

CÁTIA DE PAULA MARTINS

**AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS BT DA GASOLINA,
COM E SEM A ADIÇÃO DE ETANOL, EM SOLOS RESIDUAIS DE GNAISSE
POR MEIO DE ENSAIOS EM COLUNAS**

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M386a
2015
Martins, Cátia de Paula, 1982-
Avaliação da biodegradação de compostos BT da gasolina,
com e sem a adição de etanol, em solos residuais de gnaiss por
meio de ensaios em colunas / Cátia de Paula Martins. – Viçosa,
MG, 2015.

xiii, 124f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Izabel Christina D Almeida Duarte de Azevedo.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.115-124.

1. Biorremediação. 2. Solos - Poluição. 3. Combustíveis.
4. Hidrocarbonetos. 5. Etanol. 6. Biodegradação. 7. Benzeno.
8. Tolueno. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Engenharia Civil. Programa de Pós-graduação em Engenharia
Civil. II. Título.

CDD 22 ed. 631.4

CÁTIA DE PAULA MARTINS

**AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS BT DA GASOLINA,
COM E SEM A ADIÇÃO DE ETANOL, EM SOLOS RESIDUAIS DE GNAISSE
POR MEIO DE ENSAIOS EM COLUNAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

CÁTIA DE PAULA MARTINS

**AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS BT DA GASOLINA,
COM E SEM A ADIÇÃO DE ETANOL, EM SOLOS RESIDUAIS DE GNAISSE
POR MEIO DE ENSAIOS EM COLUNAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 26 de junho de 2015.

Christianne de Lyra Nogueira

Roberto Francisco de Azevedo

Rejane Nascentes

Patrícia Österreicher-Cunha
(Coorientadora)

Izabel Christina D'Almeida Duarte de Azevedo
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre orientando meu caminho.

Aos meus pais, Helena e Luiz Paulo, que com amor, carinho e apoio constantes tornaram possível minha formação.

Ao meu querido esposo, Wederson, pelo constante amor, apoio, cumplicidade, paciência e carinho.

Ao meu irmão, Elvis, pelo apoio prestado em todos os momentos dessa trajetória.

À orientadora Profa. Izabel Azevedo pela competência profissional, dedicação, preocupação e importante colaboração em todos os momentos desse trabalho, demonstrando sempre muito carinho, amizade e confiança.

À Dra. Patrícia Österreicher-Cunha pela sua amizade e orientação para o desenvolvimento dessa tese.

Ao Prof. Eurípedes Vargas pela atenção dispensada sempre que solicitada.

Ao Dr. Wander Rodrigues da Silva que, com muita atenção e disposição, contribuiu muito na elaboração do aparato experimental desse trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da UFV, pela dedicação e por todo o conhecimento compartilhado.

Aos laboratoristas, Paulo Capelão do Laboratório de Geotecnia (DEC) e ao funcionário Chiquito, pelo apoio e competência.

Ao Laboratório de Geotecnia e Meio Ambiente da PUC-RJ.

Aos funcionários do departamento de Engenharia Civil. Em especial à secretária da Pós-Graduação, Cilene Knauf, pela orientação e amizade.

Aos amigos de curso, pelo companheirismo e pelos grandes momentos compartilhados.

Ao amigo, Lizardo (PUC-RJ), pelo grande apoio dado durante o monitoramento dos ensaios.

Às minhas amigas, Dany, Isabel, Iara, Sílvia, Luana, Ceci, Michele, Bruna e Mel que me deram tanto apoio, carinho e incentivo.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Engenharia Civil (DEC), pela oportunidade de cursar o Doutorado.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RJ) e ao Departamento de Engenharia Civil (DEC), pela oportunidade e apoio para realizar os ensaios de Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), pelo apoio financeiro imprescindível à realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido através de Bolsa.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e para o meu crescimento profissional e pessoal, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações e relevância do tema.....	1
1.2 Objetivos.....	3
1.3 Organização da tese.....	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 O problema dos solos contaminados.....	5
2.2 Contaminação do solo por gasolina.....	6
2.3 Considerações sobre os BTEX e etanol.....	8
2.3.1 Características físico-químicas.....	8
2.3.2 Toxicidade.....	12
2.3.3 Legislação.....	13
2.4 Dinâmica de contaminação.....	14
2.4.1 Migração dos BTEX-etanol no subsolo.....	14
2.4.2 Transporte de solutos em meios porosos.....	18
2.5 Técnicas de remediação de hidrocarbonetos.....	20
	iv

2.6 Biodegradação.....	21
2.6.1 Ação dos microrganismos.....	21
2.6.2 Biorremediação.....	22
2.6.2.1 Biorremediação intrínseca.....	27
2.6.3 Fatores de influência na biodegradação.....	30
2.7 Efeito da mistura gasolina- etanol.....	34
2.7.1 Microrganismos na degradação do etanol.....	35
2.7.2 Degradação preferencial do etanol em relação aos BTEX.....	36
2.8 Avaliação da biodegradação.....	38
3 MATERIAS E MÉTODOS.....	42
3.1 Materiais.....	42
3.1.1 Caracterização dos solos	42
3.1.1.1 Solo residual de gnaiss (Viçosa).....	42
3.1.1.2 Solo residual de gnaiss (Duque de Caxias).....	48
3.1.2 Soluções contaminantes.....	50
3.2 Métodos.....	52
3.2.1 Sistema para a contaminação do solo.....	52
3.2.1.1 Projeto do equipamento.....	52
3.2.1.2 Escolha dos materiais.....	58
3.2.1.3 Construção dos sistema de contaminação.....	58

3.2.2 Processo de contaminação.....	62
3.2.3 Processo de amostragem.....	71
3.2.4 Análises.....	72
3.2.4.1 Microbiológicas.....	72
3.2.4.2 Medições de pH e potencial redox (Eh).....	76
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
4.1 Análise dos Indicadores de Biodegradação.....	78
4.1.1 Potencial de Oxi-Redução (Eh) e pH.....	78
4.1.2 Precipitação do Ferro	83
4.1.3 Atividade Microbiana Degradadora.....	87
4.1.4 Influência do Etanol.....	96
4.1.5 Avaliação da formação de biofilme.....	105
4.1.5 Considerações.....	106
5 CONCLUSÕES.....	111
5.1 Conclusões.....	111
5.2 Sugestões.....	112
REFERÊNCIAS.....	115

LISTA DE FIGURAS

2.1 Fórmulas estruturais dos BTEX e etanol	9
2.2 Diferentes fases dos hidrocarbonetos da gasolina presentes nas zonas insaturada e saturada	16
2.3 Evolução da contaminação por hidrocarbonetos na subsuperfície	17
3.1 (a) Campo Experimental e (b) Indicação do local no talude onde se retirou o solo em estudo	42
3.2 Difratoograma da fração argila natural	47
3.3 Preparo das soluções	51
3.4 Desenho da coluna com as dimensões em metros e a identificação das diferentes peças	54
3.5 Esquema dos anéis metálicos com suas dimensões	55
3.6 Desenho esquemático do sistema de contaminação das colunas de solo	57
3.7(a) Coluna em PVC e detalhes da tampa superior e inferior e, das respectivas portas para coleta do efluente (b) e injeção da solução contaminante (c)	59
3.8 Detalhe da porta no corpo da coluna para a coleta/medição	60
3.9 Visão geral das colunas	60
3.10 Colarinho e anel biselado	61
3.11 Reservatório (frasco de Mariotte) utilizado no sistema	61
3.12 Esquema geral do sistema de contaminação	62
3.13 Esquema da coluna com a amostra de solo	63

3.14 Retirada da camada superficial e processo inicial de escavação	65
3.15 Posicionamento da coluna acoplada ao anel biselado sobre a superfície do terreno	65
3.16 Retirada do solo ao redor da coluna com auxílio de faca	66
3.17 Acoplamento do colarinho à coluna e aplicação de força na superfície superior da coluna para cravação	66
3.18 Visão geral dos materiais substituídos na coluna	67
3.19 Visão geral da utilização do equipamento extrator de amostras para aplicação de pressão nas extremidades das colunas de solo	69
3.20 Vista frontal do sistema de contaminação	70
3.21 Vista lateral do sistema de contaminação	70
3.22 (a) Tampa de borracha adaptada à mangueira para coleta do líquido contaminado e (b) Rolha de silicone adaptada à mangueira	71
4.1 Gráficos de Eh e pH dos quatro experimentos ao longo do tempo	80
4.2 Diagrama de especiação de ferro no solo sob diferentes condições de pH e Eh	84
4.3 Imagem das fatias da coluna 4	85
4.4 Imagem da fatia a da coluna 4	85
4.5 Imagem das fatias da coluna 2	86
4.6 Atividade microbiana degradadora avaliada no líquido percolante e efluente da coluna 1 ao longo do ensaio	90
4.7 Atividade microbiana degradadora avaliada no líquido percolante e efluente da coluna 3 ao longo do ensaio	91

4.8 Atividade microbiana degradadora nos solos das colunas 1 e 3 avaliada durante o ensaio	93
4.9 Variação da atividade microbiana entre as fatias de solo das colunas 1 e 3 referentes ao último dia de cada ensaio. As letras 'a', 'b', 'c' e 'd' indicam a ordem das fatias em relação ao topo da coluna, local de entrada da solução contaminante	94
4.10 Atividade microbiana degradadora avaliada no líquido percolante e efluente da coluna 2 ao longo do ensaio	100
4.11 Atividade microbiana degradadora avaliada no líquido percolante e efluente da coluna 4 ao longo do ensaio	100
4.12 Atividade microbiana degradadora nos solos das colunas 2 e 4 avaliada durante o ensaio	101
4.13 Variação da atividade microbiana entre as fatias de solo das colunas 2 e 4 referentes ao último dia de cada ensaio	102
4.14 Imagem de uma amostra de solo da fatia F1b referente à coluna 1 visualizada em microscópio	105
4.15 Atividade microbiana degradadora nos solos das colunas 1, 2, 3 e 4 avaliada durante o ensaio	107
4.16 Variação da atividade microbiana entre as fatias de solo das colunas 1, 2, 3 e 4 referentes ao último dia de cada ensaio	107

LISTA DE TABELAS

2.1 Propriedades físico-químicas dos BTEX e etanol	10
2.2 Valores orientadores máximos para solos e águas subterrâneas	14
2.3 Mecanismos de transporte e atenuação de contaminantes	18
2.4 Fatores de intervenção no transporte e atenuação de soluto	19
2.5 - Algumas técnicas de remediação <i>in situ</i> e <i>ex situ</i>	21
3.1 - Normas técnicas utilizadas nos ensaios de caracterização do solo	43
3.2 Índices físicos do solo	43
3.3 Limites de consistência do solo	43
3.4 Frações do solo	44
3.5 Características químicas e micronutrientes do solo	45
3.6 Índices físicos do solo	48
3.7 Limites de consistência do solo	49
3.8 Frações do solo	49
3.9 Características químicas do solo	49
3.10 Características mineralógicas do solo	49
3.11 Materiais e acessórios utilizados na construção das colunas	58
4.1 Valores de potencial de oxi-redução (Eh) e pH medidos no líquido percolante das colunas 1 e 2 durante o ensaio	79
4.2 Valores de potencial de oxi-redução (Eh) e pH medidos no líquido percolante das colunas 3 e 4 durante o ensaio	79
4.3 Valores das concentrações de fluoresceína ($\mu\text{g} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) ao	

longo do ensaio relativo à coluna 1	88
4.4 Valores das concentrações de fluoresceína ($\mu\text{g} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) ao longo do ensaio relativo à coluna 3	88
4.5 Valores das concentrações de fluoresceína ($\mu\text{g} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) ao longo do ensaio relativo à coluna 2	98
4.6 Valores das concentrações de fluoresceína ($\mu\text{g} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) ao longo do ensaio relativo à coluna 4	99

RESUMO

MARTINS, Cátia de Paula, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2015. **Avaliação da biodegradação de compostos BT da gasolina, com e sem a adição de etanol, em solos residuais de gnaiss por meio de ensaios em colunas.** Orientadora: Izabel Christina D'Almeida Duarte de Azevedo. Coorientadores: Patrícia Österreicher-Cunha, Eurípedes do Amaral Vargas Jr. e Wander Rodrigues da Silva.

A contaminação do meio ambiente por hidrocarbonetos está, muitas vezes, relacionada a pequenos e contínuos vazamentos dos tanques de estocagem de combustíveis em postos de abastecimento. Além dos danos ao meio ambiente, a presença de hidrocarbonetos no subsolo constitui um risco para a população. Em contato com a água do solo, os compostos da gasolina, dentre os de maior interesse os BTEX, se dissolvem parcialmente sendo os primeiros contaminantes a atingir o lençol freático. Pesquisas indicam a degradação biológica como sendo o principal mecanismo para a minimização das características tóxicas desses poluentes. Esta pesquisa se propõe a avaliar a biodegradação de benzeno e tolueno em dois solos residuais de gnaiss com características distintas, em escala de laboratório. Para isso, foram projetadas e construídas colunas em PVC, por meio das quais se coletaram as amostras indeformadas dos solos. A cada coluna estava acoplado um frasco Mariotte, onde a solução contaminante, composta por água, benzeno e tolueno, com e sem etanol, era acondicionada. Para evitar a percolação por caminhos preferenciais, a injeção da solução através da amostra de solo ocorria em fluxo ascendente. Com base nos resultados de atividade microbiana e parâmetros físico-químicos (pH e Eh), em amostras de solo coletadas em pontos de monitoramento pré-estabelecidos nas colunas, pode-se sugerir a ocorrência de processos aeróbios e/ou anaeróbios de biodegradação ao longo do tempo. Valores de potencial redox na faixa de redução do ferro e observações visuais da precipitação do ferro sugerem a mobilização do ferro como aceptor de elétrons pelos microrganismos. As características dos solos demonstraram influência nesse processo nos ensaios.

ABSTRACT

MARTINS, Cátia de Paula, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2015. **Evaluation of the biodegradation of gasoline compounds BT, with and without the addition of ethanol, gneiss residual soils by tests in columns.** Advisor: Izabel Christina D'Almeida Duarte de Azevedo. Coauthors: Patrícia Österreicher-Cunha, Eurípedes do Amaral Vargas Jr. e Wander Rodrigues da Silva.

The environmental contamination by hydrocarbons is often related to small and continuous leaks from fuel storage tanks at service stations. Besides the damage to the environment, the presence of hydrocarbons in the subsurface deserves particular attention when it happens in urban areas, since it constitutes a risk to the population. In contact with water in soil, the gasoline constituents, among the most interesting BTEX, partially dissolve, being the first contaminants to reach the groundwater. Research indicates biological degradation as the main mechanism for minimizing the toxic characteristics of these pollutants. This thesis aimed to the construction and monitoring of lysimeters (PVC columns) of undisturbed residual gneissic soils, a Viçosa -MG and other Duque de Caxias – RJ, subjected to vertical upward flow of a solution composed of water, benzene and toluene, with or without ethanol, in order to assess the biodegradation of these compounds. Based on the results of analysis of microbial activity and physicochemical parameters on samples of soils collected from pre-established monitoring points in the columns, we may suggest the occurrence of aerobic and/or anaerobic biodegradation processes over time. Redox potential values in iron reduction zones and visual observations suggest the mobilization of iron as electron acceptor by microorganisms. Soil characteristics apparently influenced this process in the trials.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações e relevância do tema

A contaminação dos solos e das águas subterrâneas está muitas vezes relacionada a vazamentos de combustíveis, gasolina e diesel, entre outros, em postos de abastecimento e revenda. Nos postos de serviços, as principais fontes de vazamentos são as bombas de abastecimento e os tanques de armazenamento subterrâneos.

Os compostos do grupo BTEX, benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, presentes na gasolina, apresentam maior mobilidade em água, por serem os compostos mais hidrossolúveis do petróleo. Com isso, em um possível vazamento de gasolina, esses compostos serão os primeiros a percolar o solo e atingir o lençol freático ou aquífero, acarretando efeitos nocivos à saúde humana e ao ecossistema.

Além dos danos ao meio ambiente, a presença de hidrocarbonetos no subsolo merece particular atenção quando acontece em zonas urbanas, já que constitui um risco para a população. As vias mais comuns pelas quais esses contaminantes podem entrar em contato com as pessoas são por concentração de gases em estruturas enterradas, como os dutos de distribuição de água, luz, gás, esgoto, águas pluviais, telefonia, etc. (CORAPCIOGLU *et al.*, 1987).

As diferentes características das substâncias, densidade, solubilidade, peso molecular, coeficiente de partição carbono orgânico e octanol/água e pressão de vapor, definem suas taxas de volatilização, solubilização e retenção. A volatilização de compostos contaminantes oferece risco direto aos seres humanos devido à provável inalação destas substâncias. Por outro lado, a solubilização pode constituir uma ameaça à qualidade das águas subterrâneas, enquanto que sua retenção pelas partículas sólidas do solo pode oferecer perigo ao se tornar disponível ao meio, ao longo do tempo (CORSEUIL, MARINS, 1998; ZHENG *et al.*, 2002).

As necessidades mundiais de criar alternativas para a redução do consumo dos combustíveis derivados de petróleo levaram à adição de produtos

oxigenados, como os álcoois (etanol e metanol) e éteres, à gasolina automotiva brasileira (SANTOS, 1998). Hoje, este procedimento ainda se justifica com base nos problemas ambientais já constatados pela emissão de quantidades consideráveis de CO₂ na atmosfera pelos combustíveis fósseis. Entretanto, o etanol é outro composto que adquire importância, mesmo não sendo classificado como tóxico à saúde. A sua presença altera o comportamento da gasolina em termos de solubilidade, mobilidade e degradação, tanto no solo quanto nas águas subterrâneas. Devido ao seu efeito de cossolvência, uma elevada concentração de etanol na água pode facilitar a transferência dos BTEX presentes na gasolina para a fase aquosa, aumentando sua solubilidade (CORSEUIL, ALVAREZ, 1996; FERNANDES, CORSEUIL, 1997; SANTOS *et al.*, 1996; ALVAREZ, 1997; CORDAZZO, 2000; ÖSTERREICHER-CUNHA *et al.*, 2009).

Evidências de campo e laboratório sugerem que muitos dos hidrocarbonetos monoaromáticos originários dos vazamentos são biodegradados naturalmente antes de alcançarem um receptor de água potável, indicativo de remediação intrínseca (MOHAMMED; ALLAYLA, 2000; ÖSTERREICHER-CUNHA *et al.*, 2004, 2007; MARTINS *et al.*, 2012). Para a biodegradação destes compostos é essencial uma reação de oxirredução, em que o hidrocarboneto é oxidado (doador de elétron) e um aceptor de elétron é reduzido. Existem diferentes compostos que podem agir como aceptores de elétrons, o principal deles é o oxigênio (O₂), em seguida o nitrato (NO₃⁻), os óxidos de ferro, Fe (III), e o sulfato (SO₄²⁻). Assim, mediante o monitoramento desses indicadores presentes na água e da atividade microbiana, é possível verificar como está ocorrendo a biorremediação natural de um local contaminado. Além dos aceptores de elétrons, outras variáveis podem ser relacionadas a processos biológicos, como o pH e o potencial redox (BORDEN *et al.*, 1995; CORSEUIL, ALVAREZ, 1996; KAO, WANG, 2000; SILVA, 2002; ZWOLINSKI *et al.*, 2000).

Estudos têm abordado a biodegradação dos compostos BTEX-Etanol, ou técnica de remediação intrínseca, como alternativa viável e econômica para a remediação de solos e águas contaminadas (CORSEUIL, ALVAREZ, 1996; CORSEUIL *et al.*, 1997; LOVLEY, 1997; DA SILVA *et al.*, 2002;

ÖSTERREICHER-CUNHA *et al.*, 2004, 2007, FERNANDO, 2010). Neste contexto, existe a necessidade de obtenção de um maior número de dados técnicos sobre o problema de contaminação da subsuperfície por gasolina, para que se possa compreender melhor a dinâmica do processo de biodegradação, principalmente em solos brasileiros (tropicais), que apresentam características como o clima, o relevo, o material de origem, a mineralogia, a estrutura dos solos e a população microbiana diferentes dos solos temperados típicos de países como a Europa e EUA, onde há extensa experiência nesses estudos.

1.2 Objetivos

Esta pesquisa tem por objetivo principal analisar, de forma geral e em escala de laboratório, o efeito da biodegradação dos compostos benzeno e tolueno (BT) na presença ou não de etanol, em solos residuais, sendo um de Viçosa (MG) e outro de Duque de Caxias (RJ). Os resultados desta análise foram comparados com trabalhos realizados em solos com as mesmas características. Pretende-se, desse modo, extrair algumas conclusões acerca do comportamento da atividade microbiana e influência dos solos na biodegradação dos compostos.

Entre os objetivos específicos ressaltam-se:

- (a) Executar ensaios em escala laboratorial (colunas) em amostras indeformadas de solos residuais;
- (b) Monitorar a ocorrência do processo de biodegradação a partir de análises microbiológicas e físico-químicas; e
- (c) Avaliar a biodegradação a partir do monitoramento dos compostos benzeno e tolueno e da mistura benzeno, tolueno e etanol.

1.3 Organização da tese

Esse trabalho foi dividido em cinco seções.

A presente seção aborda a forma pela qual surgiu a ideia desta pesquisa. Mostra a importância dos problemas relacionados aos derrames de produtos derivados de petróleo para a saúde pública e enquadra este tema no cenário brasileiro. Por fim, apresenta-se a organização do projeto de tese e, resumidamente, descrevem-se os pontos principais dos diferentes capítulos.

Na seção 2 apresenta-se uma revisão bibliográfica abordando o problema da gasolina, assim como as principais características desta mistura. Abordam-se as características físico-químicas dos BTEX e resumidamente os mecanismos de contaminação no solo, os processos de transporte de massa em meios porosos e os processos de transformação. Especial atenção é dada ao processo de biodegradação. Apresentam-se, ainda, os principais fatores de influência nesse processo e aspectos importantes sobre a presença do etanol na gasolina brasileira.

Na seção 3, descrevem-se as características do solo dos pontos de vista químico, mineralógico, físico, geotécnico e microbiológico e o desenvolvimento de um sistema laboratorial para o estudo de contaminação do solo. Apresentam-se o método para a determinação da atividade microbiana e medições de alguns parâmetros, como pH e potencial redox (Eh).

