscimo de nutrientes (bioestímulo) e da comunidade microbiana específica (bioaumento) para limpeza de solos contaminados com óleo diesel (Bento *et al.*, 2005). Esses resultados têm indicado inclusive uma redução substancial do tempo necessário para o tratamento.

Existem outras técnicas de remediação que reduzem a concentração de contaminantes em função de sua associação com o processo de biorremediação. O landfarming, por exemplo, corresponde a uma técnica que envolve o espalhamento de solos contaminados em uma camada

estreita (não mais do que 1,5 m) sobre superfície do solo, estimulando a atividade microbiana aeróbia através da aeração e/ou a adição de nutrientes, minerais e umidade (Khan *et al.*, 2004). Essa técnica, no entanto, tende a estimular a volatilização de contaminantes mais leves, por exemplo, HPAs de cadeias pequenas, com riscos de contaminação do ar; promove biodegradação aeróbica e a fotooxidação de modo mais restrito na superfície do solo; além de exigir custos de instalação, operação e manutenção (grandes quantidades de solos, etc.) se comparada a outras técnicas (Huang *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2004).

A fitorremediação é um procedimento que utiliza a tecnologia da rizosfera do vegetal para aumentar a biodegradação. O efeito da rizosfera na atividade microbiana é de agir seletivamente sobre a abundância relativa dos microrganismos no solo, alterando três aspectos: maior atividade microbiana; maior oxidação potencial; comunidade microbiana modificada. Esse processo decorre, principalmente, da capacidade das raízes produzirem enzimas oxidativas que podem atuar diretamente na degradação de contaminantes, inclusive de HPAs (Joner *et al.*, 2002).

No entanto, de acordo com os estudos, as diferentes técnicas de remediação podem apresentar resultados promissores, mas se individualizadas têm efeito limitado. A combinação de multiprocessos para remediação de persistentes é altamente eficaz para o processo de remediação de HPAs, uma vez que cada tratamento pode atuar em cada fração específica desses poliaromáticos, dos mais leves aos mais pesados (Huang *et al.*, 2004). Além disso, para a biorremediação, o fator tempo é importante já que sua eficiência tende a decrescer gradativamente durante o tempo de residência do composto. Desse modo, o estudo de quais e de quantos processos se fazem necessários para o tratamento do solo contaminando é importante para o sucesso da remediação. O presente trabalho analisa a combinação de algumas técnicas comumente usadas para remediação de HPAs em solo (bioestímulo e bioaumento).

2.5 LEGISLAÇÃO: VALORES DE REFERÊNCIA PARA CONTAMINAÇÃO POR HPAS

A legislação brasileira ainda não possui valores de referência para proteção ou remediação de solos e de águas subterrâneas (Mesquita, 2004). Os limites utilizados são os mesmos de potabilidade da Portaria do Ministério da Saúde 518/2004 e da Resolução CONAMA 357/2005 que contemplam, portanto, somente padrões para a qualidade de água.

Ainda assim, o número de contaminantes orgânicos citados nas regulamentações para água é limitado, mesmo para aqueles comprovadamente nocivos ao ambiente e aos seres vivos. No caso dos HPAs, são citados pelo CONAMA 357/2005 o benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, indeno(1,2,3-cd)pireno, com limite para água doce de 0,05 µg.L⁻¹ e de 0,018 µg.L⁻¹ para água doce utilizada para a pesca cotidiana. A Portaria 518/2004, do Ministério da Saúde, cita o benzo(a)pireno com limite para água potável de 0,7 µg.L⁻¹.

As iniciativas para estabelecimento de limites, para as demais matrizes ambientais, ainda são tomadas em nível local, como no caso de São Paulo, através da CETESB, que estabeleceu restrições por meio de valores orientadores para solo e água subterrânea no Estado, inclusive, com revisões periódicas de até quatro anos. Os valores orientadores foram conceituados e utilizados como: Valor de Referência de Qualidade (VRQ), que corresponde à concentração de determinada substância no solo ou na água subterrânea e que define um solo como limpo ou a qualidade natural da água subterrânea; Valor de Prevenção (VP), concentração de determinada substância, acima da qual podem ocorrer alterações prejudiciais à qualidade do solo e da água subterrânea; e Valor de Intervenção (VI), concentração de determinada substância no solo ou na água subterrânea acima da qual existem riscos potenciais, diretos ou indiretos, à saúde humana, considerado um cenário de exposição genérico (CETESB, 2001).

Na definição desses valores, a CETESB, em 2001, estabeleceu limites apenas para o naftaleno, único citado entre os HPAs, em solo e água subterrânea. Para solo, o valor de referência atribuído ao naftaleno foi $0,20 \text{ mg.kg}^{-1}$; valor de intervenção (VI) para área agrícola de 15 mg.kg^{-1} , área urbana de 60 mg.kg^{-1} e industrial de 90 mg.kg^{-1} . Em água subterrânea o VI definido foi de $100 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ (CETESB, 2001).

Em 2005, a CETESB ampliou a tabela de valores orientadores para solo e água subterrânea. A Tabela 11 apresenta os valores indicados para os HPAs (CETESB, 2005).

Tabela 11. Valores orientadores de HPAs para solo e água subterrânea no Estado de São Paulo.

SUBSTÂNCIA	SOLO ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de peso seco) ⁽¹⁾				ÁGUA SUBTERRÂNEA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
	PREVENÇÃO	INTERVENÇÃO			INTERVENÇÃO
		AGRÍCOLA APmax	RESIDENCIAL	INDUSTRIAL	
Naftaleno	0,12	30	60	90	140
Acenaftileno	-	-	-	-	-
Acenafteno	-	-	-	-	-
Fluoreno	-	-	-	-	-
Fenantreno	3,3	15	40	95	140
Antraceno	0,039	-	-	-	-
Fluoranteno	-	-	-	-	-
Pireno	-	-	-	-	-
Benzo(a)antraceno	0,025	9	20	65	1,75
Criseno	8,1	-	-	-	-
Benzo(b)fluoranteno	-	-	-	-	-
Benzo(k)fluoranteno	0,38	-	-	-	-
Benzo(a)pireno	0,052	0,4	1,5	3,5	0,7
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,031	2	25	130	0,17
Dibenzo(a,h)antraceno	0,08	0,15	0,6	1,3	0,18
Benzo(g,h,i)perileno	0,57	-	-	-	-

FONTE: CETESB (2005).

NOTA: (1) - Procedimentos analíticos devem seguir SW-846, com metodologias de extração de inorgânicos 3050b ou 3051 ou procedimento equivalente. (-) – não determinado

Desse modo, na ausência de legislação pertinente para os contaminantes, em situações de tomada de decisão, costuma-se adotar normas internacionais para definir os níveis toleráveis de contaminação para solos e sedimentos (Mesquita, 2004). No entanto, cabe ressaltar que o uso de padrões internacionais, sem bom senso, pode levar a avaliações e a escolha de tecnologias inadequadas, já que existem diferenças nas condições climáticas, pedológicas e, portanto, físico-químicas em cada país.

A tendência mundial, inclusive, é sugerir a adoção de listas orientadoras com valores de referência de qualidade, de alerta e de intervenção, como uma primeira etapa nas ações de monitoramento da qualidade, prevenção à poluição e diagnóstico de áreas suspeitas de contaminação, remetendo a avaliação de risco, caso a caso, para as áreas contaminadas (CETESB, 2001).

As Tabelas 12 a 14 apresentam os limites indicados pelas principais agências ambientais, a Agência Americana de Proteção Ambiental ou *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) e o Ministério de Planejamento Territorial e Meio Ambiente da Holanda, amplamente adotados no mundo inteiro.

Tabela 12. Níveis genéricos de *Soil Screen Levels* (SSL's) para alguns HPAs no solo ($\mu\text{g.g}^{-1}$) segundo a USEPA.

SUBSTÂNCIA	INGESTÃO DE SOLO			
	RESIDENCIAL	INDUSTRIAL	PARQUES INFANTIS	PARQUES RECREACIONAIS
Antraceno	23	610	-	-
Naftaleno	3,1	41	-	-

FONTE: CETESB (2001).
NOTA: (-) não determinado.

Tabela 13. Valores de referência para ΣHPAs em solos segundo a Norma Holandesa.

TIPO DE SOLO	CONCENTRAÇÃO DE ΣHPAS NO SOLO PESO SECO (mg.kg^{-1})		
	REFERÊNCIA	ALERTA	INTERVENÇÃO
Concentração de HPAs em solo com 0% de teor de argila e 0% de M.O.	0,2	4,1	8,0
Concentração de HPAs em solo com 25% de teor de argila e 0% de M.O.	1,0	20,5	40,0

FONTE: Mesquita (2004).

Tabela 14. Níveis genéricos para os 16 HPAs prioritários ($\mu\text{g.g}^{-1}$) da USEPA em solo, segundo a *Generalitat da Catalunya* (segue o Níveis Genéricos de Referência da Norma Holandesa).

HPAS	URBANO	INDUSTRIAL
Naftaleno	5	5
Acenaftileno	-	-
Acenafteno	-	-
Fluoreno	-	-
Fenantreno	5	10
Antraceno	100	1300
Fluoranteno	15	1000
Pireno	-	-
Benzo(a)antraceno	10	535
Criseno	1,5	55
Benzo(b)fluoranteno	-	-
Benzo(k)fluoranteno	-	-
Benzo(a)pireno	-	-
Indeno(1,2,3-cd)pireno	100	535
Dibenzo(a,h)antraceno	-	-
Benzo(g,h,i)perileno	100	535

FONTE: Canals (2005).

NOTA: (-) não determinado.

2.6 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DO NAFTALENO

Os HPAs são compostos comuns no meio ambiente. Resultantes da incompleta combustão de materiais orgânicos, por ação humana ou natural, de processos industriais, de acidentes com petróleo e derivados, representam significativo risco à saúde humana e ambiental. Por isso, a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos eficazes para o seu monitoramento nas matrizes ambientais (Gimeno et al., 2002). No entanto, esses métodos analíticos apresentam uma série de dificuldades para a sua implantação (Ericsson & Colmsjo, 2002).

De acordo com Ericsson & Colmsjo (2002), procedimentos de extração e quantificação eficientes de compostos, especialmente àqueles de caráter orgânico hidrofóbico, como os HPAs, em matrizes complexas é de difícil alcance. Segundo esses autores, os compostos tendem a ser adsorvidos em diferentes rotas, tornando mais ou menos difícil o acesso a estes em função da morfologia da matriz e das isoterms de adsorção do sistema COH-matriz.

Na presente pesquisa, como etapa exigida para execução dos testes de sorção, foi efetuada a implantação do método de quantificação para o naftaleno. Para a garantia da qualidade do método analítico foram realizados procedimentos denominados de validação.

De acordo com a Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA (2003), a validação deve garantir por meio de estudos laboratoriais que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando confiabilidade aos resultados.

A Cromatografia Líquida de Alta Resolução (CLAE ou HPLC, sigla em inglês) é um dos instrumentos mais indicados para análise dos HPAs uma vez que o detector de fluorescência é particularmente sensível para moléculas aromáticas, especialmente as poliaromáticas, como é o caso do naftaleno (Weisman, 1998; Marcé *et al.*, 2000; USEPA, 2004d).

Além disso, a análise de HPAs em matrizes ambientais complexas, como o solo, tem como principal dificuldade a interferência dos compostos que podem co-eluir junto aos HPAs em função de propriedades físico-químicas similares. Desse modo, é requerida uma técnica seletiva e sensível, como o caso do detector de fluorescência da CLAE (Hesselink *et al.*, 1995).

Para os procedimentos de validação do método adotado, os parâmetros analíticos normalmente utilizados são seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (INMETRO, 2003; Fonseca *et al.*, 2004, Ribani *et al.*, 2004).

A seletividade é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, o composto em exame na presença de componentes que podem interferir na sua determinação em uma amostra complexa. Este parâmetro pode ser avaliado pelo (i) método da adição padrão; (ii) isolamento ou purificação do composto de interesse, utilizando técnicas de extração; (iii) utilização de detectores específicos para alguma propriedade inerente ao composto, ou (iv) análise de um branco da matriz, na possibilidade de acesso à matriz isenta do composto de interesse (Ribani *et al.*, 2004).

A linearidade, por sua vez, corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do composto em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (INMETRO, 2003). É uma relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa do composto de interesse, determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Pode ser expressa com uma equação de reta chamada de curva analítica e o coeficiente de correlação (R^2). Quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados.

Outra alternativa para determinação da linearidade do método é a determinação da faixa linear. De acordo com esse procedimento, o método é considerado linear até o ponto em que os dados relativos (sinal dos pontos da curva dividido por suas respectivas concentrações) intercepta duas linhas horizontais correspondentes a 95 e 105%, acima e abaixo, respectivamente, da linha média obtida sobre a faixa linear dos pontos da curva (Ribani *et al.*, 2004).

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A precisão pode ser avaliada pelo desvio padrão absoluto (Equação 1), pelo intervalo de confiança média (Equação 2) e pelo desvio padrão relativo (ou *Relative Standard Deviation* - *RSD*) (Equação 3). Normalmente métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um *RSD* de 1 a 2% e nível de traços ou impurezas de até 20% (INMETRO, 2003; Ribani *et al.*, 2004).

A equação usada obtenção do desvio padrão absoluto corresponde a:

- Desvio padrão absoluto $s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$ (Equação 1)

Onde $\bar{x}$ é a média aritmética de um pequeno número de medições (média das determinações), sendo uma estimativa de μ , a média verdadeira (média da população); x_i é o valor individual de uma medição e n é o número de medições.

- Intervalo de confiança da média $= \bar{x} \pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$ (Equação 2)

Em que t_{n-1} é o valor crítico da distribuição de Student com $n-1$ graus de liberdade, o valor de t é tabelado e apresenta valores para diferentes níveis de confiança e s corresponde ao desvio padrão absoluto.

- Desvio padrão relativo (*RSD*) ou coeficiente de variação (*CV*)

$$RSD(\%) ou CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{(Equação 3)}$$

Onde s corresponde ao desvio padrão da média das determinações (concentração) e $\bar{x}$ corresponde à média das determinações (concentração).

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Podem ser usados materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição padrão (INMETRO, 2003; Ribani *et al.*, 2004).

O limite de detecção (LD), por sua vez, representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada (INMETRO, 2003; Ribani *et al.*, 2004). A determinação do LD pode ser feita com base nos parâmetros da curva analítica, ou seja, da curva proveniente da injeção de diferentes concentrações da solução-estoque (Equação 4).

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad \text{(Equação 4)}$$

Onde s corresponde ao desvio do coeficiente angular da reta, proveniente da curva analítica, e S o coeficiente angular da reta.

O limite de quantificação (LQ) indica a menor concentração da substância em exame que pode ser medida. Pode ser calculada através da Equação 5. Onde, s e S são os mesmos definidos anteriormente.

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (\text{Equação 5})$$

2.7 COMPORTAMENTO SORTIVO DO SOLO NOS TRATAMENTOS TESTADOS

Apesar do grande conhecimento já adquirido sobre as técnicas de remediação e o surgimento e aprimoramento de novas tecnologias, o que se sabe a respeito dos processos geoquímicos e daqueles que permitem a disponibilidade dos xenobiontes ainda é escasso, especialmente em ambientes tropicais (Amellal *et al.*, 2001; D'Agostinho & Flues, 2006).

Uma das principais limitações é o desconhecimento a respeito da transferência de massa (Liebeg & Cutright, 1999). Não se conhece inteiramente quando, em que condições e se o contaminante está ao alcance do microrganismo, inclusive para aquele com aparato fisiológico capaz de degradá-lo. Desse modo, estes autores destacam a necessidade de se considerar os diferentes processos que estão envolvidos no destino dos compostos orgânicos e os vários fatores que podem afetar a sua cinética.

A explicação para a mobilidade e para a biodisponibilidade, ou seja, para o comportamento dos compostos orgânicos em solos, são as interações destes com a fase sólida e com as propriedades da solução (Kögel-Knabner & Totsche, 1998). São as características físico-químicas do meio (solo) e do contaminante que determinam esse comportamento e que permitem o surgimento de diferentes processos, entre eles a sorção, a dessorção, a degradação (química ou biológica) e a volatilização (Rahman, 2002).

Para compostos orgânicos hidrofóbicos no solo, como os HPAs, as interações mais comuns são a solvofóbica, ou seja, hidrofóbica em sistemas aquosos, e aquela dependente do grau de afinidade do soluto pela superfície sólida (Zytner, 2002). A interação de adsorção tem uma relação direta com as características químicas do contaminante e o tipo de solo. Assim, no caso de um contaminante não polar, não iônico, hidrofóbico, como os hidrocarbonetos poliaromáticos, esta é atribuída à fase de partição entre o soluto orgânico e a fase sólida da M.O. ou do C_{org} .

Desse modo, compreender as interações de partição dos compostos orgânicos na água e em outros compartimentos ambientais, como o solo, permite avaliar os níveis potenciais de contaminação de certos xenobiontes em cada compartimento, ou seja, avaliar o grau de sorção e de biodisponibilidade (Chiou, 2003). Isso decorre do fato de que a microbiota tem acesso ao contaminante apenas em solução e que, desse modo, a disponibilidade do contaminante é controlada por processos de aprisionamento e liberação do contaminante do solo para a água.

A sorção, principal processo de aprisionamento dos contaminantes, refere-se a um mecanismo de atenuação não destrutiva que é efetiva em poluentes orgânicos persistentes e substâncias inorgânicas (Thorton *et al.*, 2000; Heidrich *et al.*, 2004).

O processo de sorção depende de interações físicas, químicas e eletrostáticas entre a superfície sólida e o contaminante, que podem ser divididas em adsorção e absorção. A adsorção se refere à concentração de contaminantes na superfície do sólido (solo/sedimento), onde a ligação do contaminante à parte externa do sólido se dá preferencialmente através de ligações simples como, por exemplo, do tipo ponte de *van der Waals*. A absorção, por sua vez, implica na maior ou menor penetração do contaminante no sólido (Rahman, 2002).

Os estudos de adsorção e dessorção são importantes uma vez que possibilitam, além da geração de informações essenciais sobre a mobilidade e distribuição da substância química nos compartimentos ambientais (solo, água e ar da biosfera), geram informações que podem ser usadas na predição do comportamento do químico e propostas comparativas e de modelagem. No entanto, como já citado anteriormente, a distribuição de uma substância é um processo complexo e que depende de numerosos fenômenos e de mecanismos que não podem ser completamente definidos por um simples modelo como o adotado nos experimentos laboratoriais (OECD TG 106, 2001).

Consideradas estas ressalvas, equações de equilíbrio ou isotermas têm sido desenvolvidas para ajudar a explicar o processo de adsorção. Conhecer a isoterma de adsorção é poder determinar a massa real do solo contaminado por um composto orgânico dissolvido. A partir do conhecimento desse processo é possível prever o destino ambiental e o impacto sobre os diferentes mecanismos pelos quais passam o contaminante, como a volatilização, biodisponibilidade, biodegradabilidade, fotólises e hidrólises (Rahman, 2002).

Dentre todos os fenômenos que governam a mobilidade de substâncias, a transferência de substâncias de uma fase móvel (líquida ou gasosa) para fase sólida é o fenômeno universal. A “isoterma”, desse modo, corresponde a uma curva descrevendo a retenção de uma substância sobre um sólido em várias concentrações, é a maior ferramenta para descrever e prever a mobilidade dessa substância no ambiente. A concentração remanescente do soluto do composto C (kg.L^{-1}) pode ser comparada com a concentração desse composto retido sobre partículas Q (kg.kg^{-1}) e essa relação $Q = f(C)$ é nomeada “isoterma de sorção” (Limousin *et al.*, 2007).

Os experimentos em batelada é o método mais adotado para determinar os coeficientes de sorção através do balanço de massa. Esse procedimento é realizado através do monitoramento do decréscimo de uma concentração conhecida adicionada ao meio aquoso e, desse modo, a quantidade sorvida é determinada (Zytner, 2002).

Esses modelos tendem a relacionar a massa do soluto adsorvido (contaminante) por unidade de massa do adsorvente (solo) na fase líquida, quando o equilíbrio é alcançado. São formulados através da diferença das concentrações de massa do contaminante ainda presente na fase líquida (método direto) ou incorporada à fase sólida (método indireto).

Um número expressivo de modelos tem sido desenvolvido para descrever diferentes padrões de sorção. A maioria dos estudos de sorção para compostos hidrofóbicos, como no caso dos HPA's,

tem sido bem descritos pelos modelos do tipo *Freundlich*, do tipo linear ou partição constante (C) e de *Langmuir* (L) (Xing, 1997; Salloum *et al.*, 2002; Laak, 2005; Liang *et al.*, 2006; Limousin *et al.*, 2007).

As Isotermas de *Freundlich* e de partição constante, normalizada com o percentual de C_{org} (Equações 7 e 8), são as mais utilizadas. Isto se dá uma vez que o modelo de *Freundlich* considera a adsorção de orgânicos em multicamadas e não em monocamadas, como no caso da Isoterma de *Langmuir* (Zytner, 2002 e Carlson, 1999) ou em função da significativa influência da fração orgânica do solo no número de sítios de sorção (Xing, 1997; Limousin *et al.*, 2007).

A isoterma de *Langmuir* é construída com base na equação 6.

$$C_s = b_L K_L C_w / 1 + K_L C_w \quad (\text{Equação 6})$$

Onde C_s e C_w correspondem as concentrações do composto em solo e em solução, b_L é uma constante relacionada com a energia de adsorção e K_L é a capacidade máxima de adsorção pelo sólido (Ritter, 1998).

A equação de Isoterma de *Freundlich* ou isoterma de sorção é escrita:

$$S = K_f \times C^N \quad (\text{Equação 7})$$

Onde S é a concentração do composto na fase sólida, C é a concentração na fase líquida e K_f e N são constantes empíricas. Se $N=1$, a equação é linear e resulta no modelo do tipo linear ou de partição constante (Equação 8).

$$S = K_d \times C \quad (\text{Equação 8})$$

Onde o K_d é o coeficiente de partição de equilíbrio linear, dependente da hidrofobicidade do composto.

O K_d também pode ser expresso pelo coeficiente de partição octanol/água, K_{ow} , e o conteúdo de carbono orgânico, f_{oc} , do sorvente, derivando em diferentes relações matemáticas entre K_d , f_{oc} e K_{ow} , de vários compostos, naturais ou sintéticos, sorvidos (Equação 9).

$$K_d = f_{oc} \times K_{oc} = f_{oc} \times b(K_{ow})^a \quad (\text{Equação 9})$$

Onde K_{oc} é o coeficiente de partição do composto entre a água e o C_{org} do sorvente, que representa 100% do material orgânico atual, e “a” e “b” são as constantes.

O conteúdo de C_{org} e o coeficiente de partição octanol/água do composto têm sido amplamente utilizados para estimar a adsorção de algum composto orgânico não carregado em baixas concentrações e em um material natural (Limousin *et al.*, 2007).

Com o estudo de sorção, é possível prever se está havendo “seqüestro” do composto orgânico no meio e, portanto, qual o acesso destes aos organismos degradadores. A correlação entre a sorção e o seqüestro pode ser esperada uma vez que o passo inicial do seqüestro é a sorção e a molécula seqüestrada permanece, por um ou outro mecanismo, sorvida pelas partículas do solo (Kottler & Alexander, 2001).

A Tabela 15, resume as principais características físico-químicas dos 16 HPAs prioritários indicados pela USEPA:

Tabela 15. HPAs prioritários segundo a USEPA e suas principais características físico-químicas.

HPAS PRIORITÁRIOS	FÓRMULA QUÍMICA	PF (°C)	PE (°C)	PM (g.mol ⁻¹)	DENSIDADE (g.cm ⁻³)	SOLUBILIDADE EM ÁGUA S _w , 25°C (mg.L ⁻¹)	PRESSÃO DE VAPOR (atm)	CONSTANTE DE HENRY K _h (atm.m ³ .mol ⁻¹)	LOG K _{OW} (25°C)	LOG K _{OC}	MEIA-VIDA NO SOLO (dias)
Naftaleno	C ₁₀ H ₈	80,20	218,00	128,17	1,025	32,0	3,00X10 ⁻⁴	1,50X10 ⁻³	3,35	3,00	70
Acenaftileno	C ₁₂ H ₈	92,00	265,00	152,19	-	3,93	-	-	4,08	-	70
Acenafteno	C ₁₂ H ₁₀	96,00	279,00	154,21	-	3,4	-	-	4,32	-	230
Fluoreno	C ₁₃ H ₁₀	116,00	293,00	166,22	-	1,9	7,90X10 ⁻⁸	-	4,18	-	230
Fenantreno	C ₁₄ H ₁₀	101,10	340,00	178,23	0,980	1,3	8,90X10 ⁻⁷	3,50X10 ⁻⁵	4,57	4,20	230
Antraceno	C ₁₄ H ₁₀	216,20	340,00	178,23	1,283	0,05-0,07	7,90X10 ⁻⁹	-	4,63	-	230
Fluoranteno	C ₁₆ H ₁₀	111,0	383,00	202,25	-	2,6X10 ⁻¹	1,20X10 ⁻⁹	-	5,22	-	710
Pireno	C ₁₆ H ₁₀	156,00	360,00	205,25	1,271	1,4X10 ⁻¹	5,92X10 ⁻⁹	-	5,22	4,97	710
Benzo(a)antraceno	C ₁₈ H ₁₂	158,00	400,00	228,29	-	1,0X10 ⁻²	6,30X10 ⁻⁹	5,75X10 ⁻⁶	5,60	-	710
Criseno	C ₁₈ H ₁₂	255,00	441,00	228,29	-	2,0X10 ⁻³	3,80X10 ⁻¹¹	-	5,79	-	710
Benzo(b)fluoranteno	C ₂₀ H ₁₂	167,00	-	252,31	-	1,2X10 ⁻³	-	-	6,60	-	710
Benzo(k)fluoranteno	C ₂₀ H ₁₂	217,00	480,00	252,31	-	5,5X10 ⁻³	-	-	6,85	-	710
Benzo(a)pireno	C ₂₀ H ₁₂	175,00	496,00	252,30	-	3,8X10 ⁻³	2,30X10 ⁻¹⁰	1,20X10 ⁻⁶	6,04	-	710
Indeno(1,2,3-cd)pireno	C ₂₂ H ₁₂	163,00	-	276,33	-	6,2X10 ⁻²	-	-	7,70	-	710
Dibenzo(a,h)antraceno	C ₂₂ H ₁₂	222,00	-	276,33	-	2,6X10 ⁻⁴	-	-	7,00	-	710
Benzo(ghi)perileno	C ₂₂ H ₁₄	262,00	-	278,35	-	5,0X10 ⁻⁴	-	-	6,00	-	710

FONTE: Adaptada de Kaipper (2003) e Brändli *et al.* (2004).NOTA: PF – ponto de fusão; PE – ponto de ebulição; PM – peso molecular; S_w – solubilidade em água; K_{ow} – coeficiente de partição octanol-água; K_{oc} – o coeficiente de partição do composto entre a água e o C_{org} do sorvente.

Outro aspecto que merece atenção é que o coeficiente de distribuição, K_d , também pode ser estimado não experimentalmente. O objetivo dessa estimativa é determinar o comportamento de compostos no ambiente, incluindo exposição, risco e modelos matemáticos, por meio do conhecimento de suas propriedades físicas e químicas. Esse é um protocolo adotado no mundo inteiro e que aqui no Brasil faz parte das Ações Corretivas Baseadas em Risco Aplicadas a Áreas Contaminadas com Hidrocarbonetos Derivados de Petróleo e Outros Combustíveis Líquidos (ACBR) que tem como base procedimentos internacionais. Essas avaliações são importantes como dados para a tomada de decisão que incluem: determinação da urgência de ações corretivas, necessidade de remediação, níveis aceitáveis e alternativas tecnológicas mais apropriadas (D'Agostinho & Flues, 2006).

É preciso ressaltar, no entanto, que apesar da significativa importância das propriedades físico-químicas do composto para determinar seu comportamento no meio ambiente, eles são muito sensíveis ao tipo e composição do combustível, ao meio (tipo de solo) onde ocorreu o vazamento e às condições ambientais. Desse modo, são necessários estudos sobre o comportamento em condições climáticas e ambientais mais próximas das condições locais, para adequação dos modelos pré-existentes (D'Agostinho & Flues, 2006). Em ambientes tropicais, como no Brasil, poucos são os trabalhos realizados com esse objetivo, no entanto, esta é uma questão que já vem despertando a preocupação de órgãos ambientais como a CETESB que sinaliza para realização de estudos voltados para avaliação de risco local, inclusive para a estimativa de coeficientes de distribuição locais (K_d e K_{oc}) (CETESB, 2001; 2005).

Destaca-se também que o presente trabalho é um dos primeiros no país que procura relacionar os efeitos de tratamentos de biorremediação bastante usuais (bioestímulo e bioaumento) com possíveis alterações na capacidade sortiva do solo tratado. Dados estes significativos para avaliação de risco e escolha de tratamento adequado para áreas contaminadas.

No presente trabalho, buscou-se também avaliar a correlação entre os valores teóricos e os valores medidos nos ensaios (experimentalmente) da substância-teste, expresso pelo valor de K_{oc} . O valor de K_{oc} utilizado foi obtido no manual de valores para solo no *Appendix K: Soil Organic Carbon (Koc) / Water (Kow) Partition Coefficients* que apresenta amplas faixas de valores desse coeficiente, obtidos em sua maioria por isotermas de sorção e em diferentes condições ambientais (USEPA, 2004a). O K_{oc} utilizado foi proveniente de solo com características similares ao estudado (Ex: teor de C_{org}).

2.8 TESTE DE TOXICIDADE

Os compostos tóxicos quando chegam à cadeia alimentar podem ser acumulados e/ou biomagnificados e, desta forma, representar riscos para o homem. Os efeitos tóxicos potenciais de substâncias podem ser avaliados através dos testes de toxicidade e, desta forma, tomadas decisões

para minimizar e até eliminar as consequências no ambiente e no próprio homem. Os efeitos adversos dessas substâncias em nível de organismos incluem efeitos letais a curto e longo prazos, e efeitos subletais, tais como mudança de comportamento, alterações do crescimento, da reprodução, da tomada de alimento e outros (Souza, 2002).

A análise de toxicidade do solo corresponde a um dos métodos microbiológicos para avaliação da biorremediação. Essa análise pode ser realizada usando-se testes de toxicidade apropriados que podem incluir germinação e crescimento de plantas (mono e dicotiledôneas), testes do tipo Microtox e Ames, bem como o uso de minhocas como organismos-teste. O teste Microtox avalia a redução da emissão de luz pela *Photobacterium phosphoreum* e Ames, o efeito mutagênico em *Salmonella typhimurium* (Balba *et al.*, 1998).

A importância da realização de testes de toxicidade para o acompanhamento da biorremediação de solos contaminados por substâncias perigosas deve estar atrelada a análises químicas tradicionais, pois metabólitos não detectáveis ou novos compostos são formados durante esse processo podendo prejudicar a biorremediação (Plaza *et al.*, 2005).

Organismos bentônicos que vivem em contato direto com sedimentos contaminados estão expostos tanto aos contaminantes associados à fase sólida, quanto à fase líquida (água intersticial) (Lotufo & Abessa, 2002). Segundo Lotufo (1998), as frações pesadas dos petroderivados, como por exemplo, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) residem em sedimentos, podendo, desta forma, oferecer risco para a fauna bentônica. Trabalhos recentes demonstraram que organismos da meiofauna, especialmente copépodos, podem ser utilizados com sucesso em testes de toxicidade com sedimento (Coull & Chandler, 1992).

Nas últimas décadas, verificou-se que testes de toxicidade com organismos aquáticos constituem uma ferramenta efetiva para avaliação de contaminantes sobre organismos vivos (Zagatto, 1998). Várias espécies de copépodos harpacticóides estão sendo utilizadas com sucesso em testes de toxicidade, dentre elas podemos citar *Schizopera knabeni* (Lotufo, 1997; Lotufo & Fleeger, 1997; Lotufo, 1998), *Coullana* sp (Lotufo, 1998), *Nitocra lacustris* (Lotufo & Fleeger, 1997; Street *et al.*, 1998), *Nitocra spinipes* (Wernersson *et al.*, 2000; Dahl *et al.*, 2006), *Amphiascus tenuiremis* (Hagopian-Schlekat *et al.*, 2001), *Tisbe battagliai* (Pounds *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2003). *T. longicornis* (Larrain *et al.*, 1998).

Dentre estes, o gênero *Tisbe* é representante de um grupo ecologicamente importante da meiofauna, sensível a contaminantes ambientais, usado como uma espécie teste internacional em ecotoxicologia marinha (Pounds *et al.*, 2002). Além disso, é um grupo conveniente para bioensaios pela sua sensibilidade e pela consistência das respostas a substância de referências como o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) (Larrain *et al.*, 1998).

Copépodos marinhos harpacticóides bentônicos do gênero *Tisbe*, entre outros, vêm sendo frequentemente utilizados em testes letais e sub-letais de toxicidade, em função de suas várias qualidades de comportamento e ciclo de vida. O seu tamanho reduzido facilita a realização dos testes, barateando os mesmos, e seu hábito epibentônico possibilita testar poluentes tanto na fase aquosa quanto aqueles ligados aos sedimentos (Bengtsson, 1978; Silva *et al.*, 2000).

Estudos feitos para avaliação dos efeitos letais e sub-letais do dicromato de potássio, concluiu que o *Tisbe biminiensis*, copépodo bentônico tropical, pode ser usada em testes toxicológicos usando o efeito sub-letal em conjunto com o efeito letal. Esses testes foram promissores, uma vez que a maioria dos estudos toxicológicos é realizada com espécies de zonas temperadas, portanto, inadequadas para áreas de clima quente (Araújo-Castro *et al.*, 2006b).

Araújo-Castro *et al.* (2006a) utilizando à mesma espécie de copépodo bentônico, avaliou por meio de bioensaios com fração sólida a toxicidade de sedimentos portuários (Porto de Suape, NE do Brasil) através do efeito letal (mortalidade das fêmeas) e sub-letal (produção de descendentes), estabelecendo este teste como rotina laboratorial.

Em função da facilidade de acesso ao laboratório, localizado na mesma instituição da realização da presente pesquisa (UFPE), baixo custo do teste e uso de uma espécie tropical, o copépodo bentônico *Tisbe biminiensis* foi utilizado no presente estudo para avaliar a adequação deste como espécie-teste na investigação da toxicidade da matriz do tipo solo contaminado com óleo diesel.

CAPÍTULO 3.

OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência de remoção de HPAs de um solo argiloso, contaminado por óleo diesel, em condições laboratoriais, por meio de diferentes processos de biorremediação – aeração e correção de umidade (*Landfarming*); aeração, correção de umidade e adição de nutrientes (Bioestímulo); e aeração, correção de umidade, adição de nutrientes e de microrganismos (Bioaumento).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o solo em estudo, físico-químico e pedologicamente, e indicar as correções necessárias para adoção dos tratamentos de remediação;
- Identificar os microrganismos (bactérias, fungos e leveduras) cultiváveis em solo argiloso contaminado por óleo diesel;
- Avaliar a influência da adição de nutrientes e microrganismos sobre remoção aeróbia de óleos e graxas (O&G) e de HPAs de solo argiloso contaminado por óleo diesel tratados por diferentes métodos de remediação (bioestímulo e bioaumento);
- Desenvolver, implantar e estabelecer como rotina no Laboratório de Saneamento Ambiental da UFPE método para quantificação de naftaleno em água por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Avaliar a variação da capacidade sortiva de solo argiloso contaminado por óleo diesel e sujeito a tratamentos de remediação (bioestímulo e bioaumento). O naftaleno (NAP), um dos 16 HPAs prioritários indicados pela USEPA, foi adotado como substância-teste;
- Avaliar a aplicabilidade de uma espécie de copépoda bentônica tropical para quantificar níveis de toxicidade em solo contaminado por óleo diesel.

CAPÍTULO 4.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho abordou os procedimentos de biorremediação de um solo argiloso, contaminado experimentalmente por óleo diesel, e as possíveis alterações em sua capacidade sorviva. Os 16 HPAs prioritários, indicados pela USEPA, foram utilizados como parâmetros de avaliação dos tratamentos de biorremediação. O naftaleno (NAP), um destes 16 prioritários, foi usado como modelo específico de sorção em função de sua alta concentração no óleo diesel e alta solubilidade em água, que tende a facilitar a execução dos testes.

A Figura 8 ilustra as atividades desenvolvidas na presente pesquisa.

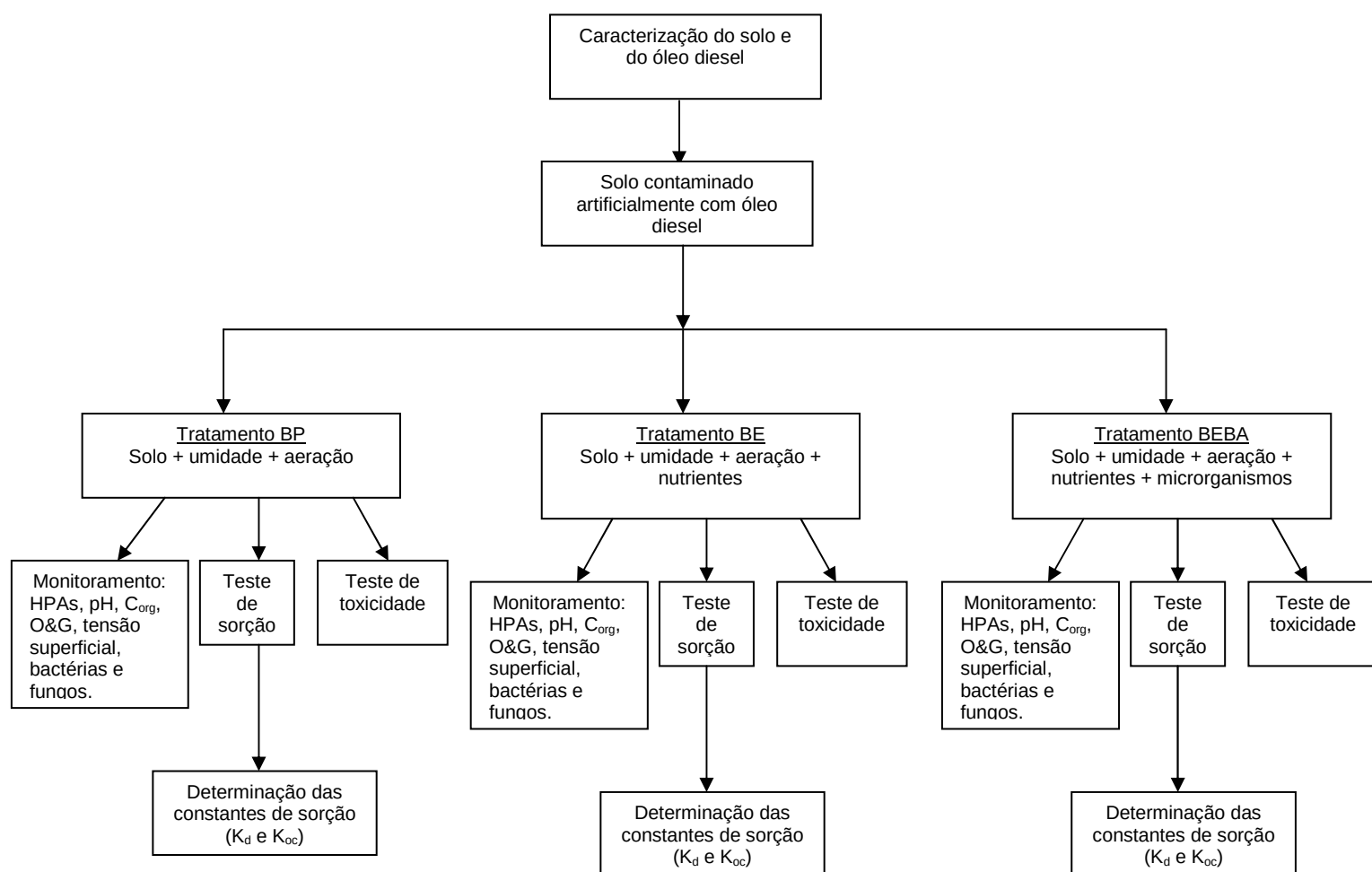


Figura 8. Fluxograma das atividades desenvolvidas na presente pesquisa.

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO SOLO E QUÍMICA DO ÓLEO DIESEL

4.1.1 Amostragem do solo

O solo argiloso foi coletado na Usina N. Sra. Auxiliadora, margem direita da BR 232 (no sentido Recife/Caruaru), altura do Km 22, município de Moreno (PE), distando cerca de 1 km das margens da rodovia. Foi realizada uma única amostragem de cerca de 50 kg de solo. O local foi escolhido em função da probabilidade de estar isento de contaminação à base de petróleo e derivados.

Para a coleta, foi utilizada uma pá e a amostragem foi feita de 10 a 20 cm de profundidade no solo, com prévia remoção de vegetação e de quaisquer outros resíduos (descrição do perfil do solo estudado no Anexo 1). A profundidade da coleta tinha como objetivo adquirir uma microbiota nativa aeróbia, uma vez que esta tende a ser a primeira atingida em um derrame e em função de sua importância na degradação de petroderivados. A amostra foi acondicionada em sacos plásticos e transportada para o Laboratório de Preparação de Amostras (LPA) do Departamento de Geologia da UFPE.

A amostra foi então seca ao ar, peneirado em peneiras com malha de 2 mm, armazenadas em bolsas plásticas e estocada sob refrigeração a 4°C até a realização dos experimentos.

4.1.2 Quantificação dos parâmetros físico-químicos da amostra de solo

A caracterização do solo teve como objetivo levantar as propriedades físico-químicas e microbiológicas que poderiam apresentar inter-relação com o contaminante presente no meio.

As análises físico-químicas para a caracterização inicial do solo foram realizadas pelos Laboratórios de Química e Física dos Solos, do Departamento de Agronomia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). A análise da tensão superficial foi realizada no Laboratório de Tecnologia Mineral, do Departamento de Engenharia de Minas da UFPE.

As concentrações de metais traços foram obtidas no Laboratório *Lakefield Geosol*. As análises foram realizadas a partir da extração do solo com auxílio de água régia e as análises foram realizadas por Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Induzido Acoplado (ICP-AES).

Os parâmetros físico-químicos avaliados, bem como os métodos aplicados, estão apresentados na Tabela 16. A descrição metodológica, por sua vez, em função do número expressivo de parâmetros, está apresentada no Anexo 3.

Tabela 16. Caracterização físico-química do solo em estudo e os respectivos métodos adotados.

PARÂMETROS	UNIDADE	REFERÊNCIA DO MÉTODO
Densidade global e partícula	g.cm ⁻³	EMBRAPA (1997).
Granulometria	%	
Porosidade	%	
Relação silte/argila	-	
Textura	-	
Capacidade de campo	%	
Condutividade hidráulica	cm.s ⁻¹	
Complexo sortivo	cmol/dm ³	
Potencial hidrogeniônico (pH)	-	
Matéria orgânica (M.O.)	%	
Nitrogênio total (amoniacoal e nitratos) (N)	g.kg ⁻¹	
Fósforo disponível (ortofosfatos) (P)	mg.kg ⁻¹	
Enxofre	mg.kg ⁻¹	
Óleos e Graxas (O&G)	g.kg ⁻¹	Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (1999). Método 5520 D, Extração por Soxhlet.
Metais pesados	mg.kg ⁻¹ e %	Método de digestão multiácida.
Tensão superficial	mN/m	ASTM D971 (1999).

4.1.3 Quantificação dos microrganismos heterotróficos totais

Para remover a microbiota do solo, 10 g deste foram colocados em um frasco Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de água deionizada e esterilizada. O frasco foi mantido em agitação de 200 rpm, durante 20 min, em temperatura ambiente ($30 \pm 1^\circ\text{C}$), de acordo com os procedimentos adotados por Santo (2002).

Da suspensão, foram realizadas diluições em série de 10 vezes (diluições decimais seriadas) para quantificar o número de colônias de acordo com os procedimentos adotados por Colores *et al.* (2000). Em seguida, o plaqueamento foi realizado em meio orgânico sólido através da técnica de *pour plate*. Esse processo foi realizado adicionando-se 1 mL de diluições adequadas em placas de Petri que continham meio sólido adequado (10 mL) para o crescimento de diferentes grupos microbianos. O meio utilizado para fazer o crescimento de bactérias foi o TSA (*Tryptic Soy Agar*), da marca *Acumedia Manufacturers*, e para a contagem dos fungos foi utilizado o *Sabouraud Dextrose Agar* (*Acumedia Manufacturers*). Foram adicionados a cada placa de bactérias e fungos, 50 µg.mL⁻¹ do antifúngico ciclohexamida e do antibactericida estreptomicina, respectivamente, para garantir crescimento exclusivo do microrganismo a ser quantificado. Depois as placas foram incubadas a $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ e após 24 ou 48 h foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC.g⁻¹). As placas foram preparadas em triplicata e os desvios padrões foram calculados para cada diluição. Brancos também foram utilizados para garantir a esterilização do aparato usado no teste.

As análises para quantificação dos microrganismos heterotróficos foram realizadas para caracterização do solo estudado, antes e após a contaminação com óleo diesel, e em todos os dias de amostragens avaliados e nos tratamentos testados no presente estudo.

Para identificação das espécies presentes no solo estudado, antes e após a contaminação com óleo diesel, os isolados de bactérias foram enviados para o Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, e de fungos e leveduras para o Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

As bactérias foram identificadas por meio da extração e análise de agrupamento dos perfis de ácidos graxos de acordo com o protocolo recomendado pela *Microbial Identification System* (MIDI), utilizando-se o sistema *Sherlock*. Os perfis cromatográficos foram comparados com a biblioteca de isolados ambientais TSBA 50.

Os fungos e leveduras foram identificados por meio de aspectos morfológicos e de esporulação.

4.1.4 Amostragem e caracterização do óleo diesel

O óleo diesel, utilizado na presente pesquisa, foi obtido na Empresa TRANSPETRO, localizada no Porto de Suape - PE. O óleo foi acondicionado em frascos tipo âmbar de 1.000 mL, com tampas plásticas rosqueadas, e foram armazenados até seu uso sob refrigeração a 4°C, para reduzir a volatilização. Foram adquiridos 4 L no total, todos provenientes do mesmo lote, bem como foi adquirida a caracterização físico-química (aspecto, cor, densidade, massa específica, viscosidade, teor de enxofre e ponto de fulgor) do óleo também fornecida pela empresa supracitada.

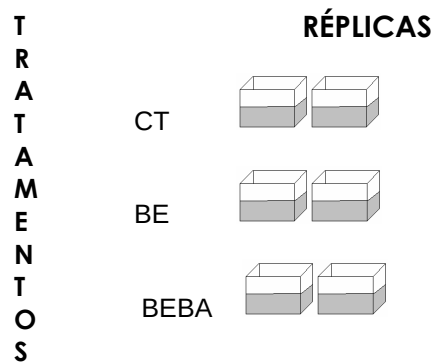
4.2 TRATAMENTOS DE REMEDIAÇÃO

4.2.1 Preparo das amostras de solo

O objetivo do presente experimento foi avaliar que tratamento seria o mais vantajoso para tratar um solo do tipo argiloso contaminado com HPAs, provenientes de derrame de óleo diesel. Os tratamentos estudados foram: *landfarming* (LF), bioestímulo (BE) e bioestímulo mais bioaumento (BEBA).

Os tratamentos foram adaptados dos experimentos desenvolvidos por Amellal *et al.* (2001), Huang *et al.* (2004) e Bento *et al.* (2005). Os microcosmos contaminados com óleo diesel passaram pelos três diferentes tipos de tratamentos, durante o período de 18 semanas (129 dias) (Figura 9).