Na seção 4 apresentam-se e discutem-se os resultados das análises e funcionamento dos ensaios.

Na seção 5, encontra-se a conclusão geral sobre o trabalho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção serão abordados alguns aspectos fundamentais referentes ao solo, à contaminação do solo por gasolina, ao comportamento dos compostos do grupo BTEX e etanol no solo.

2.1 O problema dos solos contaminados

Os solos se originam da decomposição das rochas constituintes da crosta terrestre devido à ação conjunta dos processos físicos, químicos e biológicos. Assim, são misturas de partículas que se diferenciam pelo tamanho e composição química (PINTO, 2006).

Em um solo, apenas parte do volume total é ocupado pelas partículas sólidas, que se organizam formando o arranjo estrutural. O volume restante corresponde ao chamado de *vazios*, que geralmente está ocupado por água ou ar. Portanto, o solo é constituído de três fases: sólida, líquida e gasosa (PINTO, 2006). Além disso, tem-se a presença de microrganismos e matéria orgânica.

O solo é, portanto, uma complexa mistura na sua composição e variável na sua ocorrência na natureza e propriedades, que possui importante papel na subsistência humana. A contaminação deste recurso natural põe em risco muitos elementos fundamentais à sobrevivência humana.

Na ocorrência de contaminação de solo, é necessário identificar o tipo de contaminante, sua concentração e determinar as características físicas, químicas, microbiológicas e geotécnicas do local em questão. Com o conhecimento destas informações é possível proceder à seleção de tecnologias apropriadas para a remediação da área contaminada.

Entre as fontes possíveis de contaminação do solo, os derivados do petróleo têm sido muito comuns.

2.2 Contaminação do solo por gasolina

A partir da crise do petróleo na década de 70, o Brasil experimentou uma forte industrialização e desenvolvimento econômico, que exigiram grande estruturação de toda a cadeia produtiva dos derivados de petróleo, desde novas descobertas de áreas de petróleo e a formação de vários pólos petroquímicos, até o aumento das redes de distribuição. Em 2010, segundo a Agência Nacional do Petróleo (ANP, 2010) existiam 14 refinarias, 62 terminais de armazenamento aquaviários e 31 terrestres, 508 bases de distribuição, 141 distribuidoras, 36.730 postos de revenda e a comercialização de, aproximadamente, 257 mil m³ dia⁻¹ dos principais derivados de petróleo.

Diante de toda essa estrutura na logística de produção e comercialização, as indústrias de petróleo convivem, diariamente, com acidentes ambientais causados por vazamentos e derrames, e os que acontecem durante a exploração, refinamento, transporte e operações de armazenamento do petróleo e seus derivados (CORSEUIL; MARINS, 1997).

Os combustíveis derivados do petróleo são voláteis e inflamáveis. Entre eles, a gasolina é a mais produzida e utilizada no mundo. Sendo assim, não é de se surpreender que seja comum a ocorrência de incidentes protagonizados por este combustível.

Em 2008, o transporte rodoviário foi a principal atividade geradora de emergências químicas (51,7%), seguido pelo descarte de produtos químicos (8%), postos e sistemas retalhistas de combustíveis (7,1%) e indústrias (5,5%). No transporte rodoviário, o destaque foi para os combustíveis automotivos (34%) e, nos postos e sistemas retalhistas de combustíveis, a maior parte das ocorrências envolveu gasolina (70%), que possui em sua composição, alta concentração de hidrocarbonetos leves¹ (CETESB, 2010a).

Outras fontes indiretas de contaminação do solo ocorrem a partir das águas utilizadas para lavar os pavimentos urbanos, com a presença de combustível e

¹ Os hidrocarbonetos da gasolina ditos “leves” são aqueles que contêm de 4 a 12 carbonos em cadeia linear (60 a 90% do volume) ou em compostos aromáticos (10 a 40% do volume) (FINOTTI *et. al*, 2001).

óleos perdidos pelo fluxo diário de automóveis e, a deposição de solos contaminados por derivados de petróleo em aterros.

A gasolina é constituída de uma mistura complexa de hidrocarbonetos, dentre eles os aromáticos formados por anéis benzênicos, como os usualmente designados por BTEX, benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (FINOTTI *et al.*, 2001; DUARTE, 2003; PETROBRÁS, 2010; FETTER, 1992). Estes compostos chegam a estar presentes em aproximadamente 18% do conteúdo da gasolina padrão (CHRISTENSEN; ELTON, 1996, citado por SILVA, 2008).

Os BTEX, voláteis, dentre os principais compostos da gasolina, são os mais difíceis de serem degradados e estão entre os que mais facilmente se solubilizam em água e, portanto, apresentam maior mobilidade através dos meios porosos, elevado efeito tóxico e consequente biodisponibilidade (SILVA *et al.*, 2002; CHAPELLE, 1992).

Em caso de vazamento ou derrame, as diferentes fases (vapor, líquida residual, líquida livre e dissolvida) que a gasolina pode assumir e o comportamento dessas fases nas zonas saturadas e não-saturadas do meio poroso possibilitam a avaliação de remediação de locais contaminados (CORSEUIL, MARINS, 1997; DUARTE, 2003).

Aditivos são adicionados frequentemente à gasolina para melhorar a octanagem e diminuir a emissão de monóxido de carbono na combustão, como os álcoois e éteres. No Brasil, é utilizado o etanol na porcentagem entre 20% e 26%, altamente solúvel em água. Assim, quando a gasolina entra em contato com a água, o etanol passa para a fase aquosa aumentando a solubilidade dos BTEX, por serem miscíveis nos álcoois primários (metanol e etanol) (SILVA *et al.*, 2002).

Portanto, a presença dos BTEX no solo é um indicativo de contaminação. A identificação e quantificação destes compostos são realizadas em laboratório a partir de amostras devidamente coletadas e armazenadas.

Diversos são os métodos de identificação dos compostos orgânicos no solo. A sua utilização é indispensável para a definição e quantificação dos contaminantes presentes no solo nas suas diferentes fases (gasosa, retidos na

fração sólida e dissolvidos na água). Entre as técnicas usadas estão a cromatografia gasosa (CG/FID – cromatografia gasosa com detector por ionização de chama e, CG/MS – cromatografia gasosa com espectrometria de massa), mais frequentemente utilizada, e a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).

As amostras para as análises de CG devem ser preparadas de acordo com as exigências de cada método e da fase a ser estudada. Entre os métodos mais utilizados no processo de extração dos compostos estão o “*purge and trap*” e o de “*headspace*”. Destaca-se que a coleta das amostras deve ser bem executada de forma que não leve à perda dos compostos voláteis e, conseqüentemente, a má identificação e interpretação dos resultados.

A definição da necessidade de intervenção em uma área contaminada por gasolina ocorre quando os valores aferidos, por meio das técnicas de definição e quantificação dos contaminantes presentes no solo, ultrapassam o valor limite (nível máximo de concentração) de um determinado nível de segurança.

A Portaria nº 518 de março de 2004 do Ministério da Saúde estabelece níveis máximos de concentração admissíveis para a água potável e, a Resolução CONAMA nº 420/2009, para a água subterrânea e o solo.

Técnicas de descontaminação ou de remediação devem permitir a redução da toxicidade, da mobilidade e do volume de contaminantes perigosos nos solos, água potável e subterrânea a valores menores do que os níveis máximos de concentração admissíveis. Uma destas técnicas, a de biorremediação, tem como estratégia o direcionamento do processo de atenuação natural ou intrínseca para a remediação da contaminação antrópica.

2.3 Considerações sobre os BTEX e etanol

2.3.1 Características físico - químicas

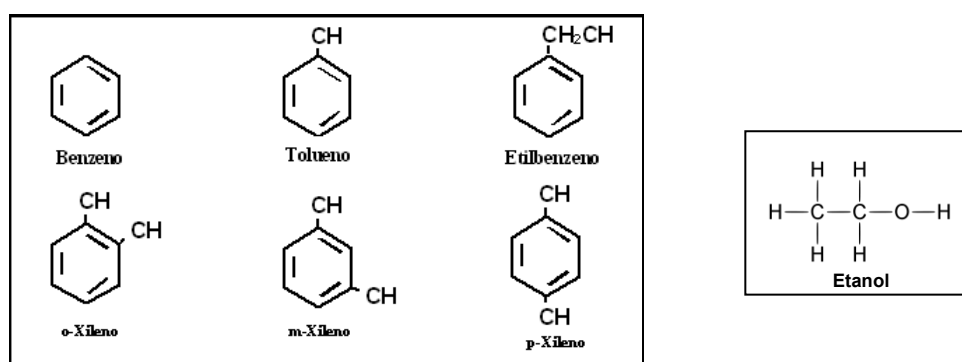
Os hidrocarbonetos são compostos orgânicos que contêm apenas os elementos carbono e hidrogênio. O benzeno e os compostos semelhantes em comportamento químico são classificados como compostos aromáticos.

De acordo com Finotti *et al.* (2001), quanto maior o número de carbonos menos volátil é o hidrocarboneto. Além disso, a maior facilidade em ficar adsorvido à matéria orgânica (hidrofóbicos) e a menor mobilidade do composto no solo estão, geralmente, associados ao aumento do tamanho da cadeia de carbonos.

Os BTEX e o etanol têm a capacidade de serem adsorvidos na superfície dos minerais e na matéria orgânica do solo. Os primeiros são altamente voláteis. Em contato com o solo, estes compostos têm comportamentos distintos, que ditam o transporte no meio poroso, e que são definidos pelas suas propriedades físico-químicas.

Na Figura 2.1 apresentam-se as fórmulas estruturais dos compostos do grupo BTEX e etanol.

Figura 2.1 - Fórmulas estruturais dos BTEX e etanol



Fonte: VIEIRA, 2004

Na Tabela 2.1 encontram-se algumas de suas características físico-químicas.

A solubilidade é a medida de concentração máxima do composto que se dissolve em água pura a uma dada temperatura. Os compostos com elevada solubilidade são facilmente transportados pela água e tendem a ser mais biodegradáveis. Fatores como a temperatura e a presença de ácidos húmicos e fúlvicos tendem a aumentar a solubilidade, enquanto, diminui com a salinidade (CHIOU *et al.*, 1986).

Tabela 2.1 - Propriedades físico-químicas dos BTEX e etanol

Composto	Fórmula	S _a (mg L ⁻¹)	D _e (g cm ⁻³)	K _{oc}	K _{ow} ²	P _v (mm Hg)	M _m (g mol ⁻¹)
Benzeno	C ₆ H ₆	1780	0,88	1,58	2,13	100	78,11
Tolueno	C ₈ H ₁₀	500	0,87	2,13	2,65	22	92,14
Etilbenzeno	C ₇ H ₆	200	0,87	3,15	3,04	9,5	106,17
Xilenos	C ₈ H ₁₀	<100	0,86	2,38	3,26	6	106,17
Etanol	C ₂ H ₆ O	∞	0,79	-	-0,30	44	46

S_a – solubilidade em água; D_e – densidade específica; K_{oc} – coeficiente de partição carbono orgânico ou solo/água (log); K_{ow} - coeficiente de partição octanol/água (log); P_v – pressão de vapor; M_m – massa molar; os valores de densidade, S_a e P_v foram obtidos a 20°C.

FONTE: CETESB, 2010c; FINOTTI *et al.*, 2001.

A densidade específica é a razão entre a densidade do composto e a densidade da água. Este parâmetro representa a capacidade do composto flutuar na água. A densidade específica da gasolina encontra-se entre 0,7 e 0,8 g cm⁻³, permitindo que esta permaneça acima do nível freático e siga o fluxo da água subterrânea.

O coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}) é utilizado como medida da hidrofobicidade de um composto orgânico e do seu potencial de se distribuir entre as fases orgânica e aquosa. Quando combinado com o teor de matéria orgânica pode servir para prever a quantidade retida no solo e o fator de retardamento do movimento através da água (FETTER, 1993).

O coeficiente de partição carbono orgânico/água (K_{co}) é a medida da tendência de um composto orgânico ser adsorvido na matéria orgânica do solo. Sendo assim, quanto maior for K_{co} menor é a mobilidade e maior é a adsorção em solos com matéria orgânica (FETTER, 1993).

A pressão de vapor de uma substância pura na fase líquida é a pressão do gás em equilíbrio com o líquido a uma dada temperatura. Esta representa a

² O coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}) é uma medida para prever a tendência de uma substância distribuir-se entre o octanol (substância orgânica) e a água.

tendência dos compostos para a evaporação. Sendo assim, quanto maior for este parâmetro maior é a tendência à volatilização (FETTER, 1993).

De acordo com a Tabela 2.1, os BTEX têm densidades inferiores a 1 g cm^{-3} . Dentre os BTEX, o benzeno é o composto mais solúvel em água. Assim, tem a tendência de ocorrer quantidade superior a dos outros compostos na água do solo e nas águas subterrâneas. Além disso, apresenta um valor baixo do coeficiente de partição no carbono orgânico (K_{oc})³ o que indica menor tendência em ficar adsorvido na matéria orgânica e, conseqüentemente, alta mobilidade. Dessa forma, em contato com o solo, além de evaporar devido a maior pressão de vapor (P_v), parte infiltra no solo podendo alcançar a água subterrânea (FINOTTI *et al.*, 2001). Pode biodegradar em condições aeróbias e, ou anaeróbias.

O tolueno, em contato com o solo, apresenta comportamento similar ao do benzeno e na água também pode se perder por volatilização ou biodegradação. Este último processo pode ser rápido em condições aeróbias. Entretanto, se estiver presente em altas concentrações, pode ser tóxico aos microrganismos, dificultando a biodegradação (FINOTTI *et al.*, 2001).

No solo, os xilenos, são relativamente móveis, apresentando de moderada a baixa adsorção. Podem ser altamente voláteis e se infiltrar, alcançando a água subterrânea, após um derramamento de gasolina no solo. Estão sujeitos à degradação natural, porém podem persistir na água por alguns anos. Na água, a maior fonte de remoção deste composto é por volatilização (FINOTTI *et al.*, 2001).

O etilbenzeno apresenta moderada solubilidade e tendência a adsorver nos solos, o que indica que pode ser lixiviado até a água subterrânea. É biodegradável e volátil (FINOTTI *et al.*, 2001).

O conhecimento das propriedades físico-químicas dos BTEX e do etanol é de grande importância, já que auxiliam na interpretação dos resultados obtidos na

³ O coeficiente de partição de carbono orgânico (K_{oc}), também conhecido como coeficiente de partição solo/água ou coeficiente de adsorção, é a medida da tendência de um composto orgânico para ser adsorvido pelos solos.

fase de avaliação do grau de contaminação de uma área e na seleção das tecnologias de tratamento de solos adequadas à situação.

2.3.2 Toxicidade

De acordo com a norma American Society for Testing and Materials, o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos são classificados como tóxicos (ASTM, 1995). O etanol é um composto atóxico.

Apresentam-se, em seguida, algumas informações sobre a toxicologia desses compostos à saúde humana.

Benzeno

A maior fonte de exposição ao benzeno está relacionada aos vazamentos de combustíveis derivados de petróleo. Entretanto, o benzeno puro pode entrar no meio ambiente através de derramamentos por outras atividades industriais.

O benzeno consta na lista especial de substâncias prejudiciais à saúde por ser capaz de induzir câncer em consequência de exposição aguda ou crônica (como leucemia) (ASTM, 1995).

Pessoas que realizam atividades de drenagem de bombas, abastecimento de veículos, amostragem e análise de gasolina e medições de tanques subterrâneos em postos de combustíveis se expõem à contaminação por benzeno e outros derivados da gasolina. No entanto, muitos desses indivíduos sequer têm noção do perigo a que estão sujeitos.

Tolueno

Diversas são as fontes de exposição ao tolueno. Dentre elas estão os vazamentos de gasolina, a sua combustão nos veículos automotores e o uso de solventes à base de tolueno (tintas, resinas, colas e etc.).

A exposição ao tolueno pode irritar os olhos, nariz e garganta. A ingestão pode causar irritação da boca e faringe, vômitos, dores abdominais e diarreia. A

exposição prolongada pode causar ressecamento e rachadura da pele, perda de apetite, náusea e danos aos rins e fígado (TIBURTIUS *et al.*, 2004).

Xilenos

As fontes de exposição aos xilenos podem ser advindas de vazamentos de gasolina e utilização de solventes. Esse composto tem sido cada vez mais utilizado como o substituto mais seguro do benzeno (FINOTTI *et al.*, 2001).

Os sintomas da contaminação por xilenos são irritação das membranas das vias respiratórias, problemas estomacais, perda de apetite, perda de memória, distúrbios do humor e do equilíbrio. Pode até levar à morte por depressão do sistema nervoso central, como consequência da parada respiratória (RIBEIRO, 2005).

Etilbenzeno

Os riscos à saúde, devido à exposição aguda a esse composto, são tonteiras, delírios, dores de cabeça, coma e até morte. Também pode irritar os olhos, nariz e garganta. Os efeitos podem ocorrer algum tempo após a exposição e podem permanecer por meses ou anos (RIBEIRO, 2005).

2.3.3 Legislação

De acordo com a Portaria nº 518 de março de 2004 do Ministério da Saúde, os valores máximos permitidos para os diferentes hidrocarbonetos monoaromáticos quanto à potabilidade da água são: 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o benzeno, 170 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o tolueno, 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o etilbenzeno e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o xileno (MS, 2004).

Na Tabela 2.2 apresentam-se os valores orientadores estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 420 de 28 de dezembro de 2009 para a proteção da qualidade dos solos e das águas subterrâneas contaminados pelos compostos dos grupos BTEX.

Tabela 2.2 - Valores orientadores máximos para solos e águas subterrâneas

Substância	VRQ	VP	Solos peso seco (mg kg ⁻¹)			Água subterrânea (μ L ⁻¹)
			Intervenção Agrícola	Intervenção industrial	Intervenção residencial	Intervenção
Benzeno	NA	0,03	0,06	0,15	0,08	5
Tolueno	NA	0,14	30	75	30	700
Etilbenzeno	NA	6,20	35	95	40	300
Xilenos	NA	0,13	25	70	30	500

NA - não se aplica a substâncias orgânicas; VRQ – valor de referência de qualidade;
 VP – valor de prevenção.
 Fonte: CONAMA, 2009

2.4 Dinâmica de contaminação

2.4.1 Migração dos BTEX-etanol no subsolo

A gasolina, ao ser liberada para o ambiente em vazamentos de tanques de armazenamento subterrâneos (TAS), por exemplo, migra verticalmente pela zona não saturada através dos poros interligados, sob a influência da força gravitacional, com velocidade maior que a da água, expulsando a água intersticial e o ar. Paralelamente ao movimento em profundidade, o contaminante sofre também um espalhamento lateral por efeitos capilares, que ocorre de forma irregular devido à heterogeneidade do solo (GUIGUER, 2000).

De acordo com Guiguer (2000), a fase composta pelos hidrocarbonetos recebe a denominação de NAPL (*non-aqueous phase liquid*) ou fase líquida não aquosa. De acordo com a densidade do hidrocarboneto existem dois tipos de NAPLs:

- LNAPL (*light non-aqueous phase liquid* ou fase líquida não aquosa leve), caracterizada por possuir densidade menor que a água. Os hidrocarbonetos presentes na gasolina e óleo diesel recebem esta classificação.

- DNAPL (*dense non-aqueous phase liquid* ou fase líquida não aquosa densa), caracterizada por possuir densidade maior que a água, como os hidrocarbonetos clorados.

Por apresentar compostos com características diferentes, como volatilidade e solubilidade, a gasolina, em contato com o solo pode ser encontrada em quatro diferentes fases que regulam o processo de migração do soluto:

(a) *vapor*: apresenta-se como vapor nos poros do solo, condensa e adsorve na superfície sólida ou dissolve-se na água do solo;

(b) *líquida residual*: resíduo líquido relativamente imóvel migra pela zona não saturada e é parcialmente retido entre as partículas sólidas do solo;

(c) *líquida livre*: quando atinge o lençol freático passa a flutuar sobre o mesmo;

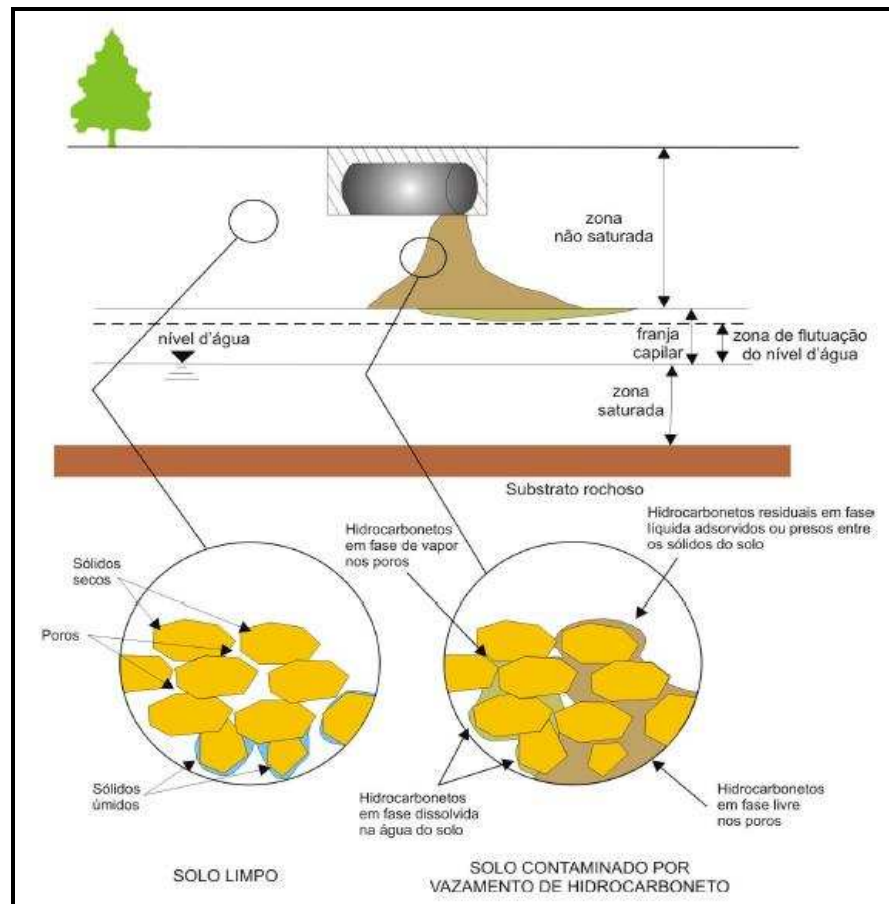
(d) *dissolvida*: presente na superfície sólida do solo formando películas ou quando atinge o nível d'água subterrâneo forma a chamada pluma de contaminação, conforme ilustrado na Figura 2.2.