ESQUEMA DO TESTE DE REMEDIAÇÃO



Total:

3 tratamentos x 2 réplicas = 6 amostras

Recipientes: bandejas plásticas (6,8 x 27 x 42,5 cm)

Legenda

LF (*Landfarming*) - com revolvimento; com adição de água deionizada; sem adição de solução nutriente; sem adição de microrganismos.

BE (Bioestímulo) - com revolvimento; com adição de água deionizada; com adição de solução nutriente (pH 7,0); sem adição de microrganismos.

BEBA (Bioestímulo mais Bioaumento) - com revolvimento; com adição de água deionizada; com adição de solução nutriente; com adição de microrganismos (pH 7,0).

Figura 9. Esquema experimental para os biotratamentos de remediação do solo argiloso contaminado com óleo diesel.

Apesar dos diferentes tratamentos de remediação adotados no experimento, alguns procedimentos-padrão foram utilizados para adequação das condições do solo e tornar mais promissores os tratamentos propostos. Esses procedimentos têm como base o trabalho realizado por Trindade (2002) e estão explicitados a seguir.

- Secagem do solo

Depois de retirado da geladeira, o solo foi seco ar em temperatura ambiente. Foi necessário 48 h para a secagem completa do solo estudado.

- Verificação e ajuste do teor de umidade do solo

Antes do início de cada teste, a umidade das amostras de solo foi ajustada para 50% da capacidade de campo (CC) (Equação 10). Este é o valor recomendado pela literatura (Trindade, 2002).

$$M_{\text{água ajuste}} = m_{\text{água } 50\% \text{ CC}} - m_{\text{água umidade}} \quad (\text{Equação 10})$$

Esse ajuste obedeceu a três condições:

1. *Landfaming* (LF) - Sem correção de nutrientes e sem adição de microorganismos – ajuste pela adição somente de água deionizada.
2. Bioestímulo (BE) - Com correção de nutrientes e sem adição de microorganismos – ajuste pela adição de solução-nutrientes (água deionizada mais nutrientes).
3. Bioestímulo mais bioaumento (BEBA) - Com correção de nutrientes e com adição de microorganismos – ajuste pela adição de solução de nutrientes e consórcio microbiano (suspensão de células).

- Verificação da relação adequada de nutrientes (C:N:P)

O acréscimo de nutrientes foi feito de acordo com o método de Bento *et al.* (2005). As concentrações utilizadas foram calculadas a partir das análises químicas laboratoriais das frações de C, N e P já existentes no solo original. Para a correção do C e efeito de cálculo das relações C:N:P, considerou-se o percentual de M.O. já presente na amostra de solo, bem como o proveniente da contaminação pelo óleo diesel.

A massa de carbono do óleo diesel foi calculada como ilustrada pela Equação 11, uma vez que este petroderivado é constituído basicamente de hidrocarbonetos.

$$mC_{aprox} = d_{diesel} \times V_{diesel} \quad (\text{Equação 11})$$

Onde:

mC_{aprox} = massa aproximada de carbono na amostra de diesel (g);

d_{diesel} = densidade da amostra de diesel utilizada (g.mL^{-1});

V_{diesel} = volume da amostra de diesel utilizada no meio de cultivo (mL).

Como fontes de N e P para o solo foram utilizadas NH_4NO_3 e K_2HPO_4 , respectivamente. As massas dos nutrientes foram calculadas de acordo com o abaixo exemplificado para o NH_4NO_3 .

$$m\text{NH}_4\text{NO}_3 = \frac{(mC_{aprox} / mC_{desejada}) \times V_{diesel}}{PM_N} \quad (\text{Equação 12})$$

Onde:

$m\text{NH}_4\text{NO}_3$ = massa de nitrato de amônia para compor o meio de cultivo;

mC_{aprox} = massa aproximada de carbono na amostra de óleo diesel;

$mC_{desejada}$ = proporção de carbono desejada na relação C:N;

V_{diesel} = volume do diesel (mL);

PM_N = peso molecular do N no composto usado.

4.2.2 Preparo dos experimentos de remediação

O solo argiloso seco e destorroado foi distribuído em recipientes plásticos (6,8 x 27 x 42,5 cm). Esses recipientes serviram de “microcosmos” onde foram simulados os diferentes tratamentos de remediação próximo as condições ambientais naturais.

Cada tratamento foi realizado em duplicata, portanto, foram 6 microcosmos provenientes de 3 tratamentos x 2 réplicas (Figura 9). Cada recipiente recebeu 4 kg de solo (peso seco), igualmente contaminados artificialmente com óleo diesel (Seção 4.2.2.1) e foram armazenados em sala em temperatura ambiente. Os procedimentos necessários para os tratamentos estão apresentados a seguir.

4.2.2.1 Contaminação do solo com óleo diesel

A contaminação do solo foi feita em uma quantidade similar à adotada por Barahona *et al.* (2004) em seu estudo sobre tratamento de solos contaminados por óleo diesel. Desse modo, cada amostra de solo (4 kg) foi artificialmente poluída com diesel comercial, até o nível de 40 g de diesel.kg⁻¹ de solo, aproximadamente 188 mL de diesel. A distribuição do contaminante foi aleatória.

Posteriormente, foi acrescentada água deionizada o suficiente para umedecer o solo (50% da CC), este foi revolvido (Huang *et al.*, 2004) e mantido em temperatura ambiente por uma semana. Esse procedimento teve como objetivo promover uma maior ligação entre os compostos químicos do óleo diesel e o solo.

4.2.2.2 Caracterização dos tratamentos

- *Landfarming* (LF)

O solo foi revolvido duas vezes por semana para expor boa parte de sua massa ao ar, o que provavelmente permite a volatilização e alguma oxidação química dos HPAs mais leves. Esse tratamento foi chamado de *Landfarming*, apesar de não apresentar todos os procedimentos característicos da técnica (Khan *et al.*, 2004), em função de ter como base a aeração por revolvimento e exposição do solo ao ar como estímulos à remediação. Os procedimentos e denominação aqui adotados também foram utilizados por Huang *et al.* (2004) em seus estudos para tratamento de solos contaminados com HPAs.

O tratamento LF também incluiu umedecimento do solo duas vezes por semana com água deionizada para manter o nível de umidade constante.

- Bioestímulo (BE)

Esse tratamento teve como objetivo melhorar a taxa de biodegradação natural através do acréscimo de nutrientes. A solução dos nutrientes foi introduzida no solo apenas uma vez, no início do experimento, com a água suficiente para umedecer o solo (50% CC) e este revolvido para facilitar a incorporação desse incremento no solo.

Durante o tempo de execução do teste (129 dias), o solo foi revolvido duas vezes por semana para expor boa parte de sua massa ao ar e umedecido duas vezes por semana com água deionizada para manter o nível de umidade constante.

- Bioaumento (BEBA)

O tratamento pretendeu ampliar o poder de degradação dos HPAs provenientes do óleo diesel, a partir do acréscimo de um consórcio microbiano adaptado a partir do próprio solo contaminado. O motivo da microbiota nem sempre acelerar o processo de biodegradação por óleo e

petroderivados, decorre da falta de especificidade desses organismos ou de adaptação às condições em que são colocados (temperatura, nutrientes, solo, etc.) (Del'Árco, 1999). Por isso a importância de se utilizar organismos nativos e o melhoramento das condições locais (bioestímulo) para facilitar o tratamento.

O experimento apresenta as mesmas condições dadas ao tratamento de bioestímulo e mais a adição de microrganismos ($350 \text{ mL de } 10^8 \text{ células.mL}^{-1}$), estes provenientes da aclimação e enriquecimento da microbiota do solo pré-adaptado (Bento *et al.*, 2005). A adição dos microrganismos também foi efetuada uma única vez no início do experimento. O uso combinado da bioestímulo e bioaumento é justificado por trabalhos de Liebeg & Cutright (1999). Estes encontraram que o bioaumento não é tão significativo sozinho quando comparado ao bioestímulo e, especialmente, pouco significativo se comparado à combinação de ambos.

As etapas desse experimento incluem a aclimação e o crescimento da cultura apta a degradar os HPAs presentes no solo contaminado por óleo diesel e a posterior inoculação da microbiota no microcosmo.

Para o procedimento de aclimação e enriquecimento foram utilizados 200 g do solo em estudo em um béquer de 500 mL, onde foram adicionados 12 mL de óleo diesel e 20 mL de meio mineral de *Bushnell-Haas* (Tabela 17). Em seguida, os componentes foram homogeneizados com bastão de vidro. A mistura foi mantida ao ar livre por 30 dias para proporcionar a aclimação e crescimento da cultura. A cada dois dias, o solo foi revolido para aumentar a aeração e a cada sete dias foi adicionado 20 mL de meio mineral para umedecer e adicionar nutrientes ao meio (Santo, 2002).

Tabela 17. Constituição do meio mineral de *Büshnell-Haas* – BH.

COMPONENTES	QUANTIDADE
KH ₂ PO ₄	1,00g
K ₂ HPO ₄	1,00g
NH ₄ NO ₃	1,00g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20g
FeCl ₃	0,05g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02g
Água deionizada	1,0 L
Agar	15,0g
pH 7,0±0,2	

FONTE: Atlas (1995b).

Após os 30 dias de enriquecimento, foi realizada a quantificação dos microrganismos presentes, como descrito na seção 4.1.3 e, a partir de diluições decimais seriadas e crescimento, foi obtida a cultura microbiológica para inoculação.

O procedimento de inoculação dos degradadores de HPAs foi realizado em uma faixa de 10^8 células.mL⁻¹ por gotejamento na amostra de solo disponível para o tratamento de bioaumento e bioestímulo (BEBA) (Bento *et al.*, 2005). Em seguida, o solo foi revolvido para aumentar o contato com os microrganismos e umedecido com água deionizada até o 50% da CC. Duas vezes por semana a amostra foi umedecida até 50% da CC.

4.2.3 Monitoramento dos tratamentos de remediação: parâmetros analisados

Alíquotas das amostras de solo foram coletadas ao longo das 18 semanas de experimento, no 0, 3º, 10º, 17º, 24º, 45º, 73º, 101º e 129º dias de incubação do experimento. Nestas alíquotas foram quantificados os 16 HPAs prioritários, provenientes da contaminação com óleo diesel, monitorados os microrganismos presentes e alguns parâmetros físico-químicos importantes (Tabela 18). Concomitantemente, foi realizado o teste de sorção, apresentado na seção 4.3.

A escolha dos intervalos de amostragem do presente experimento (0, 3º, 10º, 17º, 24º, 45º, 73º, 101º e 129º dias) teve como critério o comportamento cinético de desenvolvimento dos microrganismos (comportamento Monod), com base em trabalhos observados na literatura (Huang *et al.*, 2004; Bento, 2005) e, conseqüentemente, as velocidades de remoção dos contaminantes: intervalo de amostragem mais curto na fase exponencial e intervalo mais longo na fase estacionária e na fase de declínio.

Apenas os testes de sorção e de toxicidade foram realizados em somente três intervalos de amostragem sendo estes, respectivamente, 10º, 45º e 129º dias e 3º, 45º e 129º dias de incubação do experimento, em função do significativo tempo e trabalho demandados em suas execuções. Estes intervalos correspondiam a aproximadamente início, meio e fim do experimento total (129 dias).

Tabela 18. Parâmetros avaliados ao longo dos tratamentos.

PARÂMETROS	AMOSTRAGEM	DIAS								
		0	3º	10º	17º	24º	45º	73º	101º	129º
HPAs	composta	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C _{org}	simples	.	.	.	.	.	.	.	.	.
O&G	simples	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Tensão superficial	simples	.	.	.	.	.	.	.	.	.
pH	simples	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Sorção	composta	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fungos	composta	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Bactérias	composta	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Toxicidade	simples	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Metais pesados	simples	.	.	.	.	.	.	.	.	.

NOTA: Amostra composta – amostra proveniente da junção de alíquotas das réplicas dos tratamentos (LF = LF1 + LF2). Amostra simples - amostra proveniente de alíquotas de cada réplica dos tratamentos (LF1 e LF2).

Parte dos parâmetros (HPAs, sorção, fungos e bactérias) foi avaliada a partir de uma amostragem composta dos tratamentos, ou seja, da junção de amostras coletadas em cinco pontos aleatórios em cada duplicata dos tratamentos (amostra tratamento = réplica 1 + réplica 2). Isso foi necessário para reduzir o custo e o tempo para execução de alguns procedimentos, bem como para permitir a comparação entre parâmetros diretamente interligados. Os demais parâmetros (C_{org} , O&G, tensão superficial, toxicidade e metais pesados) foram analisados em cada duplicata dos tratamentos (amostra tratamento réplica 1 e amostra tratamento réplica 2), também amostradas em cinco pontos aleatórios (amostras simples). Todos os parâmetros foram analisados em triplicatas.

A amostragem correspondente ao tempo 0, para todos os parâmetros, foi executada imediatamente antes da introdução dos incrementos no solo contaminados com óleo diesel, uma vez que a umidade decorrente desse procedimento (introdução de água deionizada, nutrientes e inóculo) promoveria uma amostragem não segura em função da compactação da matriz. No decorrer do experimento, a amostragem foi efetuada três dias após o umedecimento do solo (50% CC). E, antes da amostragem, o solo foi destorroamento para aumentar a homogeneidade e cada amostra foi obtida a partir de sub-amostras retiradas de cinco pontos dos recipientes.

Problemas de compactação, quando se trabalha com solos de textura mais fina como o presente, são observados na literatura e costumam ter como consequência a dificuldade na aeração e evaporação de água, bem como de amostragem na condução de experimentos. Alternativas, como a utilizada, são necessárias para o melhor andamento dos testes (Gestel *et al.*, 2003; Raimundo & Rizzo, 2004; Rizzo *et al.*, 2003).

Os O&G foram quantificados no Laboratório de Engenharia Ambiental e da Qualidade (LEAQ) do Departamento de Engenharia Química da UFPE e os HPAs foram enviados para o Laboratório de Meio Ambiente do Centro de Tecnologias do Gás (CTGAS/SENAI/RN), onde foram quantificados através do método USEPA 8270 por meio de GC/MS (USEPA, 2004d).

4.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE SORTIVA DO SOLO DURANTE OS TRATAMENTOS DE REMEDIAÇÃO

Para o desenvolvimento dos testes de sorção foi implementado o método de quantificação do naftaleno por meio da Cromatografia Líquida de Alta Resolução (CLAE), no Laboratório de Saneamento Ambiental, da UFPE, como mais uma ferramenta para o monitoramento de ambientes predispostos à contaminação por petroderivados, risco que passou a ser mais significativo, para Pernambuco, com a instalação da refinaria de petróleo.

O teste de sorção teve como objetivo determinar as alterações da capacidade sortiva do solo argiloso contaminado quando submetido a diferentes tratamentos de remediação. O interesse pelo naftaleno se deu em função de sua representativa concentração nos combustíveis petroderivados e

por apresentar, entre os 16 poliaromáticos, alta solubilidade em água, o que facilita a execução dos testes. Os procedimentos necessários e os parâmetros adotados estão apresentados na sequência.

4.3.1 Implantação do método para quantificação do naftaleno por CLAE

O padrão de naftaleno (NAP) utilizado foi de alto grau de pureza (marca Merck), bem como a acetonitrila e o metanol, solventes adotados (marca J.T. Backer, grau HPLC).

Inicialmente, foi preparada uma solução-estoque de naftaleno, a partir da diluição do padrão (composto sólido), em água ultra-purificada com resistividade de 18 mΩ.cm e metanol 0,1%. A concentração utilizada foi de 30 mg.L⁻¹, portanto, próxima a sua solubilidade em água ($S_w = 32 \text{ mg.L}^{-1}$, Tabela 15). A partir dessa solução foram realizadas diluições para obtenção das seis concentrações (pontos) para a construção da curva analítica do composto (NAP) (1,5; 3; 4,5; 9; 15 e 30mg.L⁻¹).

O equipamento utilizado foi o Cromatógrafo Líquido de Alta Resolução (CLAE), da Agilent, série 1100, com coluna analítica do tipo Hypersil ODS C18 Agilent, com 2,0 x 250 mm e partículas de 5 µm.

Tendo como base estudos anteriores, para desenvolvimento da curva do naftaleno alguns parâmetros foram testados: excitação e emissão de 220 nm e 325 nm, respectivamente; fluxo de 0,2 mg.L⁻¹, com ganho 10 e uma relação H₂O / ACN crescente para a ACN de 60 a 100%, durante 7 min (Marcé *et al.*, 2000; Barranco *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2003; Pensado *et al.*, 2004). O volume de injeção testado variou de 5 a 25 µL.

4.3.1.1 Procedimentos de validação

Os parâmetros analíticos utilizados para validação do método de quantificação do naftaleno (NAP), no presente estudo, foram seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão e limite de detecção e de quantificação (INMETRO, 2003; Fonseca *et al.*, 2004, Ribani *et al.*, 2004). A Figura 10 apresenta um resumo dos procedimentos adotados.

- Seletividade

No presente estudo, a seletividade do método para a quantificação do naftaleno (NAP) foi avaliada a partir da comparação visual entre os cromatogramas obtidos da injeção da matriz isenta do composto, ou seja, do solo estudado e isento de contaminação, e da matriz com a adição de uma solução-estoque do composto.

A matriz foi contaminada de modo semelhante ao procedimento que foi usado nos testes de sorção (Seção 4.3.2). Desse modo, 50 mL da solução-estoque de naftaleno, com concentração de 30 mg.L⁻¹, foi acrescentada a um recipiente âmbar (volume 60mL) que continha 1,0000 g de solo isento de contaminação (peso seco).

Aos recipientes com matriz isenta de contaminação somente foi acrescida uma solução aquosa preparada utilizando uma solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,01 M e 200 mg.L^{-1} de azida sódica (NaN_3) em água ultra-purificada e sem a solução-estoque. O CaCl_2 foi usado como fase solvente aquosa para melhorar a centrifugação e minimizar a troca catiônica e a azida sódica foi acrescentada para inibir o crescimento bacteriano (Kleineidam *et al.*, 1999; Rügner *et al.*, 1999; Rahman, 2002).

Os recipientes, com e sem matriz contaminada, foram selados com fita *teflon*, tampa de rosca envolta por *parafilm*® e mantidos sob agitação em mesa agitadora (*shaker*) a 180 rpm, em temperatura controlada, $30 \pm 2^\circ\text{C}$, por 30 min.

Para a quantificação do naftaleno, os recipientes foram centrifugados a 1800 rpm por 15 minutos; uma alíquota de aproximadamente 10 mL do sobrenadante foi retirada, filtrada usando uma seringa acoplada a um filtro de *nylon* com diâmetro de 0,45 μm . A amostra foi extraída, com acetonitrila:sobrenadante (1:1) e determinou-se a concentração do naftaleno da solução por meio da CLAE (Gao *et al.*, 2000, 2006; Liang *et al.*, 2006).

O método foi considerado seletivo caso nenhum interferente eluisse no tempo de retenção do composto de interesse e este estivesse bem separado de quaisquer outros compostos presentes na matriz estudada (Ribani *et al.*, 2004).

- Linearidade e faixa de aplicação

A linearidade do método foi testada a partir da avaliação da correlação obtida entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração do composto. Essa relação é proveniente da injeção das seis concentrações utilizadas para a construção da curva analítica e é representada pela equação da reta e por meio do coeficiente de correlação (R^2). O coeficiente de correlação permitiu uma estimativa da qualidade da curva obtida, uma vez que quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO (2003) um valor acima de 0,90.

Foi testada também a linearidade através da obtenção da faixa de concentração e por meio da avaliação do ajuste linear dos pontos da curva na faixa de trabalho, que no presente estudo variou de 1,5 a 30 mg.L^{-1} de naftaleno. Para tanto, foi plotada, em gráfico, a razão entre a área do pico cromatográfico e a concentração do composto *versus* a concentração deste em escala logarítmica. Uma reta foi então traçada de modo a se obter os pontos da curva distribuídos ao longo desta o mais simétrico possível. Duas outras retas foram desenhadas paralelas à anterior, uma correspondendo a 105% do valor da reta média e outra a 95%. O método foi considerado linear até o ponto onde há interseção com a linha de 95% ou de 105% (Ribani *et al.*, 2004).

- Precisão

A precisão do método foi avaliada por meio da quantificação através de CLAE de três concentrações distintas (3, 9, 30 mg.L⁻¹ de naftaleno), preparadas em triplicata por um mesmo operador e em dias diferentes. A precisão foi expressa com base no desvio padrão relativo (*RSD*) (Equação 3) obtido das áreas (triplicata) de cada concentração testada. O método foi considerado preciso quando o desvio padrão relativo não excedeu 2% ($RSD \leq 2\%$).

- Exatidão

A avaliação da exatidão do método foi realizada também através da injeção em triplicata de três concentrações conhecidas (3, 9 e 30 mg.L⁻¹ de naftaleno). Os resultados obtidos, ou seja, as concentrações alcançadas foram comparadas com os valores aceitos como verdadeiros (concentrações conhecidas).

- Limite de detecção

O método usado para determinação do LD foi o método baseado em parâmetros da curva analítica, ou seja, foi utilizado o desvio do coeficiente angular e o coeficiente angular da reta, ambos obtidos através da curva analítica.

- Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ), por sua vez, indica a menor concentração do composto em exame que pode ser medida (Equação 5). O LQ do método foi obtido inicialmente através dos parâmetros da curva analítica (o desvio do coeficiente angular e o coeficiente angular da reta), e em seguida através da comparação entre esse valor estimado, pela equação supracitada, e a análise dessa concentração por CLAE em triplicata.

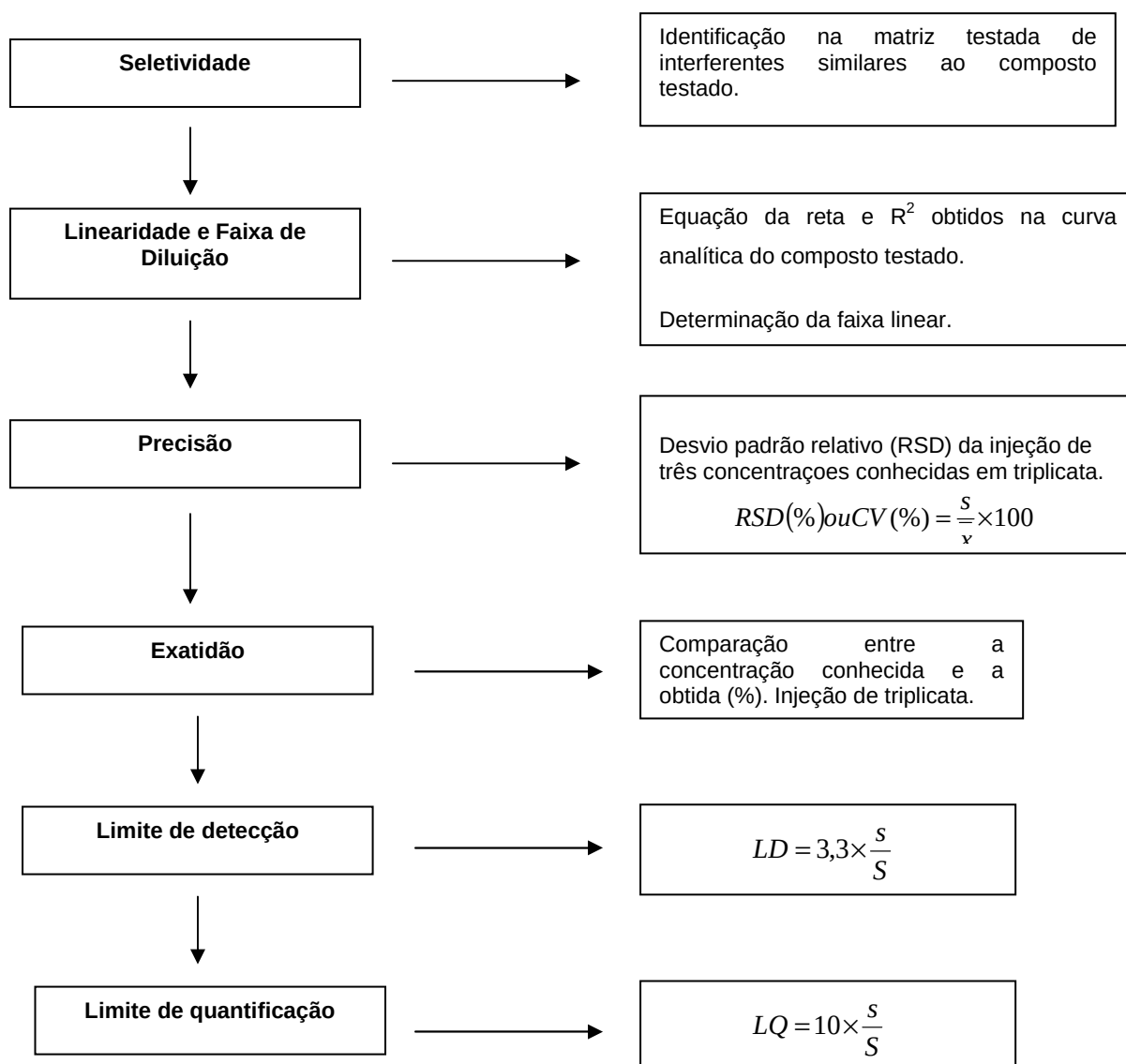


Figura 10. Esquema do procedimento adotado para validação do método de quantificação do naftaleno por CLAE.

4.3.2 Comportamento sortivo do naftaleno durante os tratamentos de remediação

Esse experimento foi realizado no 10º, 45º e 129º dias de incubação do experimento e a capacidade sortiva do solo foi testada com o uso do naftaleno (NAP), composto químico usado para representar os HPAs estudados.

O método de adsorção adotado representa o processo de ligação de uma substância química às superfícies do solo e não distingue entre os diferentes processos de adsorção (física ou química).

A adsorção que ocorre sobre partículas coloidais (diâmetro $< 0,2 \mu\text{m}$) geradas pelo solo também não foi quantificada (OECD TG 106, 2001).

Os objetivos deste experimento foram: determinação do coeficiente de distribuição ou de partição (K_d) através de isotermas de sorção e a comparação dos dados experimentais de K_d com dados da literatura, entre os tratamentos testados e nos diferentes intervalos de tempo avaliados.

4.3.2.1 Reagentes e preparo das soluções

Uma solução aquosa (SA) foi preparada utilizando uma solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,01 M e 200 mg.L^{-1} de azida sódica (NaN_3). O CaCl_2 foi usado como fase solvente aquosa para melhorar a centrifugação e minimizar a troca catiônica; já a azida sódica foi acrescentada para inibir o crescimento bacteriano. As concentrações citadas, segundo os estudos, não costumam causar mudanças significativas na química da matéria orgânica da amostra (Kleineidam *et al.*, 1999; Rügner *et al.*, 1999; Rahman, 2002).

Foi acrescentada à solução supracitada, uma solução-estoque (SE) composta de NAP. Essa solução foi preparada a partir da diluição de solução padrão do composto sólido de grande pureza (Merck), em água ultra-purificada e metanol 0,1%. A concentração inicial de NAP utilizada foi de 30 mg.L^{-1} , portanto, próxima a sua solubilidade em água ($S_w = 32 \text{ mg.L}^{-1}$, Tabela 15). Em seguida, foram utilizadas diluições a partir desta concentração inicial (Rügner *et al.*, 1999; Rahman, 2002).

O metanol foi usado como solvente orgânico uma vez que a substância testada (NAP) é pouco miscível em água (solubilidade $S_w < 10^{-4} \text{ g.L}^{-1}$) e nessa condição um solvente solúvel (acetonitrila ou metanol) deve ser usado. No entanto, sua concentração não excedeu 1% do volume total da solução-estoque e foi menor do que 0,1% na solução que entrou em contato com o solo. Essa concentração tem o propósito de evitar efeitos sobre a sorção (Rügner *et al.*, 1999; Rahman, 2002).

Todos os reagentes empregados no estudo eram de grau analítico e as soluções foram preparadas com água ultra-purificada do sistema Millipore *Milli-Q* com resistividade de 18 $\text{m}\Omega\cdot\text{cm}$. A solução-estoque foi preparada pouco antes da aplicação ou armazenada no escuro a 4°C (Chefetz, 2003).

4.3.2.2 Obtenção das isotermas de sorção

Os experimentos foram realizados em recipientes ou *vials* de vidro âmbar, de 60 mL, foram compostos de três tratamentos, todos em duplicata: (i) Amostra - composta de solo (1 g), solução aquosa e solução-estoque; (ii) Branco - composto por solo, solução aquosa, mas sem solução-estoque, portanto, sem naftaleno, cujo objetivo foi servir como controle do *background* para detectar a presença de interferentes ou solos contaminados; (iii) Referência, composta por solução aquosa, solução-estoque e sem solo, que tinha como propósito verificar a estabilidade da substância-teste na

solução e a adsorção possível no recipiente utilizado no estudo. Caso houvesse adsorção do NAP nas paredes do vidro, a sorção seria corrigida pela diferença.

Nos Brancos, se alguma concentração de NAP fosse detectada, as correções eram aplicadas aos *vials* correspondentes à experiência. Os *vials* da referência e brancos foram tratados da mesma maneira a fim verificar perdas do composto no sistema (Silvers, 2003).

Os ensaios foram realizados em duplicatas para cada um dos três tratamentos estudados (LF, BE, BEBA), além dos tratamentos de Referência e Branco. A Figura 11 ilustra os procedimentos adotados no teste.

O preparo dos recipientes tinha início com a pesagem de 1,0000 g de solo de cada tratamento em balança analítica. Esse era transferido para os recipientes âmbar (Amostra e Branco). Tomou-se o cuidado de quarteir a amostra antes da pesagem, garantindo assim sua representatividade. O solo não foi acrescentado ao recipiente Referência.

A cada uma das amostras foram adicionadas alíquotas da solução-estoque (30 mg.L^{-1}) mais a solução aquosa até alcançar cinco diferentes concentrações de naftaleno: 6, 12, 18, 24 e 30 mg.L^{-1} . Os recipientes foram selados com fita *teflon*, tampa de rosca envolta por *parafilm*® e mantidos sob agitação em mesa agitadora (*shaker*) a 180 rpm, em temperatura controlada, $30 \pm 2^\circ\text{C}$, por 48 h (Salloum *et al.*, 2001).

Para a análise, os recipientes foram centrifugados a 1800 rpm por 15 minutos; uma alíquota de aproximadamente 10 mL do sobrenadante foram retiradas, filtradas usando uma seringa acoplada a um filtro de *nylon* com diâmetro de $0,45 \mu\text{m}$. A amostra foi extraída, com acetonitrila:sobrenadante (1:1) e determinou-se a concentração do naftaleno da solução. O procedimento de extração usado no presente experimento foi o que se mostrou mais adequado dentre uma série de estudos observados na literatura (Gao *et al.*, 2000, 2006; Liang *et al.*, 2006) e também avaliados previamente no presente estudo.

As concentrações de NAP adicionadas (C_0) ao ensaio de sorção e a média da concentração de naftaleno (C_w) após 48 h de agitação foram utilizadas para cálculo da quantidade de NAP sorvida (C_s) no solo e para construção das isotermas de sorção.

As experiências de equilíbrio de sorção foram conduzidas com base nos trabalhos de Kleineidam *et al.* (1999), Rahman (2002), Cardona & Iturbe (2003), Chefetz (2003), Silvers (2003), D'Agostinho & Flues (2006) e OECD TG 106 (2001).

ESQUEMA DO TESTE DE SORÇÃO

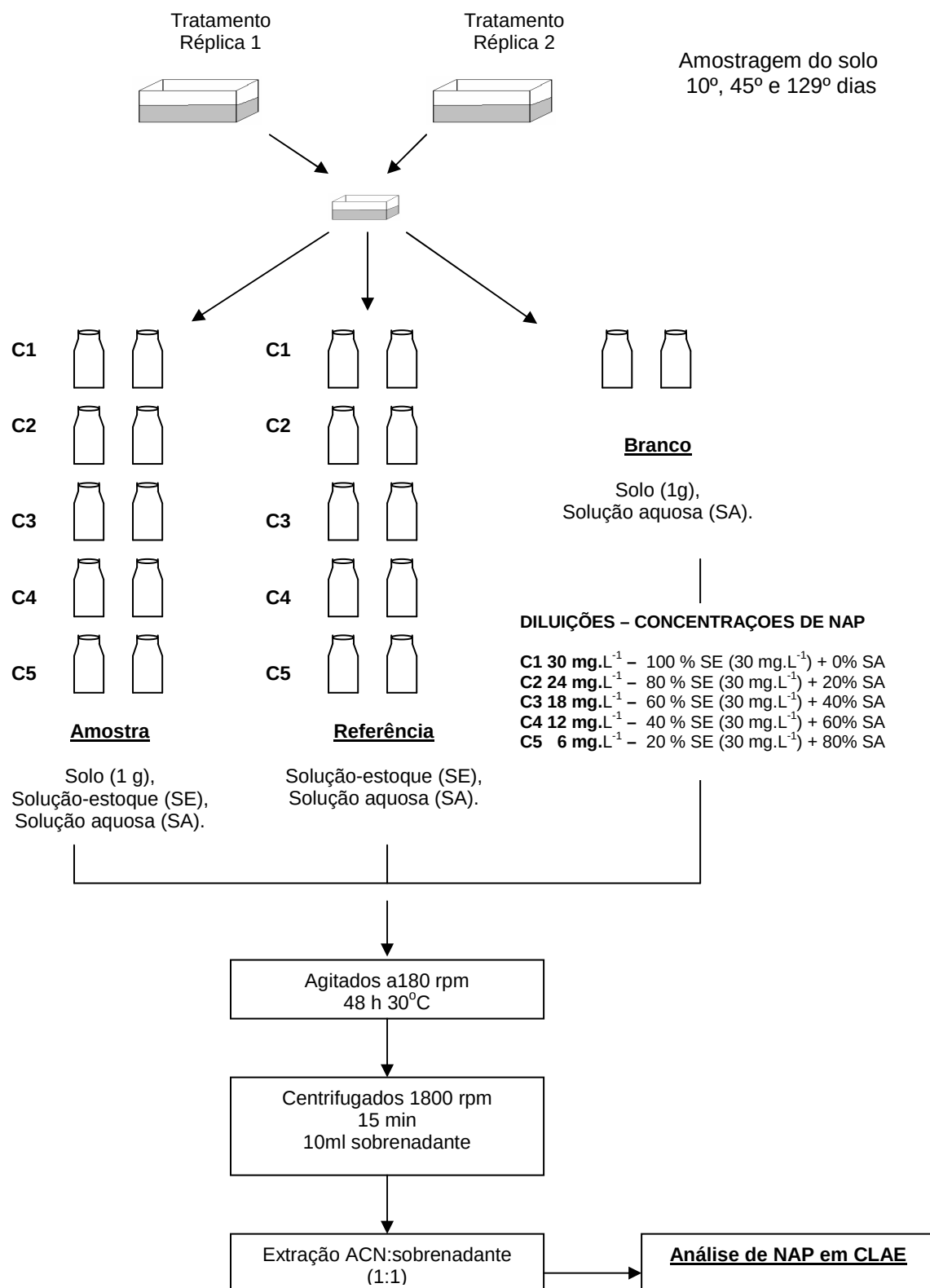


Figura 11. Fluxograma do esquema experimental e procedimento analítico para quantificação da sorção de naftaleno (NAP) em solo.

4.3.3 Estimativa do coeficiente de sorção

A isoterma de sorção foi construída através da relação estabelecida entre a concentração remanescente do composto (C_w) e a concentração do composto retido nas partículas do solo (C_s): $C_s = f(C_w)$. As condições necessárias para que essa relação fosse encontrada foram baseadas em: (i) as várias reações de equilíbrio de retenção/liberação deveriam ser alcançadas e (ii) todos os parâmetros físico-químicos eram constantes (Limousin *et al.*, 2007).

Foi determinada inicialmente a concentração sorvida no solo, C_s , por meio da seguinte equação (Cardona & Iturbe, 2003; Limousin *et al.*, 2007):

$$C_s = \frac{C_{ref} - C_w}{W} V \quad (\text{Equação 13})$$

Onde C_s = Concentração do NAP adsorvido por solo (mg.g^{-1}).

C_{ref} ou C_0 = Concentração inicial de NAP na fase aquosa (mg.L^{-1}).

C_w = Concentração de equilíbrio na fase aquosa (mg.L^{-1}).

V = Volume da solução (L)

W = Peso de solo (g)

O coeficiente de adsorção K foi determinado a partir do ajuste dos dados de sorção por meio das expressões de três tipos de isotermas: linear, de *Freundlich* e de *Langmuir*, apresentadas a seguir. Todas as isotermas foram ajustadas usando o Origin versão 5.0.

- Isoterma Linear $C_s = K_d \times C_w$ (Equação 14)

- Isoterma de *Freundlich* $C_s = K_f \times C_w^N$ (Equação 15)

- Isoterma de *Langmuir* $C_s = \frac{K_L b_L C_w}{1 + b_L C_w}$ (Equação 16)

Onde K_d (L.g^{-1}), K_f (mg.g^{-1}) (L.mg^{-1})^N e N (adimensional) são constantes determinadas experimentalmente, b_L (adimensional) é uma constante relacionada com a energia de adsorção e K_L é a capacidade máxima de adsorção pelo sólido (Ritter, 1998).

4.3.4 Estimativa dos coeficientes K_d e K_{oc}

O carbono orgânico presente no solo apresenta importante influência no processo de sorção e de distribuição de compostos orgânicos no compartimento investigado. Desse modo, o coeficiente de distribuição (K_d) passa a ser normalizado pelo teor de C_{org} , passando geralmente a ser expresso por K_{oc} .

Assim, o K_{oc} é o coeficiente de partição do contaminante na fração orgânica do solo, ou seja, é a partição do contaminante entre solo-água corrigido pela matéria orgânica do solo. No presente trabalho, o K_{oc} foi estimado pela equação (Chiou, 2003):

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}} \quad (\text{Equação 17})$$

Onde: $K_d = (L \cdot g^{-1})$;

K_{oc} = coeficiente de partição normalizado pelo carbono orgânico ($L \cdot g^{-1}$);

f_{oc} = fração de carbono orgânico no solo (g substância orgânica/g solo seco).

Como a M.O. é composta de cerca de 58% de C_{org} (EMBRAPA, 1997), há a possibilidade de calcular a constante K_{oc} através da equação abaixo descrita (Vieira *et al.*, 1999; OECD TG 106, 2001; Allen-King *et al.*, 2002):

$$K_{oc} = \frac{K_d}{\%C_{org}} 100 \quad (\text{Equação 18})$$

O coeficiente de partição octanol-água, K_{ow} , é outro importante coeficiente para a mobilidade do composto no solo. O K_{ow} é definido como a relação da concentração em equilíbrio de um contaminante orgânico na fase octanol em relação à concentração do contaminante na fase aquosa (D'Agostinho & Flues, 2006).

O valor de K_{ow} pode ser usado para estimar o comportamento de compostos orgânicos hidrofóbicos que não interagem eletricamente com a superfície do solo, é uma medida que define a hidrofobicidade de um composto orgânico. Quanto maior o valor desse coeficiente, maior a tendência do contaminante ser dissolvido em líquidos orgânicos do que em água (Gustafson *et al.*, 1997). O K_{ow} também é um coeficiente muito útil para previsão de outros parâmetros como K_{oc} , quando este não se encontra disponível na literatura.

Pode-se obter o índice K_{ow} , dividindo-se a sua concentração na fase octanol (mg.L^{-1}) por sua concentração na fase aquosa (mg.L^{-1}). Ou, como o K_{oc} (L.kg^{-1}) está fortemente correlacionado com K_{ow} (adimensional), pode ser expresso através da relação linear expressa pela equação:

$$\text{Log } K_{oc} = a \log K_{ow} + b \quad (\text{Equação 19})$$

Onde a e b são duas constantes, relacionada com os compostos e tipo de matéria orgânica sobre o solo.

O coeficiente de distribuição, K_d , foi estimado não experimentalmente por meio dos valores de K_{oc} citados para naftaleno em solo do *Soil Organic Carbon (Koc) / Water (Kow) Partition Coefficients* (USEPA, 2004a).

4.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO SOLO DURANTE OS TRATAMENTOS DE REMEDIAÇÃO

Durante o procedimento de remediação foram realizados testes que avaliaram o nível de toxicidade em diferentes intervalos dos tratamentos (3º, 45º e 129º dias de incubação). Esses testes foram realizados com o copépodo harpacticóide *Tisbe biminiensis*, escolhido em função da facilidade de acesso, pois esse organismo vem sendo cultivado desde 1998 no Laboratório de Cultivo e Ecotoxicologia (LACE) do Departamento de Oceanografia da UFPE, e por ser uma espécie bentônica tropical que vem sendo testada com resultados satisfatórios em áreas contaminadas por petroderivados em Pernambuco.

Ressalta-se, no entanto, que como esta é uma espécie essencialmente marinha, foram realizados experimentos-piloto para confirmar que uma matriz não marinha não interferiria em nenhum aspecto do ciclo de vida do *Tisbe biminiensis*. Para isto, dois tratamentos foram utilizados, um com sedimento controle, este proveniente do estuário do Rio Maracáipe, e o outro com o solo do presente estudo antes da contaminação com óleo diesel, cada um contendo 5 réplicas, seguindo a metodologia descrita na seqüência.

4.4.1 Procedimentos para execução do teste de toxicidade do solo

Copépodos harpacticóide *Tisbe biminiensis* são mantidos em recipientes de polietileno com água do mar filtrada, salinidade de $34 \pm 2\%$, temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12/12h claro/escuro e alimentados com microalgas (*Thalassiosira fluviatilis*) e ração para peixes de aquário.

A metodologia empregada para avaliação da toxicidade do solo foi de acordo com Araújo-Castro *et al.* (2006a), com algumas modificações, uma vez que o solo apresentava-se seco e desagregado no momento do bioensaio. Desta forma, cerca de 2 g de solo seco foram adicionados em cada recipiente e adicionado 20 ml de suspensão de diatomácea (*Thalassiosira fluviatilis*) a uma concentração de $0,2 \mu\text{g Chl-a.mL}^{-1}$ (clorofila a). O sedimento controle foi coletado nos primeiros 5 cm de profundidade do estuário do Rio Maracáipe, evitando assim a parte do sedimento não oxigenada.

No laboratório, o sedimento controle foi peneirado por malha de 0,063 mm, para reduzir a interferência da fração arenosa e aproximar da textura do solo estudado, e foram distribuídos nos recipientes controles, recebendo o mesmo tratamento do solo em teste. Os recipientes permaneceram em estufa incubadora a 25°C e fotoperíodo de 12/12 claro/escuro por um período de 24 h antes da adição de 10 fêmeas ovadas. A idade das fêmeas utilizadas nos testes foi controlada (± 11 dias), uma vez que a produção de descendentes tende a cair com o envelhecimento da fêmea (Pinto *et al.*, 2001).

A duração do teste foi de 7 dias, com adição de substrato a cada 2 dias para que não ocorresse falta de alimento durante o experimento. No final do experimento, todo o conteúdo dos recipientes foram fixados com formol a 4% e corados com Rosa de Bengala para determinação dos efeitos letal (mortalidade das fêmeas adultas não coradas ou desaparecidas) e sub-letal (produção de náuplios, copepoditos e a fecundidade total).

A confirmação da não interferência do solo em nenhum aspecto do ciclo de vida do copépodo tomou como base os seguintes critérios da ISO 14669 (1999): (i) concentração de oxigênio dissolvido no final do teste deveria ser igual ou maior que 4 mg/L; (ii) porcentagem de mortalidade no controle deve ser menor ou igual que 10%; (iii) toxicidade da referência deve estar dentro da faixa específica para a espécie em estudo. Outros parâmetros também foram avaliados do solo em relação ao controle, como salinidade e pH, bem como testadas a sua interferência nos níveis de sobrevivência através de testes de correlação.

Obedecidos a esses critérios, os testes toxicológicos com solo contaminado foram realizados no 3º, 73º e 129º dia com solo proveniente dos tratamentos LF, BE, BEBA e um controle (sedimento de Maracáipe-PE), cada um contendo 5 réplicas. A escolha por esses intervalos de tempo se deu por representarem aproximadamente o início, meio e fim do período total de experimentação (129 dias).

Os efeitos observados foram sobrevivência (efeito letal), número de náuplios e copepoditos, ao final dos 7 dias de experimento, e também a fecundidade (náuplios + copepoditos), estes últimos como efeitos sub-letais.

4.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS EXPERIMENTAIS

A avaliação estatística dos dados foi feita por Análise de Variância (ANOVA) e através do teste de *Tukey*, ambos adotando que os resultados se mostravam significativamente diferentes quando $p < 0,05$ (nível de significância de 95%).

Quando os dados não obedeciam aos pré-requisitos necessários para a análise de variância, o teste não-paramétrico *Kuskall Wallis* foi utilizado.

CAPÍTULO 5.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados e discussões, da presente pesquisa, estão apresentados inicialmente a partir de uma caracterização físico-química e microbiológica do solo antes da contaminação com óleo diesel e as alterações decorrentes dessa contaminação, bem como, a definição dos procedimentos necessários para o desenvolvimento dos tratamentos de remediação propostos (CT, BE e BEBA).

Na sequência, a eficiência dos tratamentos é avaliada através dos níveis de remoção de O&G e de HPAs provenientes da contaminação. A capacidade sortiva do solo, nos diferentes tratamentos, também é investigada em distintos momentos da incubação, além dos níveis de toxicidade letal e sub-letal alcançados.

5.1 CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DO SOLO E QUÍMICA DO ÓLEO DIESEL

5.1.1 Caracterização físico-química do solo

A Tabela 19 apresenta as principais características pedológicas e outros parâmetros descritivos da área na qual o solo utilizado na presente pesquisa foi coletado. Uma descrição mais ampla está apresentada no Anexo 1.

Tabela 19. Descrição pedológica e características gerais do solo estudado.

PARÂMETROS LEVANTADOS	CARACTERÍSTICAS
Classificação	PODZÓLICO VERMELHO-AMARELO Tb (ARGISSOLO) Álico a moderado Textura argilosa Fase floresta tropical subperenifólia Relevo forte ondulado.
Localização, município, estado	Usina N. Sra. Auxiliadora. Margem direita da BR 232 (no sentido Recife/Caruaru) a altura do Km 22. Município de Moreno (PE).
Situação, declive e cobertura vegetal sobre o perfil	Trincheira situada em terço médio de encosta com 20% de declividade, sob vegetação florestal.
Litologia e idade	Gnaisses e migmatitos. Pré-cambriano.
Material originário	Saprólito das rochas supracitadas.
Pedregosidade	Não pedregoso.
Rochosidade	Não rochoso.
Relevo local	Forte ondulado.
Relevo regional	Forte ondulado, formado por elevações com declives de 20-25% , vertentes convexas e vales em V e de fundo chato.
Erosão	Não aparente.
Drenagem	Moderadamente drenado.
Vegetação primária	Floresta tropical subperenifólia.
Uso atual	Floresta tropical subperenifólia raleada pela retirada de algumas espécies.
Clima	As' da classificação de Koppen – Clima Tropical (chuvas no inverno). 3dTh da classificação de Gauseen – Mediterrâneo quente ou Mediterrâneo sub-seco, sub-região termoxerocmênica, caracterizando-se por apresentar estação seca, curta de 1 a 3 meses. Índice xerotérmico variando entre 0 e 40.
Coletado	Junho/2005

O solo estudado foi descrito como um solo Podzólico Vermelho-Amarelo Tb (Argissolo). Este tipo de solo ocorre em relevo predominantemente plano ou suavemente ondulado e morfologicamente apresenta cor amarelada homogênea em profundidade, podendo apresentar textura média ou argilosa ou muito argilosa (Prado, 1995).