A partição entre as fases é determinada pelos fenômenos da dissolução, volatilização e adsorção (CORSEUIL *et al.*, 1996; GUIGUER, 2000; USEPA, 2003b; DUARTE, 2003).

Os hidrocarbonetos solúveis presentes na LNAPL, como os BTEX e etanol, são dissolvidos na água de infiltração e transportados até a zona saturada. Essas substâncias formam uma pluma que se distribui pelos mecanismos de transporte difusão e advecção. Muitos dos hidrocarbonetos tendem a ser voláteis, assim o gás sofre partição de modo que uma parte fica retida no solo e outra migra para o ar. O gás, quando presente na zona não saturada, pode retornar para a fase líquida por condensação a depender das condições físico-químicas (FERREIRA, ZUQUETTE, 1998; GUIGUER, 2000).

Produtos como a gasolina, querosene e alguns óleos são encontrados como produtos livres sobre o topo da franja capilar em razão da baixa densidade da LNAPL, que flutua quando próxima ao nível da água subsuperficial (zona de capilaridade).

Figura 2.2 - Diferentes fases dos hidrocarbonetos da gasolina presentes nas zonas insaturada e saturada



Fonte: GUIQUER, 2000

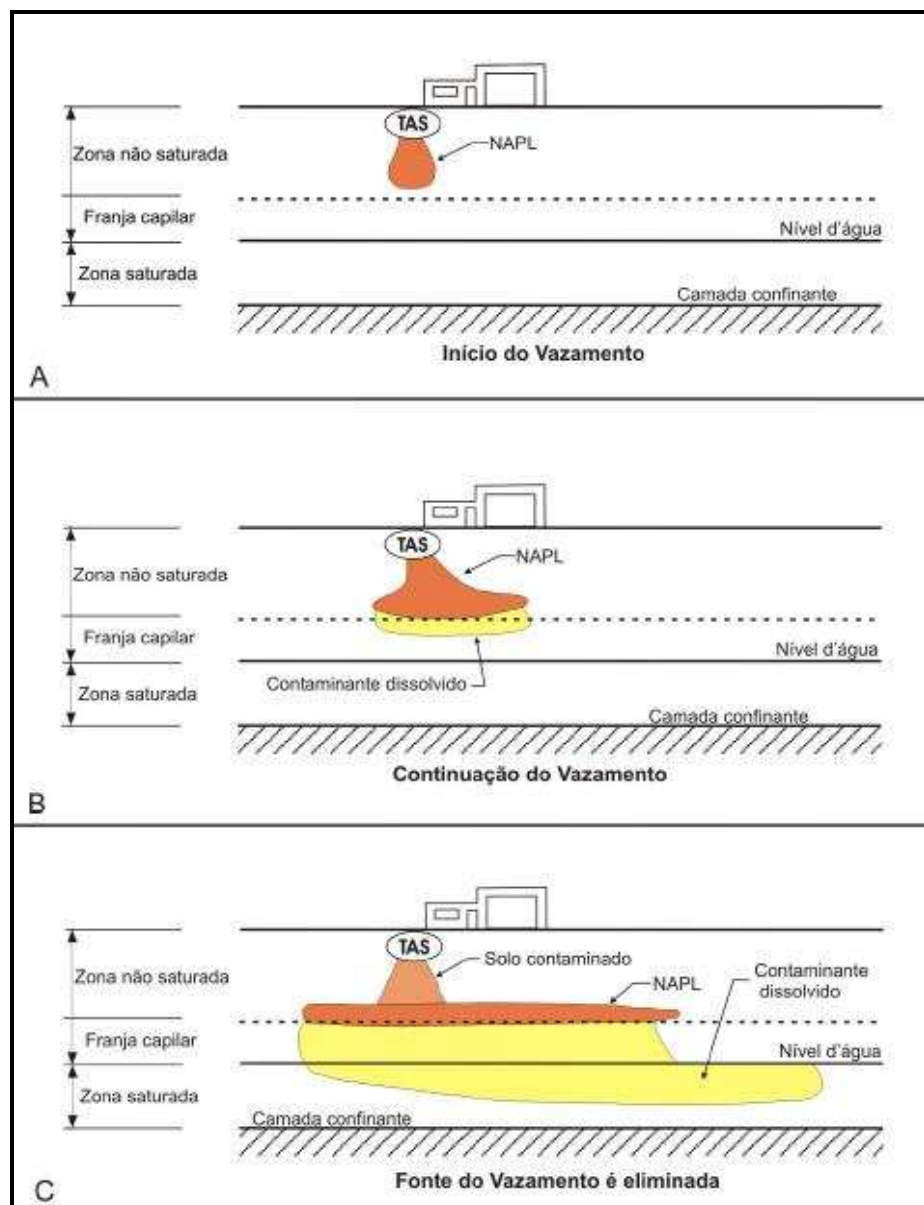
Na Figura 2.3 é ilustrado o comportamento da contaminação da subsuperfície pela gasolina após um vazamento em tanque de armazenamento até a formação de uma pluma de contaminação.

A percolação dos BTEX no solo pode ser retardada por sorção nos grãos de solo, principalmente se o solo apresentar alto teor de matéria orgânica (JACQUES *et al.*, 2007). Entretanto, o principal mecanismo que limita o transporte dos BTEX é a biodegradação e em menor escala a volatilização (WIEDEMEIER *et al.*, 1996; COURSEUIL, MARINS, 1997).

A presença de etanol na gasolina é um fator relevante na biodegradação dos BTEX, já que é degradado preferencialmente pelos microorganismos (DEEB, R. A. *et al.*, 2002).

A biodegradação deve ocorrer em velocidade maior que o fluxo de água subterrânea para garantir a redução da pluma de contaminação. O tipo e a concentração do contaminante, a atividade microbiana e alguns parâmetros hidrogeológicos (pH e Eh) são fatores importantes nesse processo (SILVA, 2002).

Figura 2.3 - Evolução da contaminação por hidrocarbonetos na subsuperfície



Fonte: USEPA, 2003b

2.4.2 Transporte de solutos em meios porosos

O movimento de contaminantes na subsuperfície não depende apenas do fluxo de fluido no qual essas substâncias estão dissolvidas, mas de mecanismos que, por sua vez, dependem de processos físicos, químicos e biológicos, aos quais estas substâncias são submetidas, e que controlam a sua partição, mobilidade, retenção e transformação (FREEZE, CHERRY, 1979; GILHAM, 1987).

Na Tabela 2.3 apresentam-se os mecanismos de transporte e atenuação de contaminantes.

Tabela 2.3 - Mecanismos de transporte e atenuação de contaminantes

Mecanismos de transporte	Mecanismos de atenuação	
Processos físicos	Processos químicos	Processo biológico
Advecção	Sorção (Adsorção, Absorção e Sorção hidrofóbica)	Decaimento biológico
Dispersão mecânica	Volatilização	
Difusão molecular	Cossolvência	
Retenção fluida	Oxirredução	
Transporte coloidal	Decaimento radioativo	
	Hidrólise	
	Complexação	
	Precipitação	

Fonte: Adaptado de CAMPOS, 2001

De acordo com Freeze & Cherry (1979), os principais mecanismos que influenciam o transporte de solutos orgânicos na água subterrânea são a advecção, a dispersão e a difusão, responsáveis pela descrição do movimento, e os mecanismos de atenuação como a sorção e transformações por reações químicas ou interações microbiológicas, conhecidos como retardamento (ou aceleração) e decaimento, responsáveis pela alteração do comportamento e das concentrações dos solutos na água subterrânea.

Os mecanismos de transporte e atenuação de soluto estão diretamente relacionados às características do contaminante, do meio poroso e da condição ambiental, algumas das quais estão apresentadas na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 - Fatores de intervenção no transporte e atenuação de soluto

Características do contaminante	Características do meio poroso	Variáveis ambientais
Tipo de poluente (substância dissolvida)	Tipo de solo (origem, formação, etc)	Condições hidrogeológicas (antes e após a disposição)
Concentração das substâncias presentes	Mineralogia (tipo de minerais argílicos)	Temperatura (variação no tempo e com a profundidade)
Densidade, viscosidade, solubilidade (influência da temperatura)	Granulometria	Condições aeróbias/anaeróbias
	Estrutura do solo	Potencial de oxi-redução
		Microorganismos presentes
Polaridade (relacionada à constante dielétrica)	Capacidade de troca iônica	
Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)	Tipo de cátions adsorvidos	
	Tipo e teor de matéria orgânica presente	
Demanda Química de Oxigênio (DQO)		
	Índice de vazios	
Solubilidade		
	Grau de saturação	
Cossolvência		
Volatilidade		
Pressão de vapor		
pH		
Potencial iônico		

Fonte: Adaptado de ARÉAS, 2006; DE CAMPOS, 2001

2.5 Técnicas de remediação de hidrocarbonetos

Em função da crescente demanda em relação ao gerenciamento de áreas contaminadas, grandes avanços têm ocorrido nas últimas décadas nos estudos que visam à recuperação ambiental.

Diversas são as tecnologias de remediação de locais contaminados por hidrocarbonetos de petróleo que têm sido desenvolvidas e encontram-se disponíveis para descontaminar o solo e a água subterrânea, restaurando a sua qualidade. A seleção da tecnologia a ser utilizada baseia-se no conhecimento das características físico-químicas da substância, volume vazado para a subsuperfície, tempo de vazamento, caracterização geológica e hidrogeológica do local, análise do meio físico superficial e subterrâneo e extensão da pluma de contaminação (SPILBORGHS, 1997)

De acordo com Chapelle (1993), a contenção e a remoção do produto livre são realizadas através de sistemas de poços ou trincheiras de bombeamento e para a remoção do produto adsorvido ao solo na zona não saturada e dissolvida na água subterrânea existem diferentes técnicas, relacionadas na Tabela 2.5.

As técnicas de remediação da zona não saturada e saturada podem ser realizadas *ex situ*, ou seja, através da retirada do material contaminado para posterior tratamento, ou *in situ*, quando o material não é retirado.

Em razão da associação de diferentes características apresentadas em cada área contaminada, longos períodos de descontaminação, custos e perigos das tecnologias convencionais de remediação do solo e das águas subterrâneas contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo, levaram à investigação de tecnologias alternativas, como a utilização de microrganismos nativos para imobilizar e/ou transformar (biodegradar) os compostos contaminantes em produtos mais simples e não tóxicos, como o dióxido de carbono e a água (COURSEUIL *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2002; ALVAREZ, ILLMAN, 2006).

Tabela 2.5 - Algumas técnicas de remediação *in situ* e *ex situ*

TRATAMENTO	TÉCNICA
<i>in situ</i>	Extração de vapores do solo (<i>SVE</i>)
	Injeção de ar (<i>air sparging</i>)
	Lavagem de solo (<i>soil flushing</i>)
	Bombeamento e tratamento (<i>pump and treat</i>)
	Tratamentos químicos (barreiras químicas, eletrocinética, solidificação e etc.)
	Biorremediação (intrínseca, bioventilação, bioestimulação e bioaugmentação)
<i>ex situ</i>	Incineração
	Lavagem de solo (<i>soil wash</i>)
	Coluna de aeração (<i>air stripping</i>)
	Dessorção térmica
	Biorremediação (compostagem, <i>ladfarming</i> e <i>biorreatores</i>)

2.6 Biodegradação

2.6.1 Ação dos microrganismos

A habilidade de alguns microrganismos em degradar os BTEX é conhecida desde 1908 (ALVAREZ; HUNT, 2002).

O solo e as águas subterrâneas contêm elevado número de microrganismos que se adaptam gradualmente às fontes de energia e carbono disponíveis (compostos orgânicos como os BTEX, por exemplo). Esses microrganismos desenvolvem naturalmente o processo de atenuação natural (biorremediação intrínseca) ou podem ser estimulados para desenvolver uma biodegradação relativamente controlada.

Microrganismos com as mais diversas capacidades metabólicas são empregados na biorremediação, como os pertencentes a gêneros de bactérias e fungos. A rota metabólica da degradação dependerá do microrganismo envolvido e do ambiente (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

Diversos são os estudos que apresentam a importância da utilização das bactérias autóctones na biorremediação. Entretanto, diversos autores consideram a introdução de consórcios de microrganismos como fator decisivo nos processos de biorremediação (SPINELLI, 2005). Contudo, esse procedimento nem sempre é permitido pela legislação, além de não ser em absoluto recomendado do ponto de vista ecológico.

A maior concentração microbiológica do solo situa-se, de modo geral, na camada superficial, entre 0 e 20 cm de profundidade devido ao maior acúmulo de matéria orgânica do solo por deposição do material vegetal. Na maioria dos solos, o teor de matéria orgânica do solo (MOS) varia de 0,5% a 5% nos horizontes minerais superficiais, podendo apresentar valores mais elevados em solos orgânicos. Apesar de encontrar-se em pequenas quantidades em comparação com a fração mineral, a MOS é importante para os sistemas de biorremediação, pois os compostos de carbono da MOS servem como fonte de energia para os organismos do solo. Portanto, a atividade desses microrganismos está diretamente relacionada à disponibilidade de carbono e também às condições químicas e físicas do solo (MEURER, 2000; MOREIRA, SIQUEIRA, 2002).

Os microrganismos participam de diversas reações e processos que ocorrem no solo, sendo sua existência de fundamental importância. A proliferação dos microrganismos é limitada, em especial, pelo pH, mineralogia do solo, espécie de matéria orgânica, temperatura e umidade (MEURER, 2000).

2.6.2 Biorremediação

A tecnologia de biorremediação é baseada em processos de reações químicas mediadas por microrganismos (biodegradação) e, por vezes, combinada com

estratégias de engenharia, criando condições para maximizar a descontaminação do solo e da água subterrânea.

Para a biodegradação dos compostos orgânicos é essencial uma reação redox, em que o hidrocarboneto ao ser oxidado perde elétrons para um aceptor de elétrons, que é reduzido (ganha elétrons). Existem diferentes compostos que podem agir como aceptores de elétrons, dentre eles o oxigênio (O_2), o nitrato (NO_3^-), dióxido de manganês (MnO_2), os óxidos de ferro (p.ex. $Fe(OH)_3$), o sulfato (SO_4^{2-}) e dióxido de carbono (CO_2). A seguinte seqüência de preferência de utilização desses aceptores foi observada: oxigênio > nitrato > manganês > óxidos de ferro > sulfato > dióxido de carbono. Esta seqüência reflete a diminuição do potencial de oxidação dos aceptores. Em geral, a cinética de oxidação dos hidrocarbonetos é mais rápida para aceptores de elétrons com potenciais de oxidação mais altos (CORSEUIL, ALVAREZ, 1996; SILVA, 2002; LOVLEY *et al.* 1994).

No processo de biodegradação dos BTEX, muitas enzimas requerem indução, e o indutor (tolueno, por exemplo) deve estar presente em concentrações mais altas que o limite mínimo de indução. Em geral esse limite é bastante baixo e a indução de enzimas dificilmente é um fator limitante na biorremediação de BTEX (CHAPELLE, 1993; LINKFIELD *et al.*, 1989; CORSEUIL, ALVAREZ, 1996).

Deeb e Alvarez-Cohen (1999) verificaram que, ao expor células bacterianas a misturas de compostos aromáticos presentes em concentrações iguais, os compostos do grupo BTEX foram degradados na seguinte seqüência: etilbenzeno, tolueno, benzeno e xilenos.

A oxidação de compostos orgânicos com a redução do oxigênio molecular é chamada de respiração aeróbia. No entanto, quando o oxigênio não está presente, a microbiota pode usar compostos orgânicos ou íons inorgânicos como aceptores de elétrons alternativos, condições estas chamadas de anaeróbias. A biodegradação anaeróbia pode ocorrer pela desnitrificação, redução do ferro, redução do sulfato ou condições metanogênicas. Na zona saturada do subsolo é de se esperar que os processos anaeróbios sejam predominantes, pois a água subterrânea está isolada da atmosfera, de maneira

que o oxigênio consumido em reações hidroquímicas e bioquímicas não é repostado (FREEZE, CHERRY, 1979; BORDEN *et al.*, 1995; CHAPELLE, 1993). Em condições aeróbias ou anaeróbias espera-se que haja uma queda nas concentrações dos aceptores de elétrons e um aumento na concentração de carbono inorgânico (CO₂ gasoso, CO₂ dissolvido ou íons de bicarbonato), devido à oxidação do carbono orgânico.

O oxigênio é o acceptor preferencial, pois os microrganismos ganham mais energia nas reações com a presença deste elemento. Em reações anaeróbias, os microrganismos utilizam os demais aceptores de elétrons, de acordo com o maior rendimento de energia que cada um possa promover, com a disponibilidade dos aceptores e com a cinética da reação microbiana associada aos diferentes aceptores (SILVA, 2002).

Chiang *et al.* (1989), em estudo de biodegradação aeróbia de BTEX em um aquífero arenoso raso, reforçaram a ideia de que a quantidade desses compostos na água subterrânea está diretamente relacionada com a disponibilidade de oxigênio dissolvido. Observaram que quando a concentração de oxigênio dissolvido era maior que 0,9 ppm, não havia concentração de BTEX.

Fernando (2009) verificou a mobilização do óxido de ferro, Fe(II), e sua redução quando em anaerobiose, em microcosmos saturados, com amostras deformadas do solo de Duque de Caxias (RJ), contaminados com BTEX.

Dethlefsen *et al.* (2004) menciona que alguns estudos sobre a redução microbiológica de óxido de ferro, Fe (III), realizados em campo e laboratório indicam que somente parte do Fe (III) do sedimento é reduzido a óxido de ferro, Fe (II), pelos microrganismos.

O nitrato, acceptor de elétron das reações anaeróbias, é um dos íons mais encontrados em águas naturais, ocorrendo geralmente em baixos teores nas águas superficiais, mas podendo atingir altas concentrações em águas subterrâneas (BORDEN *et al.*, 1995). Destaca-se que a ingestão do nitrato através das águas de abastecimento está associada a efeitos prejudiciais à saúde (ALABURDA; NISHIHARA, 1998).

Na zona saturada, as bactérias degradadoras variam com as características específicas geoquímicas e hidrogeológicas do aquífero, sendo que, de maneira geral, embora existam bactérias anaeróbias, as que predominam são aeróbias (CHAPELLE, 1993).

A biorremediação baseia-se em três aspectos principais: a existência de microrganismos com capacidade catabólica para degradar o contaminante; a disponibilidade do contaminante ao ataque microbiano ou enzimático e condições ambientais adequadas para o crescimento e atividade do agente biorremediador (COURSEUIL *et al.*, 1998; ALVAREZ, ILLMAN, 2006)

A maioria dos compostos orgânicos (substrato) é biodegradável. Porém, a biodegradabilidade é influenciada pela estrutura química do composto. Alguns compostos orgânicos são rapidamente biodegradados enquanto outros são recalcitrantes, apresentando degradação mais difícil, e outros são totalmente recalcitrantes, não biodegradáveis. No entanto, é possível que a concentração elevada de um composto considerado biodegradável possa acarretar a inibição dos microrganismos e, conseqüentemente, a sua persistência no meio. Além disso, pode ainda ser tóxica para a população microbiana.

Apresentam-se mais facilmente degradáveis, os hidrocarbonetos de peso molecular baixo ou moderado (C₁₀ a C₂₄, anel aromático simples) e os álcoois. Ao contrário, com o aumento do peso molecular, aumenta a resistência à biodegradação. As taxas de biodegradação são função do tipo de composto e também da adaptação dos microrganismos nativos às condições de contaminação com o tempo. Taxas elevadas estão relacionadas aos compostos saturados (alifáticos) seguidas pelos aromáticos leves, como os do grupo BTEX presentes na gasolina (LEAHY, COLWELL, 1990; SILVA, 2002).

O grau de alteração da estrutura molecular dos compostos orgânicos, devido à degradação pela ação dos microrganismos, determina se o processo em questão constitui uma biotransformação ou uma mineralização. A biotransformação consiste na transformação do composto orgânico em compostos mais simples, ou seja, ocorre uma degradação parcial do composto em um ou mais compostos que podem ou não ser menos tóxicos do que a substância original. A mineralização, por sua vez, é a degradação completa do

composto, pois se refere à quebra de moléculas orgânicas em substâncias inorgânicas como o dióxido de carbono e água, em massa celular e resíduos inorgânicos inertes (LA GREGA,1994; SILVA, 2002). Sendo assim, a biorremediação pode ser considerada como fonte de controle e prevenção de poluição, reduzindo a toxicidade dos orgânicos e o potencial de migração de perigosos compostos no solo (COURSEUIL *et al.*, 1998; ALVAREZ, ILLMAN, 2006).

Quando completa, o que nem sempre ocorre, a biodegradação aeróbia resulta na mineralização dos contaminantes orgânicos em CO₂ e água, ao passo que do processo de metabolização da biodegradação anaeróbia originam-se subprodutos como acetato, íon ferro (II) e metano (JACQUES *et al.*, 2007; NUNES, CORSEUIL, 2005).

A degradação de contaminantes do solo por microrganismos ocorre se: existirem no solo microrganismos degradadores dessas substâncias; a quantidade de contaminante não for tóxica à população microbiana; o ambiente não se encontrar em condições excessivas de pH alcalino ou pH ácido; o teor de umidade for adequado, e; houver disponibilidade de nutrientes (MARIANO, 2006). Sendo assim, dependendo da quantidade de microrganismos presentes no solo e do tipo de poluente, a atividade biológica pode ser relevante no retardamento do transporte de contaminantes.