Tende a ser profundo, poroso ou muito poroso e se for eutrófico, há condições adequadas para um bom desenvolvimento radicular em profundidade. Quando álico, ou distrófico, ou ácrico, apresenta limitações de ordem química em profundidade, que restringem o desenvolvimento do sistema radicular. Em geral apresenta baixa quantidade de água disponível. Em condições naturais os teores de fósforo (P) são baixos. Outra limitação refere-se à compactação não só se a textura for argilosa ou muito argilosa, mas também se a textura for média, especialmente se o teor de areia fina for alto (Prado, 1995).

A Tabela 20 apresenta as características físicas do solo estudado. A proporção granulométrica apresentada foi de 38% de areia, 17% de silte e 45% de argila, desse modo, sendo caracterizado como de textura ou granulometria argilosa ($35\% < \text{Argila} < 60\%$) (Tabelas 6 e 20). Essa textura tem aspectos relevantes que interferem nas atividades química e microbiológica do solo, como discutido abaixo.

Tabela 20. Caracterização física do solo estudado antes e após a contaminação com óleo diesel.

PARÂMETROS		SOLO <i>IN NATURA</i>
Densidade (g.cm^{-3})	Global	1,21
	Partícula	2,56
Granulometria (%)	Areia	38,2
	Silte	17,0
	Argila	44,8
Porosidade total (%)		52,73
Relação silte/argila	-	0,38
Textura do solo	-	Solo Argiloso
Capacidade de campo (CC)	(%)	28,48 (32,84%)*
Condutividade hidráulica	(cm.s^{-1})	$2,0 \times 10^{-3}$

NOTA: (*) - parâmetro avaliado após a contaminação do solo com óleo diesel.

O solo argiloso, objeto do presente estudo, de maneira geral, tem partículas que se diferenciam da areia e silte não apenas pelo tamanho, mas por serem formadas a partir do intemperismo químico das rochas ou do próprio solo e da recombinação de seus íons. Desse modo, a fração argilosa tende a ter uma alta atividade química, sendo capaz de reter água em sua superfície, além de certos nutrientes (Semple *et al.*, 2001) e contaminantes. Entretanto, o comportamento do solo é muito complexo e dependente da composição mineralógica e orgânica de sua matriz.

A análise da amostra de solo por difratograma de Raios-X (DRX) permitem a identificação dos minerais presentes e também, até certo ponto, avalia sua proporção. O resultado da difração originam diagramas que diferem de mineral para mineral, dependendo das características e do espaçamento basal entre as camadas dos argilominerais e de outros minerais de um modo geral. A análise por DRX do solo estudado identificou a caulinita como o argilomineral característico (Anexo 2), mineral

bastante representativo dos argissolos (EMBRAPA, 1999).

Como observado na Tabela 4, de maneira geral, um solo argiloso com predomínio de caulinita, apresenta baixa capacidade de reter nutrientes, água, etc., sugerindo uma reduzida capacidade sortiva desse solo. Isso decorre especialmente de sua baixa capacidade de troca catiônica (CTC). A caulinita apresenta a menor capacidade de troca dentre os argilominerais (3-15 $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$), em função do seu arranjo estrutural (Si:Al, 1:1).

A capacidade de campo (CC), parâmetro que corresponde à quantidade máxima de água que um solo pode reter em condições normais ou o limite máximo de disponibilidade de água presente no solo para as plantas e microrganismos, foi de 28,5% para o solo antes da contaminação, e de 32,8%, após a contaminação (Tabela 20). De acordo com Trindade (2002), para crescimento favorável da microbiota, a umidade do solo deve estar em torno dos 50% de sua CC e, baseado nos dados experimentais obtidos, durante os tratamentos de remediação tal correção foi efetuada a fim de manter essa proporção (seção 4.2.1).

A Tabela 21 traz a caracterização química do solo estudado.

Tabela 21. Caracterização química do solo estudado antes e após a contaminação com óleo diesel.

PARÂMETROS		SOLO <i>IN NATURA</i>	SOLO PÓS-CONTAMINAÇÃO COM ÓLEO DIESEL
Complexo Sortivo ($\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$)	Ca^{2+}	0,03	0,03
	Mg^{2+}	0,22	0,23
	Na^+	0,06	0,05
	K^+	0,15	0,14
	Al^{3+}	0,90	0,90
	H + Al	2,21	1,88
	SB	0,45	0,45
	CTC	1,36	1,35
pH	(H_2O)	4,4	4,4
Nutrientes ($\text{g}.\text{kg}^{-1}$)	C_{org}	9,77	48,0
	M.O.	16,85	82,8
	N	0,13	0,18
Nutrientes ($\text{mg}.\text{kg}^{-1}$)	P	0,51	0,51

NOTA: SB – soma das bases; CTC – capacidade de troca catiônica.

De acordo com os resultados observados (Tabela 21), a CTC do solo estudado apresentou muito baixa atividade (EMBRAPA, 1999). O valor da CTC efetiva foi de 1,35 $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$, portanto, mais baixa do que o esperado para solos argilosos que estaria entre 3 e 15 $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ (Tabela 6). Esse resultado reflete que, sob condições naturais ácidas, o solo estudado apresenta baixa capacidade de reter cátions. A equação 20 descreve o cálculo efetuado para obtenção da CTC efetiva antes e após a contaminação com óleo diesel (pH 4,4).

$$\begin{aligned}
 \text{CTC efetiva} &= \text{SB} + \text{Al} \\
 &= (\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+} + \text{Na}^{+} + \text{K}^{+}) + \text{Al}^{3+} \quad (\text{Equação 20}) \\
 &= 1,36 \text{ cmolc.dm}^{-3} \text{ (solo } in \text{ natura)} \\
 &= 1,35 \text{ cmolc.dm}^{-3} \text{ (solo com diesel)}
 \end{aligned}$$

A baixa atividade do argissolo estudado é novamente confirmada pelo valor da CTC alcançada em pH 7,0. Esta atingiu apenas 2,66 cmol_c.dm⁻³, apesar de em termos relativos, isto representar um aumento de 50,8%. Isso significa que mesmo corrigindo o solo ao pH ideal, a CTC ainda é baixa e poucos sítios estariam em abertos para efetuar trocas. Esses resultados estão apresentados na Equação 21.

$$\begin{aligned}
 \text{CTC a pH 7,0} &= \text{SB} + (\text{H} + \text{Al}) \quad (\text{Equação 21}) \\
 &= 0,45 + 1,88 \\
 &= 2,66 \text{ cmolc.dm}^{-3} \text{ (solo } in \text{ natura)} \\
 &= 2,33 \text{ cmolc.dm}^{-3} \text{ (solo com diesel)}
 \end{aligned}$$

Essa característica decorre do grau de intemperismo que é comum nos solos das regiões tropicais brasileiras, inclusive do estado de Pernambuco. Altas concentrações de argilas de baixa atividade nos solos, como a caulinita, resultam em CTC semelhante à de solos arenosos. A baixa CTC efetiva marca o potencial de perdas por lixiviação de nutrientes, sob condições naturais, dificultando o desenvolvimento da microbiota nativa e reduzindo também a capacidade selante do solo. Solos com CTC de 1 a 5 cmol_c.dm⁻³ tendem a apresentar um baixo teor de nitrogênio (N) e de fósforo (P) (Lopes & Guilherme, 1992).

Os valores dos nutrientes, para o solo em estudo, estiveram de acordo com o esperado, ou seja, com baixos níveis de N e P (Tabela 21). A relação de carbono, nitrogênio e fósforo, C:N:P, apresentou-se em torno de 100:1,3:0,005, bem abaixo da relação adequada para o desenvolvimento da microbiota nativa (100:10:1) (USEPA, 1996b). Com a introdução do óleo diesel, ou seja, uma nova fonte de carbono, a proporção alterou-se para 100:0,4:0,001. Desse modo, para o tratamento do solo contaminado com óleo diesel, por meio da ação catabólica dos microrganismos, houve a necessidade do acréscimo desses nutrientes no solo.

O percentual de C_{org} do solo, antes e após a contaminação, foi de 0,98% e 4,8%, respectivamente (Tabela 21). Esse percentual está em consonância com o encontrado na literatura, uma vez que representa 58% da M.O. presente, ou seja, próximo aos 60% esperado (EMBRAPA, 1999; Hillel, 1980 *apud* Gustafson *et al.*, 1997). Ressalta-se, no entanto, que o percentual de M.O., que tem alto poder adsorvente, aumentou consideravelmente seu teor após a contaminação do solo

com óleo diesel, o que pode modificar de maneira significativa a relação do solo com os contaminantes, especialmente àqueles orgânicos hidrofóbicos, como no caso dos HPAs, melhor discutidos na seção 5.2.2.3.

O pH do solo estudado se mostrou ácido (4,4), como o esperado para um argissolo, o que pode restringir o aumento no número de microrganismos, especialmente, bactérias, durante a execução dos tratamentos de biorremediação propostos. Esse parâmetro exigiu a correção do solo em estudo, com pH próximo à neutralidade.

As propriedades físicas do solo que mais influenciam no comportamento dos combustíveis líquidos, quando presentes, são: a porosidade, a condutividade hidráulica e a heterogeneidade da própria matriz. A porosidade e a condutividade hidráulica podem variar dentro do mesmo solo e, em grande escala, essas diferenças podem influenciar no transporte multifásico de hidrocarbonetos (Guiguer, 2000).

A porosidade de um solo é a relação entre o volume de espaços vazios e o seu volume total. No solo em estudo, a porosidade encontrada foi de 52,7%, portanto, esperada para solos argilosos (Tabelas 20 e 22) (Guiguer, 2000). No entanto, apesar de apresentarem uma porosidade total grande, é de se esperar que solos argilosos e alguns solos orgânicos geralmente apresentem vazios intergranulares menores e, portanto, porosidades efetivas menores quando comparados a solos com maior granulometria. Essa característica pode ser avaliada através da condutividade hidráulica do solo.

Tabela 22. Variação da porosidade de acordo com o tipo de solo.

TIPOS DE SOLOS	VARIAÇÃO DA POROSIDADE
Areia ou cascalho	25 a 40%
Areia e cascalho misturados	25 a 35%
Argila	33 a 60%

FONTE: Guiguer (2000).

A condutividade hidráulica é uma medida da habilidade do solo em transportar fluido (permeabilidade), mas depende especialmente das propriedades do fluido em consideração. É também um parâmetro influenciado pelas características do meio poroso. No caso dos solos ricos na fração argila, estas tendem a apresentar baixa condutividade, uma vez que apresentam pouca facilidade de permeação para líquidos ou vapores (Guiguer, 2000; Borges, 2001).

A porosidade e a permeabilidade explicam por que a fração argila é utilizada tanto como selante natural para contenção de fluido em casos de derrame, como na proteção de tanques subterrâneos em postos de combustíveis ou em aterros de refinarias. No entanto, também é por esse

mesmo motivo, dificuldade na mobilidade de líquidos e de nutrientes, que pode haver certa restrição no crescimento da microbiota. E, ainda vale ressaltar, que a maior ou menor eficiência na capacidade selante do solo depende das proporções entre os argilominerais presentes.

A condutividade hidráulica, para o solo estudado (Tabela 20), por exemplo, apresentou-se relativamente alta ($2,0 \times 10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$) similar ao esperado para areia siltosa ou fina. A explicação para esse resultado está atrelada a alguns parâmetros químicos como baixos índices de CTC e em função do tipo de argilomineral presente. Como citado, a caulinita apresenta os menores níveis de CTC e, conseqüentemente, capacidade de reter compostos.

Foi realizada também a avaliação dos níveis de óleos e graxas (O&G) no solo dito *in natura*, ou seja, antes da contaminação com óleo diesel, como um dos indicativos da presença de petroderivados. O resultado apresentado se mostrou dentro do esperado, $10,6 \text{ g.kg}^{-1}$ ou 1,06% de O&G (Tabela 23), em função das altas concentrações de C_{org} (0,98%) e M.O. (1,69%) encontrados no solo mesmo antes da contaminação com o petroderivado (Tabela 21). Assim, a concentração de O&G encontrada no solo *in natura* provavelmente se refere à composição orgânica natural do solo em estudo. Após a contaminação, por sua vez, o nível de O&G tornou-se quatro vezes maior ($40,7 \text{ g.kg}^{-1}$ ou 4,07% de O&G).

Tabela 23. Quantificação dos óleos e graxas no solo antes e pós-contaminação com óleo diesel.

PARÂMETRO	SOLO <i>IN NATURA</i> (g óleo / g solo)	SOLO PÓS-CONTAMINAÇÃO (g óleo / g solo)
Óleos e graxas	$10,6 \text{ g.kg}^{-1}$ (1,06%)	$40,7 \text{ g.kg}^{-1}$ (4,07%)

Observa-se, portanto, que o solo estudado é um argissolo, tendo a caulinita como argilomineral característico. Os baixos valores de CTC observados indicam uma baixa atividade e, possivelmente, uma pequena capacidade de reter nutrientes. Esses resultados podem sugerir também uma alta disponibilidade do contaminante para a degradação, uma vez que, a capacidade de sorção do solo em condições naturais é baixa. No entanto, deve ser considerado que uma série de fatores está relacionada dentro do processo degradativo, sendo eles, a natureza do solo, o tipo de contaminante presente, a microbiota, os intermediários produzidos, e as alterações resultantes na própria matriz.

5.1.2 Caracterização química do óleo diesel

Outro dado significativo quando se trata de biorremediação é o tipo de contaminante presente, incluindo suas características físico-químicas e ecológicas.

O óleo diesel do presente estudo foi do tipo B. Esse tipo de óleo diesel, em sua composição, tem como características básicas hidrocarbonetos parafínicos, naftênicos, aromáticos (10 – 40%, v/v) e um teor de enxofre de no máximo 0,5% (p/p). Os compostos nitrogenados e oxigenados são considerados impurezas e há também a presença de aditivos (PETROBRAS, 2003). A caracterização físico-química do óleo diesel estudado está apresentada na Tabela 24.

Tabela 24. Caracterização físico-química do óleo diesel.

PARÂMETRO	MÉTODO	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADO
Estado físico	VIS 000	PASS	PASS – límpido e isento de impurezas
Cor	NBR - 14483/ D 1500	3,0 max.	L 3,0
Densidade	NBR - 7974	0,82 a 0,88	0,84 g.cm ⁻³
Massa específica a 20°C	D 1298	820,0 a 865,0	840,2 kg.m ⁻³
Viscosidade cinemática a 40°C	NBR – 10441/ D 445	2,500 a 5,500	3,700 cSt
Teor de enxofre	D 4294	0,20 max.	0,130 % massa
Ponto de fulgor	NBR – 7974/ D 93	38,0 min.	56,5°C

FONTE: TRANSPETRO/Laboratório Suape.

5.1.3 Níveis de metais pesados no solo

Os metais pesados representam um grupo de poluentes de grande importância ecológica e ambiental, visto que podem influenciar a comunidade microbiana, reduzindo a abundância e a diversidade das populações na comunidade, e conseqüentemente, interferindo nos processos microbiológicos do solo.

No presente estudo, foi realizada uma varredura dos metais presentes no solo, tanto naquele em condições naturais (*background*), quanto naquele após contaminação com óleo diesel. O objetivo foi avaliar os níveis dos metais pesados no solo, com e sem contaminação, e os riscos para os microrganismos e, conseqüentemente, para o sucesso dos biotratamentos. Os dados estão apresentados na Tabela 25 e, como não representa o objetivo principal da presente pesquisa, estão discutidos brevemente aqueles que apresentaram aumento expressivo em seus teores no solo estudado após a contaminação com óleo diesel.

Tabela 25. Concentração de metais (mg.kg^{-1} de solo) no solo antes e após a contaminação por óleo diesel.

METAIS	SOLO NÃO CONTAMINADO COM ÓLEO DIESEL	SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO DIESEL
Ba	4,2	6,9
Cr	16	18
Cu	6,5	6,6
Mo	< 1	1,6
Ni	1,1	2,4
Pb	20	297
Sb	< 5	6,7
V	31	29
Zn	6,8	8,2
Zr	3,7	3,7
Ag	< 1	< 1
B	< 10	< 10
Be	< 1	< 1
Bi	< 10	< 10
Cd	< 1	< 1
Co	< 3	< 3
La	< 10	< 10
Li	< 1	< 1
Sc	< 3	< 3
Sn	< 10	< 10
Sr	< 1	< 1
W	< 10	< 10
Y	< 1	< 1

Para avaliação dos níveis originais esperados dos metais no solo *in natura* (*background*), foi utilizado um sistema de cálculo dos valores de referência indicado pela CETESB (2001). Nesse sistema, os teores naturais de metais é uma função do percentual da fração argila e da M.O. do solo. A Tabela 26 apresenta as equações para cada metal e os respectivos valores de referência estimados.

Tabela 26. Cálculo dos teores naturais de metais em função das porcentagens de fração argila (L) e de matéria orgânica (H) no solo e os valores de referência obtidos (L=44,8% e H =1,68%).

ELEMENTO QUÍMICO	EQUAÇÃO	VALOR DE REFERÊNCIA ESTIMADOS (mg.kg^{-1})
Cádmio	$[0,4+0,007(L+3H)]$	0,7
Cromo	$[50+2L]$	139,6
Cobre	$[15+0,6(L+H)]$	42,9
Chumbo	$[50+L+H]$	96,5
Zinco	$[50+1,5(2L+H)]$	186,9

FONTE: CETESB (2001)

De acordo com o sistema da CETESB (2001), no solo antes da contaminação por óleo diesel, os metais analisados se mostraram abaixo do valor de referência, portanto, dentro do nível de referência atual esperado (Tabela 26).

Com a introdução do óleo diesel no solo, houve aumento nos níveis do Ba, Cr, Mo, Ni, Pb, Sb e Zn, com aumento realmente expressivo apenas para o Pb de 20 para 297 mg.kg⁻¹, 15 vezes maior do que no solo livre de contaminação. A Figura 12 ilustra as concentrações dos metais analisados, no presente estudo, antes e após a contaminação com óleo diesel.

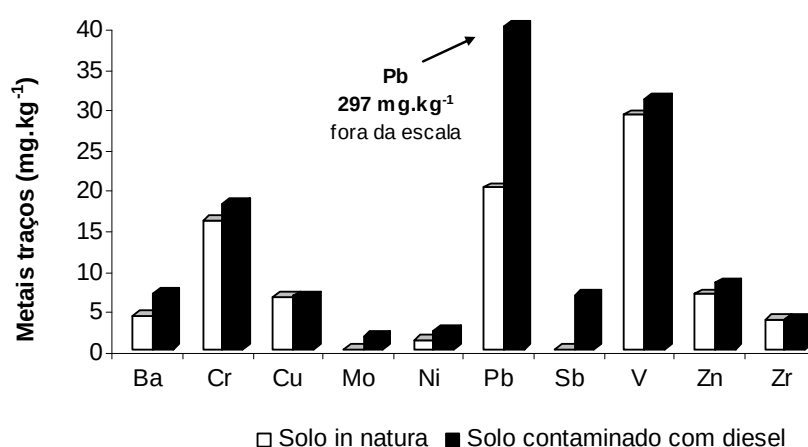


Figura 12. Concentração em mg.kg⁻¹ de alguns metais traços antes e após a contaminação com óleo diesel.

A contaminação por petroderivados, teoricamente, não deveria causar aumento nos níveis metálicos da matriz, uma vez que, após a destilação do petróleo, os metais devem ter sua concentração reduzida ou anulada. No entanto, a presença de aditivos nos combustíveis tende a introduzir alguns metais, geralmente estando presentes o Pb, Ba, Ca, além de possíveis resquícios do óleo original (Dias, 2005). Desse modo, a presença de Pb, no solo estudado, provavelmente, é decorrente da contaminação por óleo diesel.

O Pb é considerado dentre os metais o menos móvel. Normalmente, seus teores são provenientes da rocha de origem ou, como citado, no caso de contaminação por petroderivados. Além disso, o tipo de solo também pode interferir em sua concentração. Altas concentrações de M.O. presentes podem lhe servir como importante sorvente na matriz contaminada e com a elevação do pH pode causar a precipitação e a formação de complexos orgânicos, aumentando então sua retenção (Picarelli, 2003).

Riis *et al.* (2002) observaram que a presença de Pb em concentrações também significativas (235 mg.L^{-1}) em solo argiloso contaminado por óleo diesel, não impediram a degradação do óleo na matriz estudada pela microbiota autóctone. A ordem de toxicidade para a microbiota encontrada por esses autores foi de $\text{Hg} > \text{Cr (IV)} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Ni} > \text{Pb} > \text{Zn}$, portanto, o Pb representando os mais baixos riscos tóxicos.

Pesquisas sugerem que o baixo efeito tóxico desses metais pode estar atrelado à redução de sua biodisponibilidade associada à fração orgânica do solo. A adição de incrementos necessários para o processo de biorremediação (nutrientes, correção do pH, etc.), observada em alguns estudos, promoveu uma redução significativa da disponibilidade de alguns metais pesados uma vez que esses procedimentos tenderam a aumentar a ligação com a matriz do solo, por adsorção ou troca catiônica, ou mesmo em função da complexação destes compostos (Eriksson *et al.*, 2002; Riis *et al.*, 2002).

Smreczak *et al.* (1999) também encontraram efeitos inexpressivos na degradação de HPAs depois do acréscimo no solo de altas concentrações de Zn (1000 mg.kg^{-1}), Pb (500 mg.kg^{-1}) e Cd (3 mg.kg^{-1}). Segundo esses autores, os níveis de degradação dos poliaromáticos caíram de 88% para apenas 77% depois de 60 dias da introdução dos metais, sugerindo o efeito reduzido dos metais para os microrganismos degradadores de HPAs.

Desse modo, de acordo com os resultados obtidos, os níveis de metais encontrados no solo, após a contaminação com óleo diesel, não indicam comprometimento da atuação dos microrganismos e, conseqüentemente, dos processos de biorremediação propostos.

5.1.4 Caracterização microbiológica do solo

Os microrganismos que existem nos solos incluem todos os 5 maiores grupos: bactérias, fungos, algas e protozoários, sendo as bactérias o grupo mais dominante. As concentrações desses grupos dependem do tipo de solo, do seu teor de umidade e da concentração de matéria orgânica (Zytner, 2002).

Análises iniciais do solo sobre a quantidade de microrganismos heterotróficos totais e degradadores de HCs podem dar informações importantes da atividade do solo e da extensão em que os microrganismos autóctones têm sido aclimatados nas condições locais. Os resultados podem indicar se o solo contém uma população saudável capaz de dar suporte à biorremediação e, o monitoramento, durante a biorremediação do solo, é uma importante ferramenta para sugerir mudanças e discernir a atividade microbiana na degradação dos HCs. Uma forte correlação entre as quantidades de microrganismos e a degradação de compostos orgânicos tem sido relatada (Song & Bartha, 1990).

Ensaio preliminares foram realizados para investigação da abundância das bactérias e dos fungos presentes no solo estudado. Os resultados estão descritos na Tabela 27. Esses ensaios foram realizados no solo *in natura*, ou seja, antes da contaminação com o óleo diesel.

Tabela 27. Quantificação dos microrganismos heterotróficos totais (UFC.g⁻¹ de solo) do solo argiloso em estudo.

DILUIÇÕES	BACTÉRIAS	FUNGOS
10 ⁵	1,3 x 10 ⁶	2,0 x 10 ³
10 ⁴	2,1 x 10 ⁵	1,4 x 10 ³
10 ³	2,0 x 10 ³	3,3 x 10 ³
10 ²	3,4 x 10 ⁵	9,3 x 10 ²

NOTA: UFC – Unidades Formadoras de Colônias

Em ecossistemas naturais, a diversidade e o número de microrganismos apresentam oscilações que podem ser decorrentes de alterações ambientais e mesmo em função do método de contagem adotado (Cardoso, 1992).

Em solos argilosos e livres de contaminação no Brasil, o número de bactérias encontradas variam de 10⁶ a 10⁷ UFC.g⁻¹ de solo (Borges, 2001). No caso de heterotróficos totais, para o mesmo tipo de solo, pode alcançar cerca de 10⁵ UFC.g⁻¹ de solo (Trindade, 2002). No solo em estudo, utilizando-se o mesmo procedimento de quantificação adotado para os dados supracitados, foram encontrados para bactérias 10⁶ UFC.g⁻¹ de solo e para fungos, 10³ UFC.g⁻¹ de solo (Tabela 27). Desse modo, de maneira geral, o solo da presente pesquisa, apresentou-se bem povoado tanto por bactérias quanto por fungos.

Em uma segunda etapa, do presente estudo, foi promovida a contaminação do solo estudado com diesel por 30 dias, tendo como o propósito a adaptação da microbiota autóctone e a seleção da microbiota hidrocarbonoclásticas, ou seja, apta a degradar hidrocarbonetos (Santo, 2002). Nesse estágio, buscou-se identificar as bactérias e os fungos encontrados no solo sob o efeito da contaminação com óleo diesel, com o intuito de avaliar o potencial de biodegradação do solo. As espécies encontradas de bactérias e fungos presentes estão listadas nas Tabelas 28 e 29, respectivamente.

Tabela 28. Espécies de bactérias presentes no solo estudado (solo contaminado com óleo diesel após 30 dias) com os seus respectivos índices de similaridade.

ESPÉCIES DE BACTÉRIAS
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (0.474)
<i>Arthrobacter mysorens</i> (0.673) ou <i>Paenibacillus macquariensis</i> (0.639)
<i>Bacillus cereus</i> GC subgrupo A (0.349) ou <i>Bacillus cereus</i> GC subgrupo B (0.300) ou <i>Bacillus thuringiensis kurstakii</i> (0.288)
<i>Bacillus-cereus</i> GC subgrupo A (0.379) ou <i>Bacillus cereus</i> GC subgrupo B (0.305)
<i>Bacillus megaterium</i> GC subgrupo A (0.453) ou <i>Brevibacillus agri/borstelensis</i> (0.380)
<i>Bacillus mycoides</i> GC subgrupo B (<i>Bacillus cereus</i> group) (0.337) ou <i>Bacillus cereus</i> GC subgrupo A (0.263)
<i>Bacillus-mycoides</i> GC subgrupo B (<i>Bacillus cereus</i> group) (0.341)
<i>Bacillus sphaericus</i> GC subgrupo A (0.647)
<i>Bacillus subtilis</i> (0.494)
<i>Paenibacillus macerans</i> (<i>Bacillus</i>) (0.424) ou <i>Bacillus coagulans</i> (0.411) ou <i>Bacillus subtilis</i> (0.389) ou <i>Bacillus megaterium</i> GC subgrupo A (0.329)
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (<i>P. perfectomarina</i>) (0.802)
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (<i>P. perfectomarina</i>) (0.852)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> GC subgrupo C (0.776)
<i>Staphylococcus-gallinarum</i> -GC subgrupo A (0.418)
<i>Staphylococcus simulans</i> GC subgrupo A (0.446) ou <i>Staphylococcus-arlettae</i> -GC subgrupo B (0.442) ou <i>Staphylococcus cohnii cohnii</i> GC subgrupo A (0.384)
<i>Staphylococcus simulans</i> GC subgrupo A (0.628) ou <i>Staphylococcus cohnii cohnii</i> GC subgrupo A (0.542)
<i>Streptococcus bovis</i> (0.445)

Tabela 29. Espécies de fungos presentes no solo estudado (solo contaminado com óleo diesel após 30 dias).

ESPÉCIES DE FUNGOS
<i>Aspergillus oryzae</i> (Ahlburg) Cohn
<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare
<i>Eupenicillium brefeldianum</i> (Dodge) Stolk & Scott
<i>Eupenicillium shearii</i> Stolk & Scott
<i>Paecilomyces variotti</i> Bainier
<i>Penicillium corylophilum</i> Dierckx
<i>Penicillium crustosum</i> Thom
<i>Penicillium janthinellum</i> Biourge
<i>Penicillium simplicissimum</i> (Oudem.) Thom

Na literatura, a maioria dos projetos de biorremediação de áreas contaminadas com hidrocarbonetos de petróleo tem se desenvolvido em climas temperados e, portanto, as tecnologias são adaptadas para esse tipo de clima. No entanto, as investigações sobre o potencial de biorremediação em áreas tropicais têm rendido resultados favoráveis e têm demonstrado similaridade entre as espécies degradadoras (Schroeder *et al.*, 1999). Desse modo, é possível comparar os resultados encontrados, no presente trabalho, com o levantamento de espécies hidrocarbonoclasticas encontradas no mundo.

Um dos primeiros estudos em áreas tropicais foi realizado no Havaí (1994), onde foi investigada a habilidade de microrganismos nativos para degradar hidrocarbonetos de petróleo. Nesse estudo, foram isoladas várias cepas de bactérias oleofílicas, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *P. oleovorans*, *P. fluorescens* e espécies de *Acinetobacter* e de *Flavobacterium*. Esses são os mesmos gêneros conhecidos por sua habilidade de degradar hidrocarbonetos em climas temperados e capazes de degradar, em condições de clima quente, vários hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, inclusive estimulados pela adição de fertilizantes e de óleo diesel como fonte de carbono, estratégia esta que ocasionou, consideravelmente, o aumento da população oleofílica e da atividade bacteriana (Robert & Israel, 1994).

De acordo com resultados encontrados no presente estudo, os gêneros presentes de bactérias e os fungos dão indícios do potencial satisfatório do solo em promover a degradação de hidrocarbonetos provenientes de petroderivados, inclusive remoção dos HPAs (Bento *et al.*, 2003; Gestel *et al.*, 2003).

Segundo estudos, os gêneros de fungos *Aspergillus* e *Penicillium*, encontrados no solo da presente pesquisa, são conhecidos como exímios degradadores de óleo cru e refinado e, inclusive, este último é capaz de degradar o criseno e o benzo(a)pireno, poliaromáticos de 4 e 5 anéis benzênicos, respectivamente (Cerniglia, 1984 e 1992). Tem sido indicado também o gênero *Paecilomyces* como com certa capacidade de degradar diesel (Gestel *et al.*, 2003).

Entre os principais gêneros de bactérias degradadoras de óleo diesel, citados pela literatura, estão o *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter*. Entre estes, as espécies *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus sphaericus* e *Bacillus subtilis* têm sido identificadas como promissoras na degradação de compostos do diesel (Song & Bartha, 1990; Richard & Vogel, 1999; Schroeder *et al.*, 1999; Bento *et al.*, 2003; Gestel *et al.*, 2003). A espécie *Acinetobacter calcoaceticus* tem sido indicada como degradadora de naftaleno (2 anéis aromáticos), a *Arthrobacter* sp. como capaz de degradar o antraceno (3 anéis aromáticos), e o *Bacillus cereus* e a *Pseudomonas* sp. com arcabouço metabólico com potencial de degradar o acenafteno e o fluoranteno (2 e 3 anéis aromáticos, respectivamente) (Cerniglia, 1992). Todas foram espécies encontradas no presente estudo.

Durante o período de incubação dos tratamentos ao longo dos 129 dias neste estudo, os fungos mais abundantes foram identificados como *Aspergillus parasiticus*, *Eupenicillium shearii*, *Paecilomyces variotti* e *Penicillium simplicissimum*, sobressaindo-se em número em relação às demais espécies em todas as amostragens efetuadas e em especial no 17º dia de incubação do experimento.

As bactérias que apresentaram maior abundância foram *Bacillus-cereus*-GC subgrupo A (0.379) ou *Bacillus-cereus*-GC subgrupo B (0.305), *Bacillus-mycooides*-GC subgrupo B (*Bacillus cereus* grupo) (0.341) e *Staphylococcus-epidermidis*-GC subgrupo C (0.776), especialmente no 10º e 45º dias. A Figura 13 apresenta alguns representantes dos fungos encontrados no solo estudado.



Figura 13. Ilustração de exemplares de fungos presentes no solo argiloso contaminado com óleo diesel.

Desse modo, esses resultados sugerem condições favoráveis de degradação dos hidrocarbonetos de petróleo no solo em estudo, no entanto, vale ressaltar que isso não garante o seu sucesso uma vez que vários fatores estão atrelados.

Um desses aspectos é que a biorremediação é uma extensão do metabolismo microbiano normal, ou seja, as enzimas biocatalíticas dos microrganismos são exploradas para aumentar a taxa ou extensão de destruição do poluente. Mas, como tal, não operam em um déficit termodinâmico sem um subsídio de energia apropriada. Assim, microrganismos e suas enzimas não podem funcionar dentro de certos limites fisiológicos e as condições que restringem a vida ou inativam enzimas são incompatíveis com esforços de biorremediação (Karthikeyan & Singh, 2002).

Um outro aspecto a ser considerado é que nenhuma espécie sozinha é capaz de degradar por inteiro um contaminante complexo. A degradação do petróleo e derivados, como o óleo diesel, com uma série de hidrocarbonetos recalcitrantes, depende de uma diversidade genética, de uma versatilidade metabólica alcançada a partir de um consórcio de microrganismos. O principal mecanismo usado por esses microrganismos é o cometabolismo e a cooperação entre espécies (Richard & Vogel, 1999; Marchal *et al.*, 2003).

Entretanto, todo esse processo depende também de um contato direto entre os microrganismos e o contaminante, ou seja, da biodisponibilidade do xenobionte a ser degradado. No entanto, contaminantes orgânicos tendem a interagir de diversas maneiras com os constituintes do

solo, aumentando ou reduzindo a sua disponibilidade e, conseqüentemente, influenciando no potencial de biodegradação (Weissenfels *et al.*, 1992; Amellal *et al.*, 2001).

Outros fatores, inclusive, aqueles dependentes do local em estudo, como condições nutricionais adequadas, fatores abióticos, baixos índices de toxicidade também são fatores essenciais para o processo biodegradativo e estão discutidos oportunamente ao longo desse trabalho.

5.2 BIORREMEDIAÇÃO DO SOLO CONTAMINADO

5.2.1 Comportamento dos microrganismos ao longo dos tratamentos

Os resultados encontrados a partir de exames microbiológicos no decorrer dos dias de amostragem em estudo estão apresentados na Tabela 30. Esses resultados descrevem o comportamento de bactérias e fungos, por meio da quantificação dos microrganismos heterotróficos totais (UFC.g⁻¹ de solo) nos diferentes tratamentos adotados *Landfarming* (LF), Bioestímulo (BE) e Bioestímulo mais Bioaumento (BEBA) e nos dias 0, 3º, 10º, 17º, 24º, 45º, 73º, 101º e 129º de incubação do experimento.

Tabela 30. Microrganismos quantificados (UFC.g⁻¹ de solo) nos tratamentos LF, BE e BEBA nos intervalos 0, 3º, 10º, 17º, 24º, 45º, 73º, 101º e 129º dias de incubação do experimento.

DIAS	LANDFARMING		BIOESTÍMULO		BIOESTÍMULO + BIOAUMENTO	
	BACTÉRIAS	FUNGOS	BACTÉRIAS	FUNGOS	BACTÉRIAS	FUNGOS
3º	$7,5 \pm 2,5 \times 10^5$	$4,0 \pm 1,0 \times 10^3$	$7,5 \pm 0,7 \times 10^5$	$1,0 \pm 0,0 \times 10^4$	$8,3 \pm 0,0 \times 10^6$	$1,5 \pm 0,7 \times 10^4$
10º	$4,5 \pm 0,2 \times 10^5$	$4,0 \pm 0,7 \times 10^3$	$4,7 \pm 0,8 \times 10^5$	$7,3 \pm 1,5 \times 10^4$	$1,4 \pm 0,1 \times 10^6$	$1,2 \pm 0,1 \times 10^5$
17º	$1,1 \pm 0,1 \times 10^6$	$6,0 \pm 2,1 \times 10^3$	$6,0 \pm 3,6 \times 10^4$	$2,5 \pm 0,1 \times 10^5$	$6,4 \pm 4,0 \times 10^4$	$2,4 \pm 0,1 \times 10^5$
24º	$2,8 \pm 1,1 \times 10^6$	$5,0 \pm 3,1 \times 10^3$	$3,7 \pm 0,4 \times 10^6$	$1,4 \pm 0,2 \times 10^6$	$2,0 \pm 1,7 \times 10^5$	$4,8 \pm 0,4 \times 10^5$
45º	$3,2 \pm 0,2 \times 10^6$	$5,0 \pm 0,7 \times 10^3$	$3,7 \pm 0,1 \times 10^7$	$1,8 \pm 0,3 \times 10^5$	$3,4 \pm 0,1 \times 10^7$	$1,5 \pm 0,3 \times 10^5$
73º	$3,2 \pm 0,1 \times 10^6$	$4,0 \pm 0,3 \times 10^3$	$4,6 \pm 0,1 \times 10^6$	$1,2 \pm 0,2 \times 10^5$	$1,1 \pm 0,2 \times 10^6$	$2,0 \pm 0,5 \times 10^5$
101º	$2,3 \pm 0,1 \times 10^6$	$3,0 \pm 0,7 \times 10^3$	$1,1 \pm 0,1 \times 10^4$	$2,6 \pm 0,0 \times 10^4$	$1,1 \pm 0,2 \times 10^5$	$3,7 \pm 0,5 \times 10^4$
129º	$1,9 \pm 0,4 \times 10^6$	$3,0 \pm 0,5 \times 10^3$	$1,7 \pm 0,6 \times 10^6$	$8,0 \pm 1,4 \times 10^3$	$1,4 \pm 0,2 \times 10^5$	$1,1 \pm 2,1 \times 10^4$

NOTA: UFC – Unidade Formadora de Colônias.

No entanto, em virtude do número de UFCs apresentarem variação muito ampla ao longo do período de incubação, os dados foram ajustados para log na base 10 e estão analisados desse modo na sequência. A Tabela 31 apresenta a diferença estatística obtida entre os tratamentos durante o período de incubação (Teste de *Tukey*, $p < 0,05$).

Tabela 31. Microrganismos quantificados ($\log$ microrganismos.g⁻¹ de solo) nos tratamentos LF, BE e BEBA nos intervalos 0, 3º, 10º, 17º, 24º, 45º, 73º, 101º e 129º dias de incubação do experimento.

DIAS	LANDFARMING		BIOESTÍMULO		BIOESTÍMULO + BIOAUMENTO	
	BACTÉRIAS	FUNGOS	BACTÉRIAS	FUNGOS	BACTÉRIAS	FUNGOS
3º	5,88 ± 0,2 B	3,59 ± 0,1 B	5,88 ± 0,0 B	4,00 ± 0,0 AB	6,92 ± 0,0 A	4,15 ± 0,2 A
10º	5,65 ± 0,0 B	3,54 ± 0,1 B	5,67 ± 0,1 B	4,86 ± 0,1 A	6,15 ± 0,0 A	5,06 ± 5,1 A
17º	6,05 ± 0,0 A	3,78 ± 0,1 B	4,78 ± 0,3 B	5,39 ± 0,0 A	4,82 ± 0,3 B	5,38 ± 0,0 A
24º	6,45 ± 0,2 A	3,66 ± 0,3 B	6,56 ± 0,0 A	6,15 ± 0,1 A	5,30 ± 0,3 B	5,68 ± 0,0 A
45º	6,50 ± 0,0 B	3,65 ± 0,1 B	7,57 ± 0,0 A	5,26 ± 0,1 A	7,53 ± 0,0 A	5,17 ± 0,1 A
73º	6,50 ± 0,0 A	3,60 ± 0,0 C	6,66 ± 0,0 A	5,08 ± 0,1 B	6,04 ± 0,1 B	5,28 ± 0,1 A
101º	6,35 ± 0,0 A	3,45 ± 0,1 B	4,04 ± 0,1 C	4,41 ± 0,0 A	5,02 ± 0,1 B	4,57 ± 0,1 A
129º	6,29 ± 0,1 A	3,40 ± 0,1 B	6,23 ± 0,2 A	3,90 ± 0,1 A	5,16 ± 0,1 B	4,05 ± 0,1 A

NOTA: Diferentes caracteres (A, B, C) na linha indicam que há diferença significativa entre os tratamentos testados para as bactérias e para os fungos (Teste de *Tukey*, $p < 0,05$, $n=3$).

O tempo zero (dia 0) dos microrganismos presentes no solo foi quantificado, como citado, imediatamente antes dos incrementos serem adicionados aos tratamentos (LF, BE e BEBA), uma vez que a umidade decorrente desse procedimento (introdução de água deionizada, nutrientes e inóculo) promoveria uma amostragem não segura em função da compactação da matriz (Figura 14). Desse modo, o solo contaminado com óleo diesel apresentava no T0: $8,7 \pm 2,1 \times 10^3$ de bactérias ($0,93 \pm 0,1 \log$ de bactérias.g⁻¹ de solo) e $2,5 \pm 0,3 \times 10^3$ de fungos ($0,39 \pm 0,1 \log$ de fungos.g⁻¹ de solo) e, como se conhecia a número de microrganismos acrescentados a BEBA (10^8 células.mL⁻¹; Seção 4.2.2.2), permitiu fazer inferências sobre o aumento dos microrganismos alcançados por esse tratamento.

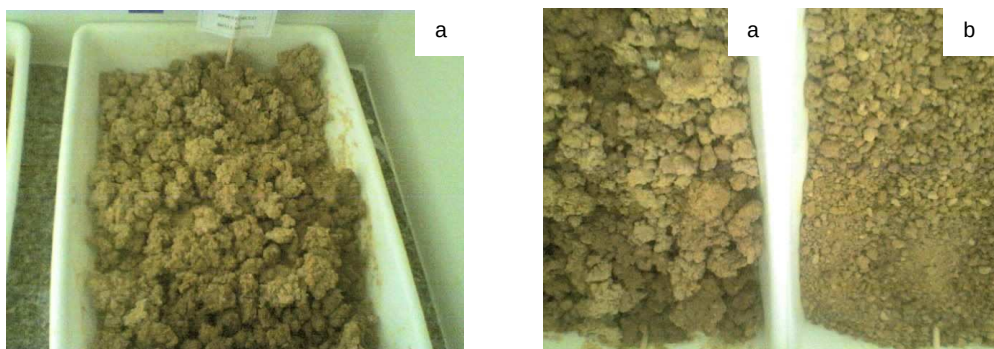


Figura 14. Características morfológicas do solo estudado: (a) 1º dia após o umedecimento e (b) após 3º dia de umedecimento e destorroamento.

De acordo com o teste Análise de Variância ($p < 0,05$), foi possível observar que o acréscimo de incrementos (nutrientes e microrganismos) promoveu diferença significativa no número de bactérias e fungos entre os tratamentos testados. Sendo, de modo geral, os tratamentos BE e BEBA semelhantes e, ambos, diferentes de LF.

Em cada tratamento estudado, houve também diferença significativa ao longo do período de incubação. Para as bactérias, a diferença ocorreu em todos os tratamentos: LF (ANOVA: $F = 21,561$; $p = 0,0001$), BE (ANOVA: $F = 139,646$; $p = 0,0000$) e BEBA (*Kruskal Wallis* = 18,4907; $p = 0,0099$).

A Figura 15 ilustra o comportamento do número de bactérias ($\log \text{bactérias.g}^{-1}$ de solo) ao longo dos dias de incubação e nos tratamentos testados.

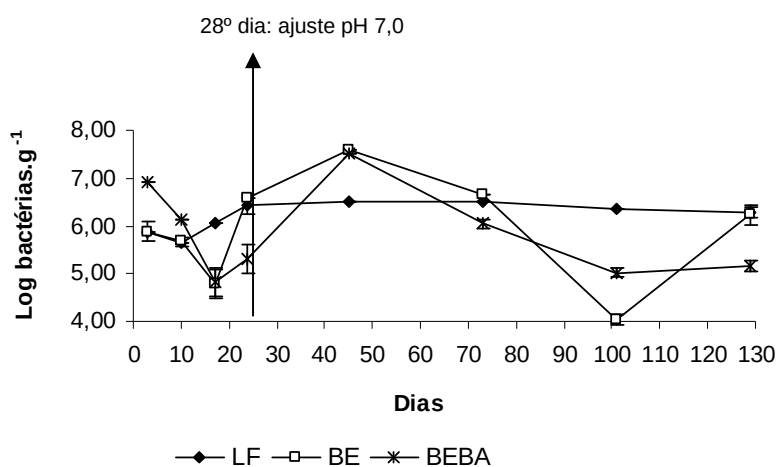


Figura 15. Número de bactérias ($\log \text{bactérias.g}^{-1}$ de solo) ao longo dos dias de incubação e nos tratamentos testados em solo argiloso contaminado com óleo diesel.

O tratamento LF, para as bactérias, apresentou comportamento mais ou menos uniforme, com pequena variação em seu número e com crescimento mais significativo no 45º, 3º e 24º dias (ordem crescente do número de microrganismos) e menor no 10º dia de incubação do experimento. No caso dos tratamentos BE e BEBA, por sua vez, observou-se um decréscimo do 3º dia até 17º e posterior crescimento, este mais significativo na amostragem referente ao 45º dia (Figura 15).

Estatisticamente, os fungos, ilustrados na Figura 16, não apresentaram diferença significativa ao longo do período de incubação em LF (ANOVA: $F = 1,835$; $p = 0,1580$), diferentemente, dos resultados obtidos em BE (ANOVA: $F = 403,402$; $p = 0,0000$) e BEBA (ANOVA: $F = 113,575$; $p = 0,0000$). Para esses dois últimos tratamentos, foi observado um crescimento gradativo até o 24º dia e posterior decréscimo até o último dia de incubação (129 dias).

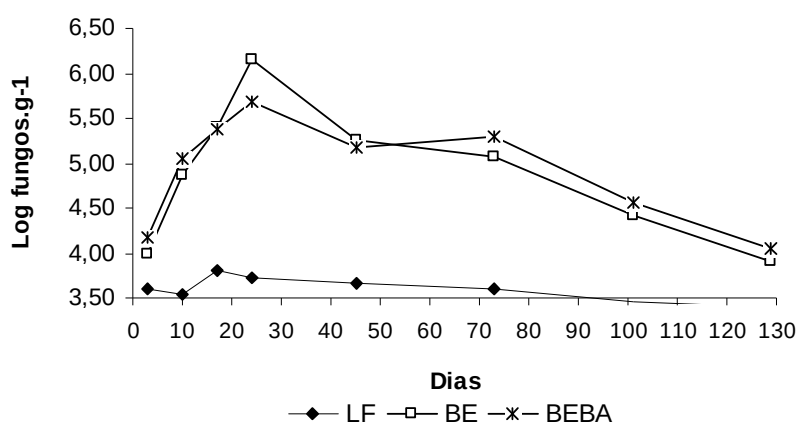


Figura 16. Número de fungos ($\log \text{fungos.g}^{-1}$ de solo) ao longo dos dias de incubação e nos tratamentos testados em solo argiloso contaminado com óleo diesel.

No terceiro dia de incubação, o tratamento BEBA diferiu significativamente, em número de bactérias, dos tratamentos LF e BE em uma ordem de magnitude (LF e BE com $5,88 \pm 0,0$ e BEBA, com $6,92 \pm 0,0$) (ANOVA, $F = 156,008$, $p = 0,0002$). Esse resultado é decorrente da inoculação de microrganismos com o propósito do bioaumento no tratamento BEBA (inóculo de 10^7). Os fungos, no entanto, apresentaram uma pequena diferença entre os tratamentos, nesta amostragem, com BE similar a LF e a BEBA (ANOVA: $F = 12,044$, $p = 0,0203$). A contaminação com óleo diesel em solo tende a provocar um aumento do número de fungos, o que pode ter provocado a semelhança no número de microrganismos entre os tratamentos adotados (Gestel *et al.*, 2003).

No decorrer dos dias de incubação dos tratamentos, é possível observar um comportamento de crescimento e de decréscimo do número de bactérias e fungos muito associado aos valores de pH quantificados durante os testes (Figura 18). No 10º e 17º dias de amostragem, por exemplo, observa-se uma redução no número de bactérias nos três tratamentos estudados e um aumento para número

de fungos. Esse resultado está, provavelmente, relacionado à queda do pH, que tornou o meio mais ácido e, conseqüentemente, mais promissor para o desenvolvimento desses microrganismos (Figura 17). Resultados similares foram encontrados em outros trabalhos (Leahy & Colwell, 1990; Cardoso, 1992; Barroti & Nahas, 2000).

Nesses dias (10º e 17º dias), o número de bactérias e fungos tornou mais similar os tratamentos BE e BEBA, onde ocorreram as maiores variações do pH. O tratamento LF não apresentou variação no número de microrganismos, mantendo-se ainda sem crescimento significativo em relação a BE e BEBA.

No 24º dia, observa-se um crescimento lento e gradual nos diferentes tratamentos, tanto no número de fungos quanto de bactérias, com BE e BEBA similares e maiores que LF em fungos (ANOVA: $F = 112,528$, $p = 0,0001$) e BEBA diferente e maior que LF e BE em bactérias (ANOVA: $F = 25,910$, $p = 0,0023$). Esse crescimento pode estar atrelado à capacidade de regeneração e de adaptação dos microrganismos às condições estabelecidas no solo, similar ao observado em outros estudos. Por exemplo, Barahona *et al.* (2004) avaliando a remoção de óleo diesel em solo estimulado por nutrientes, umidade e resíduos de colheita de milho ou cana-de-açúcar encontraram o maior número de microrganismos também no 22º dia. Segundo esses autores, o aumento no número de microrganismos nessa fase inicial, provavelmente, resulta de uma seleção e crescimento daquelas populações que toleram e/ou estão mais aptas a consumir diesel como fonte de carbono (microrganismos heterotróficos e degradadores de HCs). Gestel *et al.* (2003), em seus estudos, também observaram que a diversidade de espécies degradadoras de diesel aumentou visivelmente no 27º dia e, em especial, a proliferação de fungos.

Na tentativa de tornar o meio mais adequado para o desenvolvimento em conjunto de bactérias e fungos e tornar o pH mais próximo ao encontrado no tratamento LF (6,8), foi feita a correção no 28º dia desse parâmetro nos microcosmos de BE e BEBA para pH 7,0. De acordo com o observado na literatura, a biodegradação de petroderivados ocorre com maior eficiência em pH variando de 6,5 a 8,5 e, para óleo cru, a maior eficiência de biodegradação em solo ocorre em pH de 7,6 (Dibble & Bartha, 1979).

Destaca-se, no entanto, que mesmo após a correção, ainda foram observadas quedas constantes e significativas, o que promoveu efeitos marcantes na contagem dos microrganismos (bactérias e fungos). A Figura 17 apresenta a variação do pH e destaca a correção deste efetuada no 28º de incubação. Para a correção foi construída uma curva de neutralização, com um período de 48h de estabilização.

A redução significativa do pH, observada especialmente nos tratamentos BE e BEBA, é provavelmente decorrente do efeito catabólico decorrente da atividade bacteriana sobre as frações do óleo diesel incorporadas ao solo. Esses efeitos envolvem normalmente a produção de metabólitos que são freqüentemente ácidos. Essa queda mais significativa do pH nesses tratamentos (BE e BEBA) reforça a relação entre a introdução de incrementos ao solo e um aumento potencial na degradação de compostos orgânicos presentes. Em LF, a redução do pH se mostrou menos significativa provavelmente em decorrência da baixa atividade dos microrganismos em função da falta de nutrientes, agente limitante do processo de biodegradação.

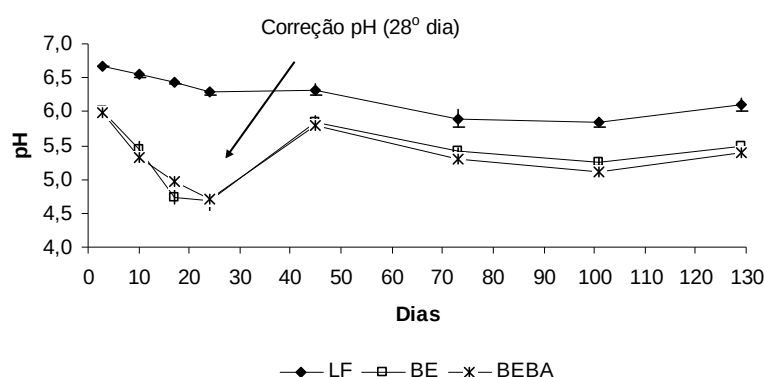


Figura 17. Variação do pH nos tratamentos LF, BE e BEBA durante o experimento.

A amostragem realizada no 45º dia destaca que houve uma redução do número de fungos e deu-se um crescimento especial das bactérias, ambos nos tratamentos BE e BEBA, que se mantiveram estatisticamente semelhantes e diferentes do tratamento LF. Esse comportamento do número de microrganismos é esperado uma vez que a queda constante e significativa do pH do meio pode ter estimulado o crescimento dos fungos e, a posterior correção do solo (28º dia), favorecido o aumento no número de bactérias nos tratamentos em função do meio mais alcalino.

Os testes estatísticos reforçam a visível variação do pH no período de incubação dos três tratamentos: LF (*Kruskal Wallis*, $H = 39,8072$; $p = 0,0000$), BE (*Kruskal Wallis*, $F = 32,2891$; $p = 0,0000$) e BEBA (ANOVA: $F = 612,478$; $p = 0,0000$), com uma tendência de queda mais lenta e gradual em LF. Essa diferença culmina ao final do experimento (129º dia), com uma diferença significativa do tratamento LF em relação ao pH dos demais tratamentos, BE e BEBA (ANOVA: $F = 82,785$; $p = 0,0000$).

Segundo estudos, o pH do solo pode variar amplamente e a maioria das bactérias e fungos heterotróficos é favorecida em pH próximo a neutralidade, com os fungos mais tolerantes a condições ácidas (Cardoso, 1992). Condições de pH extremos, como o observado em alguns solos, pode inclusive trazer uma influência negativa sobre a habilidade das populações microbianas para degradar HCs (Leahy & Colwell, 1990).

A Figura 18 ilustra a relação entre o número de heterotróficos totais ($\log$ microrganismos.g⁻¹ de solo) e o pH durante o período de incubação do experimento. De acordo com o observado, especialmente nos tratamentos BE e BEBA, onde houve queda e correção do pH, há uma relação direta entre o aumento desse parâmetro (meio mais alcalino) e o crescimento no número de bactérias; e inversa para o número de fungos, ou seja, os maiores níveis de pHs coincidem com o crescimento de bactérias, bem como o decréscimo retrata o crescimento de fungos.

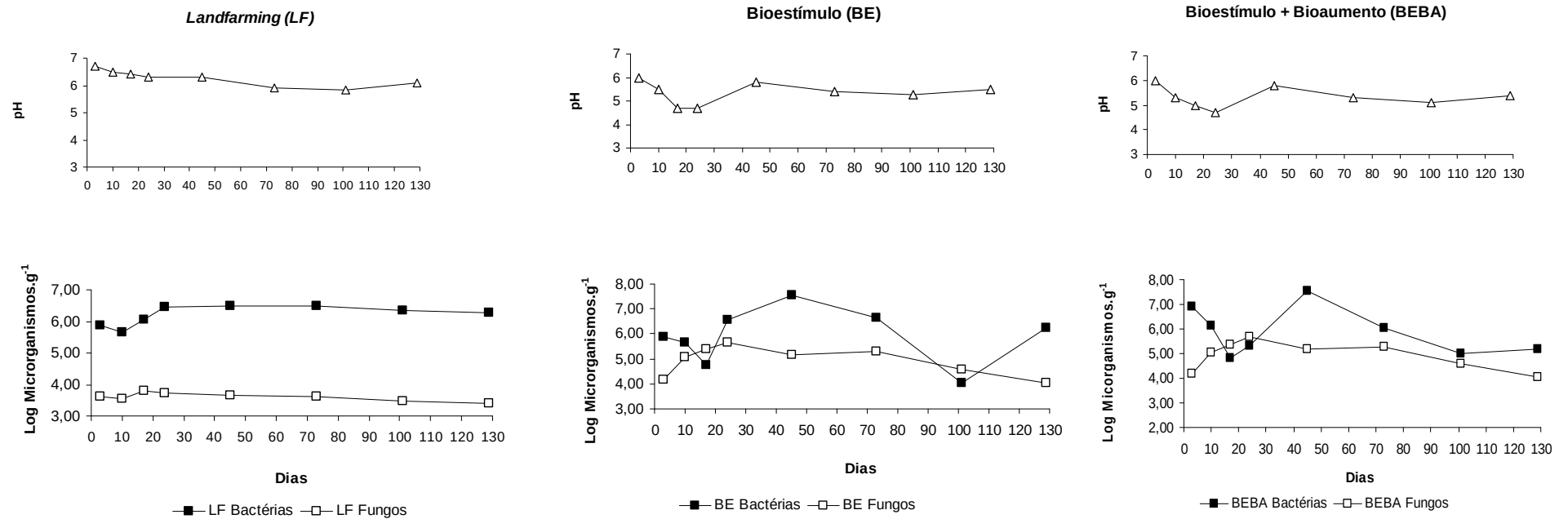


Figura 18. Relação entre a cinética de crescimento de bactérias e fungos ($\log \text{microrganismos.g}^{-1}$ de solo) e a variação de pH nos tratamentos LF, BE e BEBA durante os intervalos 0, 3º, 10º, 17º, 24º, 45º, 73º, 101º e 129º dias de incubação do experimento.

Na amostragem do 73º dia de incubação, por sua vez, foi observado um decréscimo no número de bactérias e fungos nos três tratamentos estudados e que se manteve até o final do experimento (amostragens no 101º e 129º dias). Resultados similares foram observados em outros trabalhos de remediação em solo contaminado com óleo diesel, onde a maior atividade e crescimento da população microbiana foram notados até 45º em tratamentos de bioaugmentação e de bioestímulo (Bento *et al.*, 2005) e no 55º dia também em tratamentos semelhantes (Barahona *et al.*, 2004).

Esse decréscimo, em determinada etapa do processo de biodegradação, também é observado em vários estudos como relacionado à depleção dos nutrientes inorgânicos disponíveis resultantes do consumo das fontes de carbono ou mesmo a efeitos tóxicos produzidos pelas frações residuais do contaminante (Weissenfels *et al.*, 1992; Ahn *et al.*, 1996; Loser *et al.*, 1999; Margesin & Schinner, 1999; Barahona *et al.*, 2004).

Avaliações a respeito da remoção dos contaminantes, toxicidade, sorção e de outros parâmetros são necessárias para uma compreensão mais ampla do comportamento dos microrganismos presentes, bem como do processo de biodegradação proposto.

5.2.1.1 Avaliação da produção de biossurfactantes nos tratamentos

Um dos importantes parâmetros que podem ser alterados em função do crescimento dos microrganismos é a redução da tensão superficial como resultado da produção de biossurfactantes. Essas moléculas são sintetizadas por um grande número de microrganismos e agem em interfaces, reduzindo as energias interfaciais (tensão superficial e interfacial) (Nitschke & Pastore, 2002).

Em solos impactados com HCs, essas moléculas promovem a emulsificação destes, aumentando a solubilidade e, conseqüentemente, disponibilizando-os para a biodegradação pela microbiota presente na matriz contaminada.

O uso de biossurfactantes, por exemplo, no processo de biodegradação de HPAs, com mais de quatro anéis aromáticos, tem apresentado resultados satisfatórios, uma vez que estes tem baixo poder de biodegradabilidade em função de sua baixa solubilidade em água e grande capacidade de adsorção em solos (Mulligan, 2005).

Os resultados obtidos na presente pesquisa indicaram que, estatisticamente, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) na tensão superficial entre LF, BE, BEBA e o branco (água deionizada usada no teste), no 3º dia de incubação (ANOVA: $F = 3,084$; $p = 0,1525$), 17º dia (ANOVA: $F = 4,311$; $p = 0,0960$), 24º dia (ANOVA: $F = 4,752$; $p = 0,0832$), 45º dia (ANOVA: $F = 5,627$; $p = 0,0642$), 73º dia (ANOVA: $F = 3,684$; $p = 0,0972$) e 129º dia (ANOVA: $F = 2,906$; $p = 0,1647$). A exceção se deu apenas no 10º e 101º dias de incubação (ANOVA: $F = 16,762$; $p = 0,0099$ e ANOVA: $F = 14,828$; $p = 0,0124$, respectivamente).

No 10º dia, os tratamentos LF ($69,0 \pm 0,0$ mN/m), BE ($69,3 \pm 0,4$ mN/m) e BEBA ($68,7 \pm 0,3$ mN/m) apresentaram tensão superficial diferente da obtida no branco ($70,4 \pm 0,0$ mN/m). Já no dia 101º, o branco ($70,3 \pm 0,0$ mN/m) foi similar a LF ($69,1 \pm 1,7$ mN/m) e BE ($67,5 \pm 0,7$ mN/m) foi

semelhante a LF e ao tratamento BEBA ($64,7 \pm 0,2$ mN/m). No entanto, ao se avaliar a diferença percentual entre a tensão superficial do branco e tratamentos nesse período de incubação, observa-se que esta foi muito pequena ($< 2,5\%$ no 10º dia e $< 8\%$ no 101º dia), o que sugere que outros parâmetros podem ter interferido nessa pequena variação e que não houve produção de biosurfactante nos tratamentos testados.

Estudos têm indicado, por exemplo, que há uma relação direta entre o pH do meio e a tensão superficial, ou seja, que valores baixos de pH (acidez do meio) tendem a reduzir os valores da tensão superficial (Syldatk *et al.*, 1985). O que pode ter ocorrido no presente estudo em função da queda do pH. A Figura 19 ilustra a tensão superficial nos tratamentos e no branco ao longo do experimento.

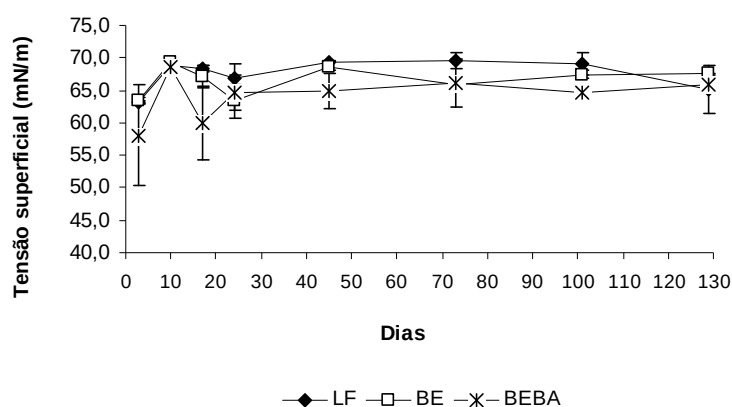


Figura 19. Variação da tensão superficial nos tratamentos LF, BE e BEBA durante o experimento.

Essas considerações são confirmadas ao final do período de incubação do experimento (129 dias), onde LF apresentou redução de apenas 5,6% da tensão superficial inicialmente observada, BE de 2,5%, BEBA de 4,0% e o controle de 0,2%. A diferença percentual entre a maior e a menor tensão superficial foi apenas de 16,6%. Ao contrário de Beltrão (2005), que em seus estudos, obteve uma redução 31% da tensão superficial (64mN/m para 44mN/m), durante apenas 20 dias de tratamento aeróbio em solo de mangue contaminado com óleo diesel. A produção de substâncias ácidas e tensoativas foram comprovadas por Beltrão (2005), durante o plaqueamento através da formação de um halo inibidor entre algumas colônias. Fato este não observado no presente estudo.

5.2.2 Eficiência dos tratamentos: remoção dos contaminantes

Não foi observada diferença significativa entre as réplicas dos tratamentos no que se refere aos parâmetros: O&G ($F = 0,425$; $p = 0,8289$) e C_{org} ($F = 0,164$; $p = 0,9743$). Desse modo, as amostras foram tratadas agrupadas como LF (LF1 e LF2), BE (BE1 e BE2) e BEBA (BEBA1 e BEBA2).

5.2.2.1 Remoção dos óleos e graxas (O&G)

Um dos parâmetros de avaliação da eficiência do processo de biodegradação do solo contaminado com óleo diesel foi a remoção de óleos e graxas (O&G) no período de incubação do experimento.

A Figura 20 ilustra a eficiência de remoção durante os dias de amostragem do experimento em cada tratamento adotado. Percebe-se que os maiores percentuais de degradação foram promovidos pelo tratamento do solo com a introdução de nutrientes (BE) e nutrientes mais microrganismos (BEBA) e com uma tendência à estabilização dessa remoção a partir do 24º dia. No tratamento somente com aeração (LF), o percentual de degradação foi mais baixo e se estendeu até o 45º dia e somente a partir de então parece ter se iniciado sua estabilização.

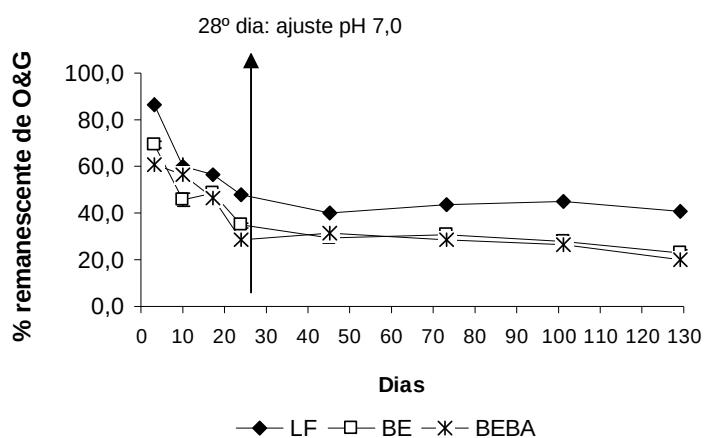


Figura 20. Eficiências de remoção de O&G nos tratamentos adotados (LF, BE e BEBA).

A Tabela 32 apresenta os percentuais de degradação relativa obtidas nos tratamentos LF, BE e BEBA estudados. Como há intervalos diferentes no período de amostragem, a comparação entre os percentuais de remoção de O&G foi feita apenas entre os tratamentos a cada período avaliado.

Tabela 32. Percentual de degradação relativa de O&G presente no solo contaminado com óleo diesel.

DIAS	LANDFARMING	BIOESTÍMULO	BIOESTÍMULO + BIOAUMENTO
0 - 3 ^o	13,3 ± 2,8 C (4,4)	30,5 ± 1,4 B (10,2)	38,9 ± 1,6 A (12,9)
3 - 10 ^o	30,9 ± 4,5 A (4,1)	34,4 ± 4,1 A (4,9)	7,8 ± 0,6 B (1,1)
10 - 17 ^o	5,6 ± 0,6 B (0,8)	0,0 ± 0,0 C (0,0)	17,9 ± 0,6 A (2,6)
17 - 24 ^o	15,5 ± 2,3 C (2,2)	27,9 ± 1,8 B (4,0)	38,6 ± 0,9 A (5,5)
24 - 45 ^o *	16,8 ± 3,3 A (0,8)	16,1 ± 2,6 A (0,8)	0,0 ± 0,0 B (0,0)
45 - 73 ^o	0,0 ± 0,0 B (0,0)	0,0 ± 0,0 B (0,0)	9,2 ± 0,2 A (0,3)
73 - 101 ^o	0,0 ± 0,0 B (0,0)	9,6 ± 2,5 A (0,4)	7,9 ± 1,7 A (0,3)
101 - 129 ^o	9,2 ± 0,0 B (0,3)	15,6 ± 4,4 AB (0,6)	23,5 ± 0,3 A (0,8)

NOTA: O percentual de degradação relativa foi calculado através da seguinte expressão: % degradação = [(concentração subsequente – concentração anterior) x 100/concentração anterior]. Diferentes caracteres (A, B, C) na linha indicam que há diferença significativa entre os tratamentos testados (Teste de *Tukey*, $p < 0,05$). Os valores entre parênteses correspondem ao percentual de remoção dividido pelo número de dias do intervalo. Dias em negrito corresponde ao dia de amostragem. (*) – ajuste do pH dos tratamentos para 7,0 no 28^o dia de incubação.

Como pode ser observado, houve decréscimo significativo do teor de O&G nos três tratamentos adotados. É válido ressaltar que a diminuição da concentração desse parâmetro pode ocorrer não somente por fatores relacionados à atividade microbológica, mas também por fatores físico-químicos como lixiviação, volatilização e adsorção nas substâncias orgânicas (Gestel *et al.*, 2003; Baptista & Rizzo, 2005).

No início do presente experimento, o indício de perda por volatilização foi marcante uma vez que havia um forte odor característico de óleo diesel no ambiente de execução do experimento. No entanto, em função de limitação técnica essa perda não foi quantificada. Outra observação interessante foi o número de insetos mortos nas proximidades dos microcosmos, especialmente do LF, durante as primeiras semanas de incubação. Esse dado pode sugerir uma maior volatilização nesse tratamento do que naqueles que receberam incrementos (BE e BEBA), como encontrado por Namkoong *et al.* (2002). Em seu trabalho foi observado que a volatilização de *n*-alcanos foi diminuída com a correção da fração orgânica do solo, ou seja, o incremento de nutrientes e de matéria orgânica aparentemente sorveu mais significativamente o contaminante, reduzindo a sua volatilização.

Os percentuais de remoção relativa variaram de 0,0 ± 0,0% a 38,9 ± 1,6% (Tabela 32). Os maiores índices ocorreram nos tratamentos BE e BEBA no 3^o dia de incubação do experimento (38,9 ± 1,6% e 30,5 ± 1,4%, respectivamente). Esse resultado foi muito significativo uma vez que esse intervalo de tempo é o mais estreito entre as amostragens efetuadas correspondendo apenas a três dias (0 e 3^o dia). A remoção observada entre o 3^o e o 10^o dias em LF e BE também foi marcante (30,9 ± 4,5% e 34,4 ± 4,1%, respectivamente), bem como os percentuais de remoção dos tratamentos BE e BEBA entre o 17^o e o 24^o dia amostrado (27,9 ± 1,8% e 38,6 ± 0,9%). O final do experimento (101 a 129 dias) apresentou percentuais de remoção com valores expressivos (15,6 ± 4,4% e 23,5 ± 0,3%, respectivamente), no entanto, em termos comparativos é menos significativo que os demais uma vez que essa remoção ocorreu em um intervalo de 4 semanas (28 dias).

Os tratamentos testados (LF, BE e BEBA) durante o período de incubação do experimento promoveram diferença significativa no percentual de remoção dos O&G. O maior percentual de remoção no 3º dia foi promovido pelo tratamento BEBA (12,9%. dia⁻¹), seguido pelo BE (10,2%. dia⁻¹). No entanto, nas amostragens realizadas no 10º, 17º e 45º dias, o tratamento LF foi similar em termos de remoção de O&G ao BE e/ou ao tratamento BEBA, o que sugere pouca interferência dos incrementos introduzidos (nutrientes e microrganismos). A partir do 73º, o acréscimo de nutrientes e/ou microrganismos (BE e BEBA) voltou a apresentar melhor desempenho no percentual de remoção que o obtido no tratamento LF. Os resultados estão apresentados na Tabela 32 e estatisticamente correspondem ao 3º dia do experimento: ANOVA: $F = 84,840$; $p = 0,0023$; 10º dia: $F = 33,174$; $p = 0,0090$; 17º dia: $F = 676,043$; $p = 0,0001$; 24º dia: $F = 84,474$; $p = 0,0023$; 45º dia: $F = 30,462$; $p = 0,0102$; 73º dia: *Kruskal Wallis*, $H = 4,8$; $p = 0,0905$; 101º dia: $F = 16,914$; $p = 0,0232$; 129º dia: $F = 15,764$; $p = 0,0256$.

Esses percentuais de remoção apresentaram relação direta com os maiores crescimentos de bactérias e fungos, marcados pelo intervalo entre os 3º e 45º dias de incubação para os tratamentos testados. De acordo com a análise de variância, cada tratamento apresentou diferença entre o percentual de remoção dos O&G e os períodos de amostragens realizados ($p < 0,05$): LF (ANOVA: $F = 37,551$; $p = 0,0000$), BE (ANOVA: $F = 51,222$; $p = 0,0000$) e BEBA (ANOVA: $F = 486,731$; $p = 0,0000$). O maior percentual de remoção em LF ocorreu no 3º (4,4%. dia⁻¹), seguido pelo 10º dia (4,1%. dia⁻¹) de incubação e os menores no 101º e 73º. Em BE, os maiores percentuais também ocorreram especialmente no 3º dia (10,2%. dia⁻¹), seguido pelos 10º (4,9%. dia⁻¹) e 24º dias (4,0%. dia⁻¹) e os menores no 73º e 17º. No tratamento BEBA, a maior remoção ocorreu também especialmente no 3º (12,9%. dia⁻¹) e no 24º dias (5,5%. dia⁻¹) e o menor no 45º. Esses resultados são similares ao crescimento de fungos e bactérias durante 129 dias de incubação dos testes. A Figura 21 ilustra esses dados.

Esses altos níveis de remoção de O&G, provenientes da contaminação por óleo diesel, nas primeiras semanas de tratamentos são similares ao encontrado por outros autores. Bento *et al.* (2005) encontraram em seus estudos um aumento no número de microrganismos degradadores de óleo diesel nos primeiros setes dias e depois esses organismos especializados não sofreram mais aumento e se mantiveram ajustados para mudar as condições do substrato, aumentando sua atividade metabólica e, inclusive, interferindo no crescimento do restante da população microbiana (Devinny & Chong, 2000).

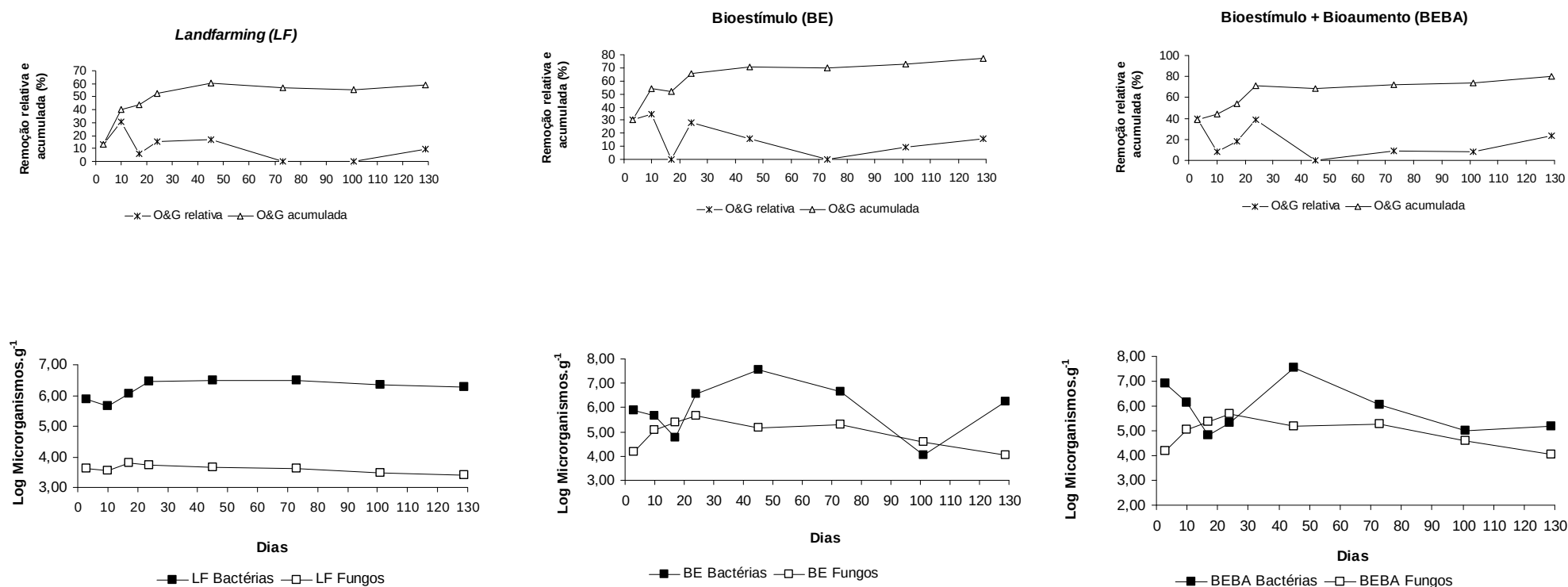


Figura 21. Relação entre a cinética de crescimento de bactérias e de fungos (log microrganismos.g⁻¹ de solo) e o percentual de remoção relativa e acumulada de O&G nos tratamentos LF, BE e BEBA durante os intervalos 0, 3º, 10º, 17º, 24º, 45º, 73º, 101º e 129º dias de incubação do experimento.

A Tabela 33 apresenta o percentual de remoção de O&G no solo contaminado com óleo diesel ressaltando a contribuição efetiva de cada incremento adotado no experimento. O percentual de degradação foi calculado descontando para cada tratamento o seu controle, através da seguinte expressão: % degradação = [(controle - tratamento)/controle]x100. O controle de BE (aeração + nutrientes) correspondeu a LF (aeração) e o controle de BEBA (aeração + nutrientes + microrganismos) adotado foi o tratamento BE (aeração + nutrientes). Foi testado também o tratamento BEBA (aeração + nutrientes + microrganismos) tendo como controle o LF (aeração).

Tabela 33. Percentual de remoção de O&G dos tratamentos em relação ao seu respectivo controle.

DIAS	BIOESTÍMULO Estímulo: nutrientes (BE - LF)	BIOAUMENTO Estímulo: microrganismos (BEBA - BE)	BIOESTÍMULO + BIOAUMENTO Estímulo: nutrientes + microrganismos (BEBA - LF)
3º	19,8 ± 1,0 AB	12,2 ± 2,0 B	29,6 ± 0,5 A
10º	23,5 ± 9,8 A	0,0 ± 0,0 B	0,0 ± 0,0 B
17º	14,7 ± 0,2 A	4,0 ± 0,1 B	18,1 ± 0,1 A
24º	27,2 ± 0,2 AB	18,2 ± 0,8 B	40,4 ± 0,7 A
45º	26,4 ± 5,2 A	0,0 ± 0,0 B	21,3 ± 8,8 A
73º	29,7 ± 4,2 A	6,9 ± 0,4 B	34,6 ± 3,6 A
101º	38,7 ± 2,1 A	5,1 ± 4,4 B	41,9 ± 0,7 A
129º	43,1 ± 3,0 A	13,9 ± 4,9 B	51,1 ± 0,2 A

NOTA: O percentual de degradação foi calculado através da seguinte expressão: % degradação = [(controle - tratamento)/controle]x100. O controle de BE corresponde a LF e de BEBA é representado pelo tratamento BE. Diferentes caracteres (A, B) na linha indicam que há diferença significativa entre os tratamentos testados (Teste de Tukey, p < 0,05).

De modo geral, a introdução de nutrientes se mostrou bastante promissora quando comparado ao tratamento somente com aeração. Apenas a introdução de microrganismos, não se mostrou muito eficiente a não ser nas semanas de significativos crescimentos destes (3º, 24º e 129º dia). Já a presença de nutrientes e microrganismos no solo contaminado com diesel permitiu um alto percentual de remoção na maioria dos dias de amostragem testados, mas estatisticamente é similar a remoção efetuada somente com nutrientes.

Os resultados de remoção de O&G obtidos ao final do presente estudo foram bem expressivos se comparado ao obtido por outros trabalhos. Cunningham *et al.* (2004), em seus estudos, observaram que solo contaminado com óleo diesel e tratado através de aeração com acréscimo de pó de serra, de bioestímulo (pó de serra e nutrientes) e de bioaumento (pó de serra, nutrientes e microrganismos) apresentou eficiência de remoção de O&G de 30%, 29% e 37%, respectivamente, após 32 dias do início do teste. No presente estudo, em um período de 24 dias e com acréscimo de nutrientes e microbiota adaptada foi obtido mais de 52% de

remoção no tratamento LF, 65% em BE e 72% em BEBA, o que sugere condições mais favoráveis de remoção desse parâmetro. No entanto, como já citado, vale outros fatores que não somente aqueles microbiológicos podem ter contribuído para essa redução efetiva (volatilização, oxidação, tempo de contaminação, etc.) (Baptista & Rizzo, 2005). A Figura 22 ilustra os percentuais alcançados no presente estudo.

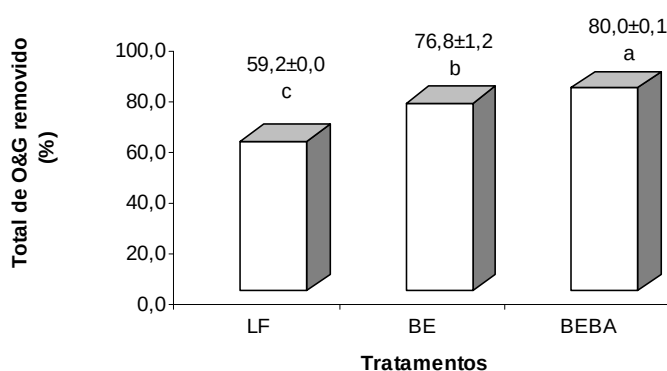


Figura 22. Eficiências de remoção de O&G (percentual) nos tratamentos adotados LF, BE e BEBA e os respectivos agrupamentos obtidos através do teste *Tukey*.

Estatisticamente, nos 129 dias de tratamento, a remoção de O&G promovida pelos tratamentos LF ($59,2 \pm 0,0\%$), BE ($74,1 \pm 0,5\%$) e BEBA ($80,0 \pm 0,0\%$) foi considerada diferente entre si (ANOVA: $F = 506,411$; $p = 0,0002$), com os maiores índices de remoção em BEBA.

Destaca-se, que já no 24º dia de experimento, os percentuais de remoção de O&G já foram expressivos, com todos os tratamentos diferentes entre si e com o acréscimo de microrganismos (BEBA) mais promissor: LF com $52,3 \pm 1,3\%$; BE = $65,2 \pm 0,9\%$ e BEBA = $71,6 \pm 0,4\%$ (ANOVA: $F = 219,609$; $p = 0,0006$).

Apesar de ter sido bem relatada na literatura como adequada a cinética de decaimento de 1º ordem para representar a degradação de petróleo (Jørgensen *et al.*, 2000; Gestel *et al.*, 2003), no presente estudo, o decaimento proveniente da remoção de O&G foi bem ajustado para o modelo de ordem zero (Figura 23 a, b, c). Desse modo, foi calculada a velocidade de degradação nos intervalos lineares, obtendo a cinética de remoção $K1$, correspondente ao primeiro intervalo entre o tempo 0 e o 24º dia, e a cinética de remoção $K2$, relativa ao segundo intervalo de remoção, do 24º dia ao final do experimento (129º dia).

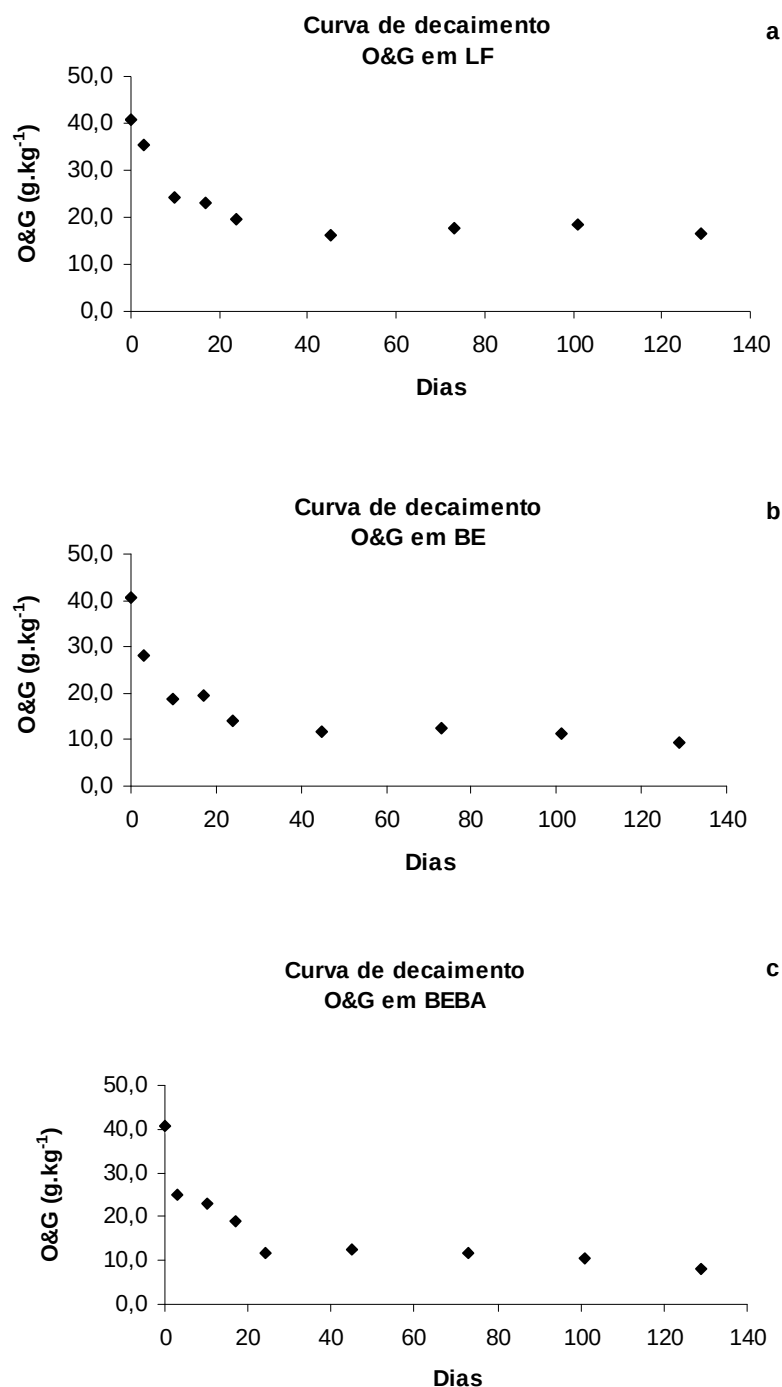


Figura 23 (a, b, c). Ajuste cinético de O&G nos tratamentos LF (a), BE (b) e BEBA (c) no tempo de incubação.

Os parâmetros cinéticos, baseados nesse modelo e apresentados na Tabela 34, indicam que a maior velocidade de remoção diária também ocorreu em BEBA ($K_1 = 1,2135 \text{ g.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$), seguido por BE ($K_1 = 1,1063 \text{ g.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) e por último LF ($K_1 = 0,8865 \text{ g.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$), no período referente a remoção mais rápida de O&G (ANOVA: $F = 219,609$; $p = 0,0006$). A

velocidade de remoção K_2 foi consideravelmente inferior a K_1 nos três tratamentos com BE ($K_2 = 0,0448 \text{ g.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) > BEBA ($K_2 = 0,0329 \text{ g.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) > LF ($K_2 = 0,0269 \text{ g.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$), mas sem diferença significativa entre si (ANOVA: $F = 5,355$; $p = 0,1024$).

Tabela 34. Velocidade de decaimento da remoção de O&G provenientes da contaminação do solo por óleo diesel nos diferentes tratamentos de biorremediação.

TRATAMENTOS	VELOCIDADE DE DECAIMENTO K_1 (g O&G.kg de solo ⁻¹ . dia ⁻¹)	VELOCIDADE DE DECAIMENTO K_2 (g O&G.kg de solo ⁻¹ . dia ⁻¹)
LF	$0,8865 \pm 0,0 \text{ C}$	$0,0269 \pm 0,0 \text{ a}$
BE	$1,1063 \pm 0,0 \text{ B}$	$0,0448 \pm 0,0 \text{ a}$
BEBA	$1,2135 \pm 0,0 \text{ A}$	$0,0329 \pm 0,0 \text{ a}$

NOTA: Diferentes caracteres (A, B, C, a) nas colunas indicam que há diferença significativa entre os tratamentos testados: letras maiúsculas para K_1 e minúsculas para K_2 (Teste de Tukey, $p < 0,05$). K_1 período compreendido entre 0 e o 24º dia e K_2 entre o 24º e 129º dia.

Esses resultados sugerem que a velocidade de decaimento de O&G, no primeiro intervalo de remoção (K_1), foi 19,9% maior em função do acréscimo de nutrientes (BE) do que no tratamento somente aeração (LF), e 27,1% maior em função do incremento de nutrientes mais microrganismos (BEBA) em relação também LF. Portanto, em K_1 foi possível observar que apenas 8% da remoção poderia ser atribuída aos microrganismos acrescentados a BEBA.

No segundo intervalo (K_2), o acréscimo de nutrientes (BE) e de nutrientes mais microrganismos (BEBA) foram responsáveis, respectivamente, por 39,9% e 18,1% da velocidade de remoção em relação à aeração (LF) e, desse modo, com BE superior 26,6% em relação a BEBA. Esse resultado sugere que em K_2 a presença de nutrientes foi mais importante para a remoção de O&G que os demais tratamentos.

5.2.2.2 Remoção de carbono orgânico (C_{org})

A Figura 24 ilustra a eficiência de remoção acumulada de C_{org} durante os dias de incubação do experimento. Percebe-se que não há claramente definido um patamar de estabilização do percentual de remoção do C_{org} .

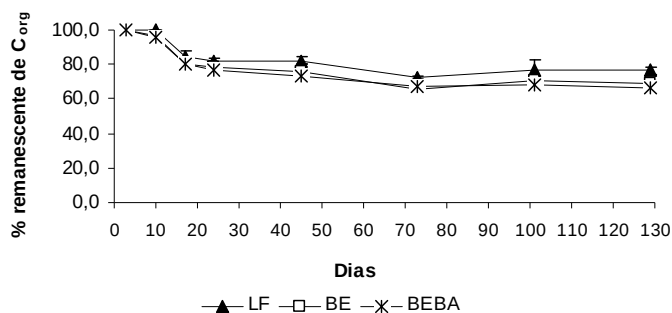


Figura 24. Eficiências de remoção de C_{org} nos tratamentos adotados (LF, BE e BEBA).

O percentual de remoção do C_{org} não foi marcadamente diferente entre os tratamentos de biodegradação utilizados no presente estudo. No final do período de incubação, a remoção nos tratamentos BE ($30,2 \pm 0,3\%$) foi considerada similar em termos estatísticos a BEBA ($34,4 \pm 2,1\%$) e também semelhante ao tratamento LF ($25,2 \pm 0,8\%$), o que implica de certo modo que, independentemente do tratamento utilizado, a redução de carbono ou da matéria orgânica foi praticamente equivalente (ANOVA: $F = 23,944$; $p = 0,0143$) (Figura 25).

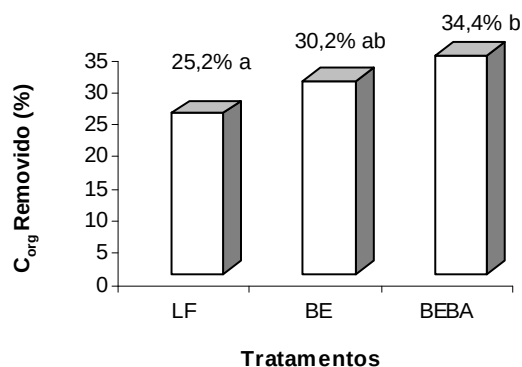


Figura 25. Eficiências de remoção do C_{org} (percentual) nos tratamentos adotados LF, BE e BEBA e os respectivos agrupamentos obtidos através do teste *Tukey*.

Em cada tratamento, por sua vez, houve diferença significativa na remoção de C_{org} entre os períodos amostrados: LF (ANOVA: $F = 212,456$; $p = 0,0000$), BE (ANOVA: $F = 25,599$; $p = 0,0001$) e em BEBA (*Kruskal Wallis*, $H = 10,9735$; $p = 0,1398$). Os maiores índices de remoção ocorreram entre o 10º e 17º dias para BE ($18 \pm 0,6\%$; $2,6\% \cdot \text{dia}^{-1}$), BEBA ($15,7 \pm 0,9$ $2,2\% \cdot \text{dia}^{-1}$) e LF ($2,1 \pm 1,1$; $2,6\% \cdot \text{dia}^{-1}$). O segundo maior intervalo de remoção relativa ocorreu

entre o 45º e 73º dias, para BE ($13 \pm 1,0$; $0,6\%.\text{dia}^{-1}$), LF ($11,5 \pm 0,1$; $0,5\%.\text{dia}^{-1}$) e BEBA ($8,4 \pm 0,4$; $0,4\%.\text{dia}^{-1}$) e os menores no dia 101 de incubação do experimento. A Figura 26 ilustra esses resultados.

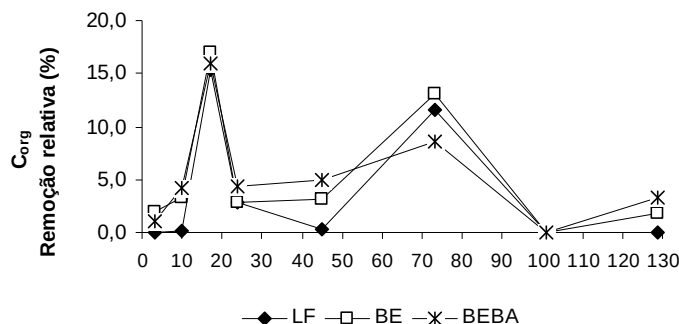


Figura 26. Remoção relativa do teor de C_{org} nos tratamentos testados ao longo do experimento.

A Figura 27 apresenta o ajuste linear obtido entre os valores médios de remoção de C_{org} e O&G durante o período de incubação. Os coeficientes de correlação foram maiores do que 0,87 e mostra uma relação linear entre esses parâmetros. No entanto, diferentemente do encontrado por Borges (2001), a eficiência de remoção de C_{org} (ou M.O.) observada não foi maior do que a de O&G. Isso se deve, provavelmente, aos processos envolvidos na remoção das frações supracitadas: o C_{org} é normalmente removido através da volatilização e da mineralização, enquanto que os O&G, além desses dois processos, podem também ser removidos por meio da humificação. O marcado crescimento da *UCM* (*Unresolved Complex Mixture*), ou seja, da mistura complexa não resolvida, apresentada na seção 5.2.2.3, reforça a hipótese de formação de compostos mais pesados, complexos e polares ao longo dos tratamentos propostos.