Segundo Jacques *et al.* (2007), uma vez que a composição da fase sólida do solo determina sua capacidade de sorção, é esperado que solos com diferentes composições mineralógicas e teores de matéria orgânica apresentem diferentes capacidades de sorção e de biodisponibilidade dos hidrocarbonetos aos microrganismos degradadores.

No caso da degradação de BTEX, pode ocorrer toxicidade de um composto (benzeno, por exemplo) a determinado grupo de microrganismos (os que degradam tolueno, por exemplo), de forma que a presença, em conjunto, do benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos tenham influência sobre a cinética de consumo de cada composto individualmente (SILVA, 2008).

De acordo com Margesin *et al.* (2000), embora a quantificação da atividade biológica em laboratório seja, frequentemente, utilizada para interpretar a intensidade da biodegradação no solo, esta indica apenas a estimulação do processo de biodegradação, mas não representa necessariamente uma medição da atual biodegradação, pois só uma parte da população de microrganismos do solo pode ser isolada e cultivada em laboratório.

Estudos sobre derrames de derivados de petróleo em solos argilosos têm estimulado inúmeras pesquisas na área de biorremediação. Diversas são as interações entre este tipo de solo, os derivados e a microbiota. Além disso, a baixa permeabilidade é um fator de influência na injeção de bioestimulantes (oxigênio e nutrientes, por exemplo) da atividade microbiana.

A técnica de biorremediação envolve variações de tratamento que pode ser realizada *in situ* e *ex situ*. A biorremediação *in situ* é realizada no próprio local, sem que haja remoção de material contaminado. Dessa forma, evitam-se custos adicionais associados à movimentação de solos e águas contaminados para locais destinados ao tratamento. Entre as estratégias utilizadas para a biorremediação de combustíveis no ambiente contaminado, destacam-se quatro processos: biorremediação intrínseca, bioventilação, bioestimulação e bioaugmentação (SKIPPER, 1999; ALVAREZ, ILLMAN, 2006).

2.6.2.1 Biorremediação intrínseca

A remediação natural de solos e das águas subterrâneas tem sido aceita, principalmente em locais contaminados por derramamentos de derivados de petróleo, como o que acontece em postos de combustíveis. Esta estratégia de gerenciamento baseia-se nos processos naturais de atenuação para remover ou conter os contaminantes dissolvidos na água (WIEDEMEIER, 1996).

A atenuação natural é a denominação dada para a técnica de descontaminação do ambiente por meio de fatores ambientais naturais existentes devido aos processos físicos, químicos e biológicos. Os mecanismos para a atenuação de hidrocarbonetos de petróleo envolvem os processos de difusão, dispersão, volatilização, sorção, reações químicas e biodegradação

por microrganismos do solo e da água (WIEDEMEIER, 1996; JACQUES *et al.*, 2007). A maioria destes mecanismos é abiótica, ou seja, simplesmente transferem o soluto para outra fase ou localização. Na ocorrência de um vazamento de gasolina, por exemplo, esta migrará através do solo atingindo o lençol freático, onde os compostos se dispersarão na forma de uma pluma. O movimento da pluma poderá ser atenuado pelos mecanismos de atenuação de hidrocarbonetos.

Diferentemente, a biodegradação reduz a massa de contaminante com a quebra ou degradação dos compostos orgânicos por meio do metabolismo de microrganismos vivos, limita o transporte dos hidrocarbonetos de petróleo e transforma-os em compostos inócuos à saúde (WIEDEMEIER, 1996; CORSEUIL, MARINS, 1998; MAZZUCO, 2004).

A técnica de atenuação natural por depender, exclusivamente, dos processos naturais, pode vir a ser muito lenta. Mesmo assim, resultados obtidos em pesquisas de campo (BARKER *et al.*, 1987; CHIANG *et al.*, 1989; CHAPELLE, 1994) têm mostrado que este mecanismo de remediação limita o deslocamento dos contaminantes e, portanto, diminui a contaminação ao meio ambiente.

Entre as estratégias da técnica de biorremediação utilizadas na degradação dos BTEX encontra-se a biorremediação intrínseca que, por vezes, é denominada atenuação natural, cujo conceito básico é o uso da capacidade de microrganismos endógenos (microbiota nativa) em degradar os contaminantes que tenham sido derramados em subsuperfície, sem qualquer interferência, como o acréscimo de nutrientes ou a adequação de qualquer condição ambiental (BORDEN *et al.*, 1995; WIEDEMEIER, 1996; JACQUES *et al.*, 2007).

A biorremediação intrínseca tem sido muito estudada e utilizada como mecanismo estratégico de transformação dos compostos orgânicos tóxicos em produtos menos tóxicos, ou na sua eliminação do solo e aquíferos. Os BTEX passam a ser utilizados como fonte de carbono pelos microrganismos e, por se tratarem de compostos de origem natural, espera-se que sejam facilmente degradados pela microbiota nativa do solo e sua completa transformação resulte na formação de substâncias mais simples e inertes, como CO₂ e água, denominados produtos de mineralização (BORDEN *et al.*, 1995; CORSEUIL,

ALVAREZ, 1996; CORSEUIL, MARINS, 1997; JACQUES *et al.*, 2007; MAZZUCO, 2004).

Na investigação da biodegradabilidade do óleo diesel e da gasolina pelos vários microrganismos do meio ambiente, Marchal *et al.* (2003) observaram considerável degradação intrínseca da gasolina (96%) e menor do óleo diesel (60 a 73%), o que é esperado, uma vez que o óleo diesel é constituído por hidrocarbonetos mais pesados e recalcitrantes do que a gasolina. Os autores verificaram ainda que a população microbiana de solos poluídos apresentou, em geral, uma capacidade de degradação pouco maior do que aquela de solos não poluídos. Pode-se atribuir, portanto, o aumento da atividade degradadora microbiótica à utilização do BTEX como fonte de carbono e energia.

De acordo com Corseuil (2004), a biorremediação intrínseca é uma alternativa eficiente e econômica para a recuperação de áreas impactadas com hidrocarbonetos de petróleo.

O solo contaminado por hidrocarbonetos presentes na gasolina está sujeito aos processos naturais de lixiviação, volatilização e biodegradação, responsáveis pela redução da concentração desses poluentes no solo. Porém, apenas a biodegradação é um indicativo da ocorrência da biorremediação intrínseca.

Considerando a existência de fatores limitantes à biodegradação, devem-se avaliar previamente alguns parâmetros geoquímicos do solo, que poderão ser utilizados para estimar as taxas em que tal processo reduzirá as concentrações aos níveis desejáveis, bem como quantificar a sorção, diluição ou volatilização dos contaminantes.

A caracterização do solo pode ser realizada por meio de análises físico-químicas (pH, temperatura, composição química, umidade, disponibilidade de nutrientes e receptores de elétrons); quantidade e biodisponibilidade dos contaminantes; propriedades geotécnicas; e informações biológicas (biomassa e atividades enzimáticas) capazes de fornecer dados sobre a presença de microrganismos no solo.

2.6.3 Fatores de influência na biodegradação

A biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo pode ser limitada devido às condições ambientais desfavoráveis à sobrevivência da atividade microbiana degradadora no solo. Além disso, depende também da natureza e concentração do contaminante.

Alguns dos fatores que influenciam o processo de biodegradação de contaminantes orgânicos são o tipo de solo, a disponibilidade de nutrientes, os aceptores e doadores de elétrons, o oxigênio, a temperatura, a umidade, o potencial redox (Eh), e o potencial de hidrogênio (pH), resumidos no que se segue.

➤ Tipo de solo

O tipo de solo, considerando suas características físicas e mecânicas, influencia na distribuição e no grau de adsorção de contaminantes e nutrientes. Solos com presença de matéria orgânica tendem a aumentar a adsorção de compostos orgânicos nas partículas sólidas.

A eficiência das tecnologias de recuperação de ambientes contaminados está, muita das vezes, restrita a diversos fatores, tais como o tipo de solo impactado em função de sua constituição mineralógica, permeabilidade e teor de matéria orgânica (JACQUES *et al.*, 2007; MENEGHETTI, 2007).

➤ Disponibilidade de nutrientes

O metabolismo requer elementos como nutrientes, nem sempre disponíveis, da mesma maneira que necessita do carbono inorgânico como substrato. O fósforo, o nitrogênio e o potássio são considerados macronutrientes por serem necessários em maiores quantidades do que outros elementos na síntese celular. Entre os micronutrientes essenciais estão o ferro, enxofre, cobre, zinco e magnésio. Destaca-se que o alumínio e outros metais pesados (Pb, Hg, Cd e Cr) podem ser tóxicos aos microorganismos (LA GREGA, 1994; CORSEUIL, ALVAREZ, 1996; JACQUES *et al.*, 2007). No entanto, quantidades traços destes metais são necessárias para os objetivos nutricionais dos microorganismos, mas podem ser prejudiciais à vida microbiana se presentes na

água subterrânea em concentrações maiores que 1 mg/L. Embora a gasolina brasileira não tenha chumbo, análises geoquímicas com amostras representativas do aquífero devem ser realizadas para verificar a ausência dessas substâncias inibitórias (CORSEUIL; ALVAREZ, 1996).

➤ Aceptores e doadores de elétrons

A produção de energia pelos microrganismos é realizada através da transferência de elétrons dos doadores aos aceptores.

Em relação à disponibilidade dos aceptores de elétrons para o processo de respiração natural dos microrganismos tem-se observado a seguinte sequência preferencial: oxigênio > nitrato > Fe (III) > sulfato > gás carbônico. Em geral, a cinética de oxidação dos hidrocarbonetos é muito mais rápida para aceptores com grande potencial de oxidação. O contaminante orgânico pode ser utilizado como substrato primário, atuando, assim, como doador de elétrons e fonte de carbono para as células microbianas (CORSEUIL, ALVAREZ, 1996; ALVAREZ – COHEN, 1993).

➤ Oxigênio

A maior limitação na cinética da biodegradação por processos aeróbios é a disponibilidade de oxigênio devido à sua baixa solubilidade em água. A biodegradação de compostos como os hidrocarbonetos de petróleo exigem alta demanda biológica de oxigênio (ALVAREZ – COHEN, 1993).

A disponibilidade de oxigênio em solos depende não só da taxa de consumo de oxigênio pelos microrganismos, como também do tipo de solo e da presença de substratos que eventualmente levem ao esgotamento do oxigênio (LEAHY; COLWELL, 1990).

➤ Temperatura

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que influenciam a atividade e a sobrevivência dos microrganismos. O clima e as estações do ano

são responsáveis pela seleção de populações microbianas distintas adaptadas às temperaturas ambientais. Temperaturas específicas dentro desta variação periódica influenciam o processo microbiológico (CORSEUIL, ALVAREZ, 1996; LA GREGA, 1994).

A atividade enzimática e a taxa de biodegradação aumentam com a temperatura até que seja atingido um valor ótimo de cada espécie. Se a temperatura aumentar muito acima do valor ótimo, proteínas, enzimas e ácidos nucléicos tornam-se desnaturados e inativos, retardando o crescimento celular e podendo inclusive acarretar a morte da célula. Ao contrário das altas temperaturas, a exposição a baixas temperaturas não é letal, mas diminui a fluidez e a permeabilidade da membrana celular, que controla o transporte de nutrientes (e contaminantes) entre o meio exterior e o interior da célula microbiana. Neste caso, a atividade celular diminui devido à atividade enzimática reduzida (LA GREGA, 1994).

Os efeitos da temperatura podem variar de acordo com a composição dos hidrocarbonetos da mistura de petróleo. De acordo com ZoBell (1969) a biodegradação destes compostos pode ocorrer para valores maiores que 25°C. No caso da água subterrânea brasileira, a temperatura varia entre 20 e 25 °C, valores favoráveis à biorremediação. É importante ressaltar que a temperatura na subsuperfície não é muito variável.

➤ Teor de umidade

Alta atividade somente ocorrerá se houver disponibilidade adequada de água aos microrganismos, já que o teor de umidade no solo se relaciona inversamente com a disponibilidade de oxigênio e, conseqüentemente, com a atividade de microrganismos aeróbios.

Na condição de inundação, a população microbiana aeróbia se reduz, incentivando o desenvolvimento de microrganismos anaeróbios ou resistentes aos baixos níveis de oxigênio (DIBBLE, BARTHA, 1979; ALEXANDER, 1967).

Um problema relevante causado pelo encharcamento do solo é a mudança de um ambiente aeróbio para outro anaeróbio. Em condição de anaerobiose, o

metabolismo é drasticamente reduzido devido à falta de oxigênio e/ou a produção, nesta condição, de toxinas de origem microbiológica (ALMEIDA, CARVALHO, 1995).

➤ Potencial redox (Eh)

O potencial de oxi-redução é um indicador qualitativo de condições aeróbias ou anaeróbias, auxiliando no conhecimento da tendência de biodegradação do meio impactado. Entretanto, o seu valor é fortemente influenciado pelas reações químicas e bioquímicas nas águas subterrâneas (STUMM, MORGAN, 1981; EDMUND *et al.*, 1984; CORSEUIL, 2004).

Este parâmetro expressa o estado redox do meio e depende da profundidade e da taxa de difusão de oxigênio. A concentração de oxigênio é usualmente medida através do potencial redox. Valores de Eh baixos ou negativos favorecem a existência de espécies reduzidas (respiração anaeróbia), enquanto que valores altos de Eh favorecem a existência de espécies oxidadas (respiração aeróbia). Para solos aeróbios (óxidos) o valor de Eh varia entre +300 a +800 mV, enquanto que para solos anaeróbios, Eh varia entre – 414 a +118 mV (MITCHELL, 2005). A água poluída (processo anaeróbio) sempre tem medidas de potencial redox bem inferiores às de água não poluída.

De acordo com Stumm e Morgan (1981), em águas subterrâneas, considerando reações em pH 7 e temperatura a 25°C, os valores característicos dos Eh seguem uma sequência energética favorável aos processos mediados pelos microrganismos. Nesta sequência a respiração aeróbia apresenta o Eh mais elevado (+820 mV), seguido pela nitrato-redução (+740 mV), manganês-redução (+520 mV), ferro-redução (-50 mV), sulfato-redução (-220 mV) e metanogênese (-240 mV). Mariano (2006) afirma que a cinética de oxidação dos hidrocarbonetos é mais rápida para aceptores de elétrons com potenciais de oxidação mais altos. Além disso, pode haver concomitância de ocorrência dos referidos processos.

Edmund *et al.* (1984) propuseram uma sequência de quatro intervalos em relação aos valores de Eh: (i) oxigênio-nitrogênio, (+) 250 mV a (+) 100 mV; (ii)

ferro, (+) 100 mV a zero mV; (iii) sulfato, zero a (-) 200 mV; e (iv) metanogênese, abaixo de (-) 200 mV.

➤ Potencial de Hidrogênio (pH)

O pH do solo afeta diretamente a atividade dos microrganismos pelos efeitos dos íons H^+ na permeabilidade celular e na atividade enzimática. O pH ótimo para a ação dos microrganismos é usualmente próximo da neutralidade (7,0), porém existem aqueles ativos na faixa de 5,0 a 9,0. A água subterrânea tem valor de pH próximo do neutro, favorecendo a atividade microbiana. Entretanto, o pH do solo pode ser bastante variável, por vezes devido à ação do homem, prejudicando assim a biodegradação de hidrocarbonetos (CORSEUIL, ALVAREZ, 1996; JACQUES *et al.*, 2007; LA GREGA, 1994).

Segundo Moreira e Siqueira (2006), a maioria dos solos apresenta pH na faixa de 4,0 e 8,5. Os horizontes superficiais dos solos, em regiões de clima úmido, tendem a ser mais ácidos devido à lixiviação dos compostos formados pela decomposição da matéria orgânica. Por outro lado, em regiões de clima seco, o solo tende a apresentar um caráter alcalino.

2.7 Efeito da mistura gasolina-etanol

A adição do etanol à gasolina apresenta como vantagens a economia de petróleo, maior rendimento dos motores, redução da emissão de poluentes para o ambiente e, como desvantagens, a produção de acetaldeídos e formaldeídos primários (DUARTE, 2003).

No Brasil, adiciona-se à gasolina quantidades que variam entre 20 e 26% de etanol (álcool etílico), tornando-a bastante diferenciada da de outros países. Os hidrocarbonetos aromáticos (BTEX) são miscíveis no etanol. De acordo com Corseuil e Alvarez (1996), concentrações de etanol superiores a 2% podem afetar o comportamento dos BTEX em sistemas subsuperficiais. Os principais aspectos são: (a) a possibilidade do aumento da solubilidade dos BTEX em água; (b) a possibilidade do aumento da mobilidade dos BTEX dissolvidos na água subterrânea e; (c) a possibilidade de que a presença do etanol possa

inibir ou atrasar a biodegradação natural dos BTEX por ser um substrato preferencial, aumentando, assim, a persistência desses compostos na água subterrânea (CORSEUIL, MARINS, 1997; CORSEUIL, FERNANDES, 1999; CORSEUIL *et al.*, 2003; CORSEUIL *et. al*, 2004; ÖSTERREICHER-CUNHA *et al.*, 2009).

Em um vazamento de gasolina à qual foi adicionado etanol, o padrão de comportamento no solo é diferente daquele apresentado pela gasolina pura, devido ao efeito de cossolvência desse composto oxigenado nas propriedades físico-químicas da mistura. Segundo Corseuil e Fernandes (1999) este efeito é definido como a capacidade de um determinado solvente (por exemplo, o etanol) em aumentar a solubilidade de um soluto (BTEX) em outro solvente (água). Dessa forma, provoca o aumento da concentração dos compostos BTEX na água subterrânea, o que pode tornar onerosa à aplicação de alguma técnica de remediação da área contaminada.

Por ser completamente solúvel em água, o etanol apresenta menor potencial de sorção e, portanto, maior mobilidade do que os compostos BTEX. Assim, em águas subterrâneas contaminadas com misturas de gasolina e etanol, sua concentração deverá ser maior do que a desses compostos. Além disso, quanto mais hidrofóbico e menos solúvel em água for o composto presente na gasolina, maior será o efeito do etanol no aumento da solubilização deste composto (CORSEUIL; FERNANDES, 1999).

2.7.1 Microrganismos na degradação do etanol

O etanol pode representar uma fonte de carbono e energia para uma variedade de populações microbianas, inclusive espécies que podem degradar os BTEX. Os microrganismos que podem degradar os álcoois primários são mais comuns na natureza do que aqueles degradadores dos BTEX (CORSEUIL *et al.*, 1998; POWERS *et al.*, 2001; ALVAREZ, HUNT, 2002).

Para Corseuil e Marins (1997) e Barker *et al.* (1987), todos os álcoois primários podem ser biodegradados em preferência aos BTEX. Além disso, a biodegradação do etanol pode demandar grande quantidade de oxigênio ou

outros aceptores de elétrons e de nutrientes que estariam disponíveis para a degradação dos BTEX.

Elevadas concentrações ($> 100.000 \text{ mg L}^{-1}$) de álcoois não são biodegradáveis devido ao efeito tóxico apresentado a maioria dos microrganismos, além de inibir a atividade microbiana degradadora dos BTEX e diminuir o retardamento no deslocamento dos BTEX causado pela sorção no solo (BARKER *et al.*, 1987; CORSEUIL, MARINS, 1997; POWERS *et al.*, 2001; CORSEUIL *et al.*, 2004). Entretanto, é importante ressaltar que a diversidade genética dos microrganismos impede generalizações sobre a concentração de etanol que reprime a ação das enzimas de degradação dos BTEX (POWERS *et al.*, 2001).

A toxicidade dos álcoois está relacionada ao comprimento da cadeia hidrofóbica. Aqueles de cadeia mais longa, com mais de 10 átomos de carbono na sua estrutura, são inibidores muito potentes do crescimento microbiano se comparados aos álcoois de cadeia curta (POWERS *et al.*, 2001).

Os microrganismos aeróbios, em especial as bactérias aeróbias, podem oxidar o etanol a CO_2 e H_2O , enquanto as anaeróbias podem oxidá-lo a acetato, CO_2 , CH_4 e H_2 (POWERS *et al.*, 2001; ALVAREZ, HUNT, 2002).

No processo de remoção de nitrato das águas subterrâneas, a desnitrificação, o etanol pode ser usado como fonte de carbono e energia para os microrganismos (POWERS *et al.*, 2001). Segundo Corseuil *et al.* (1998), a presença do etanol pode fazer com que aumente a degradação do tolueno.

2.7.2 Degradação preferencial do etanol em relação aos BTEX

A degradação dos BTEX é geralmente iniciada por enzimas induzidas. Estas enzimas são apenas produzidas quando um indutor (por exemplo, o tolueno) está presente em altas concentrações ou em um nível mínimo para a indução (POWERS *et al.*, 2001; ALVAREZ, HUNT, 2002).

Existem evidências indiretas na literatura sobre os efeitos potenciais do etanol no comportamento de enzimas envolvidas na degradação dos BTEX.

Santos (1996) verificou a degradação preferencial do etanol por parte dos microrganismos, com isso retardando a degradação dos compostos BTEX. Em seu experimento, uma amostra do contaminante puro (BTEX) foi totalmente consumida em menos de quatro dias, ao passo que misturado a uma grande concentração de etanol (300 mg/l), em doze dias não se observou biodegradação significativa.

Corseuil *et al.* (1998) relatam que pequena ou nenhuma degradação dos BTEX dissolvidos na zona saturada aconteceu em condições aeróbias, desnitrificantes, redutoras de ferro, redutoras de sulfato e microcosmos metanogênico enquanto o etanol estava presente.

Powers *et al.* (2001) observaram que o etanol foi preferencialmente degradado se comparado ao benzeno sob uma concentração de 20 mg L⁻¹ em condições aeróbias, devido a repressão da síntese de enzimas utilizadas na degradação do benzeno.

Corseuil e Kulkamp (2003) mostram em seus resultados referentes a uma investigação da atenuação natural em um derramamento controlado de etanol e diesel, que o etanol presente na água subterrânea agia como consumidor de aceptores de elétrons e nutrientes que poderiam estar disponíveis para a bioatenuação dos compostos aromáticos. Enquanto o etanol estava sendo degradado, a concentração aquosa de BTEX ainda estava aumentando perto da fonte do vazamento. Indicativos da degradação preferencial do etanol foram o aumento da concentração de acetato e diminuição do pH em uma ordem de magnitude. Indicadores geoquímicos mostraram que degradação aeróbia, redução de ferro e metanogênese eram os principais processos biológicos responsáveis pela degradação do etanol.