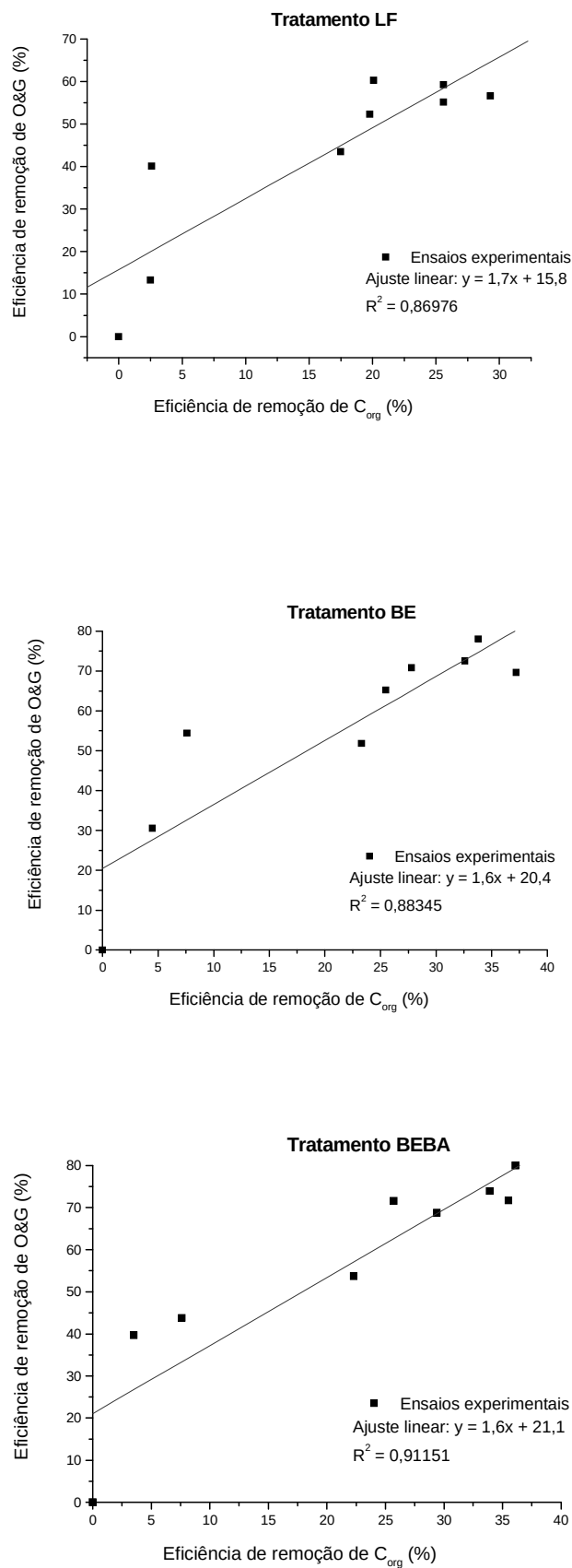


Figura 27. Relação entre eficiências de remoção de C_{org} e O&G para os tratamentos adotados LF, BE e BEBA.

5.2.2.3 Remoção dos hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs)

Os resultados referentes à remoção dos hidrocarbonetos poliaromáticos se encontram apresentados de duas maneiras: através da análise da remoção do somatório dos 16 HPAs prioritários (Σ HPAs) e por meio da análise individual dos poliaromáticos ao longo do tempo de inoculação do experimento.

A análise individual, por sua vez, foi abordada dando ênfase ao agrupamento dos HPAs tendo como base o número de anéis benzênicos (2, 3, 4, 5 e 6 anéis, Tabela 1). Esse arranjo partiu da premissa de que o número de anéis aromáticos é um dos principais indicativos da maior ou menor disponibilidade para remoção do composto poliaromático, seja promovido por fatores físicos (volatilização), químicos (foto-oxidação) ou microbiológicos (biodegradação) (Amellal *et al.*, 2001; Finotti *et al.*, 2001; Karthikeyan & Bhandari, 2001; Smith *et al.*, 2001; Zytner, 2002; U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2003; Brändli *et al.*, 2004; Oros & Ross, 2004; Potin *et al.*, 2004).

- Remoção dos HPAs totais (Σ HPAs)

Nesta fase é discutida a remoção da soma dos 16 HPAs (Σ HPAs) encontrados em cada tratamento estudado (LF, BE e BEBA), sendo comparados os resultados obtidos no início e no final do experimento. A Figura 28 apresenta a eficiência da remoção ao final dos 129 dias de incubação do solo contaminado com óleo diesel.

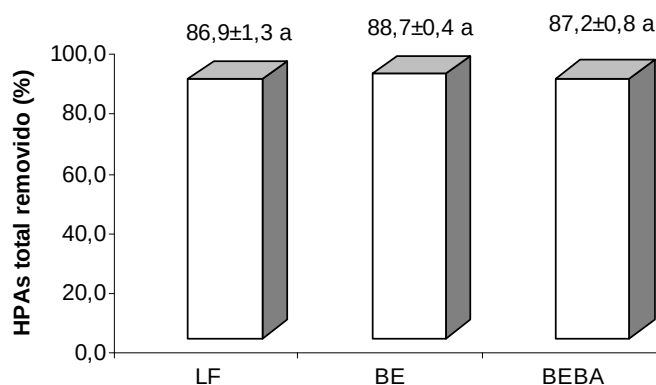


Figura 28. Eficiências de remoção em percentual cumulativo de degradação de HPAs nos tratamentos adotados LF, BE e BEBA ao final dos 129 dias de incubação e os respectivos agrupamentos obtidos através do teste *Tukey*.

A remoção do Σ HPAs ao final do experimento foi expressiva, apresentando um decréscimo da concentração estatisticamente similar nos três tratamentos avaliados ($p < 0,05$): LF com remoção de $89,9 \pm 1,3\%$; BE, de $88,7 \pm 0,4$ e BEBA de $87,2 \pm 0,8$ (ANOVA: $F = 2,140$; $p = 0,2645$). Desse modo, sugere-se que, de maneira geral, os tratamentos propostos não apresentaram diferença entre os incrementos adotados para a remoção do total dos 16 HPAs introduzidos no solo através da contaminação por óleo diesel.

Resultado similar na remoção de HPAs em solo contaminado por creosoto em 200 dias de experimento foi encontrado por Canals (2005). Em seus estudos, o percentual de remoção dos hidrocarbonetos poliaromáticos em solo somente com aeração (60%CC e aerado) foi de 87% e maior do que no solo bioestimulado com nutrientes (84%) e do que no solo com nutrientes acrescido de microrganismos (83%).

Ao longo do período de incubação do presente experimento, o comportamento cinético de remoção do Σ HPAs se mostrou similar ao encontrado na literatura para HCs de petróleo. De acordo com estudos, a cinética de biodegradação desses compostos apresentou um padrão identificado como do tipo “taco de hockey” (Canals, 2005). Esse padrão se caracteriza por uma remoção muito significativa na primeira fase seguida de uma diminuição da velocidade de remoção ao longo do tempo (Alexander, 1999; Canals, 2005). A Figura 29 ilustra o decaimento da concentração de Σ HPAs ao longo do período de incubação nos tratamentos estudados.

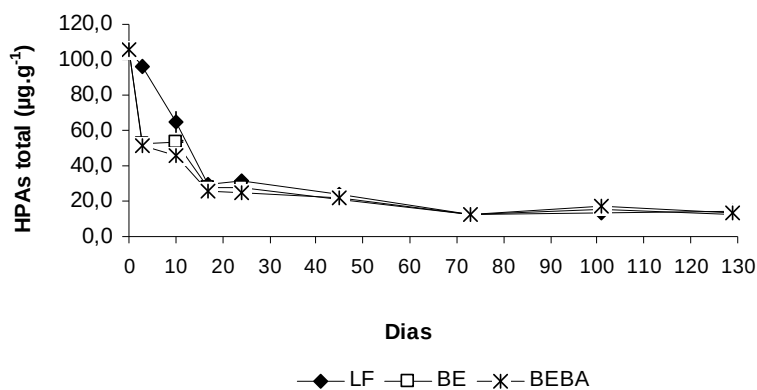


Figura 29. Remediação dos Σ HPAs (somatório dos 16 HPAs prioritários) nos tratamentos estudados (LF, BE e BEBA).

Canals (2005) observou, em seus estudos, nos primeiros 45 dias de incubação, uma queda substancial, seguida por um consumo mais lento, da concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTPs) e de HPAs em solo contaminado com creosoto e sujeito a

tratamentos semelhantes ao adotado na presente pesquisa (*landfarming*, bioestímulo, bioaumento, entre outros).

No presente trabalho, como pode ser observado na Figura 29, até o 17º dia do experimento foi observada uma efetiva remoção dos HPAs provenientes do óleo diesel e sem diferença significativa entre os tratamentos: LF com remoção de $71,8\% \pm 2,1$; BE, de $74,0 \pm 2,2\%$ e BEBA de $75,4 \pm 0,9\%$ (ANOVA: $F = 1,884$; $p = 0,2952$). No período subsequente, até o final do experimento, houve uma tendência de equilíbrio no percentual de remoção. Diferentes modelos para identificação do comportamento cinético foram testados, no entanto, estes não representaram adequadamente os dados experimentais. Desse modo, para permitir comparação entre as velocidades de remoção alcançadas por cada tratamento, foi calculada a velocidade de decaimento na fração linear de cada um deles ($\Delta C/\Delta t$), semelhante ao comportamento cinético de ordem zero.

A Tabela 35 apresenta a velocidade de decaimento referente à variação da concentração no início do experimento ao 17º dia, identificada pela cinética de remoção de ordem zero K_1 , e do 17º dia ao final do experimento (129º dia), identificada pela cinética K_2 .

Tabela 35. Velocidade de decaimento da remoção dos ΣHPAs provenientes da contaminação do solo por óleo diesel nos diferentes tratamentos de biorremediação.

TRATAMENTOS	VELOCIDADE DE DECAIMENTO K_1 ($\mu\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)	VELOCIDADE DE DECAIMENTO K_2 ($\mu\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)
LF	$4,4847 \pm 0,1 \text{ A}$	$0,1432 \pm 0,0 \text{ a}$
BE	$4,6206 \pm 0,1 \text{ A}$	$0,1391 \pm 0,0 \text{ a}$
BEBA	$4,7062 \pm 0,1 \text{ A}$	$0,1117 \pm 0,0 \text{ a}$

NOTA: Diferentes caracteres (A, a) nas colunas indicam que há diferença significativa entre os tratamentos testados: letras maiúsculas para K_1 e minúsculas para K_2 (Teste de Tukey, $p < 0,05$). K_1 período compreendido entre 0 e o 17º dia e K_2 entre o 17º e 129º dia.

Os resultados obtidos indicaram que a velocidade de decaimento no primeiro intervalo de remoção dos HPAs (K_1) apresentou o tratamento com nutrientes e microrganismos (BEBA) com velocidade de remoção ligeiramente superior ao tratamento somente com nutrientes (BE) e estes ligeiramente superiores ao tratamento somente por aeração (LF). No segundo intervalo de remoção (K_2), a velocidade em LF se mostrou ligeiramente maior que em BE e ambos maiores do que em BEBA, o que teria permitido a semelhança de remoção entre os tratamentos ao final do experimento.

Estatisticamente, assim como o percentual de remoção no fim do experimento, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os parâmetros cinéticos de ordem zero K_1 e K_2

nos três tratamentos observados. Em K1, de acordo com a ANOVA ($p < 0,05$), $F = 1,884$, $p = 0,2952$ e K2, $F = 1,046$, $p = 0,4523$, sugere-se, mais uma vez, que para a remoção do ΣHPAs não houve interferência no tipo de incremento adotado nos diferentes tratamentos. Esse comportamento similar entre os tratamentos e a remoção um pouco mais rápida em BEBA pode estar atrelada a diferença de biomassa e não em decorrência da especificidade do inóculo.

Um aspecto importante observado no presente resultado é a diferença marcante entre a velocidade de decaimento alcançada no primeiro momento (K1) e no segundo intervalo de tempo (K2) para todos os tratamentos. A velocidade de remoção alcançada nos primeiros 17 dias de incubação foi de 96,8, 97,0 e 97,6% superiores que nos 112 dias seguintes para LF, BE e BEBA, respectivamente. Este comportamento poderia ser atribuído a diversos fatores como: (i) diminuição da biodisponibilidade dos HPAs ao longo do período de tratamento (Amellal *et al.*, 2004; Rizzo *et al.*, 2003), (ii) acumulação de HPAs intermediários tóxicos (Balba *et al.*, 1998; Barahona *et al.*, 2004), (iii) aumento na presença de compostos mais recalcitrantes (Song *et al.*, 1990), e (iv) modificação da diversidade microbiana (Canals, 2005).

Analisando os tratamentos nos intervalos de amostragem, por sua vez, é possível inferir algumas dessas possíveis explicações para o comportamento cinético e observar diferença na eficiência destes. O efeito dos tratamentos sobre o percentual de degradação relativa dos HPAs a cada intervalo de amostragem está apresentado na Tabela 36.

Tabela 36. Percentual de remoção relativa de HPAs presente no solo contaminado com óleo diesel.

DIAS	LANDFARMING	BIOESTÍMULO	BIOESTÍMULO + BIOAUMENTO
0 - 3º	9,0 ± 1,9 B (3,0)	50,7 ± 2,6 A (16,9)	51,9 ± 0,2 A (17,3)
3 - 10º	32,9 ± 4,4 A (4,7)	0,0 ± 0,0 C (0,0)	10,7 ± 0,8 B (1,5)
10 - 17º	53,9 ± 0,5 A (7,7)	48,7 ± 3,8 A (7,0)	42,6 ± 2,9 A (6,0)
17 - 24º	0,0 ± 0,0 A (0,0)	2,0 ± 2,0 A (0,3)	5,9 ± 0,6 A (0,8)
24 - 45º *	23,9 ± 0,3 A (1,1)	24,4 ± 1,1 A (1,2)	9,5 ± 3,2 B (0,5)
45 - 73º	48,1 ± 7,8 A (1,7)	41,7 ± 4,7 A (1,5)	43,3 ± 4,3 A (1,5)
73 - 101º	0,0 ± 0,0 A (0,0)	0,0 ± 0,0 A (0,0)	0,0 ± 0,0 A (0,0)
101 - 129º	0,0 ± 0,0 B (0,0)	19,3 ± 7,0 A (0,7)	20,4 ± 2,1 A (0,7)

NOTA: O percentual de degradação relativa foi calculado através da seguinte expressão: % degradação = [(concentração subsequente – concentração anterior) x 100/concentração anterior]. Diferentes caracteres (A, B, C) na linha indicam que há diferença significativa entre os tratamentos testados (Teste de Tukey, $p < 0,05$). Os valores entre parênteses correspondem ao percentual de remoção dividido pelo número de dias do intervalo. Dias em negrito corresponde ao dia de amostragem. (*) – ajuste do pH dos tratamentos para 7,0 no 28º dia de incubação.

Os tratamentos testados (LF, BE e BEBA) promoveram diferença significativa no percentual de remoção dos ΣHPAs durante os intervalos do período de incubação do experimento. Como pode ser observado, a adição de nutrientes (BE) e nutrientes mais microrganismos (BEBA) se mostraram mais eficientes na remoção de HPAs do que apenas o processo de aeração do solo contaminado com óleo diesel (LF) logo nos primeiros três dias de incubação (entre 0 e 3º dia). No caso específico do tratamento LF foi necessária pouco mais de uma semana (10º dia) até que a eficiência de remoção se equiparasse aos demais tratamentos ($4,7\%.\text{dia}^{-1}$ de remoção) (Tabela 36). Comportamento similar foi observado por Bento *et al.* (2005) em solo contaminado com diesel sob atenuação natural.

Segundo estudos, esse comportamento de remoção mais marcante de HPAs nas semanas iniciais dos tratamentos é interpretado pelos autores como decorrente, especialmente, da facilidade de volatilização e de biodegradação das frações mais leves dos poliaromáticos, ou seja, com menor número de anéis benzênicos (Bento *et al.*, 2003, 2005; Canals, 2005).

A partir do 10º dia de incubação, o tratamento LF foi similar, em termos de remoção dos poliaromáticos, aos tratamentos BE e/ou BEBA, o que sugere pouca interferência dos incrementos introduzidos (nutrientes e microrganismos) a partir do período citado. Somente no 129º dia, o acréscimo de nutrientes e/ou microrganismos (BE e BEBA) volta a apresentar melhor desempenho no percentual de remoção que o obtido no tratamento LF.

Esse comportamento de remoção mais significativo dos tratamentos BE e BEBA em relação ao LF nas primeiras semanas de incubação e posterior semelhança entre os percentuais de remoção dos três tratamentos até o último intervalo de amostragem (101 – 129º dia) foi muito similar ao observado nos percentuais de remoção de O&G do presente estudo (Tabela 32).

Assim como nos O&G, esses percentuais de remoção apresentaram relação direta com os maiores índices de crescimento de bactérias e fungos, marcados pelo intervalo entre o 3º e 45º dias (Figuras 15 e 16). No entanto, é preciso ressaltar que há importantes percentuais de remoção também nos intervalos de amostragem com números não muito expressivos de crescimento dos microrganismos (entre o 45º e o 73º dias). Provavelmente, esses percentuais nesses períodos estão atrelados à presença mais marcante de microrganismos adaptados a degradação desses compostos complexos. Microrganismos, especialmente, os autóctones e com arcabouço para degradação de contaminantes tendem a se tornar mais aptos à condição imposta e, por isso, dominantes em determinadas etapas do processo, conseqüentemente, aumentando a atividade de degradação nessa fase (Balba *et al.*, 1998; Amellal *et al.*, 2001; Bento *et al.*, 2003; Bento, 2005; Canals, 2005).

No período compreendido entre as amostragens do 17º e 24º dias houve uma redução significativa no percentual de remoção de HPAs para todos os tratamentos estudados (Tabela 36). Sugere-se, como explicação para esse fato, a produção de metabólitos intermediários como resultado do processo de degradação das frações do diesel e o período necessário para readaptação dos microrganismos degradadores de HPAs (Cerniglia, 1984; Balba *et al.*, 1998;

Bento *et al.*, 2003). É possível que no intervalo do 73º e 101º dias também tenha ocorrido fato similar, uma vez que no período subsequente há um aumento no percentual de remoção nos tratamentos BE e BEBA.

Resultados similares foram observados por Bento *et al.* (2003). Segundo estes autores, em seus estudos com solo contaminado por óleo diesel, o maior percentual de remoção ocorreu na primeira semana de tratamento (7 dias), com significativos índices de microrganismos degradadores de diesel, e começou a decrescer também na segunda semana (15º dia). Ainda, de acordo com os resultados observados por Bento *et al.* (2003), em função da remoção dos HCs mais leves, e, portanto, mais rapidamente degradados, as populações microbianas foram forçadas a usar os HCs mais recalcitrantes de modo menos eficiente, provavelmente os aromáticos de alto peso molecular, reduzindo assim os índices de remoção.

Os resultados apresentados na Tabela 36 correspondem estatisticamente ao 3º dia: $F = 350,854$; $p = 0,0003$; no 10º dia: $F = 74,968$; $p = 0,0027$; no 17º dia: $F = 8,385$; $p = 0,0591$; no 24º dia: $F = 6,231$; $p = 0,0855$; no 45º dia: $F = 37,652$; $p = 0,0075$; no 73º dia: $F = 0,659$; $p = 0,5792$; no 101º dia: *Kruskal Wallis*, $H = 1,0000$, $p = 0,6065$; no 129º dia: $F = 14,707$; $p = 0,0282$.

A análise dos cromatogramas obtidos nos períodos de amostragem dos tratamentos permitiu verificar qualitativamente os níveis de degradação dos HPAs. A formação da *UCM* (*Unresolved Complex Mixture*), ou seja, da mistura complexa não resolvida, observada nos cromatogramas é fator indicativo da existência efetiva de degradação. Óleos em fase avançada de degradação apresentam cromatogramas com essa conformação em função da perda de alcanos lineares e outros componentes voláteis, ficando assim as frações mais pesadas e produtos da degradação (Araújo & Azevedo, 2004).

A Figura 30 apresenta os perfis cromatográficos (GC-MS) dos tratamentos estudados (LF, BE e BEBA) do 3º e do último dia de incubação (129 dias). Percebe-se, claramente, nessas ilustrações a evolução da degradação nesse intervalo de tempo e a semelhança mais marcante entre os perfis obtidos em BE e BEBA no 129º dia.

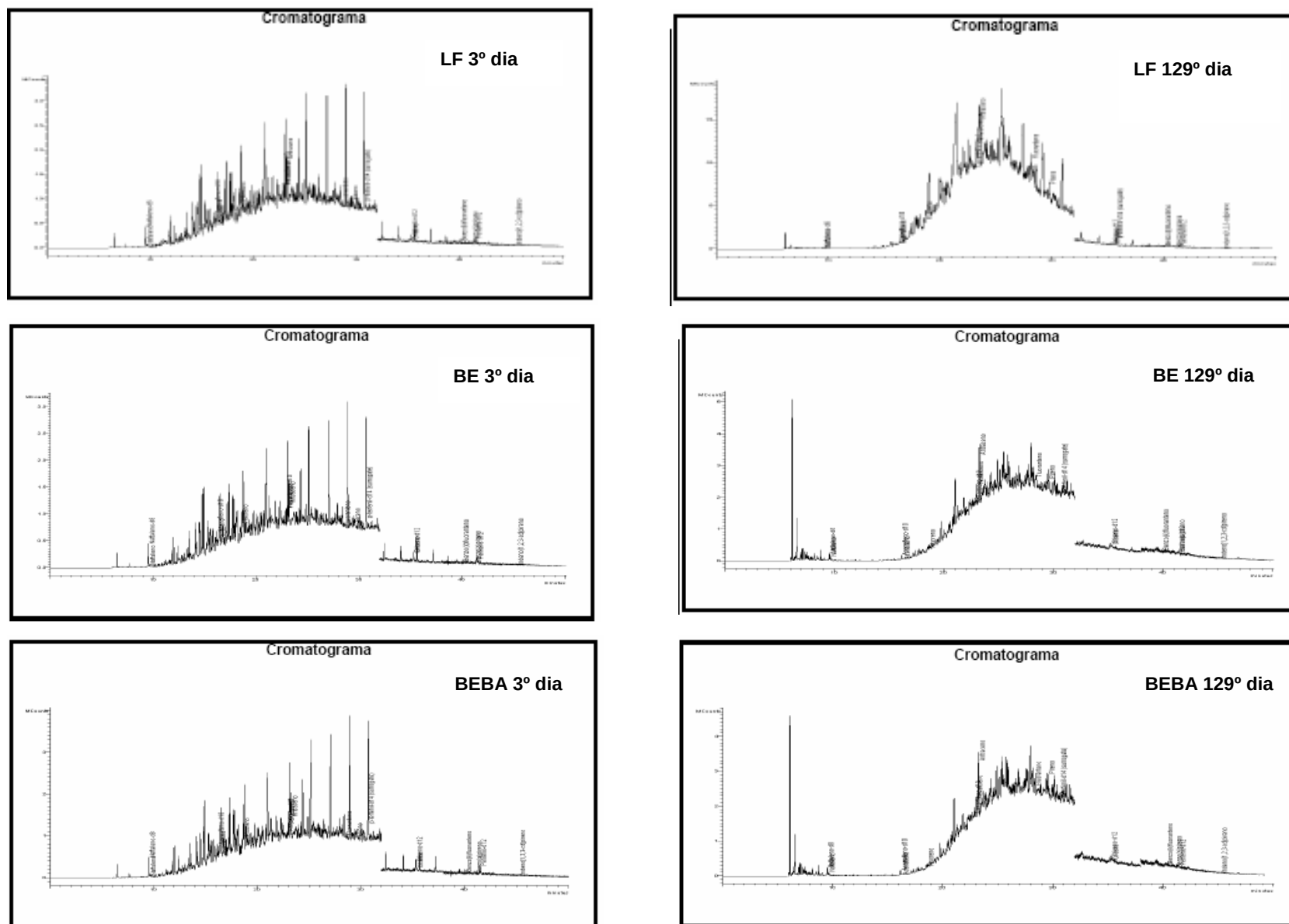


Figura 30. Perfis cromatográficos dos HPAs do solo contaminado com óleo diesel nos tratamentos LF, BE e BEBA no 3° e 129° dias.

- Remoção dos HPAs individuais

A Tabela 37 apresenta o percentual de remoção equivalente à concentração inicial e final de cada HPA nos diferentes tratamentos. Todos os tratamentos estudados (LF, BE e BEBA) apresentaram, nos 129 dias de incubação, altos índices de remoção dos HPAs individuais. Destaca-se que o acenaftileno (ACY), benzo(a)antraceno (BaA), benzo(b)fluoranteno (BbF), dibenzo(a,h)antraceno (DBA) e o benzo(g,h,i)perileno (BGP) não foram detectados no solo contaminado por óleo diesel no presente estudo, portanto, na sequência, estão discutidos onze dos dezesseis HPAs prioritários abordados.

Tabela 37. Percentual de remoção dos HPAs presente no solo contaminado com óleo diesel diante dos diferentes tratamentos adotados nos 129 dias de incubação.

HPAS	SIGLAS	NÚMERO DE ANÉIS	LANDFARMING	BIOESTÍMULO	BIOESTÍMULO + BIOAUMENTO
Naftaleno	NAP	2	100 ± 0,0 Aa	100,0 ± 0,0 Aa	100,0 ± 0,0 Aa
Acenaftileno	ACY	2	ND	ND	ND
Acenafteno	ACE	2	99,2 ± 0,1 Ba	100,00 ± 0,0 Aa	100,00 ± 0,0 Aa
Fluoreno	FLU	2	94,6 ± 0,9 Babcd	98,2 ± 0,0 Aa	98,3 ± 0,2 Aab
Fenantreno	PHE	3	79,6 ± 2,6 Be	87,4 ± 0,5 Abc	88,3 ± 0,3 Ab
Antraceno	ANT	3	87,6 ± 1,7 Ad	75,4 ± 4,0 Ad	75,0 ± 4,9 Ac
Fluoranteno	FLT	3	87,3 ± 0,4 Ad	85,4 ± 3,5 Abc	88,6 ± 1,1 Aab
Pireno	PYR	4	90,3 ± 0,4 Abcd	82,1 ± 0,1 Bcd	72,7 ± 1,9 Cc
Benzo(a)antraceno	BaA	4	ND	ND	ND
Criseno	CHR	4	89,0 ± 1,9 Acd	81,4 ± 0,3 Bcd	74,2 ± 1,1 Cc
Benzo(b)fluoranteno	BbF	4	ND	ND	ND
Benzo(k)fluoranteno	BkF	4	90,5 ± 2,5 Abcd	93,4 ± 1,3 Aab	73,9 ± 7,8 Bc
Benzo(a)pireno	BaP	5	90,9 ± 2,0 ABbcd	83,2 ± 4,1 Bcd	95,1 ± 0,1 Aab
Indeno(1,2,3-cd)pireno	IND	5	95,2 ± 1,0 Aab	92,8 ± 0,0 Aab	93,9 ± 1,9 Aab
Dibenzo(a,h)antraceno	DBA	5	ND	ND	ND
Benzo(g,h,i)perileno	DGP	6	ND	ND	ND

NOTA: Diferentes caracteres (A, B, C, D, a, b, c, d) na linha indicam que há diferença significativa entre os tratamentos testados (letras maiúsculas) e entre os HPAs (letras minúsculas) (Teste de Tukey, $p < 0,05$). ND – não detectado.

De acordo com o percentual de remoção dos HPAs individuais no solo contaminado com óleo diesel, ao final do período de incubação, a maioria (sete HPAs dos onze identificados) apresentou diferença quanto ao tratamento adotado. Esse resultado demonstra a interferência do tipo de tratamento adotado no percentual de remoção dos HPAs individualmente. A exceção se deu para o naftaleno (NAP), antraceno (ANT), fluoranteno (FLT) e indeno(1,2,3-cd)pireno (IND).

A presença de nutrientes (BE) e de nutrientes acrescido de microrganismos (BEBA), como incremento para remediação dos HPAs provenientes da contaminação do solo por óleo diesel, mostrou-se similar e mais promissor do que o percentual de remoção na presença

exclusiva da aeração (LF): acenafteno (ACE), *Kruskal Wallis*, $H = 4,8$, $p = 0,0907$; fluoreno (FLU), $F = 29,558$, $p = 0,0106$ e fenantreno (PHE), $F = 19,906$, $p = 0,0185$. O tratamento BEBA se mostrou mais eficiente na remoção do benzo(a)pireno (BaP), seguido pelo tratamento LF e BE ($F = 10,353$, $p = 0,0450$).

O benzo(k)fluoranteno (BKF), por sua vez, apresentou maior eficiência de remoção nos tratamentos LF e BE do que no tratamento BEBA ($F = 9,743$, $p = 0,0487$). O pireno (PYR) e o criseno (CHR) apresentaram diferença na capacidade de remoção para os três tratamentos diferentes, com a seguinte ordem de melhor remoção: LF > BE > BEBA (PYR, $F = 119,481$, $p = 0,0014$; CHR, $F = 70,273$, $p = 0,0030$).

De acordo com esses resultados, os HPAs com 2 e 3 anéis aromáticos (ACE, FLU e PHE) foram mais facilmente degradados na presença de incrementos com nutrientes (BE) e nutrientes mais microrganismos (BEBA) do que apenas a aeração (LF) para o tratamento do solo contaminado com óleo diesel. O antraceno (ANT) e o fluoranteno (FLT), também com três anéis, foram igualmente removidos pelos três tratamentos testados.

Os HPAs com 4 anéis aromáticos, por sua vez, apresentaram degradação mais eficiente a partir da aeração (LF), no caso do pireno (PYR) e do criseno (CHR), ou a partir da adição de nutrientes (BE), no caso específico do benzo(k)fluoranteno (BKF).

Canals (2005), em seus estudos, também identificou resultados variados nos níveis de remoção dos HPAs individuais em relação aos incrementos introduzidos (tratamentos), com resultados significativos especialmente na presença de aeração. Após 200 dias de tratamento de solo contaminado por creosoto e com tratamentos similares ao da presente pesquisa (semelhante à LF, BE e BEBA), este autor observou, para o acenafteno (ACE), fluoreno (FLU), fenantreno (PHE), antraceno (ANT) e fluoranteno (FLT), que os percentuais de remoção foram independentes do tratamento adotado. Ou seja, que os tratamentos LF, BE e BEBA foram igualmente responsáveis pela remoção desses compostos. E, para os HPAs com maior número de anéis aromáticos como, por exemplo, para o pireno (PYR), o tratamento BE foi mais promissor; para o benzo(a)antraceno (BaA) e o criseno (CHR) foi observado que o maior percentual de remoção foi proporcionado pelo tratamento LF.

Alguns aspectos podem ser considerados como indicativos desse comportamento. No caso dos HPAs mais leves (dois e três anéis aromáticos), a presença marcante de uma microbiota nativa do solo capaz de degradar HCs, como observada no presente estudo (Seção 5.1.4), e o estímulo promovido pela adição de nutrientes e de microrganismos adaptados ao óleo diesel (BE e BEBA), pode ter incentivado a uma degradação mais efetiva desses HCs por esses tratamentos. Como citado anteriormente, vários autores destacam que a microbiota adaptada e em condições ótimas tende a degradar e de modo muito eficiente, inicialmente os HCs mais leves e só então podem fazer uso dos demais (Leahy & Colweel, 1990; Balba *et al.*, 1998; Amellal *et al.*, 2001; Bento *et al.*, 2003).

No entanto, esse procedimento tende a provocar a produção de intermediários tóxicos que podem reduzir ou inibir a atividade de microrganismos degradadores de HCs, também como já citado. Barahona *et al.* (2004) observaram que em um solo contaminado com óleo

diesel, na mesma proporção do presente estudo (40 g.kg^{-1}), foi detectado um aumento inicial de microrganismos heterotróficos e degradadores de HCs, possivelmente, em função do bioestímulo, contribuindo para que as populações adaptadas predominassem no meio reduzindo a concentração de óleo diesel. Entretanto, esses resultados também apresentaram queda nesses parâmetros biológicos com 55 dias de experimento, provavelmente, pela redução dos nutrientes e pela produção de efeitos tóxicos.

Desse modo, o tratamento LF pode passar a apresentar condições significativamente mais favoráveis na manutenção do processo degradativo, inclusive, dos poliaromáticos com maior número de anéis benzênicos, e tornar-se tão eficiente, para alguns HPAs individuais, quanto os demais tratamentos. Além disso, vários relatos têm indicado que o sucesso no uso da técnica de bioaumento em ambientes contaminados pode ser irrelevante onde já se estabeleceu o equilíbrio e a microbiota já se encontra adaptada. Segundo esses estudos, tanto o bioaumento quanto o bioestímulo, podem não acarretar aumento nas taxas de biodegradação (Atlas, 1995a; Ghazali *et al.*, 2004; Rizzo *et al.*, 2003).

Segundo estudos, o *landfarming* (LF) é um efetivo processo de remediação para HPAs voláteis como o naftaleno (NAP), acenafteno (ACE) e acenaftileno (ACY) e, por certa extensão, também para o fluoreno (FLU), fenantreno (PHE) e antraceno (ANT) que, apesar de não voláteis, são sujeitos à fotooxidação. Esse tratamento pode ainda apresentar resultados favoráveis para hidrocarbonetos poliaromáticos maiores, uma vez que a aeração favorece o crescimento da microbiota nativa (Balba *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2004).

A Figura 31 (a, b) ilustra o comportamento de remoção dos HPAs individualmente. É possível observar que na maioria dos poliaromáticos há uma redução crescente e bem marcada em suas concentrações até o 17º dia de incubação e mais gradativa nos dias subseqüentes. Como já citado anteriormente, o comportamento é conhecido como “taco de hockey” (Alexander, 1999; Canals, 2005).

Não foi possível quantificar a velocidade de decaimento de todos os HPAs estudados e/ou em todos os três tratamentos testados (LF, BE e BEBA). Os poliaromáticos fenantreno (PHE), antraceno (ANT), fluoranteno (FLT), pireno (PYR) e benzo(a)pireno (BaP), apresentaram oscilação na concentração, não apresentando um padrão de comportamento linear. No 10º dia de experimento, os HPAs apresentaram concentração mais elevada que o 3º dia e menor que o 17º dia, o que não permitiu uma interpretação segura dos resultados. A oscilação observada na concentração dos HPAs ao longo dos tratamentos é esperada, visto que esta também é uma função de fenômenos de sorção e dessorção, além de refletir a heterogeneidade do próprio solo.

O naftaleno (NAP), criseno (CHR), benzo(k)fluoranteno (BKF) e o indeno(1,2,3-cd)pireno (IND) foram removidos em quase sua totalidade no primeiro intervalo de maior velocidade de remoção (K_1), desse modo, não foi quantificada a velocidade de degradação K_2 para esses compostos.

A Tabela 38 apresenta a velocidade de decaimento dos HPAs individualmente.

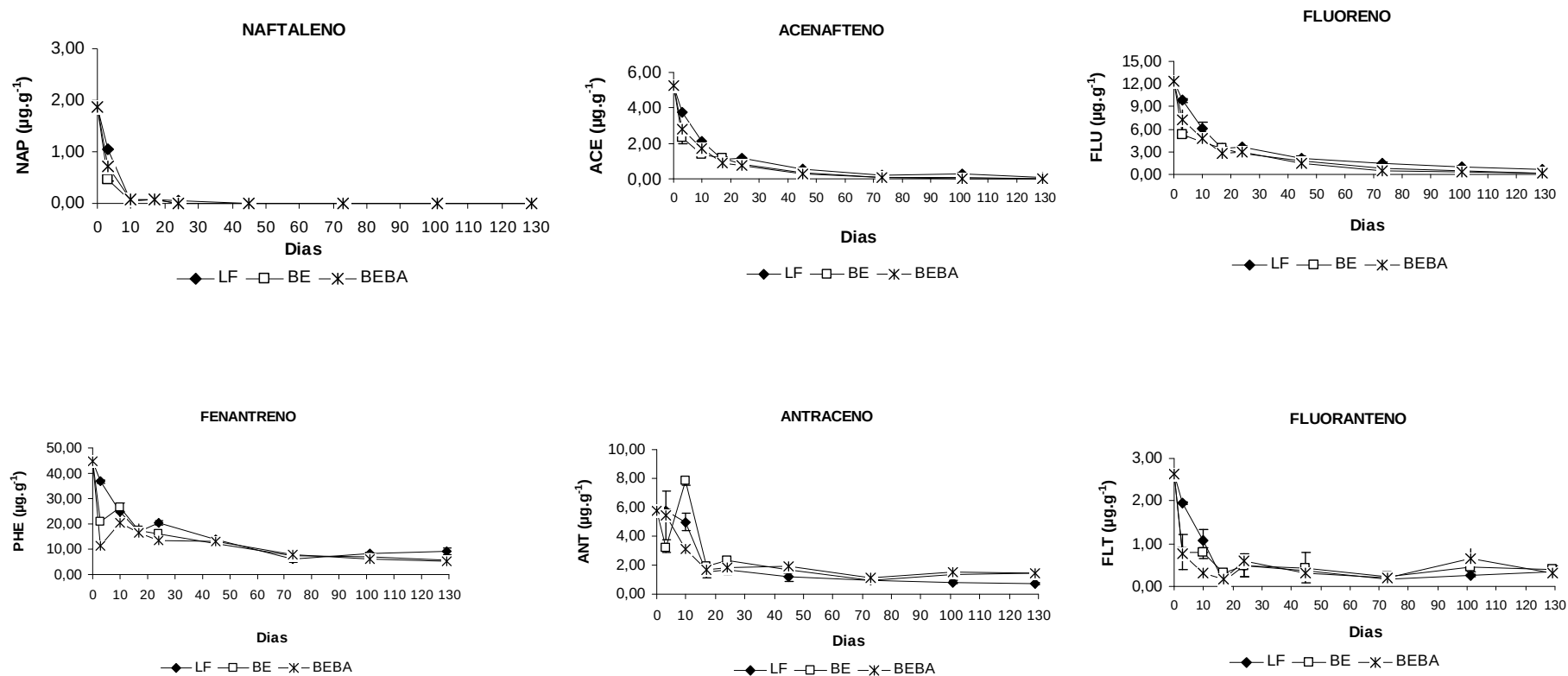


Figura 31a. Evolução da concentração de HPAs durante os 129 dias de incubação nos tratamentos LF, BE e BEBA.

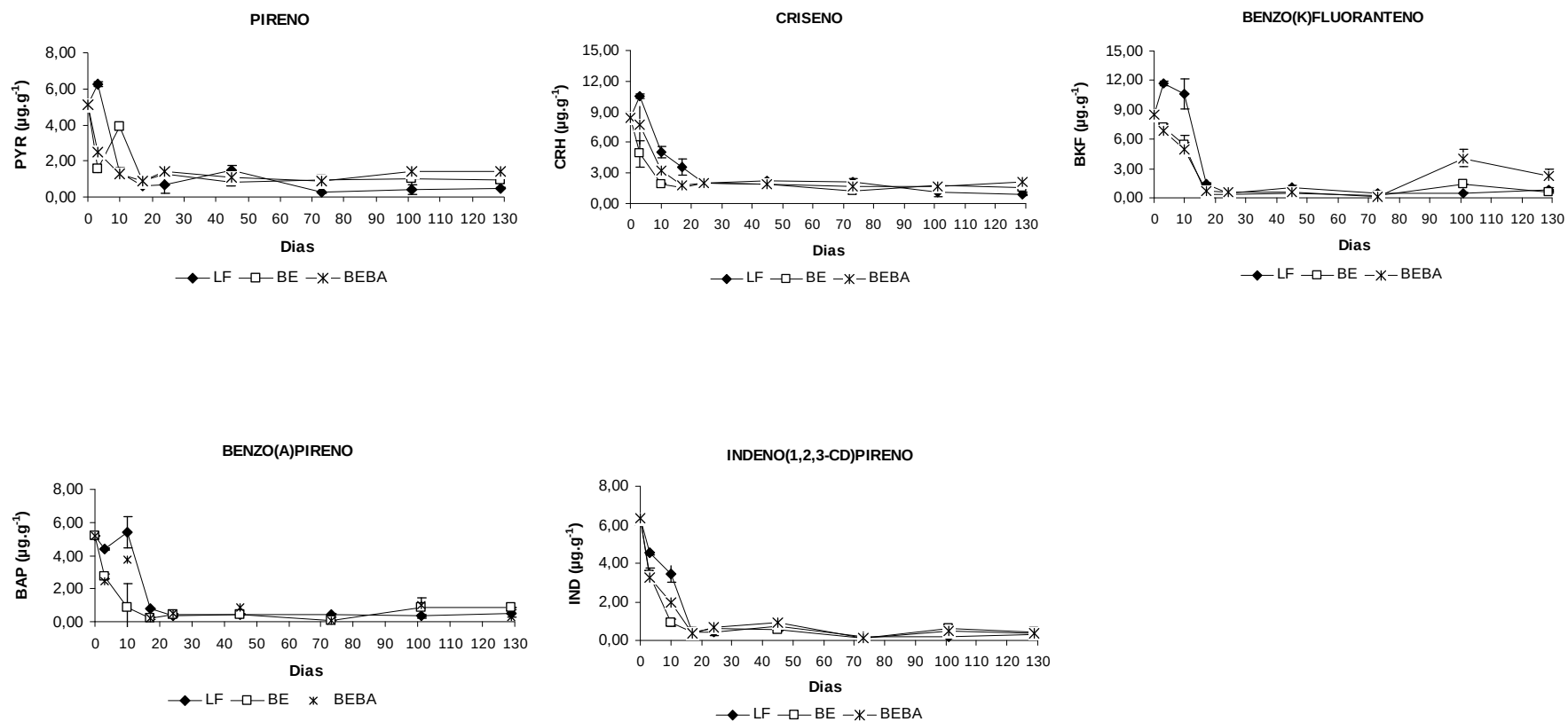


Figura 31b. Evolução da concentração de HPAs durante os 129 dias de incubação nos tratamentos LF, BE e BEBA.

Tabela 38. Velocidade de decaimento da remoção dos HPAs individuais provenientes da contaminação do solo por óleo diesel nos diferentes tratamentos de biorremediação.

HPAS	SIGLA	NÚMERO DE ANÉIS	LANDFARMING (LF)		BIOESTÍMULO (BE)		BIOESTÍMULO + BIOAUMENTO (BEBA)	
			K1	K2	K1	K2	K1	K2
Naftaleno	NAP	2	0,1053 ± 0,0 A	-	0,1062 ± 0,0 A	-	0,1053 ± 0,0 A	-
Acenafteno	ACE	2	0,2465 ± 0,0 A	0,0092 ± 0,0 a	0,2403 ± 0,0 A	0,0106 ± 0,0 a	0,2562 ± 0,0 A	0,0082 ± 0,0 a
Fluoreno	FLU	2	0,5182 ± 0,0 B	0,0254 ± 0,0 a	0,5241 ± 0,0 B	0,0285 ± 0,0 a	0,5553 ± 0,0 A	0,0238 ± 0,0 a
Fenantreno	PHE	3	1,6379 ± 0,1	0,0690 ± 0,0	NPQ	NPQ	NPQ	NPQ
Antraceno	ANT	3	NPQ	NPQ	NPQ	NPQ	0,2409 ± 0,0	0,0022 ± 0,0
Fluoranteno	FLT	3	0,1485 ± 0,0	0,0021 ± 0,0	NPQ	NPQ	NPQ	NPQ
Pireno	PYR	4	NPQ	NPQ	NPQ	NPQ	0,2503 ± 0,0	0,0048 ± 0,0
Criseno	CHR	4	NPQ	NPQ	0,4044 ± 0,0 A	-	0,3900 ± 0,0 A	-
Benzo(k)fluoranteno	BkF	4	NPQ	NPQ	0,4800 ± 0,0 A	-	0,4574 ± 0,0 B	-
Benzo(a)pireno	BaP	5	NPQ	NPQ	0,2932 ± 0,0	0,0059 ± 0,0	NPQ	NPQ
Indeno(1,2,3-cd)pireno	IND	5	0,3491 ± 0,0 B	0,0011 ± 0,0	0,3503 ± 0,0 AB	-	0,3526 ± 0,0 A	-

NOTA: Diferentes caracteres (A, B) nas colunas indicam que há diferença significativa entre os tratamentos testados: letras maiúsculas para K1 e minúsculas para K2 (Teste de Tukey, $p < 0,05$). K1 período compreendido entre 0 e o 17º dia e K2 entre o 17º e 129º dia. NPQ – não foi possível quantificar. (-) velocidade não quantificada em função de a remoção total ter ocorrido no período compreendido entre 0 e o 17º dias (K1).

O naftaleno (NAP) e acenafteno (ACE), HPAs com dois anéis aromáticos, foram completamente degradados nos primeiros 17 dias de incubação (K1) com a mesma velocidade de remoção em todos os tratamentos (NAP, ANOVA: $F = 1,000$, $p = 0,4648$; ACE, ANOVA: $F = 3,260$, $p = 0,1769$).

O naftaleno, como esperado, apresentou o maior percentual de remoção para todos os tratamentos estudados (Tabela 37). Isso decorre da alta volatilidade característica desse poliaromático. Este HPA apresenta menor ponto de ebulição, atingindo o estado gasoso somente a 218°C e tempo de vida médio de 70 dias em solo (Tabela 15). Além disso, encontra-se mais sujeito a sofrer efeitos de processos físico-químicos, tais como volatilização e foto-oxidação do que processos biológicos (Bento, 2005).

O fluoreno (FLU), também com dois anéis aromáticos, por sua vez, apresentou uma maior velocidade de remoção (K1) no tratamento com nutrientes e microrganismos (BEBA) do que nos tratamentos com nutrientes (BE) e somente com aeração (LF) ($p < 0,05$). Essa diferença de velocidade permitiu que, ao final do experimento, o maior percentual de remoção fosse alcançado pelo tratamento BEBA (98,3%). No segundo intervalo de remoção (K2), o tratamento BE apresentou velocidade de remoção do fluoreno (FLU) um pouco maior do que a dos demais tratamentos, o que pode ter permitido que este tratamento apresentasse, também ao final do experimento, remoção similar à alcançada por BEBA (remoção final de BE, 98,2%; remoção final de BEBA, 98,3%) (Tabela 37).

O fenantreno (PHE), HPA com três anéis aromáticos, apresentou cinética de remoção superior a 93,6% maior que a dos demais HPAs (Tratamento LF, Tabela 38), o que sugere uma microbiota mais favorável para a degradação deste. A cinética de degradação do criseno (CHR), poliaromático de quatro anéis, foi afetada semelhantemente nos tratamentos BE e BEBA.

No caso do indeno(1,2,3-cd)pireno (IND), HPA com cinco anéis aromáticos, houve uma semelhança entre as velocidades de remoção, sendo um pouco mais rápida em BEBA do que em LF e ambos semelhantes a BE ($F = 10,182$, $p = 0,0460$). A velocidade de decaimento, por sua vez, no segundo intervalo de remoção (K2) para esse composto, só foi quantificada em LF, já que a remoção em BE e em BEBA foi completa no primeiro intervalo de remoção (K1). Esses resultados permitem inferir que os HPAs com maior número de anéis aromáticos foram mais amplamente removidos quando havia condições de manter a degradação mais prolongadamente, fato aparentemente possível em LF.

Esses resultados reforçam as observações encontradas nos testes de toxicidade do presente estudo (Seção 5.4), onde os níveis de toxicidade letal e sub-letal se mantiveram mais altas em BE e BEBA do que em LF, provavelmente em função da produção de intermediários tóxicos nos tratamentos com introdução de nutrientes e microrganismos.

- Concentração de HPAs no solo após tratamentos

Os níveis de HPAs alcançados após a execução dos tratamentos (LF, BE e BEBA) foram avaliados tomando como base os limites estabelecidos pela CETESB Resolução 314 (2005) e pela Norma Holandesa.

Os limites da Norma Holandesa foram utilizados uma vez que, considerando a falta de consenso sobre o limites permitidos para HPAs em solo na literatura mundial, essa norma apresenta níveis mais estreitos de permissividade para os poliaromáticos testados (Tabela 14). Na ausência de limites de tolerância para alguns HPAs não determinados pela Norma Holandesa, foi utilizado os limites indicados pela CETESB (2005) (Tabela 11).

De acordo com o limites estabelecidos para solos em áreas urbanas e industriais (CETESB e a Norma Holandesa), os níveis de remoção dos 16 HPAs investigados foram bastante favoráveis, ficando todos abaixo dos níveis aceitáveis e de risco para a saúde humana, com exceção do benzo(a)pireno e o criseno. Ressalta-se, no entanto, que, segundo a CETESB, as concentrações finais do fenantreno, antraceno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno e indeno(1,2,3-cd)pireno ficaram acima dos valores de prevenção (VP), portanto, merecendo ainda atenção já que indicam valores prejudiciais à qualidade do solo.