Estudos conduzidos por Österreicher-Cunha *et al.* (2007, 2009), em solo residual brasileiro mostraram que o etanol inibe a biodegradação dos compostos BTEX na zona não saturada e que, de acordo com os parâmetros microbianos monitorados, o rápido decaimento das concentrações dos compostos aromáticos pode ser atribuído ao aumento da atividade degradadora e da biomassa de microrganismos no solo que degradaram o etanol.

De maneira geral, a degradação preferencial do etanol sobre BTEX pode se refletir no fato de que o etanol é considerado um substrato prontamente degradável, que pode ser oxidado por enzimas constitutivas. Por outro lado, os BTEX são degradados tipicamente por enzimas induzidas, cuja síntese pode ser reprimida na presença de outros substratos facilmente degradáveis, quando em altas concentrações. Sendo assim, a presença do etanol pode acarretar o retardo ou impedimento da degradação completa dos BTEX.

O etanol pode ainda afetar a disponibilidade de nutrientes essenciais e substratos necessários à biodegradação dos BTEX através do consumo preferencial de nutrientes e aceptores de elétrons, tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias (CORSEUIL *et al.*, 1998; POWERS *et al.*, 2001; ALVAREZ, HUNT, 2002). Dessa forma, dependendo das reações químicas no aquífero ou no solo e da taxa de reabastecimento natural dos aceptores de elétrons, o etanol pode impedir a degradação dos BTEX através da depleção dos aceptores de elétrons presentes.

Segundo Silva *et al.* (2002) os modelos tradicionais de transporte, usados na análise das contaminações e nas propostas de remediação, devem também levar em consideração o comportamento diverso dos BTEX na presença de etanol.

Sendo assim, na remediação de áreas contaminadas por derramamentos de gasolina é necessário que se conheçam, detalhadamente, as interações físico-químicas e biológicas do etanol com os constituintes da gasolina para que se obtenha sucesso no processo de descontaminação.

2.8 Avaliação da biodegradação

Para que se possa afirmar que a biodegradação está ocorrendo, deve haver evidências de que os microrganismos estão envolvidos no processo de degradação do contaminante. Além disso, deve-se ter indicativos das condições do meio favoráveis à atividade microbiana, migração, adsorção ao solo, mudanças por reações químicas abióticas ou possibilidade de volatilização. Sendo assim, é importante verificar o potencial dos

microrganismos presentes nas amostras da área contaminada para transformar os contaminantes sob as condições ambientais, a perda do contaminante e alguns dados capazes de mostrar que o processo de biodegradação está realmente acontecendo na área de estudo. Os fatores relevantes na análise da biodegradação são similares em estudos laboratoriais ou *in situ* (ALVAREZ – COHEN, 1993).

No caso da biorremediação *in situ*, o monitoramento do ambiente subsuperficial é fundamental para avaliar o progresso desta técnica. Os fatores geralmente analisados a partir de amostras da área contaminada incluem a concentração de contaminantes, a atividade microbiana, a concentração de aceptores e doadores de elétrons, a demanda de oxigênio, os produtos da degradação, o pH e a temperatura (ALVAREZ – COHEN, 1993).

Vicente *et al.* (2009) apresentaram um levantamento dos experimentos realizados em grande escala, no país (Fazenda Ressacada, Santa Catarina) e no exterior (Borden, Ontário, Canadá; Cape Cod, Massachussetts, Estados Unidos), para avaliar a contaminação de solo e águas subterrâneas por derivados de petróleo. Os experimentos, entretanto, restringiram-se a solos arenosos, que apresentam características bastante diversas das dos solos residuais.

Malamud *et al.* (2005) apresentaram os resultados do monitoramento de um vazamento controlado, iniciado em 1998, de 100 litros de gasolina comercial, para avaliar a atenuação natural dos BTEX, em uma área na Fazenda Experimental da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis, em que foram examinados os efeitos do etanol no processo de biodegradação por meio do balanço de massa. Foram analisados os principais parâmetros indicadores dos processos de transporte e transformação, como a concentração dos compostos BTEX e etanol, os receptores de elétrons (oxigênio dissolvido, sulfato, nitrato), os subprodutos metabólicos (ferro II, metano, acetato, sulfeto), e os parâmetros hidrogeoquímicos (pH, potencial redox, condutividade, acidez e alcalinidade). Os resultados mostraram que as massas dos compostos do grupo BTEX sofreram decréscimo significativo somente após o desaparecimento do etanol, primeiro composto a ser

biodegradado, confirmando sua degradação preferencial. Mesmo com a influência negativa do etanol, observou-se ter ocorrido rápida degradação dos BTEX e concluiu-se, portanto, que a tecnologia de atenuação natural monitorada pode ser uma alternativa viável e econômica para a recuperação de aquíferos impactados por derramamentos de baixo risco de combustíveis. Verificou-se que a avaliação da atenuação natural por meio do balanço de massa se mostrou eficiente por possibilitar a determinação da biodegradação sem que seja necessário determinar os parâmetros dos fluxos advectivo e dispersivo.

Mohammed e Allayla (2000) desenvolveram um estudo, em escala piloto, para avaliar os efeitos causados pela velocidade da água subterrânea e a biodegradação dos compostos BTEX em solos arenosos saturados. Construíram um tanque de areia de grandes dimensões instrumentado e, com base no monitoramento concluíram que a taxa de biodegradação dos compostos BTEX é fortemente dependente da velocidade do fluxo.

Tendo em vista a escassez de trabalhos publicados na literatura sobre experimentos envolvendo a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em solo residual *in situ*, Martins *et al.* (2012) construíram, instrumentaram e monitoraram um bloco retangular de grandes dimensões de solo residual de gnaisse, submetido ao fluxo horizontal de uma solução composta de água, benzeno e tolueno. Ao longo do período de 85 dias, foram coletadas, periodicamente, amostras da solução percolante em pontos de monitoramento previamente estabelecidos. As concentrações de benzeno e tolueno nas amostras foram determinadas por meio de cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC-MS). Com base nos resultados das análises químicas e microbiológicas, observou-se um decaimento das concentrações dos compostos na água ao longo do comprimento do bloco e do tempo. Ambos os compostos apresentaram perfis semelhantes de decaimento, indicando não ter havido diferenças significativas na retenção e biodegradação de B e T, nas condições analisadas.

Em relação aos modelos de aplicação prática do transporte de massa em meios porosos, a maioria inclui somente os processos físicos de advecção,

difusão molecular e dispersão, e o processo químico de sorção. Porém, no caso do transporte de contaminantes orgânicos é necessária a consideração do fenômeno bioquímico (decaimento biológico). De acordo com Silva *et al.* (2002) muitos pesquisadores dedicam-se ao desenvolvimento de modelos matemáticos como alternativa na simulação e na previsão de processos de transporte e biodegradação.

Uma tentativa de quantificar o processo de biodegradação de contaminantes em aquíferos de águas subterrâneas pode ser bem sucedida ao se utilizar modelos que combinem os processos físicos, químicos e biológicos. Os principais utilizados são o modelo cinético de *Monod* de 1942 (mais comum), o decaimento radioativo/biológico de primeira ordem e a reação instantânea (BEDIENT *et al.*, 1999; FETTER, 1993).

Neste contexto, faz-se referência ao trabalho de Velasquez (2015) que simulou o comportamento de um bloco residual *in situ* contaminado com benzeno, com dados experimentais de Martins *et al.* (2012), para encontrar os valores de parâmetros de Monod e da população bacteriana. Além disso, simulou também duas colunas em PVC com amostras indeformadas do mesmo solo residual, visando avaliar ao longo da coluna a biodegradação do composto benzeno e a influência do etanol nesse processo. O estudo sugere o rápido esgotamento do oxigênio, na zona saturada, devido a presença do etanol, atrasando a biodegradação do benzeno e criando condições anaeróbias. Além disso, sugere que o etanol contribuiu para o aumento do crescimento de bactérias degradadoras do benzeno.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nessa seção, descrevem-se as atividades experimentais desenvolvidas e as metodologias adotadas nas análises das amostras.

3.1 Materiais

3.1.1 Caracterização dos Solos

Foram utilizados dois solos de natureza residual com diferentes características, um coletado no Município de Viçosa (MG) e outro no Município de Duque de Caxias (RJ).

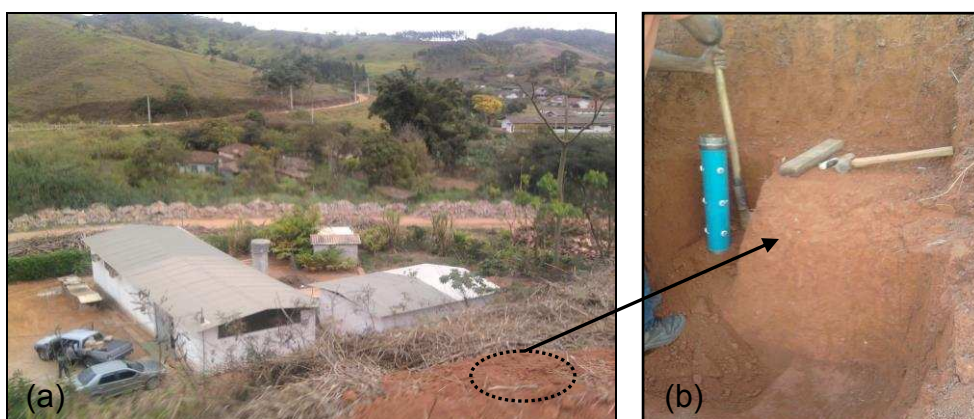
3.1.1.1 Solo Residual de Gnaisse (Viçosa)

Os resultados apresentados referem-se às amostras de solo coletadas no Campus da UFV em agosto de 2013.

➤ Características Físicas e Geotécnicas

O material foi coletado em um talude localizado no Campo Experimental do Laboratório de Resíduos Sólidos, no Campus da Universidade Federal de Viçosa, conforme ilustrado na Figura 3.1.

Figura 3.1 - (a) Campo Experimental e (b) Indicação do local no talude onde se retirou o solo em estudo



Os ensaios de caracterização geotécnica foram realizados no Laboratório de Geotecnia da UFV, de acordo com as normas técnicas da ABNT, relacionadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Normas técnicas utilizadas nos ensaios de caracterização do solo

Ensaio	Normas
Classificação Unificada de Solos (USC)	ASTM D2487-85
Granulometria	NBR-7181/84
Limites de consistência	NRB-6459/84 e NRB-7180/84
Peso específico dos sólidos	NRB-6508/84

Tabela 3.2 – Índices físicos do solo

γ_s	γ_n	γ_d	e	n	S	w_{nat}	k_{sat}
kN m ⁻³					%		m s ⁻¹
27,80	15,80	13,06	1,14	0,53	51,10	21	1,53E-06

γ_s - peso específico dos sólidos; γ_d - peso específico do solo seco; γ_n - peso específico natural do solo; w - teor de umidade; e – índice de vazios; S – grau de saturação; n – porosidade total e k_{sat} – condutividade hidráulica saturada.

Tabela 3.3 – Limites de consistência do solo

LL	LP	IP
(%)		
58	46	12

LL-limite de liquidez; LP-limite de plasticidade; IP-índice de plasticidade

Tabela 3.4 – Frações do solo

Pedregulho	Areia	Silte	Argila
(%)			
0	22	8	70

Em geral, a movimentação de gases e água nos solos argilosos é mais lenta que em solos arenosos (AZEVEDO; DALMOLIN, 2004).

A eficácia do processo de biodegradação em solos contaminados por derivados de petróleo pode ser limitada por algumas características do solo com maior percentual da fração argilosa. Como exemplo, podemos citar a baixa permeabilidade de solos argilosos, que pode interferir na distribuição de oxigênio, fundamental para o processo aeróbio de degradação, e também na incorporação de nutrientes (BAPTISTA; RIZZO, 2004).

➤ Características Químicas

Com base nos resultados obtidos por Martins (2010) e apresentados na Tabela 3.5, o solo natural apresenta as seguintes características:

✓ pH ácido. A determinação da acidez do solo é realizada principalmente pela concentração presente no solo de Hidrogênio (H) e Alumínio (Al). Segundo Novais R. F. *et al.* (2007), a acidez do solo pode estar, de modo geral, associada à presença de Alumínio (Al) e Manganês (Mn) em concentrações tóxicas e a baixos teores de cátions de caráter básico, como Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg). Dentre os microrganismos, as bactérias são as mais tolerantes a acidez.

✓ Baixa porcentagem de matéria orgânica (MO). De acordo com Azevedo e Dalmolin (2004), o teor de MO decresce em profundidade, associado ao maior grau de empacotamento das partículas do solo. Jacques *et al.* (2007) alertam que o teor de MO é a característica do solo que mais influi na sorção de hidrocarbonetos.

Na Tabela 3.5 apresentam-se as características químicas e micronutrientes do solo residual de gnaíse.

Tabela 3.5 - Características químicas e micronutrientes do solo (MARTINS, 2010)

P	K	Zn	Fe	Mn	Na	Cu	Cr	Ni	Cd	Pb	P-rem
mg dm ⁻³											mg L ⁻¹
0,80	37	1,28	22,50	5,00	10,20	0,58	0,32	0,19	0,0	0,06	5,90

Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	SB	CTC _(t)	CTC _(T)	V	m	ISNa	MO	pH
cmol _c dm ⁻³							%	mg kg ⁻¹	H ₂ O		
0,80	0,12	0,0	0,50	1,05	1,05	1,55	67,7	0,0	4,22	0,64x10 ⁴	5,29

pH em água, KCl e CaCl₂ - Relação 1:2,5 Efetiva

P - Na - K - Fé - Zn - Mn - Cu - Cr - Ni - Cd - Pb - Extrator Mehlich 1

CTC (T) - Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0

H + Al - Extrator Acetato de Cálcio 0,5 mol/L - pH 7,0

B - Extrator água quente

S - Extrator - Fosfato monocálcico em ácido acético Walkley-Black

SB = Soma de Bases Trocáveis

CTC_(t) - Capacidade de Troca Catiônica

V = Índice de Saturação de Bases

Ca - Mg - Al - Extrator: KCl - 1 mol/L

m = Índice de Saturação de Alumínio

ISNa - Índice de Saturação de Sódio

Mat. Org. (MO) = C.Org x 1,724 -

P-rem = Fósforo Remanescente

✓ Os micronutrientes encontrados no solo são considerados característicos para um Latossolo. Os teores de elementos inorgânicos (zinco, cobre, níquel, ferro, cromo, cádmio, chumbo e manganês) estão dentro dos padrões de referência determinados na Lista de Valores Orientadores para Solos e Água Subterrâneas (CETESB, 2014).

A biorremediação é feita pela microbiota, cuja sobrevivência depende das condições ambientais, logo, entre outros, também à presença/ausência de nutrientes, macro e micro. Entretanto, a concentração de C e NPK está diretamente relacionada a este processo.

Embora não tenham sido apresentados os teores de carbono orgânico (C) e nitrogênio (N) total do solo, estes podem ser considerados baixos visto que o

percentual de MO é baixo. As concentrações de fósforo (P) e potássio (K) também são consideradas baixas.

Por fim, é importante ressaltar que não será realizada a bioestimulação com concentrações maiores de nitrogênio, fósforo e potássio. O presente trabalho pretende avaliar a atenuação natural do etanol e de compostos orgânicos derivados do petróleo.

✓ A CTC mede a capacidade que o solo tem de trocar cátions. Segundo Azevedo e Dalmolin (2004), pode-se assumir, grosseiramente, que a CTC cresce proporcionalmente ao aumento do teor de argila, de matéria orgânica e do pH do solo. De acordo com a classificação química da Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais - CFSEMG (1999), para uso agrícola dos solos, verifica-se baixa (0,81 a 2,30 $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$) capacidade de troca catiônica efetiva (CTC_t), característica normalmente encontrada em solos mais intemperizados.

➤ **Características Mineralógicas**

As características mineralógicas da fração argila foram determinadas no Laboratório de Mineralogia do Departamento de Solos da UFV, por meio de um difratômetro de raios - X Rigaku D-Max, com monocromador de grafite curvo para obtenção da radiação Co-K e tubo de cobalto, operando com potência de 45KV e corrente de 30 mA e apresentadas por Martins (2010).

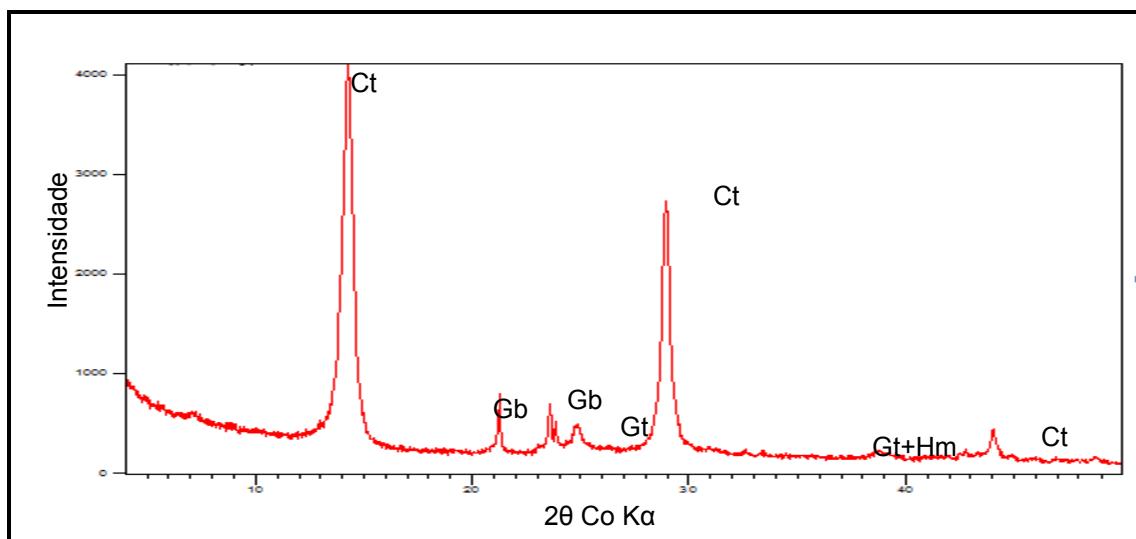
No difratograma da fração argila natural (Figura 3.2) observa-se a presença de vários picos que permitem identificar os minerais caulinita (Ct), gibbsita (Gb) e pequena quantidade goethita (Gt). A ocorrência desses minerais é típica de ambientes que sofreram intenso intemperismo químico. Visualiza-se, também, a hematita (Hm), mineral que apresenta alto poder pigmentante e que, mesmo em baixas concentrações, consegue imprimir sua cor característica vermelha nos solos (FONTES, 2006). Assim, apesar de o pico característico da hematita não ser identificado na amostra de argila natural, sua presença pode ser inferida pela cor.

Os constituintes do solo que se comportam como adsorventes são os minerais de argila, oxi-hidróxidos de ferro e alumínio e as substâncias orgânicas (húmicas), que são colóides negativos, isto é, têm carga superficial negativa capaz de fixar e trocar cátions (NASCENTES, 2006).

Os compostos orgânicos benzeno e tolueno podem ser adsorvidos na superfície dos minerais e na matéria orgânica do solo, contudo são altamente voláteis (JORGE et al., 2008).

Considerando a composição mineralógica da fração argila (maior percentual no solo) e o baixo teor de matéria orgânica pode haver pequena capacidade de retenção de benzeno e tolueno no solo ou, pelo menos, de retardamento de sua migração.

Figura 3.2 - Difratoograma da fração argila natural



➤ Característica Microbiológica

O procedimento padrão definido pelo Laboratório GeoBioSolo do DEC/PUC-Rio foi seguido para a coleta de amostras de solo que foram submetidas às medidas de atividade microbiana degradadora, por hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA), adaptada por Österreicher-Cunha *et al.* (2007) de Adam e Duncan (2001) e de Green *et al.* (2006). O método está descrito no item 3.2.4.1.

Na condição natural, recém-coletado, o solo residual de gnaiss de Viçosa (MG) apresentou a concentração de fluoresceína resultante da análise em triplicata da hidrólise de FDA, com medida em ambiente aeróbio, igual a $0,607 \pm 0,000 \mu\text{g} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. O resultado mostra baixa atividade microbiana degradadora, principalmente por se tratar de solo que estava coberto por vegetação e possui mais de 50% de argila. O nível de atividade detectado encontra-se próximo daqueles encontrados em solos brasileiros indeformados de subsuperfície (ÖSTERREICHER - CUNHA *et al.*, 2007, 2012).

3.1.1.2 Solo Residual de Gnaiss (Duque de Caxias)

Os resultados apresentados em seguida referem-se às amostras de solo coletadas em um talude da Rodovia Washington Luís no município de Duque de Caxias - RJ em setembro de 2013. Segundo estudos anteriores (ÖSTERREICHER - CUNHA *et al.*, 2004) tem-se que este solo foi originado de rocha gnáissica, presente no horizonte pedológico C, e apresenta grande heterogeneidade na profundidade explorada (3m).

➤ Características Físicas e Geotécnicas

Os ensaios realizados nas amostras de solo para a determinação das características físicas e geotécnicas do solo residual de gnaiss foram executadas no Laboratório de Geotecnia e Meio Ambiente da PUC-Rio e seguiram as normas da ABNT.

Nas Tabelas 3.6, 3.7 e 3.8 encontram-se, respectivamente, os resultados dos índices físicos, limites de consistência e análise granulométrica.

Tabela 3.6 – Índices físicos do solo

γ_s	γ_n	γ_d	e	n	S	w_{nat}	k_{sat}
	kN m^{-3}				%		m s^{-1}
27,60	16,80	13,52	1,02	0,51	66	24,30	7,73E-06

γ_s - peso específico dos sólidos; γ_d - peso específico do solo seco; γ_n - peso específico natural do solo; w - teor de umidade; e – índice de vazios; S – grau de saturação; n – porosidade total e k_{sat} – condutividade hidráulica saturada.