O benzo(a)pireno é um dos HPAs de maior preocupação mundial. Composto com cinco anéis aromáticos, que constitui um dos HPAs mais estudados devido a sua elevada toxicidade, sendo considerado cancerígeno, genotóxico, teratogênico e embriotóxico (Bento, 2005).

De acordo com os níveis genéricos indicados pela Norma Holandesa, esse composto não deve ser detectado em áreas urbanas ou industriais. No presente trabalho, os níveis iniciais de contaminação apresentados para um solo argiloso, sugerindo derrame de óleo diesel, foram de $5,19 \pm 0,0 \mu\text{g.g}^{-1}$. A redução mais significativa apresentada ao final de 129 dias de experimento ocorreu no solo tratado através da adição de nutrientes e microrganismos (BEBA), alcançando $0,26 \pm 0,0 \mu\text{g.g}^{-1}$. Na sequência, o tratamento com exclusiva aeração (LF) apresentou concentração final duas vezes maior que o anterior, com $0,48 \pm 0,1 \mu\text{g.g}^{-1}$ e o tratamento com acréscimo de nutrientes (BE), apresentou concentração três vezes maior que o primeiro, cerca de $0,87 \pm 0,2 \mu\text{g.g}^{-1}$ do composto.

Segundo a Norma Holandesa, o criseno (CHR), poliaromático de quatro anéis aromáticos, deve apresentar concentração máxima de $55 \mu\text{g.g}^{-1}$, para área industrial, e de $1,5 \mu\text{g.g}^{-1}$, para área urbana. No solo do presente estudo, a concentração inicial quantificada foi de $8,39 \pm 0,0 \mu\text{g.g}^{-1}$, portanto, maior que o permitido para área urbana. Ao final do experimento, os níveis alcançados se mantiveram acima do permitido para a área urbana no solo tratado com nutrientes e microrganismos (BEBA) e nutrientes (BE), com concentrações de $2,17 \pm 0,1 \mu\text{g.g}^{-1}$ e $1,57 \pm 0,0 \mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente. Apenas o solo tratado com aeração (LF) apresentou níveis aceitáveis ($0,92 \pm 0,2 \mu\text{g.g}^{-1}$).

Desse modo, de acordo com os resultados observados, a identificação do tratamento mais adequado para a remoção dos HPAs, depende do critério usado para essa avaliação. Analisando o ΣHPAs se pode concluir que o acréscimo de nutrientes (BE) ou de nutrientes mais microrganismos (BEBA) não representou diferença significativa em relação aos índices de remoção alcançados pelo tratamento que utilizou apenas aeração (LF) (Figura 28). Esses resultados sugerem que o tratamento

LF seria o mais adequado. No entanto, avaliando individualmente os HPAs, apesar da significativa remoção promovida pelo tratamento LF, este não foi o tratamento mais eficiente para todos os HPAs. No caso específico do benzo(a)pireno (BaP), poliaromático de extrema preocupação para a saúde humana, cujo valor indicado é zero segundo a Norma Holandesa, a presença de nutrientes e microrganismos (BEBA) foi importante para a remoção de 95% desse composto ao final de 129 dias. O acréscimo de nutrientes (BE) removeu 83% e o tratamento com aeração apenas (LF) removeu 91% desse poliaromático. A concentração alcançada, ao final do experimento, em BEBA foi 46% menor do que a atingida pelo tratamento LF e 70% menor do que a remoção observada em BE.

Esses resultados reforçam uma tendência mundial para avaliação mais criteriosa dos contaminantes presentes e das condições locais para efetuar o processo degradativo (microbiota nativa, tipo de solo), tomando como base a remoção, especialmente, de compostos considerados de risco mais representativo (uso de composto-alvo) (Huang *et al.*, 2004; Canals, 2005).

5.3 SORÇÃO DO NAFTALENO DURANTE OS TRATAMENTOS DE REMEDIAÇÃO

5.3.1 Implantação da quantificação do naftaleno por CLAE

A Tabela 39 apresenta, em detalhe, as condições analíticas que proporcionaram o melhor ajuste para quantificação do naftaleno por CLAE e a Figura 32, por sua vez, apresenta um dos exemplos dos cromatogramas obtidos da injeção da solução-padrão de naftaleno.

Tabela 39. Condições analíticas do CLAE para quantificação do naftaleno.

PARÂMETROS	CONDIÇÃO
Detector de Fluorescência (FLD)	$\lambda_{\text{Excitação}}$ 280 nm e $\lambda_{\text{Emissão}}$ 330 nm
Fluxo da fase móvel	0,5 ml.min ⁻¹
Eluição isocrática	20% H ₂ O e 80% ACN
Temperatura da coluna	30°C
Sensibilidade do detector	8
Tempo de análise	5 minutos
Volume injetado	5 µL

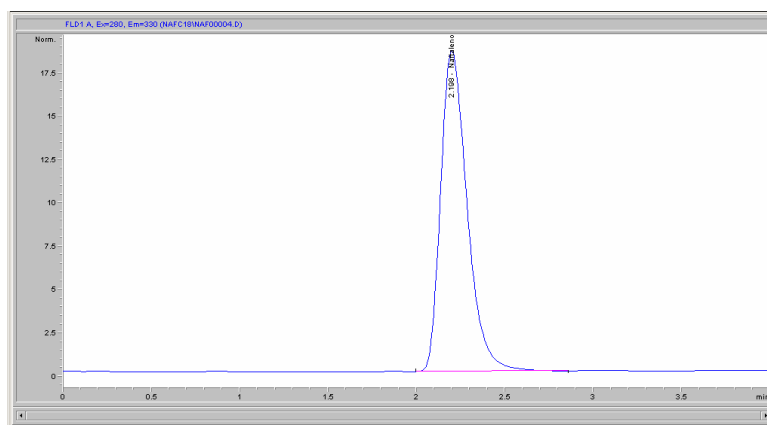


Figura 32. Cromatograma da solução-padrão de naftaleno por CLAE (FLD).

5.3.2 Validação do método para análise do naftaleno

- Seletividade

No presente estudo, a partir da comparação entre o branco da matriz e a solução padrão de naftaleno, não foi observado no cromatograma do branco (Figura 33) nem um outro sinal similar ao do naftaleno e no mesmo tempo de retenção deste, além do sinal proveniente do ruído do detector (Figura 32).

Esse resultado sugere que o método utilizado para quantificação do naftaleno (NAP) através de CLAE não apresenta interferentes similares à substância analisada na matriz estudada (solo). Desse modo, o método foi considerado seletivo.

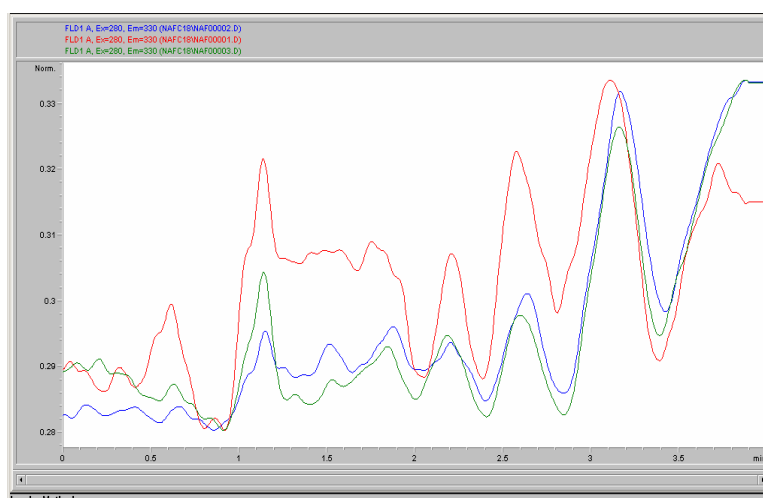


Figura 33. Cromatograma obtido a partir da injeção de três amostras do branco do solo argiloso estudado (branco). As diferentes amostras estão indicadas pelas cores vermelho, azul e verde.

- Linearidade e faixa de aplicação

A equação da reta e o coeficiente de correlação obtidos a partir da injeção das seis concentrações da curva do naftaleno (1,5; 3; 4,5; 9; 15 e 30 mg.L⁻¹), sugerem que os pontos estão bem ajustados à reta média (Figura 34). O coeficiente de correlação alcançado entre o sinal e a concentração ou massa do composto de interesse, foi de 0,99988, indicando que há uma baixa dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A equação obtida foi $Y = (59,8 \pm 0,5) X + (17 \pm 8)$.

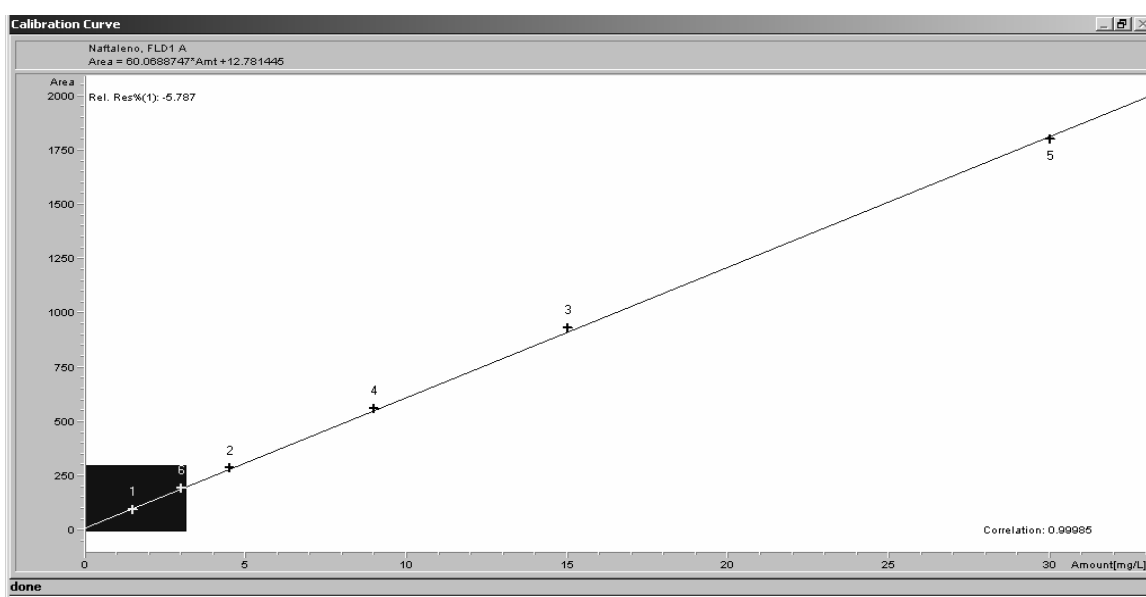


Figura 34. Reta analítica obtida da injeção de pontos da solução-padrão do naftaleno.

Avaliando-se a distribuição dos pontos entre o intervalo da reta média e a faixa linear obtida entre 95 e 105%, apresentados na Figura 35, foi possível observar que todos os pontos encontravam-se dentro da faixa do erro permitido de $\pm 5\%$. Desse modo, foi possível concluir que na faixa de trabalho, o método foi considerado com expressiva linearidade.

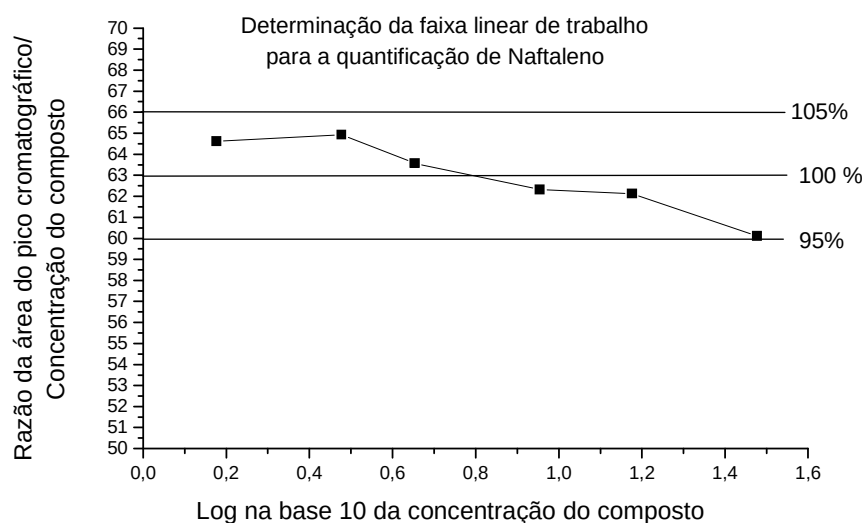


Figura 35. Determinação gráfica da curva de linearidade por meio da razão sinal/concentração *versus* a concentração em escala logarítmica obtida da injeção de pontos da solução-padrão do naftaleno.

- Precisão

A precisão do método analisado, avaliada através da quantificação em triplicata de três concentrações distintas (3; 9 e 30 mg.L⁻¹), apresentou desvio padrão relativo (*RSD*) de suas áreas de cada concentração menor do que 2% (*RSD* ≤ 2%). Portanto, o método foi considerado preciso.

Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 40.

Tabela 40. Parâmetros para avaliação da precisão do método para quantificação do naftaleno.

TESTES	ÁREA	<i>RSD</i> / PRECISÃO (n = 3)
1 (3 mg.L ⁻¹)	193,3 ± 0,7	0,4 %
2 (9 mg.L ⁻¹)	559,7 ± 0,8	0,1 %
3 (30 mg.L ⁻¹)	1802 ± 4	0,2 %

- Exatidão

A avaliação da exatidão do método foi realizada através por meio da injeção em triplicata de três concentrações (3; 9 e 30 mg.L⁻¹) e os resultados obtidos dos cromatogramas foram comparados com os valores aceitos como verdadeiros (concentração conhecida).

Os resultados estão apresentados na Tabela 41 e indicam que o método desenvolvido para a quantificação do naftaleno se mostrou com níveis consideráveis de exatidão, próximas a 100%.

Tabela 41. Parâmetros para avaliação da exatidão do método para quantificação do naftaleno.

TESTES	CONCENTRAÇÃO CONHECIDA (mg.L ⁻¹)	CONCENTRAÇÃO OBTIDA (mg.L ⁻¹)	EXATIDÃO (%) (n=3)
1 (3 mg.L ⁻¹)	3,00	3,00 ± 0,01	100%
2 (9 mg.L ⁻¹)	9,00	9,11 ± 0,01	99%
3 (30 mg.L ⁻¹)	30,00	29,78 ± 0,07	99%

- Limite de detecção

O método usado para determinação do LD foi o método baseado em parâmetros da curva analítica, ou seja, foi utilizado o desvio do coeficiente angular e o coeficiente angular da reta, ambos obtidos através da curva analítica. O LD obtido foi de 0,003 mg.L⁻¹.

- Limite de quantificação

O LQ obtido através dos parâmetros da curva analítica alcançou concentração de 0,10 mg.L⁻¹.¹ A injeção dessa concentração em CLAE apresentou resultados coerentes uma vez que foi possível quantificar com precisão analítica uma concentração mínima de naftaleno de 0,10 ± 0,05 mg.L⁻¹

5.3.3 Comportamento sortivo do naftaleno durante os tratamentos de remediação

5.3.3.1 Definição do modelo de sorção adequado para os tratamentos testados

Para o presente estudo, os três modelos comumente utilizados para representar o comportamento sortivo de compostos hidrofóbicos, como os HPAs, (*Freundlich* – Xing, 1997; linear ou partição constante (C) – Xing, 1997; e *Langmuir* (L) - Limousin *et al.*, 2007) foram avaliados. O naftaleno (NAP), utilizado como referência dos poliaromáticos no solo em estudo, foi testado nos tratamentos LF, BE e BEBA e no período de incubação correspondente ao 10º, 45º e 129º dias. As Figuras 36 (a, b), 37 (a, b) e a Tabela 42 (a, b, c) apresentam os ajustes e os resultados obtidos.

Tabela 42a. Dados de regressão provenientes do ajuste de sorção do naftaleno (NAP), nos modelos linear, *Freundlich* e *Langmuir*, no 10º dia de incubação nos tratamentos LF, BE e BEBA.

TRATAMENTOS	FREUNDLICH $C_s = K_F + C_w^N$			MODELO LINEAR $C_s = K_d * C_w$		LANGMUIR $C_s = b_L K_L C_w / (1 + K_L C_w)$		
10º dia do experimento	K_F (mg.g ⁻¹) (L.mg ⁻¹) ^N	N	R ²	K_d (L.g ⁻¹)	R ²	K_L	b_L	Chi ²
LF	0,042	1,185	0,95	0,06098	0,93	Não representou adequadamente os resultados experimentais.		
BE	0,069	0,871	0,96	0,05925	0,96			
BEBA	0,051	1,066	0,99	0,05775	0,99			

Tabela 42b. Dados de regressão provenientes do ajuste de sorção do naftaleno (NAP) nos modelos linear, *Freundlich* e *Langmuir* no 45º dia de incubação nos tratamentos LF, BE e BEBA.

TRATAMENTOS	FREUNDLICH $C_s = K_F + C_w^N$			MODELO LINEAR $C_s = K_d * C_w$		LANGMUIR $C_s = b_L K_L C_w / (1 + K_L C_w)$		
45º dia do experimento	K_F (mg.g ⁻¹) (L.mg ⁻¹) ^N	N	R ²	K_d (L.g ⁻¹)	R ²	K_L	b_L	Chi ²
LF	0,093	0,744	0,96	0,05332	0,89	0,18222	0,69143	0,00169
BE	0,052	0,780	0,99	0,03419	0,99	Não representou adequadamente os resultados experimentais.		
BEBA	0,056	0,702	0,94	0,03327	0,96			

Tabela 42c. Dados de regressão provenientes do ajuste de sorção do naftaleno (NAP) nos modelos linear, *Freundlich* e *Langmuir* no 129º dia nos tratamentos LF, BE e BEBA.

TRATAMENTOS	FREUNDLICH $C_s = K_F + C_w^N$			MODELO LINEAR $C_s = K_d * C_w$		LANGMUIR $C_s = b_L K_L C_w / (1 + K_L C_w)$		
129º dia do experimento	K_F (mg.g ⁻¹) (L.mg ⁻¹) ^N	N	R ²	K_d (L.g ⁻¹)	R ²	K _L	b _L	Chi ²
LF	0,058	0,94	0,98	0,05134	0,98	Não representou adequadamente os resultados experimentais.		
BE	0,069	0,87	0,96	0,01862	0,87			
BEBA	0,016	1,02	0,83	0,01935	0,87			

Destaca-se que o modelo de *Langmuir* não se mostrou adequado para o ajuste dos dados experimentais nos tratamentos estudados. Esse resultado sugere que o processo adsorptivo do composto em questão (NAP) não sorve em superfícies homogêneas com igual energia e que, provavelmente, não houve limitação no número de sítios de sorção, indicado pelo parâmetro b_L de seu modelo (Laak, 2005). Desse modo, não haverá uma discussão dos ajustes resultantes.

O melhor ajuste dos dados foi obtido através do modelo de *Freundlich*, constatado pelos valores de R^2 (Tabela 42 a, b, c e Figura 36 a, b). A exceção se deu apenas para o tratamento BEBA no 129º dia ($R^2 = 0,83$). Esse tratamento, nesse período de incubação, apresentou comportamento atípico para todos os modelos testados e o uso de um modelo exclusivo para essa situação, não permitiria a comparação proposta entre os coeficientes de sorção obtidos nos intervalos e nos tratamentos testados. Portanto, apesar de o coeficiente de correlação (R^2) mais baixo, este dado foi tratado dentro do modelo de melhor ajuste para os demais.

O modelo de *Freundlich* tem sido freqüentemente usado na literatura para representar o comportamento de compostos orgânicos hidrofóbicos (COHs) e retrata bem a distribuição e o número de sítios de energéticos do solo. O modelo tem o parâmetro N como ordem da reação (Levenspiel, 2000; D'Agostinho & Flues, 2006; Limousin *et al.*, 2007).

A Figura 36 (a, b) apresenta os ajustes obtidos por esse modelo.

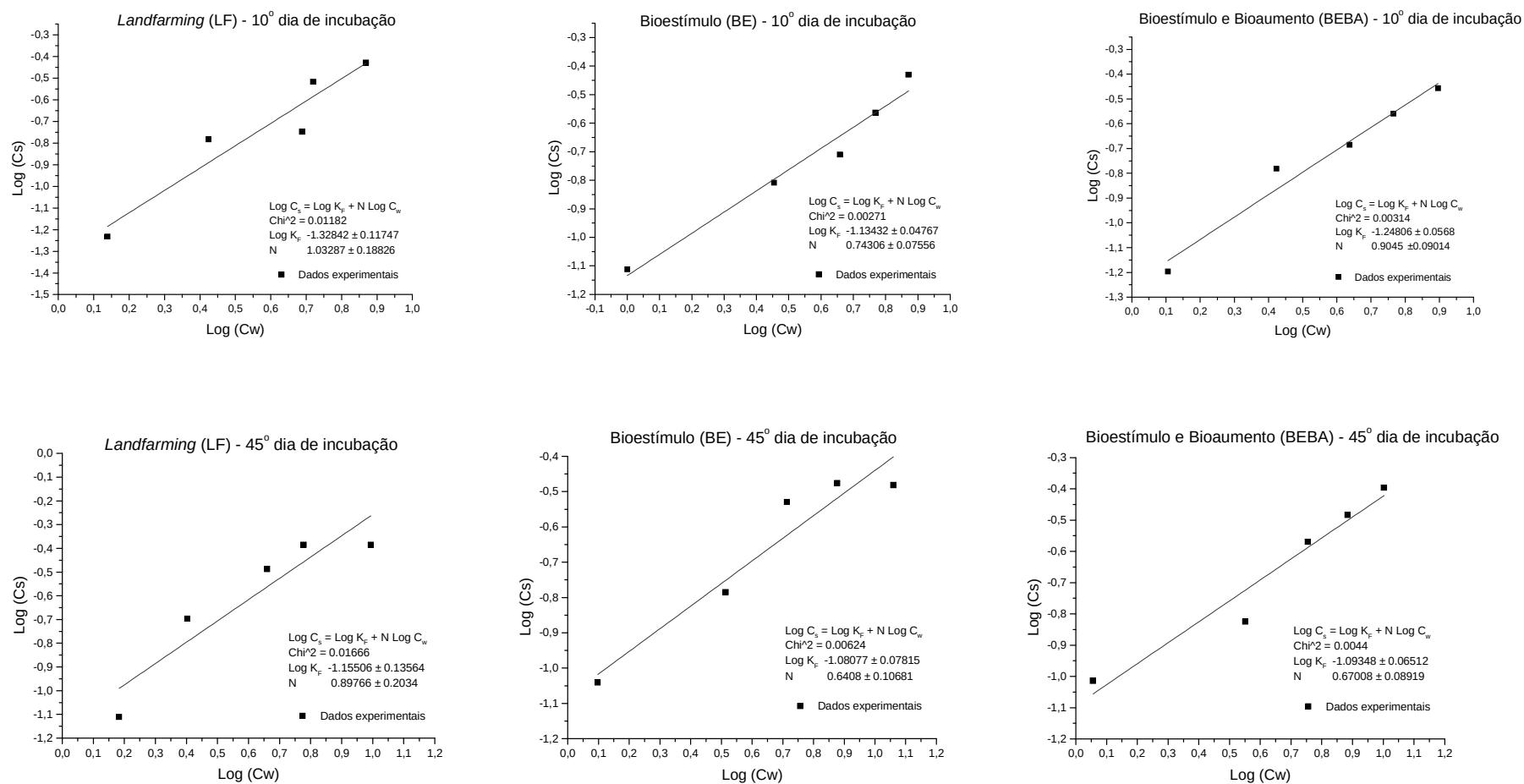


Figura 36a. Isotermas de sorção do naftaleno (NAP) obtidas no 10º e 45º dias dos tratamentos LF, BE e BEBA ajustadas pelo modelo de *Freundlich* linearizado.

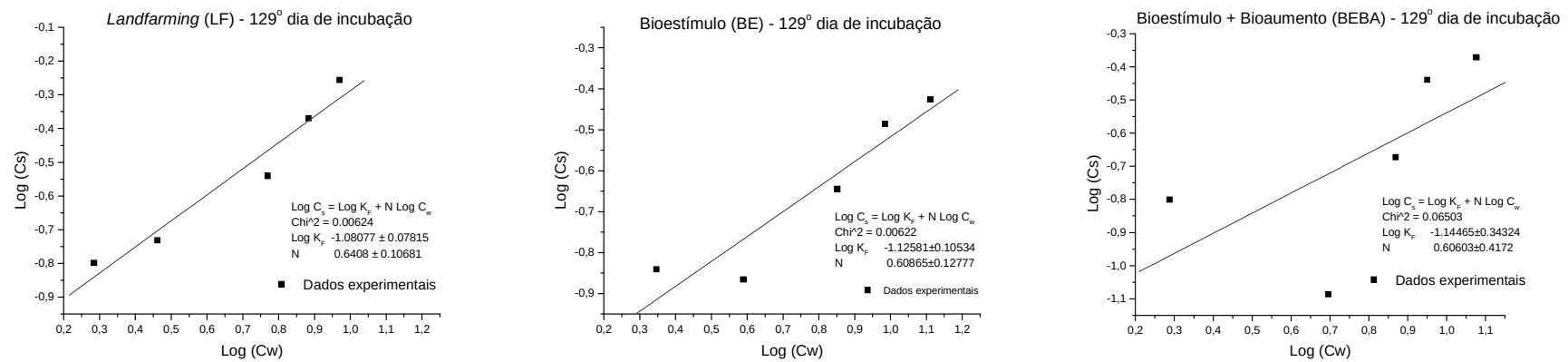


Figura 36b. Isotermas de sorção do naftaleno (NAP) obtidas no 129º dia dos tratamentos LF, BE e BEBA ajustadas pelo modelo de *Freundlich* linearizado.

Os valores de N , de maneira geral, indicam que a sorção ocorre com alta dependência da concentração do contaminante na solução do solo, quando estão próximos à unidade; ou baixa dependência quando não (OECD TG 106, 2001; Laak, 2005). Essa relação ainda pode depender da natureza da M.O. presente: valores de N menores do que 1 podem indicar que os sítios de ligação do solo com a molécula são limitados e que, à medida que a concentração da molécula em solução aumenta, estes sítios vão sendo saturados progressivamente (Xing, 1997; Damin, 2005). Esses resultados costumam apresentar isothermas do tipo não-linear, também muito características da sorção de COHs no solos (Damin, 2005; Farenhorst, 2006).

No entanto, apesar dos coeficientes de correlação expressivos (R^2), como o observado no presente trabalho, os dados de regressão de *Freundlich* podem apresentar limitação para uma comparação segura dos coeficientes de sorção, caso haja valores de N diferentes entre si (Xing, 1997; Farenhorst, 2006). A variação desse parâmetro pode implicar em unidades diferentes de K_F para cada tipo de solo.

Nos tratamentos adotados no presente estudo, durante os intervalos de incubação, o valor de N variou de 0,7 a 1,2 (Tabela 42 a, b, c, Figura 36 a, b), sugerindo que o número de sítios de ligação disponíveis também sofreu alteração. Isso pode ter decorrido de uma série de interações químicas no solo resultantes do processo de degradação de compostos provenientes da contaminação por óleo diesel.

Pesquisas realizadas têm sugerido como alternativa para valores de N diferentes, que quando estes estiverem próximos da linearidade, ou seja, entre $0,7 \leq N \leq 1$, podem ser expressos através de uma relação linear e o coeficiente de sorção pode ser estimado através do coeficiente de partição constante (K_d), reduzindo assim os erros envolvidos (Barizon, 2004; OECD TG 106, 2001). Essa alternativa foi a adotada no presente estudo e, portanto, o comportamento sortivo avaliado no presente trabalho foi expresso pelo coeficiente linear, ilustrados na Figura 37 (a, b), Tabela 42 (a, b, c) e na Seção 5.3.3.2.

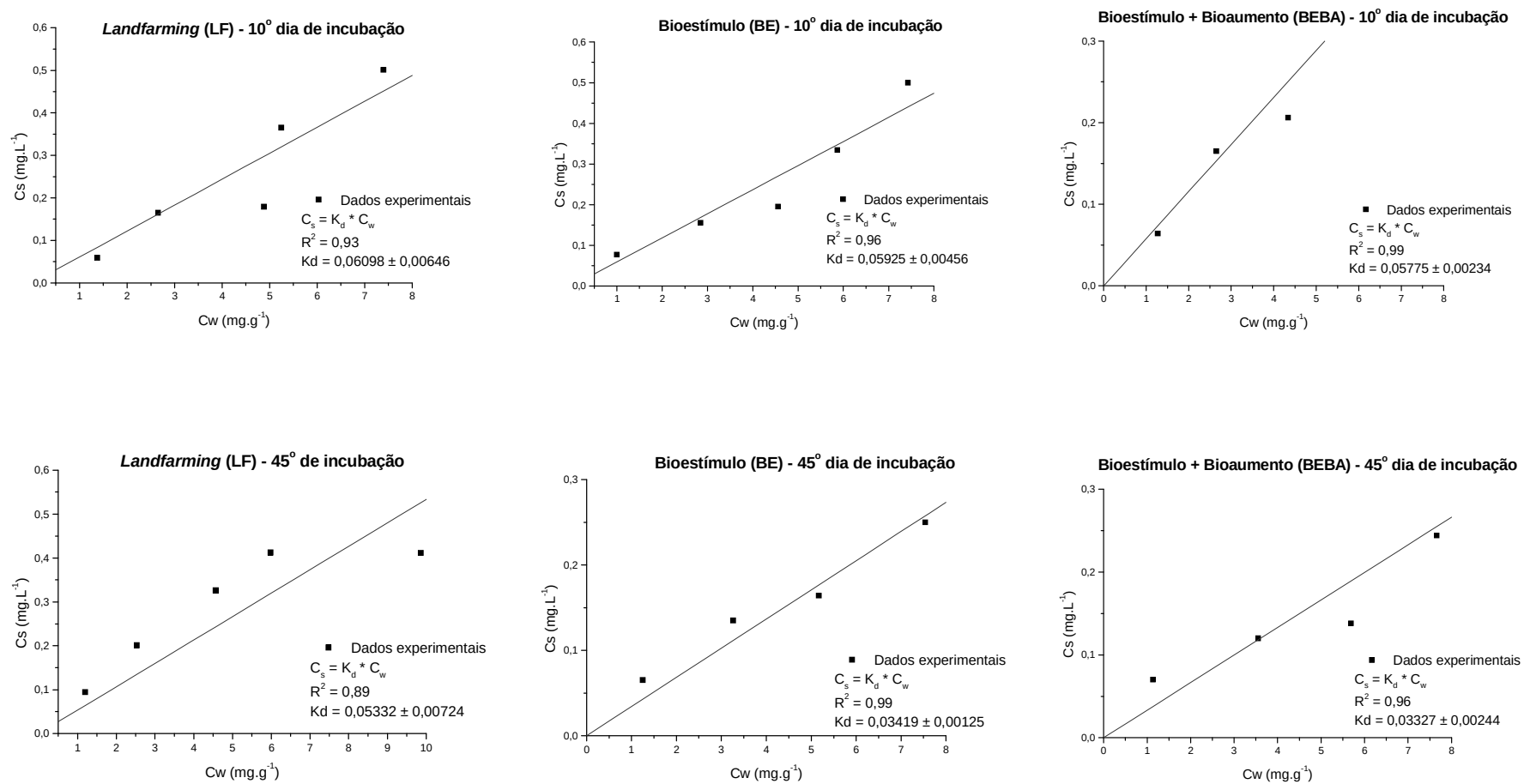


Figura 37a. Isotermas de sorção do naftaleno (NAP) obtidas no 10° e 45° dias dos tratamentos LF, BE e BEBA ajustadas pelo modelo de linear.

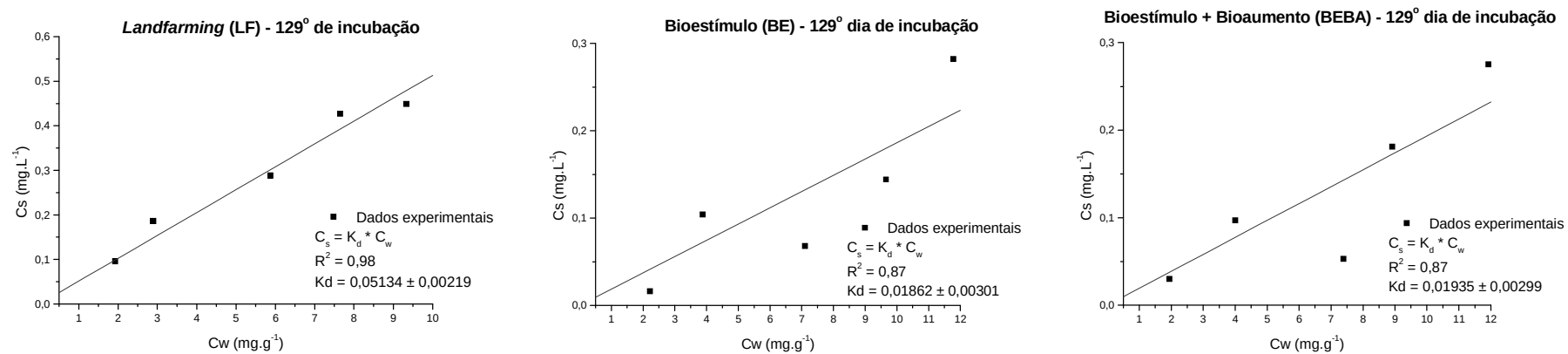


Figura 37b. Isotermas de sorção do naftaleno (NAP) obtidas no 129º dias dos tratamentos LF, BE e BEBA ajustadas pelo modelo de linear.

A explicação para o ajuste linear da isoterma para esses tipos de compostos (COHs) é que estes tendem a ser adsorvidos dentro de uma parte hidrofóbica da M.O.. Assim, a sorção pode ser frequentemente bem justificada por este parâmetro (Schmidt, 2004). Extensivos estudos têm relatado que a sorção de contaminantes orgânicos hidrofóbicos, no sistema solo-água, é governada por um mecanismo onde as moléculas desses compostos se distribuem dentro da M.O. do solo, especialmente, através das forças de *van der Waals* (Gao *et al.*, 2006). A sorção desses compostos é então controlada pela afinidade com a M.O., tornando assim possível explicar o comportamento sortivo (D'Agostinho & Flues, 2006; Limousin *et al.*, 2007; Schmidt, 2004).

No caso específico dos HPAs, o coeficiente de sorção obtido linearmente, tem sido muito utilizado para avaliar a sorção em amostras de solo, a exemplo de experimentos realizados com o naftaleno (Xing, 1997) e o fenantreno (Gao *et al.*, 2006).

No presente estudo, em função dos significativos níveis de C_{org} (Tabela 43 a, b, c) e a provável variação de sua natureza, em decorrência do processo de degradação, bem como, a introdução de incrementos por meio do bioestímulo e do bioaumento, o coeficiente de partição, K_d , foi normalizado pelo teor de C_{org} presente no solo (K_{oc}). Esse procedimento permitiu uma comparação mais coerente entre o comportamento sortivo diante das condições locais (Vieira *et al.*, 1999; OECD TG 106, 2001; Allen King *et al.*, 2002; Chiou, 2003; Limousin *et al.*, 2006). O K_{oc} é conhecido como coeficiente de distribuição de uma dada substância por unidade de C_{org} usado para comparar adsorções relativas no solo (Vieira *et al.*, 1998).

5.3.3.2 Coeficientes de sorção dos tratamentos testados

As Tabelas 43 (a, b, c) apresentam os parâmetros derivados do modelo linear ou de partição constante, entre eles, os coeficientes de distribuição, K_d e K_{oc} , determinados a partir do ajuste linear entre as concentrações do composto estudado no solo e em solução, C_s/C_w . Além disso, são também apresentados os coeficientes estimados por correlações empíricas obtidas na literatura (K_d teórico). Os valores de K_d teóricos foram obtidos do produto correspondente a média do K_{oc} para o naftaleno ($K_{oc} = 1.231 \text{ L.kg}^{-1}$), indicada pela USEPA (2004a), e as frações de C_{org} (f_{oc}) de cada tratamento ao longo dos períodos testados.

O objetivo de comparar os dados obtidos experimentalmente com os apresentados na literatura é avaliar a adequação desses últimos à realidade local, bem como estimar valores de persistência e mobilidade, como instrumento para avaliação de risco.

Tabela 43a. Valores experimentais do coeficiente de distribuição (K_d) do naftaleno (NAP), das amostras de solo nos tratamentos LF, BE e BEBA no 10º dia, e teóricos com base nos dados de K_{oc} da USEPA.

	EXPERIMENTAL				TEÓRICO	FATOR ESTIMADO/ EXPERIMENTAL
10º DIA	C_{org} (g.kg ⁻¹)	foc (kg.kg ⁻¹)	K_d (L.kg ⁻¹)	K_{oc} (L.kg ⁻¹)	K_d (L.kg ⁻¹)	
LF	47,9	0,048	60,1 Aa	1254,7 Ab	59,0	0,981
BE	45,4	0,045	59,3 Aa	1306,2 Aa	55,9	0,942
BEBA	45,5	0,046	57,8 Aa	1270,3 Aa	56,0	0,969

NOTA: $K_{d \text{ teórico}} = K_{oc} \cdot foc$. $K_{oc} = 1231 \text{ L.kg}^{-1}$ (USEPA 2004a) e $foc = \text{kg de } C_{org} \cdot \text{kg}^{-1}$ de solo. As letras maiúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos testados e as minúsculas que não há diferença entre os dias testados para cada tratamento (Teste de Tukey, $p < 0,05$), $n = 5$.

Tabela 43b. Valores experimentais do coeficiente de distribuição (K_d) do naftaleno (NAP), das amostras de solo nos tratamentos LF, BE e BEBA no 45º dia, e teóricos com base nos dados de K_{oc} da USEPA.

	EXPERIMENTAL				TEÓRICO	FATOR ESTIMADO / EXPERIMENTAL
45º DIA	C_{org} (g.kg ⁻¹)	foc (kg.kg ⁻¹)	K_d (L.kg ⁻¹)	K_{oc} (L.kg ⁻¹)	K_d (L.kg ⁻¹)	
LF	39,3	0,0393	53,3 Aa	1356,2 Aa	48,4	0,908
BE	35,5	0,0355	34,2 Bb	963,4 Ba	43,7	1,278
BEBA	34,7	0,0347	33,3 Bb	959,7 Ba	42,7	1,283

NOTA: $K_{d \text{ teórico}} = K_{oc} \cdot foc$. $K_{oc} = 1231 \text{ L.kg}^{-1}$ (USEPA 2004a) e $foc = \text{kg de } C_{org} \cdot \text{kg}^{-1}$ de solo. As letras maiúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos testados e as minúsculas que não há diferença entre os dias testados para cada tratamento (Teste de Tukey, $p < 0,05$), $n = 5$.

Tabela 43c. Valores experimentais do coeficiente de distribuição (K_d) do naftaleno (NAP), das amostras de solo nos tratamentos LF, BE e BEBA no 129º dia, e teóricos com base nos dados de K_{oc} da USEPA.

	EXPERIMENTAL				TEÓRICO	FATOR ESTIMADO/ EXPERIMENTAL
129º DIA	C_{org} (g.kg ⁻¹)	foc (kg.kg ⁻¹)	K_d (L.kg ⁻¹)	K_{oc} (L.kg ⁻¹)	K_d (L.kg ⁻¹)	
LF	36,6	0,0366	51,3 Aa	1401,6 Aab	45,1	0,878
BE	32,6	0,0326	18,6 Bc	570,6 Bb	40,1	2,158
BEBA	31,5	0,0315	19,4 Bc	615,9 Bb	38,8	1,999

NOTA: $K_{d \text{ teórico}} = K_{oc} \cdot foc$. $K_{oc} = 1231 \text{ L.kg}^{-1}$ (USEPA 2004a) e $foc = \text{kg de } C_{org} \cdot \text{kg}^{-1}$ de solo. As letras maiúsculas iguais indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos testados e as minúsculas que não há diferença entre os dias testados para cada tratamento (Teste de Tukey, $p < 0,05$), $n = 5$.

Estatisticamente, de acordo com a Análise de Variância ($p < 0,05$), os tratamentos dados ao solo contaminado com óleo diesel promoveram diferença significativa na capacidade sortiva deste (K_{oc}), mas somente a partir do 45º dia (Tabela 43 a, b, c).

No 10º dia não foi observada diferença significativa na capacidade de sorção entre os tratamentos ($F = 0,433$; $p = 0,6582$), apesar dos incrementos introduzidos em BE e BEBA. No 45º e 129º dias, por sua vez, o acréscimo de nutrientes (BE) e de nutrientes e microrganismos (BEBA) implicaram em uma redução do coeficiente de sorção em relação ao tratamento apenas com aeração (LF) ($F = 6,011$; $p = 0,0155$ e $F = 27,896$; $p = 0,0000$, respectivamente). Estas análises estão expressas por caracteres, letras maiúsculas, nas Tabelas 43 (a, b, c).

Ao longo do período de incubação (10º, 45º e 129º dias), cada um dos tratamentos, individualmente, apresentou diferença entre o K_{oc} nos intervalos testados. O tratamento LF apresentou K_{oc} no 129º dia semelhante ao observado no 10º dia e 45º dia ($F = 4,511$; $p = 0,0346$). Os tratamentos BE e BEBA apresentaram diferença entre o 10º e 45º dias em relação ao 129º dia, esse último com a menor capacidade adsorptiva para ambos ($F = 12,690$; $p = 0,0011$ e $F = 7,340$; $p = 0,0083$, respectivamente). Estas análises, por sua vez, estão expressas por letras minúsculas nas Tabelas 43 (a, b, c) e representa a comparação estatística dos dias de amostragem para cada tratamento estudado.

Esses resultados sugerem que os tratamentos de biorremediação (BE e BEBA) promoveram diferença na capacidade sortiva do solo e que esta foi reduzida ao longo do período de incubação. Uma possível explicação para a diminuição dos valores de K_{oc} é o chamado efeito *priming*, que se refere a maior degradação da M.O. edáfica do solo na presença de resíduos orgânicos (Damin, 2005). A redução mais marcante nos tratamentos BE e BEBA, que apresentaram acréscimo de nutrientes e nutrientes e microrganismos, em relação ao tratamento LF reforça essa hipótese.

Estudos com o benzo(a)pireno (BaP), poliaromático de 5 anéis, confirmaram as interações entre os HPAs e a matéria húmica do solo, mas os processos com essa matriz complexa ainda não estão completamente conhecidos (D'Agostinho & Flues, 2006).

Essas observações coadunam com os resultados obtidos no presente estudo. Os maiores valores de K_d e K_{oc} foram encontrados no tratamento LF e os menores nos demais tratamentos (BE e BEBA). Um dos aspectos que deve ser considerado é que o tratamento LF teve como incremento apenas a aeração duas vezes por semana e o acréscimo de água deionizada até 50% da CC, o que poderia implicar em uma mudança pouco ou menos significativa no teor e nas características da M.O. em relação aos incrementos dos tratamentos BE e BEBA (nutrientes e microrganismos).

Segundo estudos anteriores, isotermas de adsorção idênticas ocorrem em função da mesma qualidade e acessibilidade da M.O. do solo. Portanto, alterações na capacidade sortiva ocorridas em uma mesma matriz podem estar relacionadas a diferentes qualidades ou geometria da M.O. (Farenhorst, 2006).

No presente estudo, a relação entre o conteúdo de M.O. do solo e o processo sortivo é confirmada pela redução proporcional entre o C_{org} e o K_d . Do 10º ao 45º dia, o tratamento LF apresentou redução de 18% de C_{org} e de 11% do K_d . No BE, a redução foi de 22% para o C_{org} e de

42% para o K_d . No tratamento com introdução de nutrientes e microrganismos, BEBA, a redução de C_{org} também ficou em torno de 24% e de 42% para o coeficiente linear de sorção.

Do 45º dia para o 129º dia, em LF, houve uma redução menos significativa de C_{org} , 7%, relacionada também com uma pequena redução do K_d que foi de 4%. Em BE e BEBA, por sua vez, a redução do C_{org} também não foi expressiva, de 8% a 9%, em relação ao 45º e 129º dias, mas a redução do K_d continuou marcante, 46% e de 42%, respectivamente. Como citado, esses resultados sugerem que há uma estreita relação entre o conteúdo de M.O. e a capacidade sortiva do solo, e que alterações na natureza da M.O., como o possivelmente ocorrido em BE e BEBA, podem alterar o grau de sorção. Esses percentuais foram calculados com base nos dados apresentados na Tabela 43 (a, b, c).

A Figura 38 (a, b, c) ilustra a relação estabelecida entre o teor de C_{org} e o coeficiente de sorção K_d no período e em cada tratamento estudado. Como o observado, o decréscimo do conteúdo de C_{org} foi acompanhado também por um decréscimo na capacidade sortiva do solo, especialmente, nos tratamentos BE e BEBA.

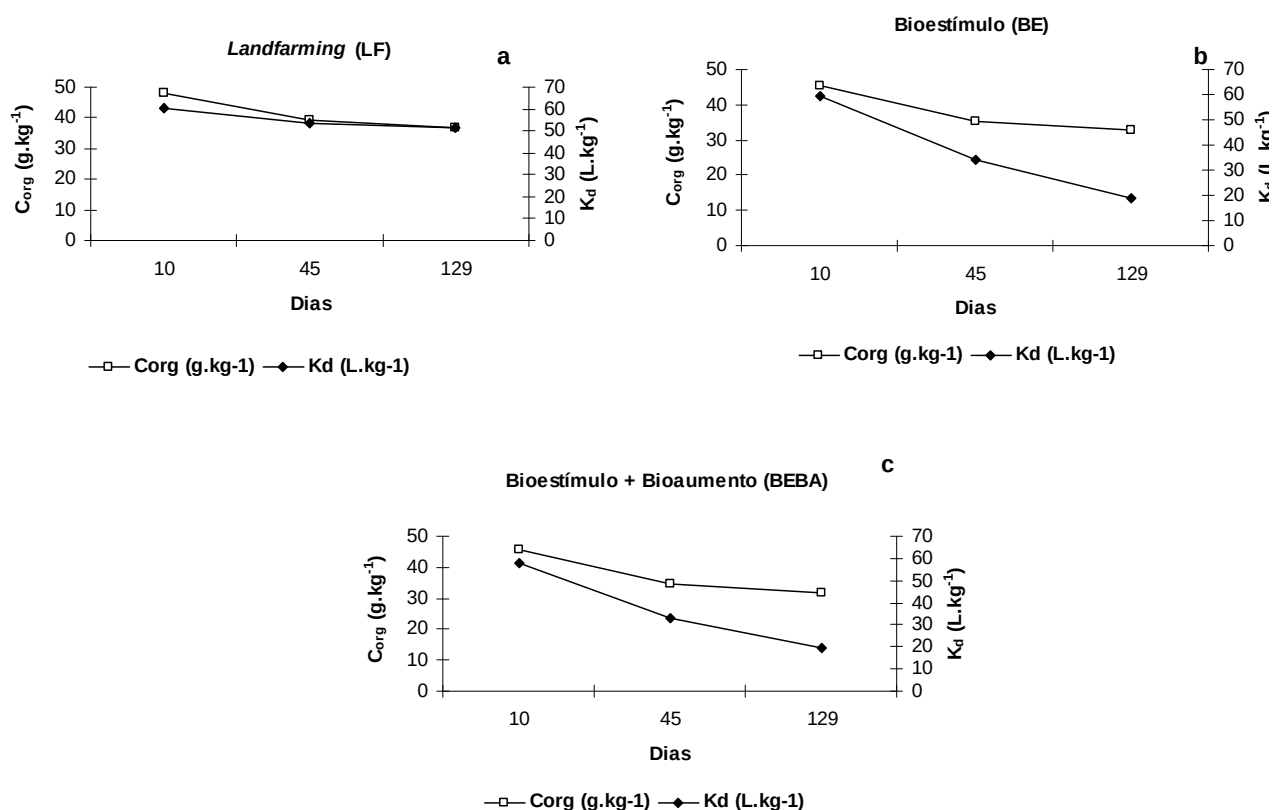


Figura 38 (a, b, c). Relação entre o C_{org} ($g.kg^{-1}$) e o coeficiente de sorção (K_d) observada durante o 10º, 45º e 129º dias dos tratamentos LF (a), BE (b) e BEBA (c) aplicado ao solo argiloso contaminado por óleo diesel.