Tabela 3.7 – Limites de consistência do solo

LL	LP	IP
(%)		
56	44	12

LL-limite de liquidez; LP-limite de plasticidade; IP-índice de plasticidade

Tabela 3.8 – Frações do solo

Pedregulho	Areia	Silte	Argila
(%)			
0,5	21	36,2	42,3

➤ Características Químicas e Mineralógicas

As características química e mineralógicas (Tabelas 3.9 e Tabela 3.10) foram obtidas anteriormente por Österreicher-Cunha *et al.* (2004).

Tabela 3.9 - Características químicas do solo

P _{assimilável}	K ⁺	C/N	N	C _{org}	CTC _(T)	H ⁺	Al ³⁺	Soma:S	Na ²⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	pH
mg kg ⁻¹												
1,167	0,01	6	0,2	1,25	3,583	2,467	0,85	0,267	0,073	2,5	0	4,6

Fonte: Österreicher-Cunha *et al.*, 2004

Tabela 3.10 - Características mineralógicas do solo

SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	TiO ₂	K ₂ O ₅	MnO	Ki=SiO ₂ /Al ₂ O ₃	Kr=SiO ₂ /R ₂ O ₃	Al ₂ O ₃ /Fe ₂ O ₃
g kg ⁻¹								
259,8	238,8	120	14,33	0,7	0,2	1,845	1,395	3,13

Fonte: Österreicher-Cunha *et al.*, 2004

➤ **Característica Microbiológica**

Na condição natural, recém-coletado, o solo residual de gnaiss de Duque de Caxias (RJ) apresentou a concentração de fluoresceína resultante da análise em triplicata da hidrólise de FDA, com medida em ambiente aeróbio, igual a $0,0317 \pm 0,006 \mu\text{g} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. O resultado mostra baixa atividade degradadora enzimática (ÖSTERREICHER-CUNHA *et al.*, 2004).

3.1.2 Soluções contaminantes

Com o objetivo de abordar a biodegradação dos compostos mais hidrossolúveis e tóxicos da gasolina, e avaliar a influência da presença do etanol, prepararam-se duas soluções aquosas, no Laboratório GeoBioSolo da PUC-Rio, como segue: uma com a mistura BT de benzeno (B) e tolueno (T) e outra BTE com adição de Etanol à solução-BT.

Em conformidade com a média das concentrações encontradas na gasolina brasileira preparava-se uma mistura com 2% de benzeno (Vetec) e 4% de tolueno (Vetec), a qual era posteriormente diluída em água destilada à concentração de 1000 ppm (ou 1000 mg L⁻¹). Portanto, partindo-se da densidade de cada composto e concentração final desejada, eram adicionados 1,2 mL da mistura BT (1:2) para o preparo de um litro de solução. Já a adição de etanol (Vetec) era feita à concentração de 3000 ppm. Sendo assim, além da alíquota de 1,2 mL de BT, eram acrescentados 4 mL de Etanol a cada litro de solução.

Descrevem-se, em seguida, os materiais e o procedimento empregado no preparo da solução.

• **Materiais**

- Proveta de vidro (1 L)
- Reservatório (5 L)
- Bastão de vidro
- Benzeno, Tolueno e Etanol PA (Vetec)

- Pipeta graduada
- Ponteiras em plástico

• *Procedimento*

- Preencher uma proveta de vidro (1 L) com 950 mL de água destilada;
- Lançar na proveta de vidro com 950 mL de água as alíquotas da mistura BT (ou da mistura BT e Etanol) retirada do respectivo frasco, com auxílio de pipeta graduada e ponteira plástica;
- Completar com água o volume de 1 L da proveta;
- Agitar a solução durante 1 minuto com uso de um bastão de vidro;
- Finalmente, verter a solução no reservatório (frasco de Mariotte), com capacidade para 5 L.

É importante salientar que a preparação da solução também poderia ser realizada no próprio reservatório. Neste caso, bastaria apenas prepará-la nas proporções correspondentes da mistura BT e/ou Etanol em relação à sua capacidade. Na Figura 3.3 é ilustrado o preparo das soluções contaminantes.

Figura 3.3 - Preparo das soluções



3.2 Métodos

3.2.1 Sistema para a contaminação do solo

A modelagem física permite criar situações, em condições controladas, que se assemelhem àsquelas reais, de modo a se poder prever determinado comportamento dos contaminantes no solo. A validação da modelagem matemática, mais rápida e econômica, exige a modelação física para a obtenção de parâmetros e estudo de previsão.

No caso em estudo, a modelagem laboratorial permitiu simular a contaminação do solo por hidrocarbonetos de petróleo (benzeno e tolueno) e etanol e sua interação com as partículas sólidas do solo, matéria orgânica e a água, assim como com a microbiota natural.

Em seguida, descreve-se detalhadamente o projeto do sistema de contaminação, a questão da escolha dos materiais e a construção do sistema.

3.2.1.1 Projeto do equipamento

Um sistema de contaminação do solo em laboratório foi confeccionado a fim de analisar o comportamento entre solos com diferentes características. Além disso, pensou-se em um sistema semelhante àquele (bloco de solo de grandes dimensões) *in situ*, desenvolvido por Martins et al. (2012), de modo a comparar os resultados em escalas diferentes, para um mesmo solo com características definidas.

Apesar dos cuidados adotados, houve durante o experimento a necessidade de se realizar pequenas adaptações, para o bom funcionamento do aparato experimental.

a) Coluna

Os lisímetros utilizados para o estudo da biodegradação foram denominados 'colunas'. Assim, como parte do sistema de contaminação, a coluna era

estanque, já que os compostos ensaiados eram voláteis e eventuais fugas seriam difíceis de ser detectadas.

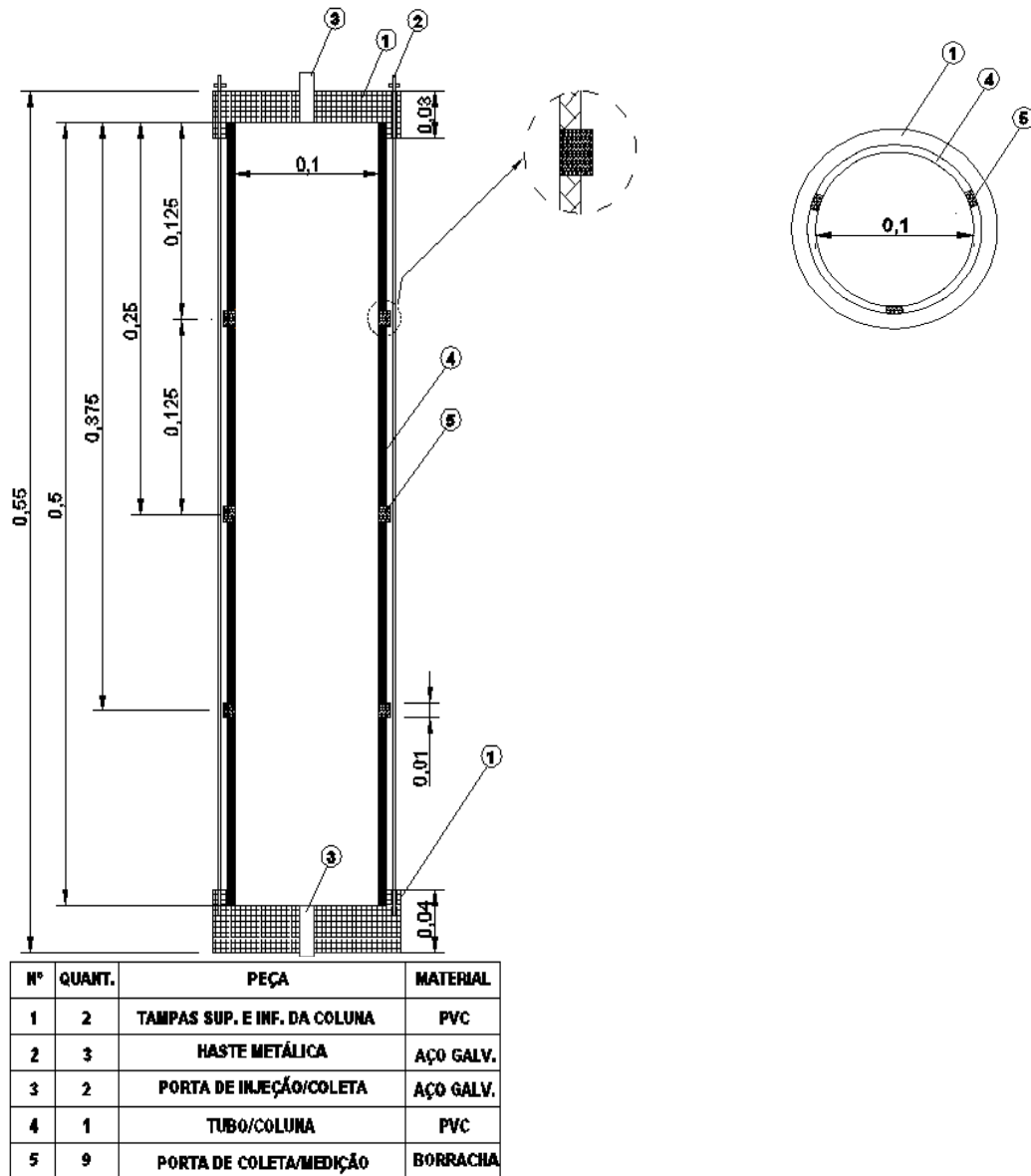
A coluna era constituída por diversas peças que se encaixavam, rigorosamente, umas nas outras e que possuíam anéis (*o-rings*) de borracha (interior) para garantir a estanqueidade. No sistema de contaminação referente a cada tipo de solo estudado foram utilizadas duas colunas confeccionadas em PVC.

Cada coluna consistia em um cilindro com diâmetro interno de 10 cm, 50 cm de altura e espessura de parede de 0,3 cm, com extremidades onde se encaixavam duas tampas com características semelhantes. As tampas possuíam três aberturas rosqueadas onde se adaptavam três hastes metálicas, uma em cada abertura. As hastes permitiam que as tampas superior e inferior fossem conectadas e ajustadas ao corpo da coluna. Na tampa da base (inferior), foi prevista uma *porta de injeção*, com válvula, para a ligação ao sistema de contaminação. A tampa superior possuía uma saída, designada *porta de coleta*, com válvula, também conectada ao sistema. Nas duas tampas existe uma abertura interior, em degrau, onde se encaixava um *o-ring* com 12 cm de diâmetro externo e 0,4 cm de espessura. Quando fechada, a coluna media, entre as extremidades das tampas, 55 cm (Figura 3.4).

O corpo da coluna possuía nove portas, designados *portas para coleta e medição*, importantes para o monitoramento do ensaio, distribuídos de forma que três encontravam-se em cada uma das faces livres definidas pelo posicionamento das hastes metálicas. O diâmetro interno de cada porta era de 1,0 cm e seu afastamento em relação à extremidade superior da coluna, em cada face livre, é de 12,5 cm, 25 cm e 37,5 cm (Figura 3.4). Cada porta era fechada com *tampa de borracha* especial que tinha como finalidades facilitar o processo de coleta de amostras, as medições e vedação.

Como a amostra de solo a ser ensaiada deveria estar na condição indeformada (estrutura natural conservada), as colunas foram confeccionadas de forma tal que pudessem ser utilizadas no campo sem oferecer riscos de danificar as amostras ou até mesmo de dificultar a coleta.

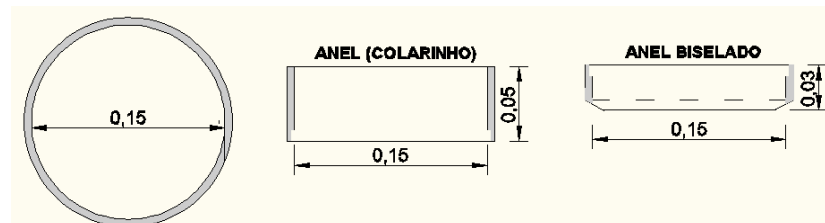
Figura 3.4 - Desenho da coluna com as dimensões em metros e a identificação das diferentes peças



Foram também confeccionados dois anéis metálicos, um designado *colarinho* (diâmetro interno de 15 cm e altura de 5 cm) e outro *anel biselado* (diâmetro interno de 15 cm e altura de 3 cm), ambos para proteger as superfícies da amostra de solo de alguma perturbação durante o processo de amostragem no campo (Figura 3.5). O primeiro era acoplado na extremidade superior e o segundo na extremidade inferior da coluna. Este último possuía, ainda, a

finalidade de facilitar o processo de moldagem por apresentar a face biselada cortante.

Figura 3.5 - Esquema dos anéis metálicos com suas dimensões



A metodologia para a coleta da amostra indeformada de solo está descrita no item 3.2.2, bem como sua preparação para a contaminação.

b) Sistema de contaminação

O sistema de contaminação, apresentado na Figura 3.6, foi pensado de modo a se ter um reservatório para o armazenamento de cada solução contaminante (colunas 1, 2, 3 e 4), conectado por tubos de plástico a cada coluna. Um reservatório (frasco de vidro), funcionando como um Mariotte, posicionado à distância de 25 cm da superfície da tampa superior de cada coluna, foi utilizado para acondicionamento da solução contaminante e para a injeção ascendente da solução. Dessa forma, pretendia-se evitar a percolação do líquido por caminhos preferenciais na amostra de solo, o que certamente ocorreria na condição de fluxo descendente.

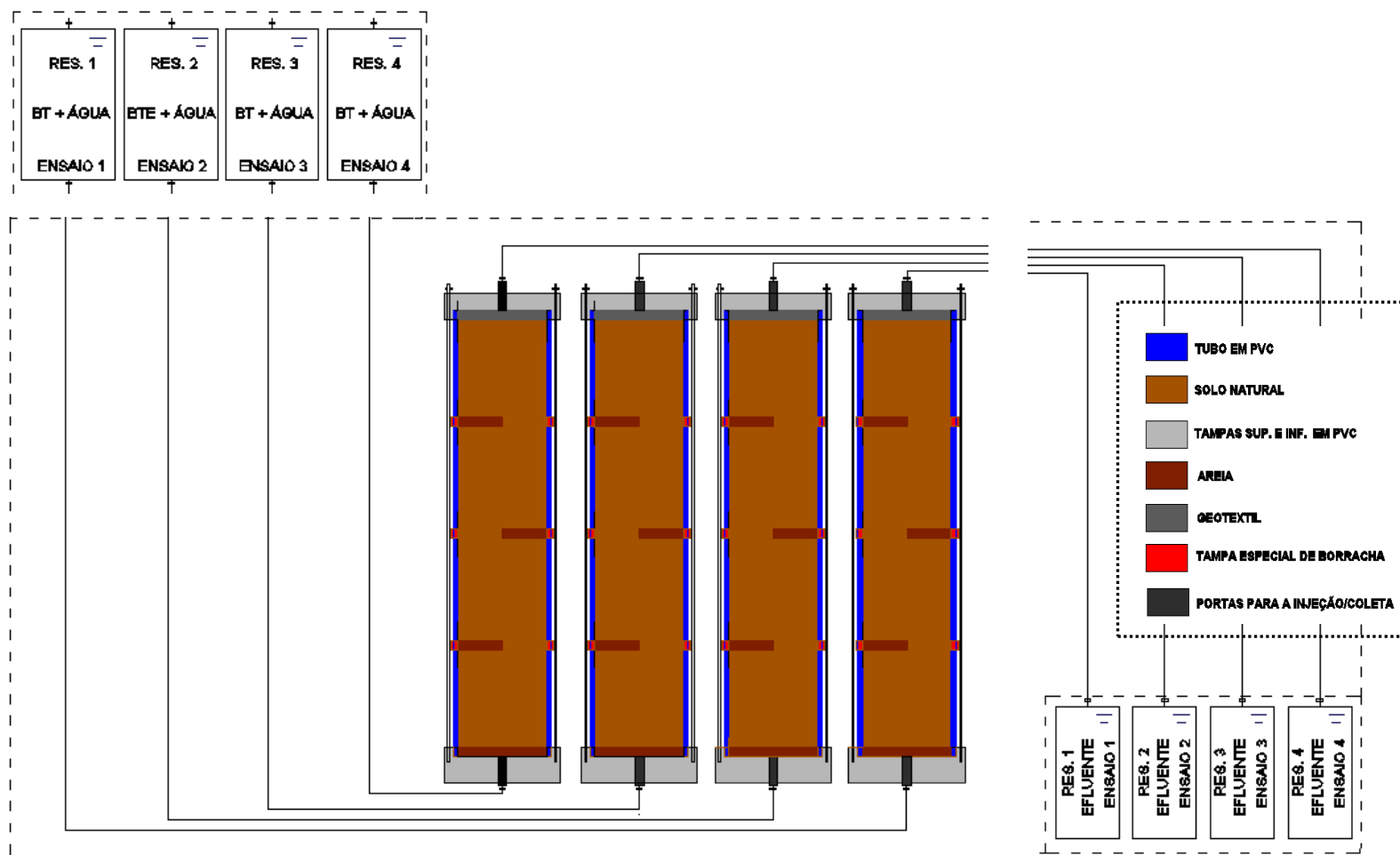
As colunas 1 e 2 corresponderam àquelas realizadas com o solo de Viçosa (MG), ao passo que as colunas 3 e 4 com o solo de Duque de Caxias (RJ). A contaminação das colunas foi distribuída da seguinte forma: duas (1 e 3) contaminadas com solução aquosa contendo BT e duas (2 e 4) com solução aquosa contendo BT-Etanol.

Em consequência da perda de amostras de solo, não foram realizados ensaios designados como *branco*, consistindo apenas na passagem de água por estas.

Cada coluna tinha um reservatório conectado a uma mangueira plástica, que era acoplada à porta localizada na extremidade superior da coluna, para o recebimento do efluente.

Todo o sistema esteve interligado por tubos de plástico e válvulas de aço galvanizado para o controle do fluxo da solução contaminante.

Figura 3.6 - Desenho esquemático do sistema de contaminação das colunas de solo



3.2.1.2 Escolha dos materiais

Para a construção do sistema de contaminação, pesquisaram-se, inicialmente, os materiais normalmente utilizados, como polímeros e metais, de modo que fossem escolhidos aqueles menos reativos aos compostos. Por serem solventes e do mesmo gênero dos polímeros, o benzeno e o tolueno podem interagir com estes materiais, degradando-os. Os metais, por sua vez, podem sofrer corrosão devido às reações químicas desenvolvidas no contato entre estes e os compostos. Além disso, como o fator econômico assume, por vezes, relevância no desenvolvimento de trabalhos experimentais, a escolha dos materiais levou em conta a eficiência e o custo, considerando-se os objetivos a serem atingidos e o período de duração dos ensaios previsto para um período de 150 dias. Por fim, chegou-se à conclusão que os materiais a utilizar deveriam ser o PVC, o aço galvanizado e a borracha (apenas para a vedação das *portas* no corpo da coluna), mesmo não sendo totalmente inertes.

3.2.1.3 Construção do sistema de contaminação

Para o presente trabalho foram confeccionadas quatro colunas no Departamento de Construção e Manutenção da UFV.

Os materiais e acessórios necessários à construção das colunas estão especificados na Tabela 3.10.

Tabela 3.10 - Materiais e acessórios utilizados na construção das colunas

Materiais	Acessórios
<ul style="list-style-type: none">• Tubo em PVC da marca TIGRE com diâmetro de 10 cm e espessura de 0,3 cm;• Aço galvanizado em varão, diâmetro de 0,3 cm;• Cilindro maciço em PVC, diâmetro de 14 cm;	<ul style="list-style-type: none">• 36 tampas em borracha, diâmetro de 1,0 cm;• <i>O-rings</i>• 8 válvulas de aço galvanizado de 3/4";• 8 conectores de aço galvanizado de 3/4";• 12 borboletas de latão de 1/4";• 12 arruelas de latão de 1/4";

Na Figura 3.7 apresenta-se uma coluna em PVC, bem como detalhes das tampas superior e inferior e das portas, com registros acoplados, para a injeção e coleta do efluente.

Na Figura 3.8 apresenta-se a porta (ou orifício) no corpo da coluna para a coleta de solo e/ou líquido e medição de outros parâmetros, e um detalhe da tampa em borracha usada para vedar o orifício.

Nas Figuras 3.9 e 3.10 apresentam-se, respectivamente, uma visão geral das quatro colunas e, do colarinho e do anel biselado.

Figura 3.7 – (a) Coluna em PVC e detalhes da tampa superior e inferior e, das respectivas portas para coleta do efluente (b) e injeção da solução contaminante (c).



Figura 3.8 - Detalhe da porta no corpo da coluna para a coleta/medição

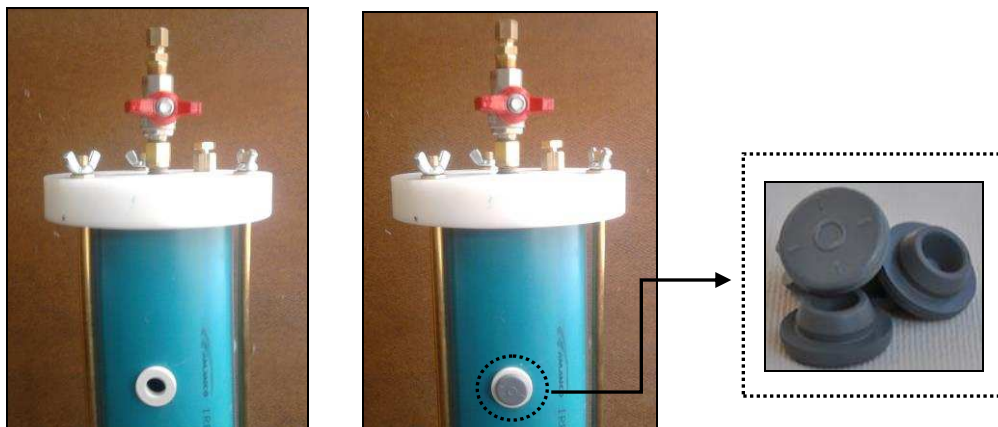


Figura 3.9 - Visão geral das colunas



Figura 3.10 - Colarinho e anel biselado



Para alimentar os ensaios (colunas de solo) com a solução contaminante, em regime de fluxo ascendente, visando minimizar a passagem de água por caminhos preferenciais, utilizou-se um frasco de vidro (material não reagente com os compostos da solução contaminante), com capacidade para 5 L, adaptado para funcionar como um frasco de Mariotte (Figura 3.11).

O frasco foi vedado por uma tampa de borracha perfurada no centro por onde passava um tubo de vidro, cuja extremidade inferior ficava a 0,05m do fundo. Por ser o tubo perfurado, a pressão em sua extremidade inferior é a atmosférica.

Como o frasco era de vidro verificava-se facilmente o nível da solução em seu interior. Posicionou-se cada frasco a 0,10 m acima da superfície da tampa superior da coluna.

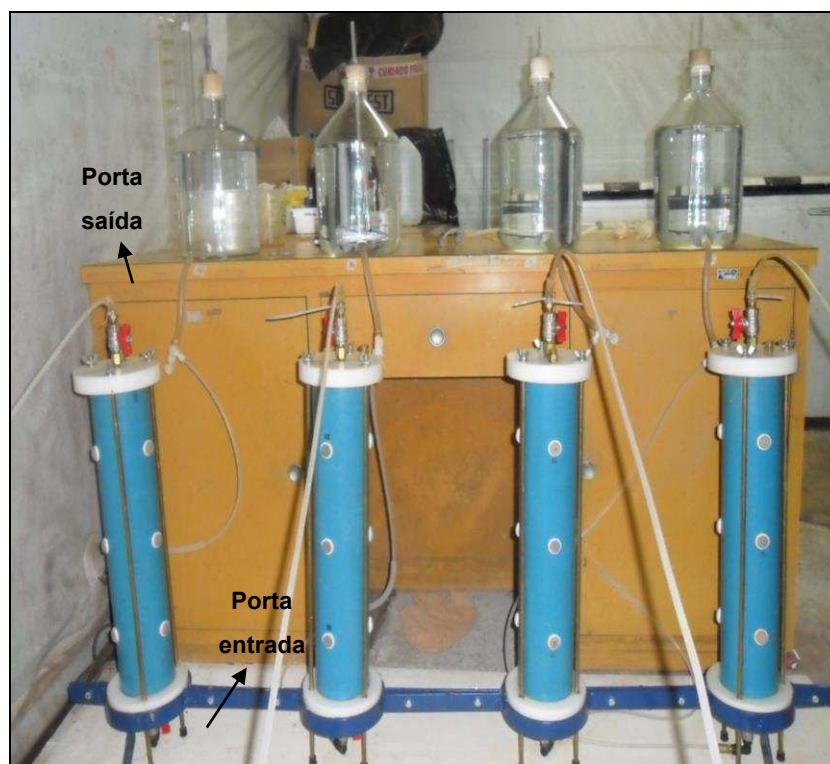
Figura 3.11 - Reservatório (frasco de Mariotte) utilizado no sistema



A alimentação do frasco com água para o preparo da solução contaminante se dava após a retirada da tampa de borracha. O orifício próximo à base do frasco conectava-se a uma mangueira de silicone acoplada a um registro para impedir ou não a alimentação do ensaio.

O sistema de contaminação foi montado em área experimental externa do GeoBioSolo (Figura 3.12) e submetido a testes para verificar o funcionamento das válvulas, reservatórios e colunas.

Figura 3.12 – Esquema geral do sistema de contaminação



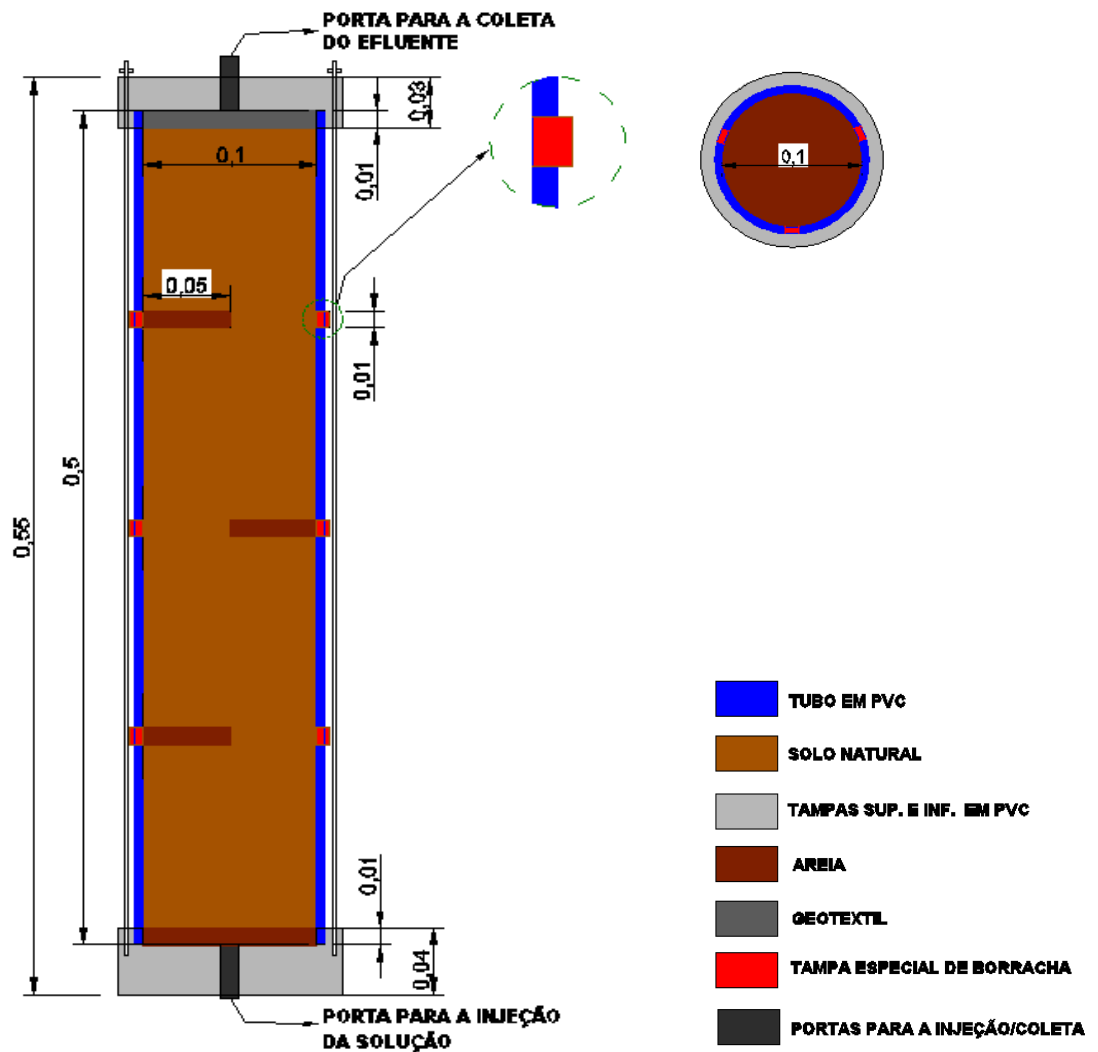
3.2.2 Processo de contaminação do solo

a) Coleta e preparação da coluna de solo para o ensaio

As coletas das amostras indeformadas de solos nas colunas em PVC foram realizadas em um talude no Campo Experimental do Laboratório de Resíduos Sólidos da UFV e em outro talude da Rodovia Washington Luís no município de

Duque de Caxias (RJ) por um processo cuidadoso de amostragem, de forma a evitar qualquer perturbação em sua estrutura. Na Figura 3.13, apresenta-se um esquema da coluna com a amostra de solo.

Figura 3.13 - Esquema da coluna com a amostra de solo (cotas em metros)



O procedimento de coleta das amostras encontra-se detalhado no que se segue:

- Retirava-se a camada superficial (orgânica) no ponto de coleta do talude (Figura 3.14);

- Posicionava-se a coluna acoplada ao anel biselado sobre a superfície plana do terreno (Figura 3.15);
- Retirava-se o solo ao redor da coluna com o auxílio de uma faca/cavadeira (Figura 3.16);
- Acoplava-se o colarinho à coluna e aplicava-se uma força com as mãos na superfície superior da coluna para empurrá-la para baixo, de modo que o anel biselado e, conseqüentemente, a coluna penetrassem no solo (Figura 3.17);
- Repetiam-se os dois últimos passos até que toda a coluna estivesse preenchida;
- Finalizado o processo descrito acima, a coluna era transportada para o laboratório, onde foram retirados o colarinho e o anel biselado e niveladas as superfícies superior e inferior da amostra de solo.

A preparação de cada coluna para o ensaio teve início com a substituição de cerca de 1,0 cm de altura do solo amostrado da base da coluna por material granular (Figura 3.18), seguida do acoplamento da tampa inferior, onde se encontra a porta de injeção da solução. O material granular teve função semelhante à de uma pedra porosa, no sentido de distribuir o líquido injetado na superfície do solo.

Na superfície superior da coluna, onde seria acoplada a tampa superior com a porta para a coleta de efluente, foi também substituído 1,0 cm de solo por areia. Neste caso, o objetivo da utilização deste material era impedir o carreamento de partículas sólidas da amostra pela solução.

Em relação às portas de coleta de líquido contaminado situadas no corpo de cada coluna, três delas, alternadas como ilustrado na Figura 3.13, tiveram o volume de solo correspondente ao seu diâmetro (1 cm) e comprimento até o centro da coluna (5 cm) substituídos por areia. O processo consistia da retirada do solo com auxílio de espátula metálica e, em seguida, preenchimento do pequeno orifício com areia. Pretendeu-se com esta preparação realizar mais facilmente a amostragem do líquido contaminado visto que a areia é um

material mais permeável que os solos ensaiados. As demais portas eram destinadas à coleta de amostras de solo e medições de pH e Eh.

Figura 3.14 - Retirada da camada superficial e processo inicial de escavação



Figura 3.15 – Posicionamento da coluna acoplada ao anel biselado sobre a superfície do terreno



Figura 3.16 – Retirada do solo ao redor da coluna com auxílio de faca



Figura 3.17 – Acoplamento do colarinho à coluna e aplicação de força na superfície superior da coluna para cravação



Figura 3.18 – Visão geral dos materiais substituídos na coluna



b) Saturação com água

O processo de saturação com água teve início em 26/08/2013 nos experimentos realizados com solo residual de Viçosa (MG) e em 01/10/2013 com aqueles de Duque de Caxias (RJ).

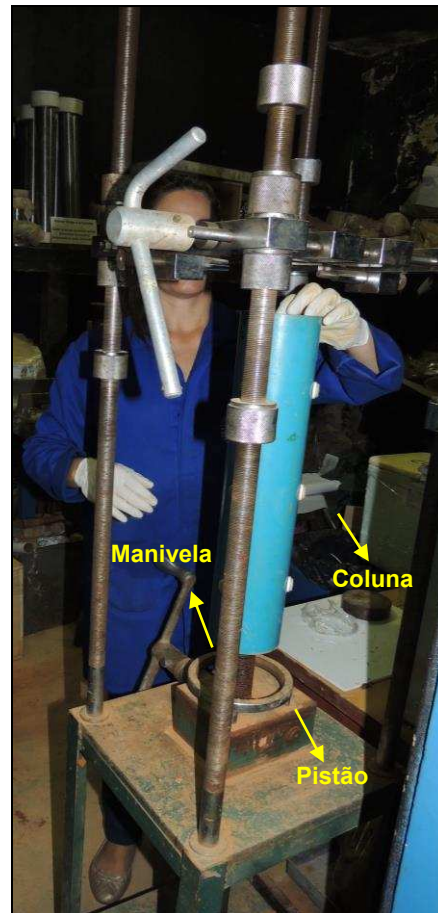
Para isso, os reservatórios conectados às colunas 1, 2,3 e 4 foram preenchidos com água destilada e o sistema entrou em funcionamento com a abertura dos registros adaptados às portas de entrada e saída das colunas (Figura 3.12). Adotou-se a aplicação de fluxo ascendente nas colunas para minimizar a passagem de água por caminhos preferenciais. O período de saturação foi de aproximadamente dez dias. Ao longo deste período monitorou-se a vazão de água a jusante das colunas. Medidas efetuadas em diferentes intervalos de tempo mostraram valores elevados das vazões quando comparadas àquelas esperadas com base na condutividade hidráulica (k) dos solos e gradiente hidráulico aplicado. O valor de k observado era uma ordem de grandeza maior do que aquele aferido em laboratório. Este comportamento foi atribuído à passagem de água por caminhos preferenciais, entre a parede interna do tubo de PVC e a amostra, apesar dos cuidados tomados durante o processo de

coleta da amostra indeformada de solo. Naquele momento tornou-se inviável a alimentação dos ensaios em virtude do grande volume de solução necessário. No propósito de tentar resolver o problema do fluxo preferencial e reaproveitar as colunas, decidiu-se paralisar o processo de saturação e aplicar uma pressão nas superfícies superior e inferior da amostra de solo de forma que houvesse uma redução de 1 cm em cada extremidade. Com isso, o comprimento final da coluna de solo, na condição de extremidades amolgadas, passou a ser 46 cm. O processo de compressão teve como objetivo preencher com solo os possíveis vazios entre a amostra e a parede interna da coluna, de modo a dificultar a passagem de água por caminhos preferenciais próximos às extremidades e, conseqüentemente, reduzir a vazão de jusante. O processo consistiu nas seguintes etapas:

- Retirar a areia inserida nas extremidades das colunas;
- Posicionar a coluna no equipamento extrator de amostras, como apresentado na Figura 3.19;
- Fixar a superfície superior para não ocorrer movimentação da massa de solo;
- Submeter a superfície inferior da amostra à compressão, para a redução de 1 cm no comprimento, a partir da movimentação do pistão alcançada com rotações aplicadas manualmente a uma manivela;
- Inverter a coluna no equipamento e proceder a compressão da superfície superior, como descrito anteriormente;
- Após a compressão, as colunas foram reinstaladas nos suportes para novo processo de saturação e monitoramento da vazão a jusante.

Ao longo do segundo processo de saturação, as vazões a jusante das colunas se mostraram menores, com valores de coeficiente de permeabilidade (k) próximos àqueles aferidos em laboratório. Com o problema de fluxo preferencial resolvido, deu-se início ao processo de contaminação do solo, com o reaproveitamento das colunas.

Figura 3.19 - Visão geral da utilização do equipamento extrator de amostras para aplicação de pressão nas extremidades das colunas de solo



c) Solução contaminante

O fluxo de alimentação das colunas com a solução contaminante era contínuo, de forma que os reservatórios, com capacidade para 5 L, eram completados à medida que ocorria redução do nível da solução, a cada quatro ou cinco dias.

As amostras de solo de Viçosa foram contaminadas em 06/09/2013 e as de Duque de Caxias, em 11/10/2013. A duração dos ensaios correspondeu a 137 dias para as colunas de Viçosa e 146 dias para aquelas de Duque de Caxias.

Nas Figuras 3.20 e 3.21 apresentam-se vistas, frontal e lateral, do sistema de contaminação em funcionamento em área externa ao laboratório GeoBiosolo.

Figura 3.20 – Vista frontal do sistema de contaminação

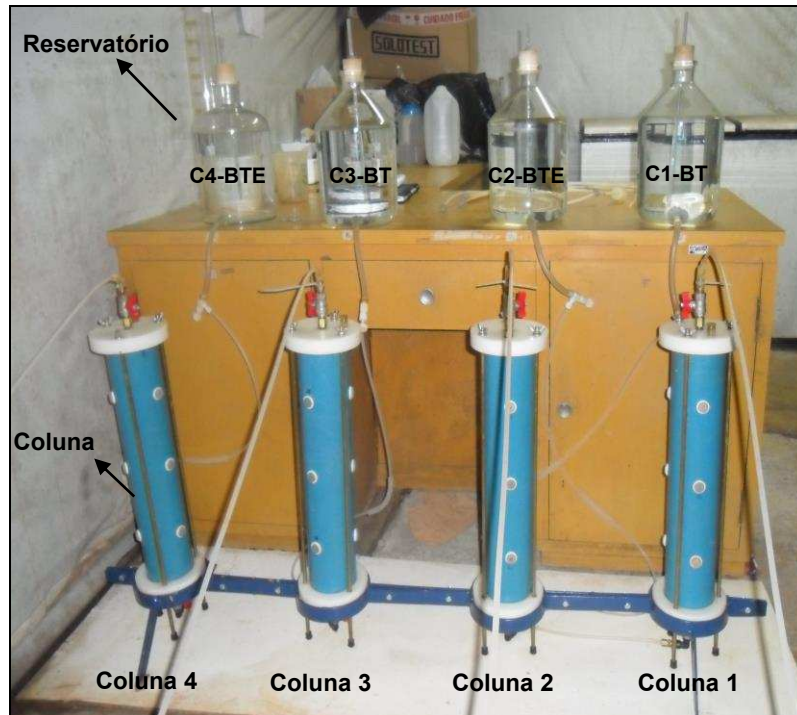


Figura 3.21 – Vista lateral do sistema de contaminação

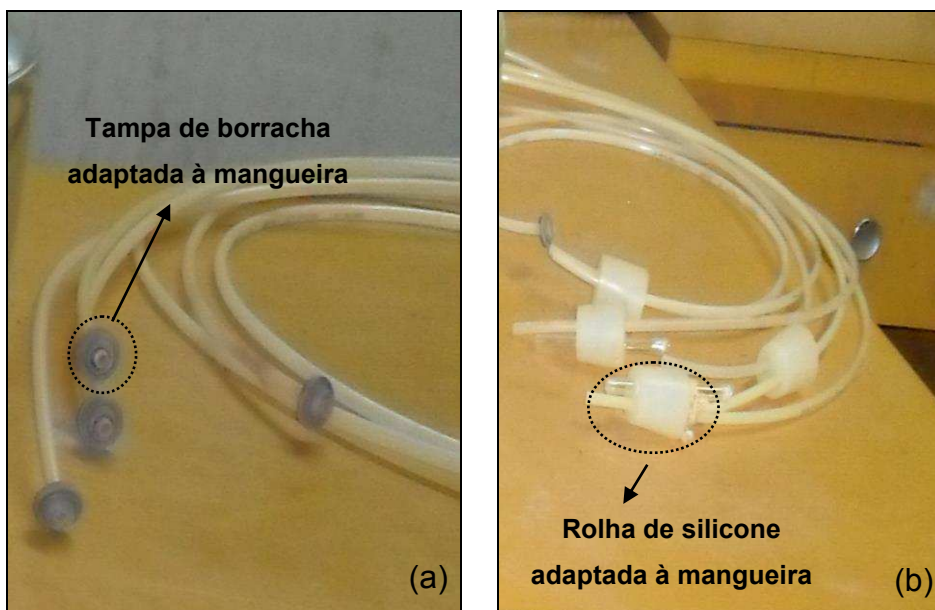


3.2.3 Processo de amostragem

A extração do líquido contaminado das amostras ocorreu com a substituição da tampa de borracha de cada uma das portas da coluna por outra tampa, esta conectada a uma das extremidades de uma mangueira plástica (Figura 3.22a), tendo na outra extremidade uma rolha de silicone ajustável ao frasco para armazenamento da amostra (Figura 3.22b).

Ao se retirar a tampa de borracha de cada porta coletava-se, também, uma pequena fração da amostra de solo, com o auxílio de uma espátula metálica. Nesse instante, eram diretamente aferidos o pH, por meio da inserção de uma tira de papel indicador universal (Merck), e o potencial redox (Eh), com o uso de uma sonda (Lutron - Modelo ph206).

Figura 3.22 – (a) Tampa de borracha adaptada à mangueira para coleta do líquido contaminado e (b) Rolha de silicone adaptada à mangueira



Do total de nove portas distribuídas no corpo da coluna, propôs-se que:

- Três, uma de cada face, previamente preenchidas com areia, fossem utilizadas para permitir a coleta do líquido contaminado para as análises de microbiologia;

- Seis, uma de cada face, fossem utilizadas para a coleta de pequena fração da amostra de solo para as análises de microbiologia e, em seguida, da aferição direta do pH e do potencial redox (Eh) no local. A cada três portas anotava-se a data de amostragem correspondente.

Após cada amostragem de solo, o mesmo material, em condição estéril, era repostado com auxílio de espátula metálica esterilizada. Após esta reposição, aguardava-se um período de tempo, suficiente para que ocorresse a recolonização do solo estéril pela microbiota.

As amostras contaminadas, tanto de solo quanto de líquido, eram formadas pela mistura das frações coletadas de cada porta, enquanto que o efluente era coletado diretamente da porta de saída da coluna. Como as coletas do líquido contaminado e do efluente eram mais demoradas do que a do solo, por vezes, as datas de amostragens/análises não coincidiam.

O líquido contaminado coletado, com mangueira acoplada à tampa de borracha e rolha de silicone era armazenado em frasco de 100 mL. Os frascos eram fechados com a tampa plástica e, em seguida, levados para análises.

O efluente, coletado através de mangueira plástica acoplada à porta de saída e também a uma rolha estéril ajustada a um frasco em vidro de 1 L, era também enviado para o laboratório de análises.

Por fim, cada fração de solo coletada através das portas com espátula metálica, era acondicionada em frasco esterilizado e analisada imediatamente (ou permanecia sob refrigeração até ser analisada) com relação à atividade microbiana. Esta análise era realizada em um prazo máximo de 24 horas após a coleta, no laboratório.

3.2.4 Análises

3.2.4.1 Microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas nas amostras de solo saturado e não-saturado (na condição inicial) e de líquido percolado, retirados através das

portas no corpo da coluna; no efluente coletado da porta de saída da coluna; e na solução contaminante acondicionada no reservatório de alimentação.

Com base nos estudos de Zwolinski (2000), que afirma que os processos de biodegradação podem ser monitorados através da avaliação da atividade das comunidades microbianas, determinou-se a atividade microbiana degradadora total a partir da medição da hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) produzida pelos microorganismos do solo. O método adotado para as análises baseou-se em uma adaptação sugerida por Österreicher-Cunha *et al.* (2007) de uma metodologia modificada por Adam e Duncan (2001) e Green *et al.* (2006) e desenvolvida por Schnürer e Rosswall (1982).