Desse modo, de acordo com o observado, a capacidade sortiva do solo foi alterada durante os tratamentos, especialmente quando houve a introdução de nutrientes (BE) e de nutrientes mais microrganismos (BEBA). Esses resultados, provavelmente, associados ao estímulo à biodegradação, reduzem os níveis de M.O. e alteram a natureza desta (humificação), promovendo um aumento na disponibilidade do contaminante-teste (NAP). De modo geral, os contaminantes orgânicos responderiam de modo semelhante, tornando-se assim mais ou menos disponíveis à degradação.

A Figura 39 (a, b, c) ilustra um dos parâmetros de remoção testados, os O&G, e as alterações da capacidade sortiva do solo nos tratamentos testados tomando como base o coeficiente de sorção normalizado pelo C_{org} (K_{oc}).

Os percentuais removidos apresentados nos gráficos se referem à remoção relativa ao período de incubação anterior. Em LF, no 45º dia houve uma remoção de 34% em relação ao 10º dia de incubação e não houve remoção entre o 45º e 129º dia. Esse tratamento apresentou pequena variação do K_{oc} nos dias de incubação avaliados. Nos tratamentos BE e BEBA, por sua vez, onde houve redução expressiva na capacidade sortiva do solo, os percentuais de remoção alcançados também se mostraram maiores. Em BE, a remoção entre o 10º e 45º dia foi de 36% e entre o 45º e 129º dia foi de 20%. Em BEBA, a remoção no primeiro intervalo foi de 45% e no segundo foi de 36%.

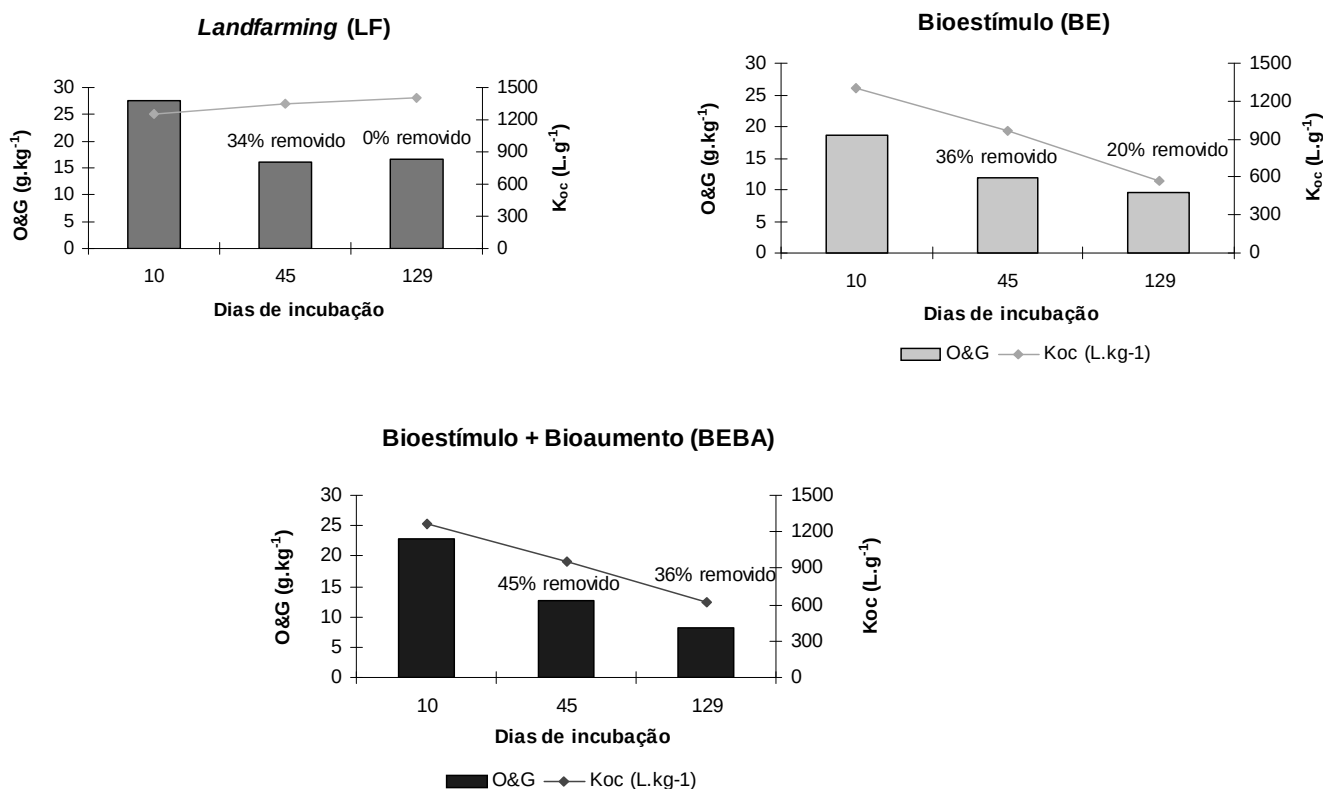


Figura 39 (a, b, c). Relação entre o conteúdo de O&G e o coeficiente de sorção normalizado pelo C_{org} (K_{oc}) observada durante o 10º, 45º e 129º dias dos tratamentos LF (a), BE (b) e BEBA (c) aplicado ao solo argiloso contaminado por óleo diesel.

Para efeito de avaliação dos dados obtidos no presente estudo com os valores estimados da literatura, os valores de K_d experimentais foram comparados com os valores de K_d obtidos pela USEPA (2004a) (K_d teóricos). Esses dados estão apresentados na Tabela 43 (a, b, c).

Os valores de K_d experimentais foram maiores do que os teóricos nos três tratamentos, LF, BE e BEBA, no 10º dia de incubação. Nos demais períodos, 45º e 129º dias, apenas para o tratamento LF (Tabela 43 a, b, c). O valor experimental menor do que o estimado pode ser atribuído ao bloqueio de sítios de sorção e o inverso pode ser atribuído a um maior número de sítios em aberto, bem como a uma significativa afinidade do contaminante com a M.O. do solo (Ran *et al.*, 2003; Damin, 2005). O bloqueio no número de sítios e/ou menor afinidade com a M.O. podem então ser sugeridos como possíveis responsáveis pela redução da capacidade sortiva em BE e BEBA no 45º e 129º dias.

No entanto, apesar de comum a comparação entre os valores teóricos e experimentais, vale ressaltar alguns aspectos. É preciso ser considerado que existe na literatura uma ampla variação dos valores de K_{oc} de um mesmo composto orgânico hidrofóbico para diferentes tipos de solos. Tais variações indicam porque o conteúdo de C_{org} total de um solo não necessariamente avalia a natureza, a localização e a composição da MO que irá afetar os níveis efetivos de M.O. ativa capazes de sorver contaminantes orgânicos não iônicos. Existe evidência que algumas frações da M.O. do solo, por exemplo, podem ser inacessíveis para os contaminantes orgânicos se ele se associa dentro de partículas húmicas ou argilas agregadas, reduzindo o efeito da M.O. ativa no solo (D'Agostinho & Flues, 2006; Gao *et al.*, 2006).

Outro dado importante é que existem poucas referências em solos naturais e praticamente não existem referências de experimentos em amostras de solos tropicais, o que pode implicar em uma predição errônea dos resultados quando comparados com os dados da literatura (D'Agostinho & Flues, 2006). Por isso, como já citada, há a necessidade da obtenção de dados mais próximos às condições de estudo para uma predição mais segura dos riscos e escolha dos tratamentos mais adequados em caso de contaminação. A CETESB tem como atual diretriz a estimativa de dados locais (CETESB, 2001; 2005), inclusive de coeficientes de sorção (K_d e K_{oc}) para solos tropicais que auxiliarão significativamente no tratamento de áreas brasileiras contaminadas. Sugere-se que essa diretriz se estenda para diferentes regiões do país, tornando ainda mais local as avaliações de risco.

No presente estudo, a redução na capacidade sortiva do solo comparada aos valores teóricos em BE e BEBA corrobora com o discutido anteriormente. Essa redução pode estar atrelada aos maiores índices de remoção da M.O., bem como a alteração da natureza desta, como produto da ação catabólica. Esses resultados sugerem e reforçam a importância dos tratamentos de biorremediação como um processo que pode potencializar a biodisponibilidade de contaminantes orgânicos hidrofóbicos (Ex: produção de biossurfactantes, alterações da M.O., etc.).

5.4 TESTE DE TOXICIDADE DURANTE OS TRATAMENTOS DE REMEDIAÇÃO

O teste de toxicidade, como citado anteriormente, exigiu a avaliação da adaptabilidade do mesmo às condições da matriz testada: solo argiloso, em lugar de sedimento, matriz usada originalmente para a espécie adotada. Desse modo, foi executado um primeiro teste com esse objetivo, estando, portanto, o solo ainda livre da contaminação por óleo diesel.

5.4.1. Teste piloto: avaliação da adequação da matriz ao teste de toxicidade

O experimento piloto foi realizado em duas etapas. A primeira foi desenvolvida sem promover alteração na condição do solo testado e a segunda a partir da correção do pH, único parâmetro físico-químico que apresentou diferença expressiva no solo em estudo em relação ao controle (sedimento) (>20%). A Figura 40 (a, b, c, d) ilustra os resultados obtidos nos dois experimentos, sem e com correção do solo, Pilotos 1 e 2, respectivamente.

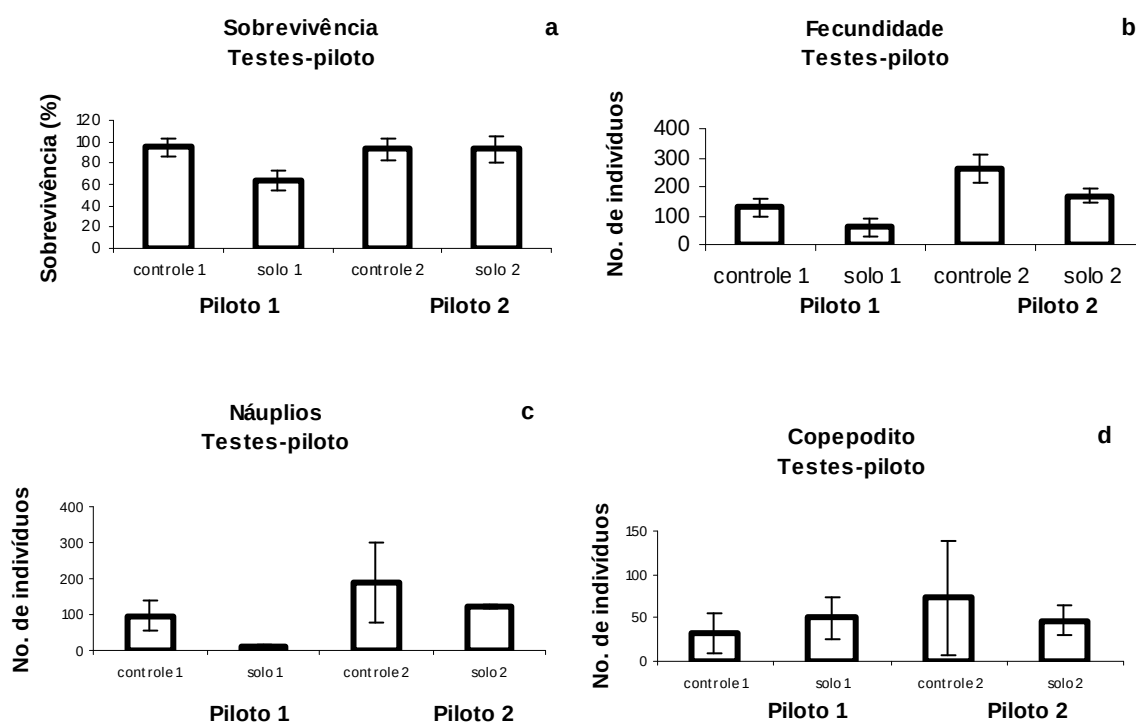


Figura 40 (a, b, c, d). Média $\pm$ desvio padrão da sobrevivência (a), fecundidade (b), número de náuplios (c) e copepoditos (d) medidos no final dos testes-piloto, utilizando fêmeas adultas do copépodo bentônico *Tisbe biminiensis*. Piloto 1 - sem a correção do pH e Piloto 2 – com a correção do pH.

No primeiro teste, observou-se no solo, mesmo livre de contaminação, um decréscimo significativo em relação à sobrevivência (ANOVA, $F = 17,014$; $p = 0,0033$), à fecundidade (ANOVA, $F = 5,330$; $p = 0,0498$) e também em relação ao número de náuplios produzidos (ANOVA, $F = 8,327$; $p = 0,0203$). Somente não foi observada diferença significativa no número de copepoditos presentes no solo e no controle (sedimento) (ANOVA, $F = 0,472$; $p = 0,5187$) (Figura 40 a, b, c, d). Esses resultados sugerem interferência de outros parâmetros.

Os parâmetros físico-químicos monitorados, durante o teste Piloto 1, estiveram de acordo com os critérios estabelecidos pela ISO 14669 (1999). No entanto, observou-se um decréscimo expressivo apenas para o pH do solo em relação ao controle e que indicou uma correlação positiva entre esse parâmetro e os níveis de sobrevivência. Desse modo, o solo testado foi corrigido para pH próximo a 7,0 e foi realizado o teste Piloto 2. O objetivo dessa etapa foi a avaliação do teste de toxicidade após a correção do pH do solo estudado.

No segundo experimento, Piloto 2, por sua vez, não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros analisados, sobrevivência (ANOVA, $F = 0,090$; $p = 0,7755$), fecundidade (ANOVA, $F = 2,662$; $p = 0,1468$), náuplios (ANOVA, $F = 0,360$; $p = 0,5739$) ou copepoditos (ANOVA, $F = 0,472$; $p = 0,4431$), no controle e no solo testado, o que indica que o teste se mostra adequado para o solo desde que haja correção do pH. Os resultados supracitados estão também apresentados na Figura 40 (a, b, c, d).

5.4.2. Teste de toxicidade no solo contaminado com óleo diesel

Os testes de toxicidade foram realizados em cada um dos três tratamentos adotados para remediação da contaminação do solo por óleo diesel (LF, BE e BEBA). Os testes foram executados no 3º, 73º e 129º dias de incubação do experimento. Os resultados obtidos para o 3º dia de incubação estão apresentados na Figura 41 (a, b, c, d).

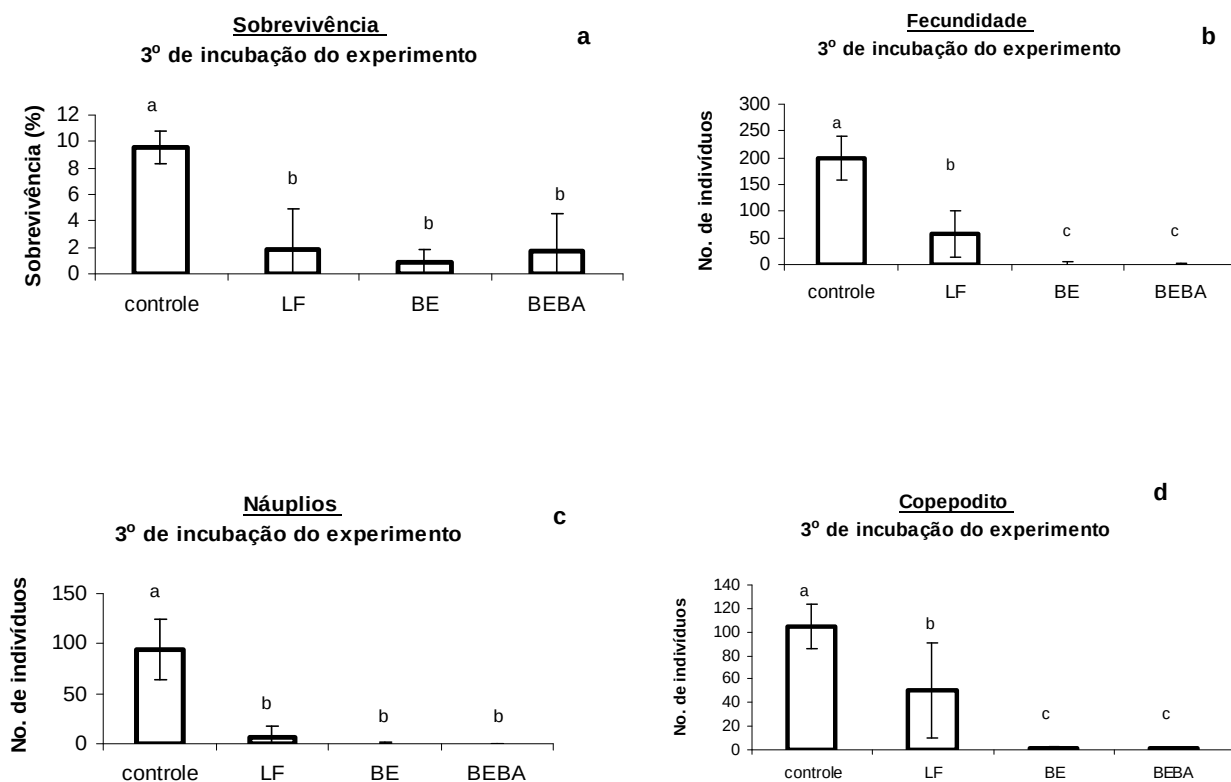


Figura 41 (a, b, c, d). Média $\pm$ desvio padrão da sobrevivência (a), fecundidade (b), número de náuplios (c) e copepoditos (d) medidos no final do experimento com solo contaminado no 3º dia de incubação nos diferentes tratamentos (LF, BE e BEBA) e sedimento controle utilizando fêmeas adultas do copépodo bentônico *Tisbe biminiensis*.

De acordo com os resultados obtidos, no 3º dia de incubação do solo contaminado com óleo diesel, observou-se diferença significativa entre os tratamentos e o controle no que refere ao efeito letal: sobrevivência (ANOVA, $F = 19.217$; $p < 0,0001$); e os sub-letais: fecundidade (ANOVA, $F = 60.055$; $p < 0,0001$), número de náuplios (*Kruskal Wallis*, $H = 18,295$; $p = 0,0004$) e no número de copepoditos (*Kruskal Wallis*, $H = 19.1147$; $p = 0,0003$). O tratamento LF apresentou fecundidade 97,7% maior em relação ao tratamento BE e 98,8% em relação a BEBA. No número de copepoditos, o tratamento LF também apresentou resultados mais promissores em relação aos tratamentos BE e BEBA, com percentuais de 98,4% e 98,7%, respectivamente. Portanto, o tratamento LF no 3º dia de tratamento do solo contaminado com óleo diesel foi considerado de baixo efeito sub-letal (Figura 41 a, b, c, d).

A Figura 42 (a, b, c, d) apresenta os resultados referentes aos efeitos letal e sub-letal dos testes de toxicidade realizados no 73º dia do experimento para os três tratamentos testados.

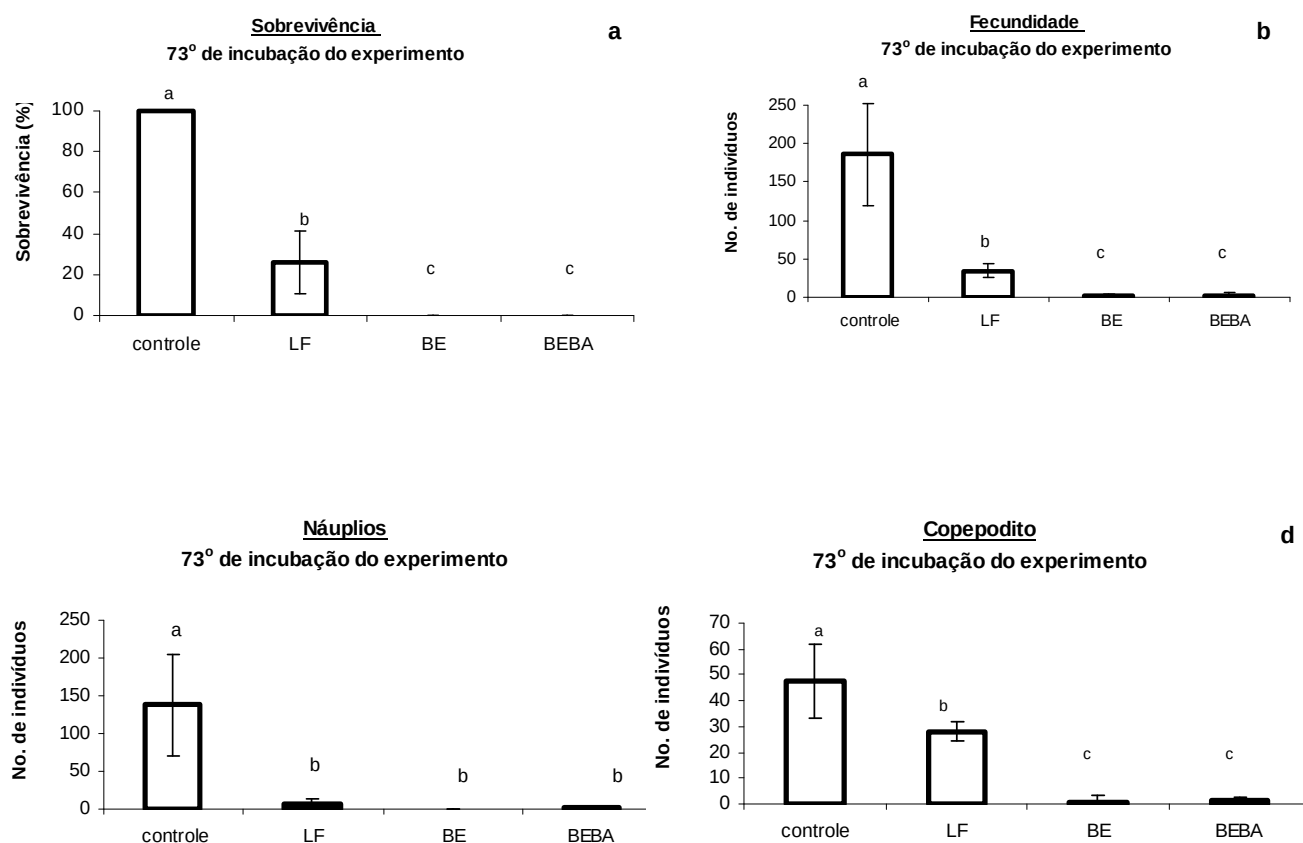


Figura 42 (a, b, c, d). Média $\pm$ desvio padrão da sobrevivência (a), fecundidade (b), número de náuplios (c) e copepoditos (d) medidos no final do experimento com solo contaminado no 73º dia de incubação nos diferentes tratamentos (LF, BE e BEBA) e sedimento controle utilizando fêmeas adultas do copépodo bentônico *Tisbe biminiensis*.

De acordo com o observado no 73º dia de incubação, também foi possível perceber uma queda significativa na sobrevivência (*Kruskal-Wallis*, $H = 17,3204$; $p = 0,0006$), fecundidade (*Kruskal Wallis*, $H = 16,5061$; $p = 0,0009$), número de náuplios (*Kruskal Wallis*, $H = 13,8567$; $p = 0,0003$) e no número de copepoditos (*Kruskal Wallis*, $H = 16,6805$; $p = 0,0008$) dos tratamentos em relação ao controle. O tratamento LF, nesse período de incubação, mostrou-se também significativamente mais promissor do que os demais tratamentos. No que se refere à fecundidade, LF foi 95,9% maior do que BE e 91,0% maior que BEBA; no aspecto número de copepoditos, o LF foi 96,4% maior do que BE e 94,3% maior do que BEBA e; sobre o efeito letal (sobrevivência), apresentou índices de sobrevivência 100% maior do que os demais tratamentos. Esses resultados sugerem a redução da toxicidade do meio.

Os testes de toxicidade (efeitos letal e sub-letal), na última amostragem dos testes de remediação (129º dia), estão apresentados na Figura 43 (a, b, c, d).

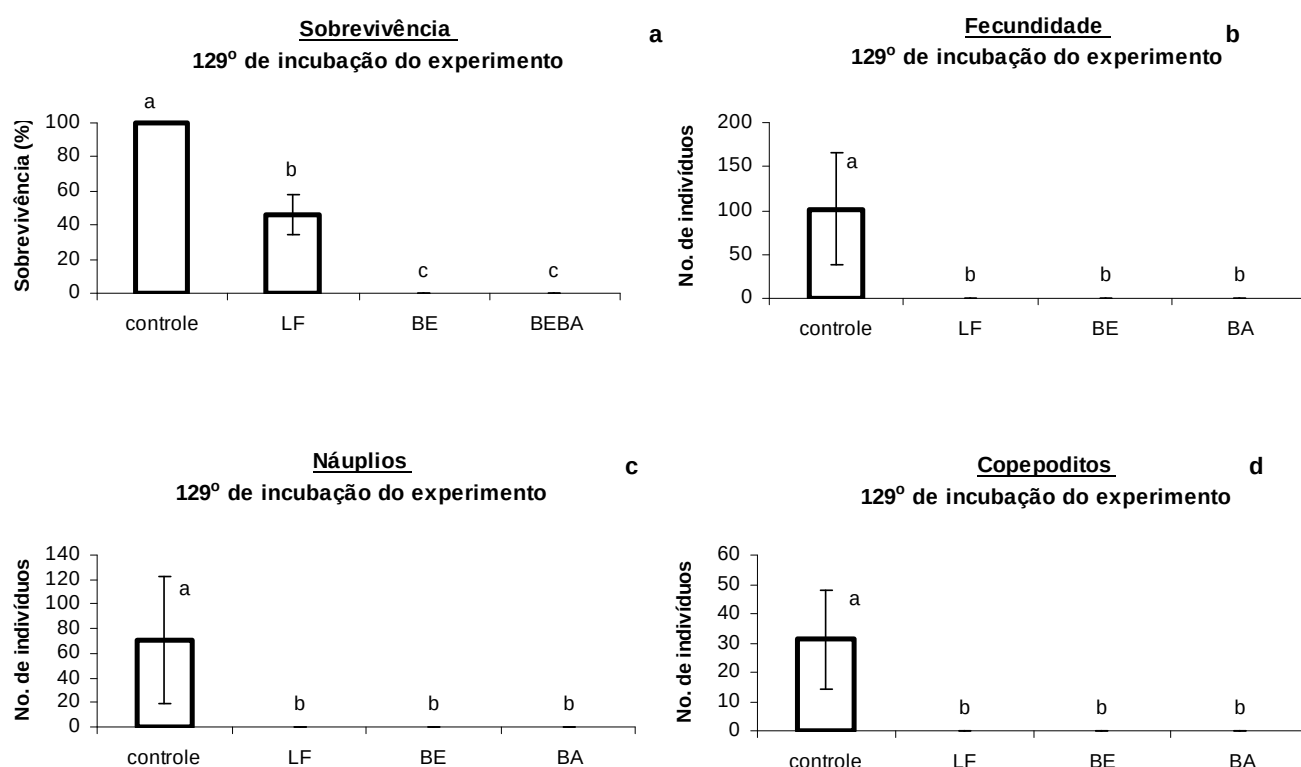


Figura 43 (a, b, c, d). Média $\pm$ desvio padrão da sobrevivência (a), fecundidade (b), número de náuplios (c) e copepoditos (d) medidos no final do experimento com solo contaminado no 129º dia de incubação nos diferentes tratamentos (LF, BE e BEBA) e sedimento controle utilizando fêmeas adultas do copépodo bentônico *Tisbe biminiensis*.

Segundo os dados obtidos, no final do experimento de remediação do solo contaminado com óleo diesel, manteve-se uma queda significativa na sobrevivência (ANOVA, $F = 78,082$; $p = 0,0000$), fecundidade (ANOVA, $F = 12,735$; $p = 0,0002$), número de náuplios (ANOVA, $F = 9,175$; $p = 0,0009$) e no número de copepoditos (ANOVA, $F = 17,186$; $p = 0,0000$), entre tratamentos e o controle (Figura 43 a, b, c, d). E, nesse período, LF se diferenciou significativamente dos demais tratamentos somente em relação aos mais altos índices de sobrevivência (100% maior que os demais tratamentos).

Os resultados observados nos bioensaios realizados no 3º, 73º e 129º dias indicam que houve efeitos letais e sub-letais nos tratamentos BE e BEBA, sugerindo que o copépodo utilizado é sensível a presença deste tóxico. Apenas o tratamento LF apresentou no 3º e 73º ausência de efeitos sub-letais, especialmente, em relação ao número de copepoditos e fecundidade, e ausência de efeito letal no 73º e 129º dias, o que pode indicar menor toxicidade no meio, quando comparado com os demais.

A presença de efeitos sub-letais em LF no 129º significa que a contaminação ou poluente está numa concentração suficientemente baixa para não causar efeito letal, mas a longo prazo pode interferir na perpetuação da espécie, já que age sobre a reprodução ou desenvolvimento.

Os efeitos letais e sub-letais, marcadamente encontrados em BE e BEBA, apesar da remoção observada nos contaminantes do óleo diesel, pode estar relacionado com uma possível presença de produtos intermediários que muitas vezes podem ser mais tóxicos do que os próprios contaminantes originais. Existem indícios que a produção de intermediários da degradação dos HPAs, particularmente dihidrodiois, são mais perigosos do que os compostos de origem (Cerniglia, 1984; Bento *et al.*, 2003).

Em teste de toxicidade para avaliação da biodegradação de resíduos oleosos com *Daphnia similis*, foi encontrado resultado similar ao observado no presente estudo (Morais, 2005). No citado experimento, a redução na concentração dos hidrocarbonetos de petróleo também não foi acompanhada por uma redução na toxicidade, sugerindo que durante a biodegradação dos hidrocarbonetos, a produção de compostos secundários pode ter apresentado efeito tóxico semelhante ou ainda maior do que os compostos iniciais. Em estudos de biorremediação de solos contaminados com petróleo Dorn & Salanitro (2000) também chegaram a conclusões similares.

Esses resultados podem apresentar relação com o presente estudo uma vez que foi observada, ao longo do experimento, uma redução no número de microrganismos (bactérias e fungos) que pode estar atrelada à redução de nutrientes disponíveis, mas também a presença de intermediários.

CAPÍTULO 6.

CONCLUSÕES

No que tange a caracterização do solo estudado, concluiu-se que:

- O solo estudado foi caracterizado como Podzólico Vermelho-Amarelo Tb (Argissolo), tendo a caulinita como o argilomineral característico. Como esperado, para esse tipo de solo, este apresentou textura argilosa; baixa CTC, sugerindo uma reduzida capacidade sortiva; acidez e baixo nível de nutrientes. Tais ocorrências podem ser justificadas pelo tipo de argilomineral característico do solo estudado, a caulinita apresenta a menor capacidade de troca dentre os argilominerais.
- A contaminação do solo com óleo diesel promoveu aumento expressivo do Pb (20 para 297 mg.kg⁻¹). No entanto, não indicando comprometimento da atuação dos microrganismos e, conseqüentemente, dos processos de biorremediação propostos.
- O solo, de maneira geral, apresentou-se bem povoado tanto por bactérias (10⁶ UFC.g⁻¹ de solo), quanto por fungos (10³ UFC.g⁻¹). Os gêneros e espécies encontradas deram indícios do potencial satisfatório do solo em promover a degradação de petroderivados, inclusive remoção dos HPAs.

Para avaliar a influência dos métodos de remediação propostos mediante o acréscimo de nutrientes e de microrganismos, os níveis de remoção sobre os óleos e graxas (O&G) e de HPAs foram testados. Esses parâmetros permitiram chegar as seguintes observações:

- De acordo com o observado, durante a execução dos tratamentos testados (LF, BE e BEBA), sugere-se que não houve alteração da solubilidade dos contaminantes por ação de biossurfactantes produzidos. Os níveis de tensão superficial do solo nos tratamentos permaneceram inalterados ao longo do experimento.
- O acréscimo de nutrientes (BE) e de microrganismos mais nutrientes (BEBA) ao solo argiloso contaminado com óleo diesel se mostrou eficiente na remoção de O&G em relação à aeração (LF). Com os maiores índices de remoção em BEBA (80%), seguido pelo tratamento BE (77%) e por LF (59%).
- Em 24 dias de experimento, a remoção de O&G já era bastante promissora: BEBA com maior percentual de remoção, seguido por LF e BE (72 ± 0,4%; 65 ± 0,9% e 52 ± 1,3%, respectivamente). Tais resultados são confirmados pelos parâmetros cinéticos de ordem zero obtidos, no primeiro intervalo de remoção (24 dias), que foram iguais a 0,89 µg.g⁻¹.dia⁻¹; 1,10

$\mu\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e $1,21 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ para LF, BE e BEBA, respectivamente. No segundo intervalo (105 dias), os parâmetros cinéticos foram $0,03 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$; $0,04 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e $0,03 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ para LF, BE e BEBA, respectivamente.

- O percentual de remoção do C_{org} foi diferente entre os tratamentos de biodegradação utilizados no presente estudo: BE ($30,2 \pm 0,3\%$) foi considerado similar a BEBA ($34,4 \pm 2,1\%$) e similar LF ($25,2 \pm 0,8\%$).
- Houve uma significativa remoção do ΣHPAs , ao final do experimento (129 dias), para os três tratamentos testados (LF, BE e BEBA, 87%; 89% e 87%, respectivamente) e não foi constatada diferença significativa entre os tratamentos utilizados.
- Durante o experimento foi observada a ocorrência de dois intervalos distintos de remoção dos ΣHPAs para cada tratamento. O primeiro intervalo correspondeu aos primeiros 17 dias do experimento e apresentou a mais rápida remoção dos poliaromáticos e sem diferença nos incrementos adotados (LF = $72 \pm 2,1\%$; BE = $74 \pm 2,2\%$ e BEBA = $75 \pm 0,9\%$). O segundo intervalo correspondeu aos 112 dias restantes dos testes.
- Nos primeiros três dias de incubação (entre 0 e 3º dia), ressalta-se que a adição de nutrientes (BE) e nutrientes mais microrganismos (BEBA) se mostraram mais eficientes na remoção de ΣHPAs do que apenas o processo de aeração do solo contaminado com óleo diesel (LF). No caso específico do tratamento LF foi necessária pouco mais de uma semana (10 dias) até que a eficiência de remoção se equiparasse aos demais tratamentos ($4,7\%.\text{dia}^{-1}$ de remoção).
- Não foi observada diferença significativa na velocidade de remoção de ΣHPAs entre os tratamentos testados nos dois intervalos de remoção. As cinéticas de decaimento de ordem zero, no primeiro intervalo (17 dias), foram iguais a $4,48 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$; $4,62 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e $4,71 \mu\text{g.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, para LF, BE e BEBA, respectivamente. No segundo intervalo (112 dias), as cinéticas de decaimento foram 97%; 97% e 98% inferiores às anteriores, para LF, BE e BEBA, respectivamente.
- O percentual de remoção dos HPAs individuais no solo contaminado com óleo diesel, ao final do período de incubação, apresentou para a maioria dos HPAs (sete HPAs dos onze presentes no solo contaminado) diferença quanto ao tratamento adotado, resultado que sugere a interferência do tipo de tratamento adotado no percentual de remoção dos HPAs individualmente: ACE, FLU e PHE apresentaram como tratamentos mais promissores o BE e BEBA; o PYR e CHR tiveram LF como mais promissor do que BE e este mais do que BEBA; o BkF apresentou o LF e BE mais promissores do que o BEBA; e, o BaP obteve como resultado mais satisfatório o tratamento BEBA e LF do que o BE. O NAP, ANT, FLT e IND foram indiferentes aos tratamentos adotados.
- Para o fenantreno (PHE) os tratamentos BE e BEBA apresentaram eficiência de remoção em torno de 88%, enquanto que para LF a eficiência de remoção foi de 79%. O benzo(a)pireno (BaP), HPA extremamente tóxico, foi removido com eficiência de 95% em BEBA, 91% em LF e 83% em BE. A menor concentração de BaP foi igual a $0,26 \mu\text{g/g}$ em BEBA.

- Não foi possível obter modelo cinético que representasse o decaimento de todos os HPAs estudados e/ou em todos os três tratamentos testados (LF, BE e BEBA). Os hidrocarbonetos poliaromáticos, PHE, ANT, FLT, PYR e BaP, apresentaram oscilação na concentração, não apresentando um padrão de comportamento linear. Tal fato pode estar associado aos fenômenos de sorção e dessorção, além de refletir a heterogeneidade do próprio solo.
- A redução significativa na velocidade de remoção entre o primeiro e segundo intervalos de tempo, para O&G, ΣHPAs e HPAs individuais, pode ser atribuída, entre outros aspectos, a acumulação de intermediários tóxicos que podem ter interferido negativamente na atividade de degradação promovida pelos microrganismos.

O naftaleno (NAP), um dos 16 HPAs prioritários indicados pela USEPA, foi adotado como substância-teste, com o intuito de avaliar possíveis alterações na capacidade sortiva do solo argiloso contaminado por óleo diesel e sujeito a tratamentos de remediação (bioestímulo e bioaumento). Seguem as principais conclusões alcançadas:

- O método para quantificação de naftaleno em água por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi considerado seletivo, linear, preciso, exato e adequado para execução dos testes de sorção.
- A capacidade de sorção do solo no tratamento somente com aeração (LF) foi semelhante às demais no 10º dia de experimento e se manteve constante no 45º e 129º dia de testes. O acréscimo de nutrientes (BE) e de microrganismos (BEBA) promoveu uma redução contínua e similar sobre a capacidade sortiva do solo, no 45º e 129º dias. Provavelmente, essa redução, associada ao estímulo à biodegradação pelo acréscimo de nutrientes, reduziu os níveis de M.O. e/ou alterou a natureza desta (humificação), promovendo um aumento na disponibilidade do contaminante-teste (NAP).
- Foi observada relação entre a alteração na capacidade sortiva e a remoção de O&G nos tratamentos BE e BEBA em detrimento do observado em LF.
- Não foi possível identificar relação entre a capacidade sortiva do solo, nos tratamentos testados, e o decaimento da concentração do ΣHPAs e dos HPAs individualmente. Esse fato pode ter ocorrido em função da rápida remoção dos HPAs logo nos primeiros 17 dias de experimento (em torno de 75% para os tratamentos testados). Nessa etapa, a capacidade sortiva do solo em cada tratamento podia ainda ser muito similar.

As conclusões sobre os testes de aplicabilidade de uma espécie de copépodo bentônica tropical para avaliação da toxicidade em solo contaminado por óleo diesel e os níveis alcançados foram:

- O teste de toxicidade realizado no presente estudo com o copépodo bentônico *Tisbe biminiensis* se mostrou adequado à matriz solo, desde que fosse corrigido o pH para básico, próximo a 7,0.

- Os tratamentos BE e BEBA, ao fim do período de incubação, não reduziram a toxicidade do solo argiloso contaminado com óleo diesel, provavelmente em função da produção de metabólitos intermediários.

SÍNTESE

Os tratamentos testados se mostraram adequados para a remoção dos parâmetros avaliadores da contaminação proveniente do óleo diesel (Σ 16 HPAs, 16 HPAs individuais e O&G). No entanto, a escolha por um desses tratamentos depende da finalidade desejada. De acordo com os resultados obtidos, não foi observada diferença entre os tratamentos para remoção do somatório dos 16 HPAs prioritários indicados pela USEPA, já para alguns dos mesmos HPAs analisados individualmente e para os O&G, a introdução de nutrientes (Bioestímulo - BE) e de nutrientes e microrganismos (Bioestímulo e Bioaumento - BEBA) foram promissores, especialmente, no que tange a adição de nutrientes, uma vez que na maior parte das vezes não foi observada diferença entre BE e BEBA.

Quanto à capacidade sortiva do solo, os resultados são compatíveis com os percentuais de remoção alcançados pelos tratamentos testados. Ao longo dos 129 dias de experimento, observou-se que o solo tratado por bioestímulo (BE) e por bioestímulo e bioaumento (BEBA) apresentou redução em sua capacidade sortiva, o que poderia ter promovido maior biodisponibilidade do contaminante. O solo tratado apenas por aeração (LF) não apresentou alteração nos seus níveis de sorção durante o experimento.

CAPÍTULO 7. RECOMENDAÇÕES

- Identificação de compostos intermediários provenientes da degradação de óleo diesel e dos HPAs, a fim de melhor avaliar a relação com os níveis de toxicidade encontrados.
- Identificação das espécies de microrganismos presentes nos experimentos ao longo do tempo, para que se possam avaliar possíveis alterações em sua abundância e diversidade. Sugere-se a aplicação de técnicas de biologia molecular (DGGE, FISH, etc.).
- Realização de testes *in situ* para confirmação dos resultados obtidos em laboratório.
- Realização de testes de dessorção associados aos testes de sorção. Bem como, a redução dos intervalos de avaliação das alterações da capacidade sortiva do solo.
- Buscar organismos mais adequados para a execução dos testes de toxicidade em solo. Ex: minhoca.

CAPÍTULO 8.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), 1987. *Resíduos Sólidos*. NBR 100004, São Paulo, ABNT.

Ahn, I.S., Lion, L.W., Schuler, M.L., 1996. Microscale-based modeling of polynuclear aromatic hydrocarbon transport and biodegradation in soil. *Biotechnol. Bioeng.*, 51:1-14.

Alexander, M., 1999. *Biodegradation and Bioestimulation*. Academic Press, 2nd ed., San Diego, USA, 453p.

Allen-King, R.M., Grathwohl, P., Ball, W.P., 2002. New modeling paradigms for the sorption of hydrophobic organic chemicals to heterogeneous carbonaceous matter in soils, sediments, and rocks. *Advances in Water Resources*, 25: 985–1016.

Amellal, N., Portal, J.M., Berthelin, J., 2001. Effect of soil structure on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons within aggregates of a contaminated soil. *Applied Geochemistry*, 16:1611–1619.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2003. *Resolução RE nº 899*, de 29/05/2003.

Araújo, A.S. & Azevedo, D.C. (organizadores), 2004. Encontro Brasileiro Sobre Adsorção. *Anais*. Natal, RN: EDUFRRN. Vol. 5. 278p.

Araújo-Castro, C.M.V; Souza-Santos, L.P; Costa, M. F. 2006a. *Avaliação da Toxicidade dos sedimentos dos Porto de Suape utilizando o copépodo bentônico Tisbe biminiensis nos períodos seco e chuvoso de 2003*. In: Mário Takayuki Kato (Org.). *Gestão e tratamento dos resíduos líquidos gerados na cadeia produtiva do petróleo*. 1ª coletânea de trabalhos técnicos, Recife: Ed. Universitária, p. 47-60.

Araújo-Castro, C.M.V; Souza-Santos, L.P; Costa, M.F. 2006b. *Efeitos Letais e Subletais do dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) no Copépodo Bentônico Tisbe biminiensis*. In: Mário Takayuki Kato (Org.). *Gestão de Tratamento de Resíduos Líquidos Gerados na Cadeia de Produtiva de Petróleo: 1ª Coletânea de Trabalhos Técnicos*. Recife: Ed. Universitária, p. 61-70.

ASTM D971, 1999. 99ª *Standard Test Method for Interfacial Tension of Oil Against Water by the Ring*. In: Method American Society for Testing Materials, West Conshohocken, Pennsylvania.

Aswathanarayana, U., 1995. *Geoenvironment: An Introduction*. The Netherlands: A.A. Balkema, Rotterdam, 270p.

Atlas, R.M., 1977. Stimulated petroleum biodegradation. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 5:371-386.

Atlas, R.M., 1995a. Bioremediation. *Chemical and Engineering News*, 3: 32-42.

Atlas, R.M., 1995b. *Handbook of media for environmental microbiology*. London. CRC Press.

Baker, K.H. & Herson, D.S., 1994. Bioremediation of surface and subsurface soils. In: *Bioremediation*. McGraw Hill, Inc: USA, p. 203-259.

Balba, M.T., Al-Awadhi, N., Al-Daher, R., 1998. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, 32:155–164.

Baptista, P. M. & Rizzo, A. C. L., 2005. *Acompanhamento do processo de atenuação natural de solo contaminado por petróleo*. In: XIII Jornada de Iniciação Científica do CETEM, Rio de Janeiro. Anais da XIII JIC CETEM.

Barahona, L.M., Vázquez, R.R., Velasco, H., Jarquin, C. V., Perez, O. Z., Cantú, A. M., Albores, A., 2004. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. *Applied Soil Ecology*, 27:165-175.

Barizon, R.R.M., 2004. Sorção e transporte de pesticidas sob condições de não-equilíbrio. *Tese doutorado*. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 96p.

Barranco, A., Alonso-Salces, R. M., Bakkali, A., Berrueta, L. A., Gallo, B., Vicente, F., Sarobe, M., 2003. Solid-phase clean-up in the liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils. *Journal of Chromatography A*, 988:33-40.

Barroti, G. & Nahas, E., 2000. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. *Pesq. Agrop. Bras.*, 35:2043-2050.

Beltrão, E.P.S., 2005. Estudo do impacto do óleo diesel em solo do manguezal de Vila Velha – Itamaracá. *Dissertação de mestrado*. Pós-graduação em Biotecnologia e Produtos Bioativos, UFPE, 80p.

Bengtsson, B.E., 1978. Use a harcticoid copepod in toxicity tests. *Mar. Pol. Bull.*, 9:238-241.

Bento, D.M., 2005. Análise Química da Degradação dos Hidrocarbonetos de Óleo Diesel no Estuário da Lagoa dos Patos – Rio Grande/RS. *Dissertação de mestrado*. Departamento de Geociências/UFRG, 112p.

Bento, F.M., Camargo, F.A.O., Okeke, B.C., Frankenberger, W.T., 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, 96:1049-1055.

Bento, F.M., Camargo, F.A.O., Okeke, B.C., Frankenberger-Júnior, W.T., 2003. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34: 65-68.

Blumer, M., 1976. Polycyclic aromatic compounds in nature. *Scientific American*, 234: 34-45, 1976. *Apud*: Wilson, S.C. & Jones, K.C., 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environmental Pollution*, 81:229-249.

Boopathy, R., 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74:63-67.

Borges, R.M.H., 2001. Biodegradação em solo argiloso contaminado com petróleo. *Dissertação de Mestrado*. Programa EQ-ANP, RJ, 180p.

Brändli, R., Kupper, T., Bucheli, T., Mayer, J., Stadelmann, F.X., Tarradellas, J., 2004. Occurrence and relevance of organic pollutants in compost, digestate and organic residues - Literature review. EPF Lausanne – ENAC – ISTE – CECOTOX / Agroscope FAL Reckenholz. Disponível em: http://www.umwelt-schweiz.ch/imperia/md/content/abfall/s_m1.pdf. Acesso em: 18/10/2005.

Bratberg, D. & Hopkins, L. Risk Based Corrective Action and Risk Assessment Procedures in the United States: a 1995 Survey. In: *Proceedings of the 1995 Petroleum Hydrocarbon and Organic Chemicals in Ground Water: Prevention, Detection, and Restoration Conference*, Houston, Texas. Nov. p. 25-31.

Braun, S. & Schmal, M., 2003. A poluição gerada por máquinas de combustão interna movidas a diesel - a questão dos particulados. Estratégias atuais para a redução e controle das emissões e tendências futuras. *Química Nova*, 27: 472-482.

Brayner, F.M.M., 1998. Determinação de taxas de retenção de metais-traço por sedimentos orgânicos em um viveiro de piscicultura em área estuarina e urbana. *Tese de Doutorado*. (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos. Univ. São Paulo. São Carlos, 103p.

Canals, M.V., 2005. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. *Tesis*, Universitat de Barcelona. 342p.

Cardona, S. & Iturbe, R., 2003. Biodegradación de diesel mexicano por un consorcio de bacterias de un suelo agrícola. *DYNA*, 70: 13-26.

Cardoso, E. J. B. N., 1992. *Ecologia microbiana do solo*. In: Cardoso, E. J. B. N. (coord.), Tsai, S. M., Neves, M.C.P. Microbiologia do solo. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 360p.

Carlson, C., 1999. Influences of sorption on microbial degradation of organic substances. Disponível em: <<http://www.ecotox.lu.se/STAFF/CK/Introduc.htm>> Acesso em: 08/06/2004.

Carvalho, R.F., Rigitano, R.L.O., Lima, J.M., 2002. Sorção e degradação do fungicida triadimenol em solos representativos do município de Lavras – MG. *Ciênc. Agrotec.*, 26:332-341.

Cerniglia, C.E., 1984. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Advances in Applied Microbiology*, 20:31-71.

Cerniglia, C.E., 1992. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Biodegradation*, 3:351-368.

Cerniglia, C.E., 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 4:331-338.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental), 2001. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo / Dorothy C. P. Casarini et al.. São Paulo. 73 p. + ap. : il. ; 30 cm. - - (Série Relatórios Ambientais).

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental), 2005. Decisão de Diretoria nº. 195-2005 de 23 de novembro de 2005. São Paulo. 4 p.

Chefetz, B., 2003. Sorption of phenanthrene and anthrazine by plant cuticular fractions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22:2492–2498.

Chiou, C.T., 2003. Environmental partitioning and contamination compounds organic. *Journal of the Chinese Institute of Environmental Engineering*, 13:1-6.

Colores, G.M., Macur, R.E., Ward, D.M., Inskeep, W.P., 2000. Molecular analysis of surfactant-driven microbial population shifts in hydrocarbon-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:2059-2964.

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente / Ministério do Meio Ambiente), 2005. Resolução N° 314, de 29 de outubro de 2002. Site: www.mma.gov.br/conama/res/res02/res31402.pdf.

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente / Ministério do Meio Ambiente), 2005. Resolução N° 357, de 17 de março de 2005. Site: www.mma.gov.br/conama/res/res05/res35705.pdf.

Cordazzo, J., Maliska, C. R., Corseuil, H. X., 1999. Solução numérica do problema de derramamento de gasolina acrescida de álcool no solo. In: ENPROMER'99 - II Congresso de Engenharia de Processos do MERCOSUL. Florianópolis - Santa Catarina – Brasil, 108p.

Corseuil, H.X., Montenegro, M.A.P., Marins, M.D.M., 1996. Biorremediação passiva de águas subterrâneas contaminadas com derramamentos de gasolina. In: Trabalhos Técnicos: 11º Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Rio de Janeiro.

Costa, A.F., 2001. Avaliação da contaminação humana a Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs): determinação 1-hidroxipireno urinário, com os trabalhadores do CESTEH/FIOCRUZ. Dissertação de mestrado – Escola Nacional de Saúde Pública. Rio de Janeiro. xviii, 81p.

Costa, J. B., 2004. Caracterização e constituição do solo. Fundação Calouste Gulbenkian, 7º ed, Lisboa, 527 p.

Coull, B.C.; Chandler, G.T. 1992. Pollution and meiofauna: Field, laboratory, and mesocosm studies. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann.*, 30:191-271.

Cunningham, C.J., Ivshina, I.B., Lozinsky, V.I., Kuyukina, M.S., Philp, J.C., 2004. Bioremediation of diesel-contaminated soil by microorganisms immobilized in polyvinyl alcohol. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54:167 – 174.

Cutright, T.J., 1995. A feasible approach to the bioremediation of contaminated soil from lab scale to field test. *Fresenius Env. Bul*, 4:67-73.

D'Agostinho, A. & Flues, M., 2006. Determinação do coeficiente de distribuição (Kd) de benzo(a)pireno em solo por isotermas de sorção. *Química Nova*, 29:657-661.

Dahl, U., Gorokhova, E., Breitholtz, M., 2006. Application of growth-related sublethal endpoints in ecotoxicological assessments using a harpacticoid copepod. *Aquatic Toxicology*, 77:433-438.

Damin, V., 2005. Biodegradação, sorção e dessorção do herbicida ¹⁴C-Diuron em dois latossolos tratados com lodo de esgoto. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 71p.

Del'Árco, J.P., 1999. Degradação de hidrocarbonetos por bactérias e fungos em sedimento arenoso. Tese de doutorado. Rio de Janeiro, EQ/UFRJ. Apud: Borges, R.M.H., 2001. Biodegradação em solo argiloso contaminado com petróleo. Dissertação de Mestrado. Programa EQ-ANP. RJ, 180p.

Devinny, J. & Chang, S.H., 2000. *Bioaugmentation for soil bioremediation*. In: Wise, D.L., Trantolo, D.J. (Eds.), *Bioremediation of Contaminated Soils*. Marcel Dekker, New York, pp. 465–488.

Dias, M. A. G., 2005. Opções reais híbridas com aplicações em petróleo. *Tese de doutorado*. Rio de Janeiro: PUC, Departamento de Engenharia Industrial, 490p.

Dibble, J.T. & Bartha, R., 1979. Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludget. *Applied and environmental Microbiology*, 37:729-739.

Dorn, P. B. & Salanitro, J. P., 2000. Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. *Chemosphere*, 40:419-426.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA), 1997. *Manual de métodos de análise de solo*. 2.ed. Rio de Janeiro, Centro Nacional de Pesquisa de Solo, 212p.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA), 1999. *Sistema brasileiro de classificação de solos*. Brasília, 412p.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA), 2002. Disponível em: www.cnpab.embrapa.br/solo.html. Acesso em: 20/05/2004.

Ericsson, M. & Colmsjo, A., 2002. D ynamic microwave-assisted extraction coupled on-line with solid-phase extraction: determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment and soil. *Journal of Chromatography A*, 964: 11-20.

Eriksson, M., Dalhammar, G., Mohn, W. W., 2002. Bacterial growth and biofilm production on pyrene. *FEMS Microbiology Ecology*, 40:21-27.

Farenhorst, A., 2006. Importance of soil organic matter fractions in soil-landscape and regional assessments of pesticide sorption and leaching in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 70:1005-1012.

Felsot, A. & Dahm, P.A., 1979. Sorption of Organophosphorous and Carbamate Insecticides by Soil, J. Agri. Food Chem., v. 27, pp. 394. *Apud* Zytner, R.C., 2002. Organic Compounds in Unsaturated Soil for ENGG*6670 Fall 2002 soil_overview_03.wpd. Disponível em: <www.soe.uoguelph.ca/webfiles/rzytner/HazWaste/soil_overview_03.pdf>. Acesso em: 25/02/2005.

Finotti, A. R., Caicedo, N. L., Rodriguez M. T. R., 2001. Contaminações subterrâneas com combustíveis derivados de petróleo: toxicidade e a legislação brasileira. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos/Associação Brasileira de Recursos Hídricos, ABRH*, 6:29-46.

Fonseca, S.G.C., Silva, L.B.L., Castro, R.F., Santana, D.P., 2004. Validação de metodologia analítica para dosagem de soluções de Lapachol por CLAE. *Química. Nova*, 27 (1):157-159.

Gallego, J.L.R., Loredó, J., Llamas, J.F., Vasquez, F., Sanchez, J., 2001. Bioremediation of diesel contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation*, 12: 325–335.

Gao, B., Yang, L, Wang, X., Zhao, J., Sheng, G., 2000. Influence of modified soils on the removal of diesel fuel oil from water and the growth of oil degradation micro-organism. *Chemosphere*, 41: 419-426.

Gao, Y., Xiong, W., Ling, W., Wang, X, Li, Q., 2007. Impact of exotic and inherent dissolved organic matter on sorption of phenanthrene by soils. *Journal of Hazardous Materials*, 140:138-144.

Garcia, S.S., Moro, D.B., Vocatore, C.M., Lopes, E.W., Jablonski, A., 2003. *Avaliação da cromatografia líquida para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em amostras aquosas*. XI Encontro de Química da Região Sul. Pelotas, RS.

Gestel, K. V., Mergaert, J., Swings, J., Coosemans, J., Ryckeboera, J., 2003. Bioremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste. *Environmental Pollution*, 125:361–368.

Ghazali, F.M., Rahman, R.N.A., Saleh, A.B., Basri, M., 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54:61-67.

Gimeno, R.A.; Altelaar, A.F.M.; Marcé, R.M.; Borrull, F., 2002. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic sulfur heterocycles by high-performance liquid chromatography with fluorescence and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry detection in seawater and sediment samples. *Journal of Chromatography A*, 958: 141-148.

Grathwohl, P., 1998. Diffusion in natural porous media. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA, 207p.

Guiguer, N., 1996. Poluição das águas subterrâneas e do solo causada por vazamentos em postos de abastecimentos. *Waterloo Hydrogeologic Inc*, 356p.

Gustafson, J., Tell, J.G., Orem, D., 1997. *Volume 3: Selection of Representative TPH Fractions Based on Fate and Transport Considerations*. TPH Working Group Series, 102p.

Hagopian-Shlekat, T., Chandler, G.T., Shaw, T.J., 2001. Acute toxicity of five sediment-associated metals, individually and in a mixture, to the estuarine meiobenthic harpacticoid copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Marine Environmental Research*. v.51, p. 247-264.

Harayama, S., 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. *Environmental biotechnology*, 8:268-273.

Heidrich, S., Weiß, H., Kaschl, A., 2004. Attenuation reactions in a multiple contaminated aquifer in Bitterfeld (Germany). *Environmental Pollution*, 129:277–288.

Hesselink, W., Schiffer, R. H. N. A., Koostra, P. R., 1995. Separation of polycyclic aromatic hydrocarbons on a wide-pore polymeric C₁₈ bonded phase. *Journal of Chromatography A*, 697:165-174.

Hillel, D.. Fundamentals of Soil Physics. Academic Press, Orlando, FL., 1980. In: Gustafson, J., Tell, J.G., Orem, D., 1997. *Volume 3: Selection of Representative TPH Fractions Based on Fate and Transport Considerations*. TPH Working Group Series, 102p.

Holliger, C., Gaspard, S., Glod, G., Heijman, C., Wolfram, S., Schwarzenbach, R. P., Vazquez, F., 1997. Contaminated environments in the subsurface and bioremediation: organic contaminants. *FEMS Microbiology Reviews*, 20:517-523.

Huang, X. D., El-Alawi, Y., Penrose, D.M., Glick, B., Greenberg, B.M., 2004. A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Environmental Pollution*, 128:429–435.

Hutchinson, T.H. & Williams, T.D., 1989. The use of sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) and abenthic copepod (*Tisbe battagliai*) in short-term tests for estimating the chronic toxicity to industrial effluents. *Hydrobiology*, 188/189:567-572.

IARC (International Agency on Cancer Research) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. World Health Organization International Agency for Research on Cancer. Volume 3 Certain Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Heterocyclic Compounds. Summary of Data Reported and Evaluation. Disponível em: <http://www-cie.iarc.fr/htdocs/indexes/vol03index.html> e www.cpcb.nic.in/ph/ch31103.htm - 33k. Acesso em: 05/01/2006.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), 2003. *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*, DOQ-CGCRE-008, revisão: 01.

ISO 14669, 1999. *Water quality – Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea)*. Geneva, Switzerland. First edition. 1999-04-01.

Joner, E.J., Corgié, S.C., Amellal, N., Leyval, C., 2002. Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*, 34: 859-864.

Jørgensen, K. S., Puustinen, J., Suottilä, A.M., 2000. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental Pollution*, 107:245-254.

Kaipper, B. I. A., 2003. Influência do etanol na solubilidade de hidrocarbonetos aromáticos em hidrocarbonetos aromáticos em aquíferos contaminados por óleo diesel. *Tese de doutorado*. Química Analítica, UFSC, 179p.

Karthikeyan, K & Singh, K., 2002. Bioremediation of polluted soils – an overview. 17th WCSS, 14 -21 August 2002, Thailand. Symposium no. 42. Paper 379, 5p.

Karthikeyan, R. & Bhandari, A., 2001. Anaerobic biotransformation of aromatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in soil microcosms: a review. *Journal of Hazardous Substance Research*, 3:1-19.

King, R.B., Long, G.M., Shelav, J.K., 1992. *Practical Environmental Biodegradation the Field Guide*. Portland, Book News.

Kleineidam, S, Rugner, H., Ligouis, B., Grathwohl, P., 1999. Organic Matter Facies and Equilibrium Sorption of Phenanthrene. *Environ. Sci. Technol*, 33:1637-1644.

Kögel-Knabner, I. & Totsche, K.U., 1998. *Sorption and desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to individual constituents of natural and contaminated soils*. 16th World Congress of Soil Science. Scientific registration n° 237 Symposium: 8 Presentation: oral, 1998. 8p. Disponível em: <http://natres.psu.ac.th/Link/SoilCongress/bdd/symp8/237-r.pdf> Acesso em: 01/07/05.

Kottler, B.D. & Alexander, M., 2001. Relationship of properties of polycyclic aromatic hydrocarbon to sequestration in soil. *Environmental Pollution*, 113:293-298.

Laak, T., 2005. Sorption to soil of hydrophobic and ionic organic compounds: measurement and modeling. *Dissertation*. Universiteit Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde, IRAS. Disponível em: www.igitur-archive.library.uu.nl/dissertations/2006-0529-200329/full.pdf. 157p. Acesso em: abril/2007.

Larrain, A., Soto, E., Silva, J., Bay-Schmith, E., 1998. Sensitivity of the meiofaunal copepod *Tisbe longicornis* to K₂Cr₂O₇ under varying temperature regimes. *Bulletin Environmental Toxicology*, 61:391-396.

Leahy, J.G. & Colwell, R.R., 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiological Reviews*, 54:305-315.

Lee, J., Hundal, L.S., Horton, R., Tompson, M.L., 2002. Vadose Zone processes and chemical transport: Sorption and transport behavior of naphthalene in an aggregated soil. *J. Environ. Qual*, 31: 1716-1721.

Levenspiel, O., 2000. *Engenharia das reações químicas*. Tradução: Verônica M. A. Calado. Edgard Blücher, São Paulo, 563p.

Liang, C., Dang, Z., Xiao, B., Huang, W., Liu, C., 2006. Equilibrium sorption of phenanthrene by soil humic acids. *Chemosphere*, 63:1961–1968.

Liebeg, E. W. & Cutright, T.J., 1999. The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 44:55-64.

Limousin, G., Gaudet, J.P., Charlet, L., Szenknet, S., Barthès, V., Krimissa, M., 2007. Sorption: isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement. *Applied Geochemistry*, 22 (2):249-275.

Lopes, A. S. & Guilherme, L. R., 1992. *Boletim técnico N° 2*. Interpretação de análise do solo: Conceitos e Aplicações. ANDA Associação Nacional para Difusão de Adubos, São Paulo, 64p.

Löser, C., Seidel, H., Hoffmann, P., Zehnsdorf, A., 1999. Biodisponibility of hydrocarbons during microbial remediation of a sandy soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51:105-111.

Lotufo, G.R. & Abessa, D.M.S., 2002. Testes de toxicidade com sedimento total e água intersticial estuarinos utilizando copépodos bentônicos. In: Nascimento, I.A.; Souza, E.C.P.M.; Nipper, M. *Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil*. Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda., São Paulo, 262p.

Lotufo, G.R. & Fleeger, J.W., 1997. Effects of sediment-associated phenanthrene on survival, development and reproduction of two species of meiobenthic copepods. *Marine Ecology-Progress Series*, 151:91-102.

Lotufo, G.R., 1997. Toxicity of sediment-associated PAHs to na estuarine copepod: Effects on survival, feeding, reproduction and behaviour. *Marine Environmental Research*, 44:149-166.

Lotufo, G.R., 1998. Bioaccumulation of sediment-associated fluoranthene in benthic copepods: uptake, elimination and biotransformation. *Aquatic Toxicology*, 44:1-15.

Marcé, R.M. & Borrell, F., 2000. Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds. Review. *Journal of Chromatography A*, 885:273–290.

Marchal, R., Penet, S., Solano-Serena, F., Vandecasteele, J.P., 2003. Gasoline and Diesel Oil Biodegradation. *Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP*, 58:441 – 448.

Margesin, R. & Schinner, F., 1999. Biodegradation of diesel oil by cold-adapted microorganisms in presence of sodium dodecyl sulphate. *Chemosphere*, 38:3463-3472.

Mesquita, A. C., 2004. Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes. *Tese de doutorado*. Pós-graduação de Engenharia da UFRJ. 158p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004. *Portaria n.º 518*, de 25 de março de 2004. Disponível em: http://www.pgr.mpf.gov.br/pgr/4camara/grupos_trabalho/residuos/ministerio_saude/portaria_518-2004.pdf

Morais, E. B., 2005. Biodegradação de resíduos oleosos provenientes de refinaria de petróleo através do sistema de biopilhas. *Dissertação de Mestrado*. Pós-graduação em Microbiologia, Universidade Estadual Paulista.

Mulligan, C.N., 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133:183-198.

Namkoong, W., Hwang, E.-Y., Park, J.-S., Choi, J.-Y., 2002. Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. *Environmental Pollution*, 119:23–31.

Nascimento, I.A.; Souza, E.C.P.M.; Nipper, M. *Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil*. Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda., São Paulo, 262p.

Nipper, M., 2002. *Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil*. São Paulo: Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda. 262p.

Nitschke, M & Pastore, G.M., 2002. Biosurfactantes: Propriedades e aplicações. *Química Nova*, 25 (5): 772.776.

OECD TG 106, 2001. *C18 Test Determination of Soil Adsorption/Desorption, using a Batch Equilibrium Method*. Dir 2001/59/EC (O.J. L225 2001).

Oliveira, E., 1992. Contaminação de aquíferos por hidrocarbonetos provenientes de vazamento de tanques de armazenamento subterrâneo. *Dissertação de mestrado*. Instituto de Geociências da Universidade de São Paulo, 112p.

Oros, D.R. & Ross, J.R.M., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons in San Francisco Estuary Sediments. *Marine Chemistry*, 86:169–184.

Pensado, L., Blanco, E., Casais, M. C., Mejuto, M. C., Martinez, E., Carro, A. M., Cela, R., 2004. Strategic sample composition in the screening of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, 1056:121-130.

Pereira Netto, A. D., Moreira, J.C., Dias, A. E., Arbilla, G., Ferreira, L.L.F., Oliveira, A.S., Barek, J., 2000. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NPAHs): uma revisão metodológica. *Química Nova*, 23:765 - 773.

PETROBRAS, 2003. Ficha de Informação e Segurança de Produto Químico – FISPQ. Produto: óleo diesel, data: 19/02/2003, No. FISPQ: Pb0091_P, Versão: 0.1P, 6p.

PETROBRAS, 2004. PORTAL PETROBRAS BR DISTRIBUIDORA. Disponível em: <<http://www.br.com.br/portalbr/calandra.nsf#http://www.br.com.br/portalbr/calandra.nsf/0/FC04353360FFF67603256DAD004D0E47?OpenDocument&SGrandes+consumidores>> Acesso em 31/07/2004.

Picarelli, S., 2003. Avaliação da contaminação de solos por hidrocarbonetos e metais pesados em diques de contenção. *Dissertação de Mestrado*. Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e Materiais - PPGEM. UFRGS. Porto Alegre, RS, 95p.

Pine, S.H., 1987. *Organic Chemistry*. McGraw-Hill Book Company, 5^h, New York, 1187p.

- Pinto, C.S.C., Souza-Santos, L.P., Santos, P.J.P., 2001. Development and population dynamics of *Tisbe biminiensis* (Copepoda: Harpacticoida) reared on different diets. *Aquaculture*, 198:253-267.
- Plaza, G., Nalecz, J., Ulfing, K., Brigmon, R. L., 2005. The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. *Chemosphere*, Oxford, 59:289-296.
- Potin, O., Veignie, E., Rafin, C., 2004. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 51:71–78.
- Pounds, N.A., Hutchinson, T.H., Williams, T.D., Whiting, P., Dinan, L., 2002. Assessment of putative endocrine disrupters in an in vivo crustacean assay and an in vitro insect assay. *Marine Environmental Research*, 54:709-713.
- Prado, H., 1991. *Manejo dos solos – aspectos pedológicos e suas implicações*. São Paulo: Nobel, 116p.
- Prado, H., 1995. *Pedologia simplificada*. Arquivo Agrônomo Nº 1 – DEZEMBRO/95 (2ª edição – ampliada e totalmente modificada). 16p.
- Rahman, M., 2002. *Sorption and Transport Behaviour of Hydrophobic Organic Compounds in Soils and Sediments of Bangladesh and their Impact on Groundwater Pollution – Laboratory Investigations and Model Simulations*. Institut und Museum für Geologie und Paläontologie der Universität Tübingen Sigwartstraße 10, D-72076 Tübingen, 73p.
- Raimundo, R.S. & Rizzo, A.C.L., 2004. *Emprego de biorreator não convencional no tratamento de solo contaminado por petróleo*. Trabalho apresentado na XII JIC, julho de 2004, realizado pelo Centro de Tecnologia Mineral (CETEM), 10p.
- Ran, Y., Xiao, B., Huang, W., Peng, P., Liu, D., Fu, J., Sheng, G., 2003. Organic compounds in the environment: kerogen in aquifer material and its strong sorption for nonionic organic pollutants. *J. Environ. Qual.*, 32:1701 – 1708.
- Renzoni, A., Mattei, N., Lari, L., Fossi, M.C. (eds), 1994. *Contaminants in the environment: a multidisciplinary assessment of risks to man and other organisms*. Lewis Publishers, London, 1994, 275p.
- Ribani, M., Botolli, C.B.G., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F., Melo, L.F.C., 2004. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química. Nova*, 27 (5):771-780.
- Richard, J.Y. & Vogel, T.M., 1999. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 44:93-100.
- Riis, V., Babel, W., Pucci, O. H., 2002. Influence of heavy metals on the microbial degradation of diesel fuel. *Chemosphere*, 49:559–568.
- Ritter, E., 1998. Efeito da Salinidade na Difusão e Sorção de Alguns Íons Inorgânicos em um Solo Argiloso Saturados, Tese de Doutorado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 216p.
- Rizzo, A.C.L., Cunha, C.D., Raimundo, R.S., Magalhães, M.H., Lemos, J.L.S., Millioli, V.S., Leite, S.G.F., Santos, R.L.C.; Soriano, A.U., 2003. *Identification of the bioremediation limiting factors of a clay bearing soil contaminated with crude oil*. 10th Annual International Petroleum Environmental Conference, Houston, USA, 10p.

Robert, F. & Israel, S., 1994. Response of bacterial populations to petroleum hydrocarbon contamination in tropical soils. *Presentación en el 94th Am. Soc. Microbiol. Gen. Meeting*, 23-27, Mayo, Las Vegas, Nevada.

Rugner, H., Kleinedam, S., Grathwohl, P., 1999. Long Term Sorption Kinetics of Phenanthrene in Aquifer Materials. *Environ. Sci. Technol.*, 33:1645-1651.

Salloum, M. J., Dudas, M. J., McGill, W. B., 2001. Variation of 1-naphthol sorption with organic matter fractionation: the role of physical conformation. *Organic Geochemistry*, 32:709-719.

Salloum, M.L; Chefetz, B.; Hatcher, P.G., 2002. Phenanthrene Sorption by Aliphatic-Rich Natural Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.*, 36:1953 – 1958.

Santo, L.S.E., 2002. Biodegradabilidade de óleo diesel por microrganismos nativos da areia da praia de SUAPE-PE e predição de um modelo relacionado ao derramamento do poluente. *Dissertação de Mestrado*, Escola de Engenharia, CTG, UFPE, 84p.

Schmidt, C. A. B., 2004. Aplicação de Técnica Eletrocinética em Laboratório a Dois Tipos de Solos Argilosos [Rio de Janeiro]. (COPPE/UFRJ, D.Sc. Engenharia Civil, 2004). *Tese de Doutorado* – Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE/UFRJ. XIV, 336 p. 29,7 cm

Schroeder, R.H.A., Rodríguez, V. I. D., Hernández, L. G., 1999. Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el tropico mexicano. *Terra*, 17:159 - 174.

SECRETARIA DO GABINETE CIVIL DE PERNAMBUCO. Publicada em 08/07/2005. Disponível em: <http://www.pe.gov.br/gabinete_civil/news1_.asp?idnoticia=6726>. Acesso em: 07/02/2005.

Semple, K.T., Reid, B.J., Fermor, T.R., 2001. Impact of composting strategies on treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution*, 112:269-283.

Silva, E.M., Chastinet, C.B.A., Navarro, M.F.T., Barros, A.F., Cavalcante, P., Mota, M.F.V., 2000. Utilização de ensaios de ecotoxicidade com *Tisbe holothuriae* (Copepoda, Harpacticoida) em programas de avaliação da toxicidade de efluentes complexos. In: Espíndola, E.L.; Botta-Paschoal, C.M.R.; Rocha, O.; Bohrer, M.B.; Oliveira-Neto, A.L. (editores) *Ecotoxicologia: Perspectivas para o Século XXI*. São Carlos, RiMa, 575p.

Silvers, K.G., 2003. Determination of PAH Distribution and Sorption Characteristics in Soils and Sediments based on the Characterisation of Organic Matters. *Tesis Tübingen*. 50p. Disponível em: <http://www.uni-tuebingen.de/geo/msc-aeg/pdf/2001/silvers.pdf>. Acesso em: 24/03/2007.

Sisinno, C.L.S., Pereira Netto, A.D., Rego, E.C.P., Lima, G.S.V., 2003. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em resíduos sólidos industriais: uma avaliação preliminar do risco potencial de contaminação ambiental e humana em áreas de disposição de resíduos. *Cad. Saúde Pública*, 19:671-676.

Smith, K.E.C., Thomas, G.O., Jones, K.C., 2001. Seasonal and Species Differences in the Air-Pasture Transfer of PAHs. *Environ. Sci. Technol.*, 35:2156-2165.

Smreczak, B., Maliszewska-Kordybach, B., Martyniuk, S., 1999. Effect of PAHs and heavy metals on activity of soil microflora. In: *Bioavailability of organic xenobiotics in the environment* NATO ASI Series, 64:377– 380.

Song, H.G. & Bartha, R., 1990. Effects of jet fuel spills on microbial community of soil. *Applied Environmental Microbiology*, 56:641-651.

Song, H.G., Wang, X., Bartha, R., 1990. Bioremediation Potential of Terrestrial Fuel Spills. *Applied and Environmental Microbiology*, 56:652-656.

Song, I.F., Jing, X., Fleischmann, S., Wilke, B.M., 2002. Comparative study of extraction methods for the determination of PAHs from contaminated soils and sediments. *Chemosphere*, 48:993–1001.

Souza, E.C.P.M., 2002. Toxicologia Marinha: Histórico. In: Nascimento, I.A.; Souza, E.C.P.M.; Nipper, M. *Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil*. São Paulo: Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda., 262p.

Standard Methods for Examination of Water and Wastewater 20th, 1999. APHA-AWWA-WEF, Washington.

Street, G.T., Lotufo, G.R.; Montagna, P.A., Fleeger, J.W., 1998. Reduced genetic diversity in a meiobenthic copepod exposed to a xenobiotic. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 222:93-111.

Suguio, K., 1973. *Introdução à sedimentologia*. Edgar Blucher, São Paulo, 317p.

Syldatk, C., Lang, S., Wagner, F., Wray, V., Witte, L., 1985. Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* sp. DSM 2874 grown on n-alkanes. *Z. Naturforsch*, 40: 51-60.

Thomas, K.V., Barnard, N., Collins, K., Eggleton, J., 2003. Toxicity characterization of sediment porewaters collected from UK estuaries using a *Tisbe battagliai* bioassay. *Chemosphere*. 53:1105-1111.

Thornton, S. F., Bright, M. I., Lerner, D., Tellam, H., 2000. Attenuation of landfill leachate by UK Triassic sandstone aquifer materials 2. Sorption and degradation of organic pollutants in laboratory columns. *Journal of Contaminant Hydrology*, 43:355–383.

TRANSPETRO (PETROBRÁS TRANSPORTE S.A.), 2003. Plano de contingência local. *Anexo 24: Derrames de hidrocarbonetos em terra e em águas interiores*. Ver.: 00. p. 1-59.

Trindade, P.V.O., 2002. Avaliação das técnicas de bioaumento e bioestímulo no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo. *Tese de Mestrado*. Universidade Federal do Rio de Janeiro – Escola de Química / (EQ/UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil, 127p.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2003. *Health Consultation: BARTON SPRINGS POOL*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry Division of Health Assessment and Consultation Atlanta, Georgia 30333. Texas Department of Health (TDH), 73p.

USEPA (United States Environmental Protection Agency), 1993. *Behavior and determination of volatile organic compounds in soil: a literature review*. EPA/600/R-93/140. Washington, DC. Disponível em: <<http://permanent.access.gpo.gov/lps34511/biohaz1.pdf>> Acesso em: 29/03/2004.

USEPA (United States Environmental Protection Agency), 1996a. *Seminars Bioremediation of Hazardous Waste Sites: Practical Approaches to Implementation*. EPA/625/K-96/. Washington, DC. Disponível em: <<http://permanent.access.gpo.gov/lps34511/biohaz1.pdf>> Acesso em: 03/03/2004.

USEPA (United States Environmental Protection Agency), 1996b. *Test methods for evaluating solid wastes*. Disponível em: <<http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/3611b.pdf>>. Acesso em: 03/03/2004.

USEPA (United States Environmental Protection Agency), 2003. *Report on bioavailability of chemical wastes with respect to the potential for soil bioremediation*. EPA/600/R-03/. Disponível em: <www.epa.gov/oerrpage/superfund/resources/soil/toc.htm>. Acesso em: 25/02/2005.

USEPA (United States Environmental Protection Agency), 2004a. *Appendix K. Soil Organic Carbon (Koc) / Water (Kow) Partition Coefficients*. Disponível em: <www.epa.gov/oerrpage/superfund/resources/soil/toc.htm>. Acesso em: 03/03/2004.

USEPA (United States Environmental Protection Agency), 2004b. *Chapter III: Behavior of hydrocarbons in the subsurface*. Disponível em: <www.epa.gov/swrust1/pubs/fprg_chap3.pdf>. Acesso em: 03/03/2004.

USEPA (United States Environmental Protection Agency), 2004c. *Contamination fate and transport analysis in evaluation of the environment*. Tennessee Products NPL Cleanup Site Documents. Disponível em: <<http://www.epa.gov/Region4/waste/npl/npltn/tnprod/sect8.pdf>>. Acesso em: 03/03/2004.

USEPA (United States Environmental Protection Agency), 2004d. *Test Methods 8270*. Disponível em: <http://www.epa.gov/sw-846/main.htm>. Acesso em fevereiro/2004. Acesso em: 03/03/2004.

Vieira, E.M, Prado, A.G.S., Landgraf, M.D., Rezende, M.O.O., 1999. Estudo da adsorção/dessorção do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D) em solo na ausência e presença de matéria orgânica. *Química Nova*, 22:305-308.

Wang, X. & Bartha, R., 1990. Effects of bioremediation on residues, activity and toxicity in soil contaminated by fuel spills. *Soil Biol. Biochem.* 22:501-505.

Weisman, W. (ed), 1998. *Volume 1: Petroleum Hydrocarbon Analysis of Soil and Water in the Environment*. TPH Working Group Series. Disponível em: <http://www.aehs.com/publications/catalog/contents/tph.htm>. Acesso em: 25/02/2005.

Weissenfels, W.D., Klewer, H.J., Langhoff, J., 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36:689-696.

Wernersson, A.S., Dave, G., Nilsson, E., 2000. Assessing pollution and UV-enhanced toxicity in Torsviken, Sweden, a shallow bay exposed to contaminated dredged harbor sediment and hazardous waste leachate. *Aquatic Ecosystem Health and Management*. 3:301-316.

Wilson, S.C. & Jones, K.C., 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environmental Pollution*, 81:229-249.

Xing, B., 1997. The effect of the quality of soil organic matter on sorption of naphthalene. *Chemosphere*, 35:633-642.

Zagatto, P.A., 1998. *Significado dos estudos de validação de testes de toxicidade: Resultados publicados*. Anais do 5º Encontro Brasileiro de Ecotoxicologia – Perspectivas da Ecotoxicologia no Brasil. Itajaí, SC.

Zytner, R.C., 2002 *Organic Compounds in Unsaturated Soil for ENGG*6670 Fall 2002* soil_overview_03.wpd. Disponível em: www.soe.uoguelph.ca/webfiles/rzytner/HazWaste/soil_overview_03.pdf. Acesso em: 25/02/2005.

ANEXOS

Anexo 1.

DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DO SOLO ESTUDADO

Oo- 5-0cm; Camada constituída por restos de folhas pouco decompostas e raízes.

A- 0-13cm, bruno-acinzentado-escuro (10YR 4/2, úmido); franco-argiloso; moderada e forte pequena a média granular; firme, plástico e pegajoso; transição clara e plana.

AB - 13-24cm, bruno-escuro a bruno (10YR 4/3, úmido); argila arenosa; moderada pequena blocos subangulares; firme, plástico e pegajoso; transição clara e plana.

BA- 24-46cm, bruno-amarelado (10YR 5/6, úmido); argila; fraca pequena blocos subangulares e angulares; firme, plástico e pegajoso; transição clara e ondulada (15-30 cm).

Bt1- 46-88cm, vermelho-amarelado (5YR 5/8, úmido), mosqueado comum, pequeno a médio e distinto, bruno-amarelado (10YR 5/6, úmido); argila; moderada pequena a média blocos subangulares e angulares; firme, plástico e pegajoso; transição gradual e plana.

Bt2- 88-113cm, vermelho-amarelado (5YR 5/8, úmido), mosqueado pouco, pequeno a médio e distinto, vermelho (2,5YR 4/8, úmido) e comum, pequeno a médio e distinto, bruno-amarelado (10YR 5/6, úmido); argila; moderada pequena a média blocos subangulares e angulares; firme, plástico e pegajoso; transição gradual e ondulada (14-40cm).

BC- 113-150cm, vermelho-amarelado (5YR 5/8, úmido), mosqueado comum, pequeno a médio distinto, bruno-amarelado (10YR 5/6, úmido); franco-argiloso; fraca pequena a média blocos subangulares; firme, plástico e pegajoso; transição clara e irregular .

C/B- 150-202cm.; coloração variegada composta de vermelho-amarelado (5 YR 5/8, úmido) e amarelo-avermelhado (7,5YR 7/6, úmido); franco-argilo-arenoso; maciça; friável, ligeiramente plástico e ligeiramente pegajoso; transição clara e plana.

C- 202cm+, material decomposto proveniente de gnaisses e migmatitos com predominância de minerais primários.

RAÍZES: Muitas em Oo e A; comuns no AB e poucas em BA e Bt1.

OBSERVAÇÕES: 1. Perfil coletado úmido

2. Muitos poros em A, AB e BC e comuns em BA, Bt1 e Bt2.

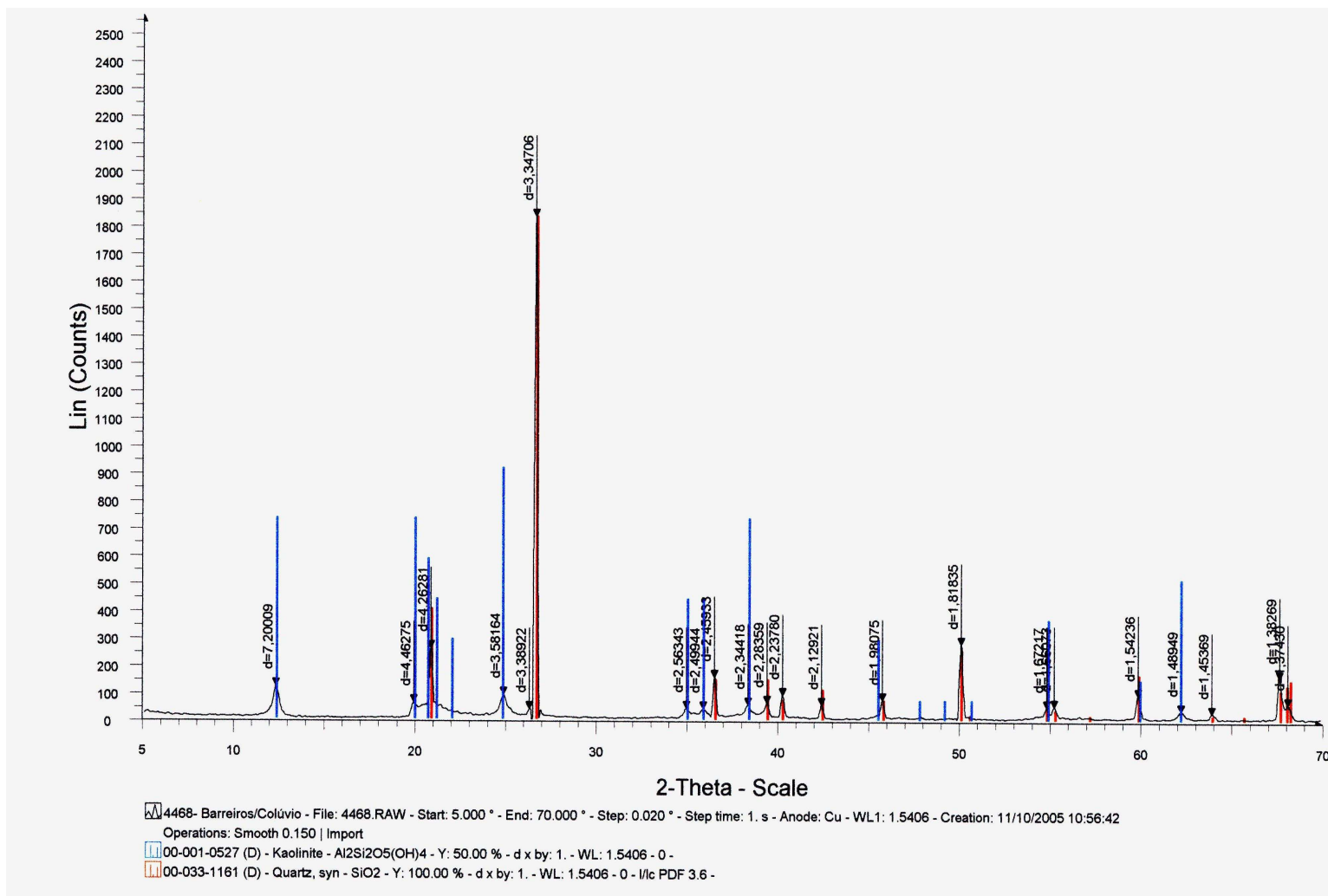
3. Foram coletadas amostras compostas para análise de fertilidade em área sob vegetação florestal.

4. A cerosidade do C/B se restringe as partes relacionadas ao B

5. Fragmentos de quartzo encontrados a partir do horizonte BA.

Anexo 2.

DIFRATOGRAMA DE RAIOS X



Anexo 3.

RESUMO DO MÉTODO DE ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICAS DO SOLO

- ◆ Densidade global e partícula – determinação do volume de álcool necessário para completar a capacidade do balão volumétrico, contendo solo seco em estufa. Pesa 20 g de solo, coloca em lata de alumínio e leva à estufa e deixa secar por 6 a 12 horas. Pesa para se obter o peso seco. Transfere a amostra para um balão de 50 mL, adiciona-se álcool etílico, agitando bem o balão para eliminar bolhas de ar. Prossegue a operação, vagarosamente, até a ausência de bolha e completar o volume do balão.

$$Densidade(g/cm^3) = m/50 - V$$

Onde m= peso da amostra seca a 105°C (g)

V = volume de álcool gasto (cm³)

- ◆ Granulometria – a distribuição granulométrica do solo foi determinada gravimetricamente por pesagem seca. Foram pesadas 30 g da amostra única de solo (peso seco) e feito o peneiramento por via úmida com descarte da fração fina. As frações areia e cascalho foram levadas à secura, em estufa a 60°C, até peso constante. Em seguida, essas frações foram repesadas e seus respectivos percentuais determinados. O percentual da fração fina foi determinado pela diferença da massa perdida durante o peneiramento.
- ◆ Porosidade – determina o volume de poros totais do solo ocupado por água e/ou ar. A Porosidade Total pode ser calculada como $PT = 100 (densidade\ real - densidade\ aparente) / densidade\ real$.
- ◆ Relação silte/argila – razão entre o percentual de silte e de argila.
- ◆ Textura – granulometria do solo.
- ◆ Capacidade de campo (CC) – em uma proveta foi pesada certa quantidade de solo ($m_{solo\ úmido}$) (cerca de 500g), quantidade esta que seja suficiente para formar uma pequena coluna. Foi adicionada água ao solo, gota a gota, até que toda a coluna de solo fosse percolada, chegando ao fundo da proveta (condição de saturação). Após a pesagem ($m_{sistema\ saturado}$), o sistema foi colocado em estufa a 110°C por 24 horas. Após a secagem do material, o sistema será repesado ($m_{solo\ seco}$) e sua capacidade de campo foi determinada através da expressão:

$$M_{água\ retida} = (m_{sistema\ saturado}) - (m_{solo\ seco})$$

$$Capacidade\ de\ campo\ (\%) = (m_{água\ retida} / m_{solo\ úmido}) \times 100$$

- ◆ Condutividade hidráulica – velocidade em que a água se movimenta através do solo.

$$K = Q \cdot L / A \cdot H \cdot t$$

Onde: K = condutividade hidráulica (cm.h⁻¹)

Q = volume do percolado em mL, ou seja, o valor da última leitura quando não há variação entre os valores anteriores, ou a média das duas leituras quando há alguma variação.

L = altura do bloco do solo (cm)

H = altura do bloco do solo e da coluna (cm)

A = área do cilindro (cm²)

t = tempo (h)

- ◆ Complexo sortivo

- o Cálcio, magnésio e alumínio trocáveis (Ca, Mg e Al) – foram extraídos com solução de KCl (cloreto de potássio) 1 mol.L⁻¹ e determinados por Espectrofotometria de absorção atômica (EAA).
- o Sódio, potássio e fósforo trocáveis (Na, K e P) – em solução de MEHLICH-1, a determinação foi feita utilizando foi feita por fotometria de chama (Na e K) e por colorimetria (P) a partir de uma curva pré-estabelecida;
- o Acidez potencial (H + Al) – extração da acidez do solo com solução tamponada a pH 7,0 de acetato de cálcio e determinação volumétrica com hidróxido de sódio (NaOH) em presença de fenolftaleína como indicador. A acidez potencial (cmol_c.dm⁻³) é calculada através da equação:

$$H^+ + Al^{+++} = (a + b) \times 1,65$$

Onde: a = volume de NaOH gasto na amostra (mL); b = NaOH gasto na prova em branco (mL); 1,65 = fator de correção (eficiência do método).

- o SB – Soma das bases trocáveis (Ca²⁺ + Mg²⁺ + Na⁺ + K⁺)
- o CTC – capacidade de troca catiônica

Onde: CTC efetiva = SB + Al³⁺ e CTC a pH 7,0 = SB + H⁺ + Al³⁺

- ◆ Potencial hidrogenionico (pH) – uma amostra de 10 cm³ de solo, terra fina seca ao ar, e 25 ml de água deionizada foram colocadas em um béquer de 50 mL. A amostra foi agitada com um bastão de vidro durante 1 min e depois mantida em repouso por 1 h. Novamente, a amostra foi agitada e em seguida foi feita a leitura do pH da suspensão homogeneizada, empregando-se um potenciômetro digital previamente calibrado com soluções padrão de pH 4,0 e 7,0.
- ◆ Teor de carbono orgânico e matéria orgânica (C_{org} e M.O.) – a determinação do teor de M.O. e do C_{org} do solo foi realizada através do método *Walkley-Black* modificado. Inicialmente, o C_{org} de 0,5 g de solo foi oxidado pelo dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) e na sequência foi feita

a titulação do excesso de dicromato com sulfato ferroso (H_2SO_4). O teor de C_{org} (g.kg^{-1}) foi calculado pela formula:

$$C_{\text{org}} = (40 - T) \times f \times 0,06$$

Onde: T = volume (mL) de sulfato ferroso gasto na titulação da amostra de solo; f = 40/ volume de sulfato ferroso gastos na titulação da prova em branco.

O teor de M.O. (g.kg^{-1}) foi calculado considerando através da equação abaixo, uma vez que sua concentração possui aproximadamente 58% de carbono.

$$MO = C_{\text{org}} \times 1,724$$

- ◆ Nitrogênio total (amoniacal e nitratos) (N) – solução Kjeldah por digestão sulfúrica.
- ◆ Nitrogênio total (amoniacal e nitratos) (N) – solução Kjeldah por digestão sulfúrica. Fósforo disponível (ortofosfatos) (P) – a dosagem do fósforo em extrato de solo foi realizada mediante a mediação da intensidade de coloração de azul desenvolvida por um complexo de fosfo-molibdico em meio redutor.
- ◆ Óleos e Graxas (O&G) – adaptação da metodologia descrita na seção 5520D do Standard Methods (1999). Pesou 5 g de solo seco e transferiu-se para cartuchos apropriados para extração. A amostra foi levada ao extrator Soxhlet a 80°C, reciculada com velocidade de 3 ciclos.min⁻¹, durante 4 horas. Os solventes utilizados foram acetona e hexano (1:1). Após a evaporação do solvente, o teor de óleos e graxas foi obtido pela diferença de peso do balão contendo o óleo extraído e o balao vazio, conforme apresentado na equação abaixo:

$$O \& G = \left(\frac{(P1 - P2)}{m} \right) * 1000$$

Onde: P1 = massa do balão + óleo extraído (g)

P2 = massa do balão vazio (g)

m = massa do solo utilizada (g)

O&G = teor de óleos e graxas no solo (g.g^{-1})

- ◆ Metais pesados – digestão multiácida. Amostras dissolvidas em uma combinação de três ácidos (ácidos nítrico, clorídrico e fluorídrico), secas e posteriormente redissolvidas em água régia (ácidos nítrico e fluorídrico). Leitura feita em ICPI/AES (*Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry* ou Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente).
- ◆ Tensão superficial – 4 g de solo foram colocados em um recipiente de vidro de 50 mL, neste foi acrescentado 40 mL de água ultra-purificada com resistividade de 18 mΩ.cm (10%, p/v) e

levados a uma mesa agitadora por 16 h (150 rpm). Em seguida, a mistura foi centrifugada (3000 rpm, 10 min) e filtrada em uma membrana de éster de celulose com tamanho de poro de 0.45 µm a fim de eliminar os sólidos em suspensão. A tensão superficial das amostras foram medidas em um tensiômetro KSV da modelo Sigmato através do método Wihelmy. A unidade utilizada foi mN/m.

- ◆ Umidade – uma amostra de 5g de solo úmido foi pesada em um cadinho tarado o qual será colocado em estufa à 60° C por 16 horas. O cadinho foi repesado e a umidade calculada através da diferença percentual.

Massa de água = massa do solo úmido – massa do solo seco

Umidade (%) = (massa de água / massa de solo úmido) x 100