O uso da hidrólise de FDA como um método enzimático para medir atividade microbiana é reconhecido por muitos pesquisadores, visto que a maior parte das enzimas abundantes nos solos possuem a capacidade de catalisá-la. As bactérias e os fungos, considerados os maiores decompositores, mostram habilidade apreciável em hidrolisar FDA (ADAM E DUNCAN, 2001; GREEN *et al.*, 2006).

As amostragens e análises de atividade microbiana degradadora ocorreram em ambiente aeróbio. Os programas de amostragem seguidos para os dois solos estudados, Viçosa e Duque de Caxias encontram-se, respectivamente, nos Quadros 3.1 e 3.2.

Quadro 3.1 – Programa de amostragem dos ensaios com o solo de Viçosa (C1 e C2)

Dia	Amostras			
	Líq. Percolante	Solo	Efluente	Reservatório
0°	x	x	x	x
11°	x	x	x	
21°	x		x	
32°	x		x	
46°	x		x	
67°	x	x		
79°	x			
110°	x	x		
137°		x		

Quadro 3.2 – Programa de amostragem dos ensaios com o solo de Duque de Caxias (C3 e C4)

Dia	Amostras			
	Líqu. Percolante	Solo	Efluente	Reservatório
0°	x	x	x	x
11°	x	x	x	
21°	x		x	
32°	x		x	
56°	x		x	
80°	x	x		
108°	x	x		
146°		x		

Os reagentes e soluções necessários à realização das análises microbiológicas, bem como o procedimento adotado são detalhados no que se segue:

• *Reagentes:*

- Diacetato de fluoresceína (FDA)
- Fluoresceína
- Metanol
- Clorofórmio
- Fosfato de potássio monobásico
- Fosfato de potássio dibásico
- Água destilada

• *Soluções:*

- Tampão fosfato 60nM
- Solução de clorofórmio-metanol 2:1
- Solução estoque de FDA 1000 µg.L-1
- Solução estoque de fluoresceína 2000 µg.mL-1

- Solução padrão de fluoresceína 20 µg.mL⁻¹

• *Procedimento geral para análise em solo:*

Para cada amostra foram pesadas três replicatas de 2 g de solo contaminado e não contaminado (condição inicial) em tubos *falcon* (50 mL) previamente preenchidos com 15 mL da solução tampão, esterilizados e identificados (2 replicatas da amostra e 1 branco). Às duas replicatas foram acrescentados 200 µL de solução de FDA 1000 µg.mL⁻¹ e agitou-se ligeiramente. O branco não recebe FDA e serve para medir uma eventual fluorescência natural do solo, sem relação com a atividade degradadora dos contaminantes. Um controle químico foi igualmente preparado com solução de tampão fosfato e FDA, para medir a eventual hidrólise abiótica do FDA. Em seguida, as replicatas e o controle foram levados à estufa a 30°C para incubação, por aproximadamente 30 minutos, o tempo de incubação sendo escrupulosamente monitorado e anotado. Após este período, a reação foi interrompida com 15 mL de solução de clorofórmio-metanol 2:1 e agitação manual. Logo depois, as amostras foram filtradas em filtro quantitativo e anotou-se o volume de filtrado. A medida da fluoresceína formada nos filtrados durante a incubação foi feita em espectrofotômetro a 490 nm. A determinação da concentração em cada amostra foi obtida a partir de uma curva padrão de fluoresceína. O valor medido no controle químico assim como o medido no branco de cada amostra foi descontado do valor medido na amostra. Por fim, os cálculos foram feitos para encontrar a quantidade de fluoresceína formada por grama de amostra por minuto, como segue: (concentração medida x volume de filtrado) / massa de amostra / tempo de incubação).

• *Procedimento geral para análise em água:*

Em fluxo laminar, as amostras do líquido percolante ou efluente a ser analisadas foram concentradas através de filtração em membrana esterilizante (poro de 0,20 µm) estéril, utilizando um sistema de filtração (kitazato e bomba de vácuo) esterilizado. Após filtragem retirava-se a membrana com pinça estéril, subdividia-a em duas ou quatro partes iguais, a depender da quantidade

de amostra filtrada, e introduzia cada parte em tubos *falcon* com 15 mL de solução tampão fosfato. Identificava-os como controle (1) e replicatas da amostra (1 ou 3). Acrescentavam-se 200 μL de solução de FDA 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ nas replicatas, agitava, incubava-se por aproximadamente 40 minutos, interrompia a reação com 15mL de solução de clorofórmio-metanol 2:1, filtrava e media a fluoresceína formada nos filtrados durante a incubação em espectrofotômetro, conforme descrito para solos. O seguinte cálculo foi feito para encontrar a quantidade de fluoresceína formada para a quantidade de água filtrada: (concentração medida x volume de filtrado) / volume de água filtrada / tempo de incubação).

3.2.4.2 Medições de pH e potencial de redução (Eh)

As medidas de parâmetros físico-químicos são importantes para a estimativa de alterações das condições químicas do solo, bem como do comportamento da microbiota.

De acordo com a USEPA (2003) é possível verificar a existência de algum potencial geoquímico do ferro que esteja afetando o comportamento ambiental no solo a partir das medições do pH e Eh.

O pH e o Eh eram medidos diretamente nas portas das colunas, pouco antes da amostragem dos solos. Em virtude do período de tempo demandado para a chegada dos materiais e instrumentos, as medições nas colunas com o solo de Viçosa (MG) foram realizadas apenas nos 67º, 110º e 137º dias de ensaio. Já para aquelas com o solo de Duque de Caxias (RJ) as medições ocorreram nos 80º, 108º e 146º dias.

Através da inserção de uma tira de papel indicador universal de pH (Merck), em cada porta das colunas, deixando-a em contato com a fase líquida por aproximadamente 1 minuto, foi realizada a medição deste parâmetro. Assim, foram obtidas medidas de pH ao longo das colunas, sendo as posições denominadas topo, meio e base.

A aquisição de uma sonda para verificação de Eh (Lutron - Modelo ph206), com diâmetro menor que 1,0 cm, permitiu a medida deste parâmetro ao ser

inserida em cada porta das colunas, deixando-a em contato com a fase líquida por aproximadamente 5 minutos. Anterior às medições, o eletrodo era lavado com água deionizada, seco com papel e envolto por tecido fino e permeável. De forma semelhante à do pH, considerou-se a primeira medida para as posições referidas como topo, meio e base.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção são apresentados e discutidos os resultados, relacionados ao monitoramento realizado em laboratório, do potencial redox, pH e das análises microbiológicas.

4.1 Análise dos Indicadores de Biodegradação

A partir da análise integrada temporal dos dados de laboratório foi possível acompanhar a variação de alguns indicadores do processo de atenuação natural monitorada (ANM) estudado em dois tipos de solo, um contaminado apenas com benzeno (B) e tolueno (T), e outro acrescido do composto etanol (E). Assim, obteve-se uma concepção geral da tendência de biodegradação dos contaminantes ao longo do tempo.

O período de duração dos ensaios, com medida da atividade microbiana em amostras de solo e água, correspondeu a 137 dias para as colunas com solo de Viçosa e 146 dias para aquelas com solo de Duque de Caxias.

4.1.1 Potencial de Oxi-Redução (Eh) e pH

Os solos naturais em estudo apresentaram medidas de pH iguais a 4,6 (Duque de Caxias) e 5,29 (Viçosa). Estes valores são de pH ácido, geralmente comuns em solos tropicais. Já os solos de regiões temperadas tendem a variar os seus valores de pH entre 6 e 7, como mencionado nos trabalhos de Anderson *et al.* (1998), Lovely *et al.* (1991) e Zheng *et al.* (2002).

As colunas de solo, enumeradas na Tabela 4.1 como 1 e 2, referem-se às colunas com amostras de solo residual de gnaiss de Viçosa, sendo uma contaminada com solução aquosa contendo os compostos BT e a outra com BTE, respectivamente. Já as colunas 3 e 4, Tabela 4.2, são as colunas com amostras de solo residual de gnaiss de Duque de Caxias, em que a primeira foi contaminada com BT e a segunda com BTE.

Tabela 4.1 - Valores de potencial de oxi-redução (Eh) e pH medidos no líquido percolante das colunas 1 e 2 durante o ensaio

Dia	Solo Residual de Gnaiss (Viçosa)				
	Posição	Coluna 1 - BT		Coluna 2 - BTE	
		Eh (mV)	pH	Eh (mV)	pH
21	-	-	8	-	7
67	topo	321		193	
	meio	270	7	192	7
	base	308		164	
110	topo	230		110	
	meio	200	7	105	7
	base	220		190	
137	topo	150		101	
	meio	207	7	102	7
	base	205		134	

Tabela 4.2 - Valores de potencial de oxi-redução (Eh) e pH medidos no líquido percolante das colunas 3 e 4 durante o ensaio

Dia	Solo Residual de Gnaiss (Duque de Caxias)				
	Posição	Coluna 3 - BT		Coluna 4 - BTE	
		Eh (mV)	pH	Eh (mV)	pH
80	topo	232		230	
	meio	222	7	220	7
	base	216		218	
108	topo	201		139	
	meio	276	7	149	7
	base	195		143	
146	topo	150		125	
	meio	172	7	89	7
	base	148		136	

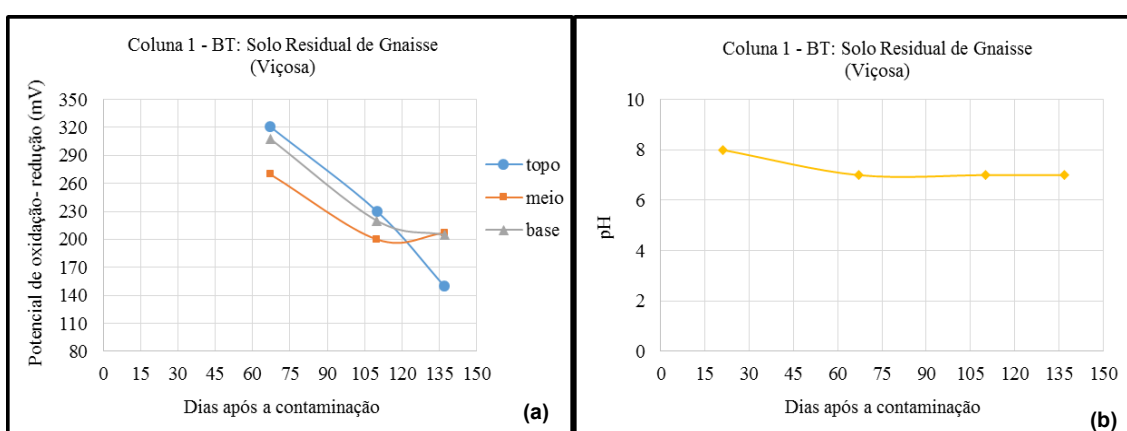
É importante lembrar que as medições de Eh foram realizadas através da inserção da sonda nas portas posicionados próximo ao topo, à base e no meio da coluna. O topo e a base da coluna referem-se aos locais de entrada e saída da solução contaminante, respectivamente. Assim, a partir dos valores observados, podem-se obter informações sobre o processo de biodegradação predominante durante o monitoramento realizado. Contudo, o modo como foi

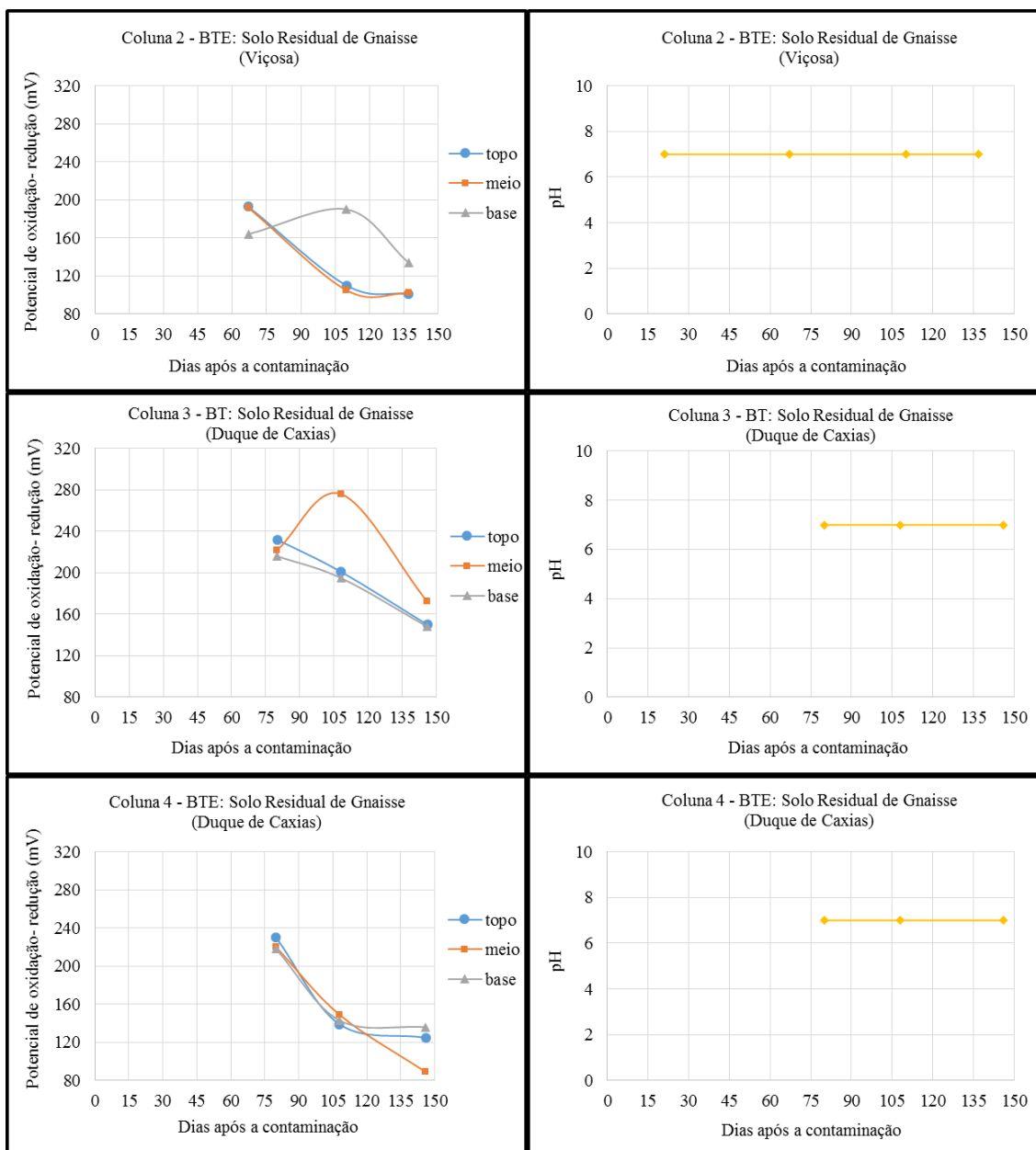
possível fazer a medição provavelmente aumentou ligeiramente o valor do potencial, devido à exposição ao oxigênio. Assim sendo, pode-se considerar que os valores medidos ficaram ligeiramente acima dos reais.

Os gráficos da Figura 4.1, plotados a partir dos dados das Tabelas 4.1 e 4.2, apresentam os valores de Eh e pH, os quais correspondem aos 80°, 108° e 146° dias após a contaminação do solo residual de gnaiss de Duque de Caxias; e aos 67°, 110° e 137° dias após a contaminação do solo residual de gnaiss de Viçosa.

Os valores de pH, valor médio das medidas realizadas no líquido percolante em cada orifício (topo, meio e base) para cada coluna de solo, são apresentados nos gráficos (b), (d), (f) e (h) da Figura 4.1. É possível observar que os valores de pH para as diferentes colunas, contaminadas com BT e BTE, mantiveram-se constantes, em torno de 7. O pH ótimo para a ação dos microrganismos é usualmente próximo da neutralidade, mas muitos microrganismos presentes em aquíferos podem agir, sem prejuízos de suas funções, para valores de pH entre 2 e 9 (CORSEUIL, ALVAREZ, 1996; MESQUITA, 2004). Além disso, Mariano (2006) sugere que um aumento nos valores de pH pode ser creditado ao consumo de prótons (H⁺), durante a redução de íons férricos, por exemplo.

Figura 4.1 - Gráficos de Eh e pH dos quatro experimentos ao longo do tempo





Em relação aos gráficos (a) e (c), Figura 4.1, verifica-se que a coluna 1 apresentou maiores valores de Eh, (+) 150 a (+) 321, quando comparada à coluna 2, (+) 101 a (+) 193. Diversos estudos demonstram que a biodegradação do etanol acontece preferencialmente em relação aos BTEX, consumindo assim todo ou parte do oxigênio disponível (FERNANDES, 1997; ÖSTERREICHER-CUNHA *et al.*, 2007). Além disso, sabe-se também que as concentrações de oxigênio e hidrogênio são utilizadas para avaliar o potencial redox. Assim, enquanto que em condições aeróbias os microrganismos utilizam o oxigênio encontrado no meio para oxidar combinações orgânicas (EPA,

2004), na ausência dele, o hidrogênio é consumido pelos microrganismos que fazem uso do nitrato, ferro (III), sulfato e/ou CO como aceptores de elétrons, estabelecendo a biodegradação anaeróbia (LANGENBACH, 1994; EPA, 2004). Dessa forma, sabendo-se que neste estudo o aporte de O₂ era constante, em função da entrada de água nas colunas, o declínio do potencial redox, a princípio, indica que houve redução da concentração de oxigênio dissolvido, sugerindo ter ocorrido a biodegradação preferencial aeróbia do etanol em relação aos hidrocarbonetos BT.

Ao analisar os gráficos (e) e (g), Figura 4.1, referentes às colunas 3 (148 e 276 mV) e 4 (89 a 230 mV), nota-se que o comportamento é similar ao observado para as colunas 1 e 2 porém em Eh mais baixo, sendo os valores de potencial redox ligeiramente mais baixos ao ensaio com BTE. Inclusive, é possível observar a diferença significativa do Eh entre os valores do meio das colunas 3 e 4, onde a influência da entrada de O₂ pelas extremidades é menor.

Quanto aos valores de Eh no meio das colunas 2 e 3, pontos discrepantes das curvas, podem ser advindos de erros ou artefatos experimentais. Este último pode ter permitido a entrada de maior percentual de O₂, sem manuseio, não constituindo um erro.

De forma geral, é possível verificar nos gráficos (a), (c), (e) e (g), Figura 4.1, que houve uma redução do valor de Eh, ao longo do tempo, em relação a cada ponto de medição da coluna (topo, meio e base). O declínio dos valores de Eh é um indicativo das possíveis mudanças de condições oxidantes, favoráveis aos microrganismos aeróbios, para condições redutoras, melhores condições aos processos anaeróbios (Anderson et al., 1998). Portanto, é aceitável sugerir que a biodegradação preferencial do etanol, seguida dos compostos BT, tenha consumido o O₂ disponível mais rapidamente que a sua recarga através da entrada de solução contaminante aquosa nas colunas, criando condições favoráveis à biodegradação anaeróbia.

No entanto, é notável que os valores do potencial redox referentes às colunas com solo de Viçosa em relação àqueles das colunas com solo de Duque de Caxias, nas mesmas condições de ensaios, são ligeiramente mais elevados. Sabe-se que o rápido consumo de oxigênio leva à anaerobiose e,

consequentemente, acarreta a queda do potencial redox. Assim, a diferença observada mostra que o solo de Duque de Caxias pode ter entrado em anaerobiose, e isso pode ter ocorrido devido a maior atividade microbiana por uma degradação mais rápida. Neste contexto, futura abordagem será feita em relação às características naturais dos solos.

4.1.2 Precipitação do Ferro

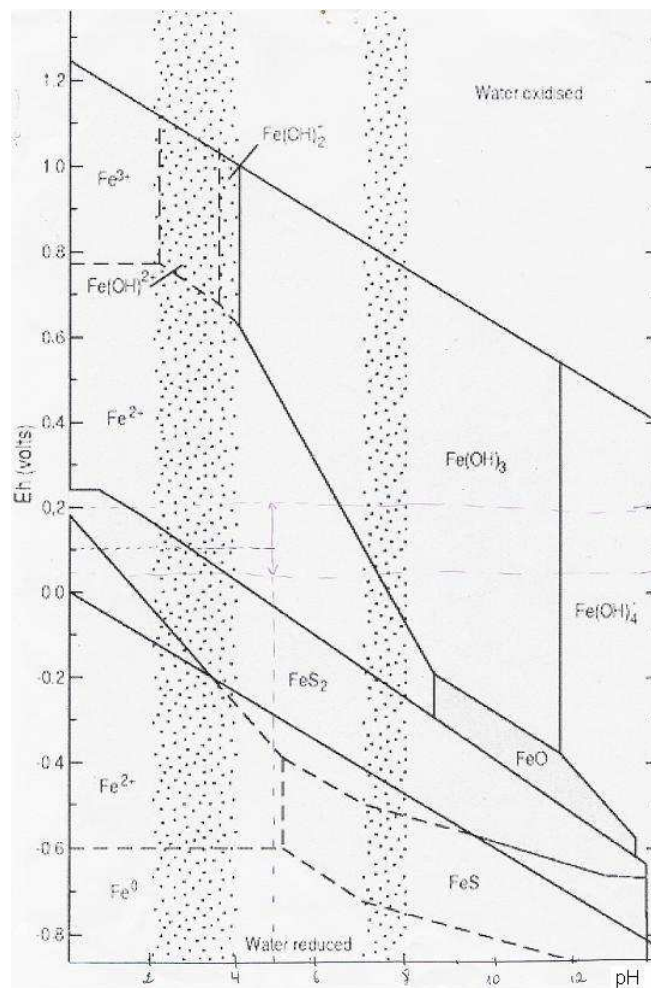
O ferro, sob condições ambientais naturais, aparece em solução como as espécies Fe(II) e Fe(III). Nos solos, ocorre como óxidos de Fe(III), sendo o Fe(II) a forma menos solúvel. O pH, potencial redox e umidade são fatores determinantes no controle da disponibilidade do ferro (SEGALEN, 1964; USEPA, 2003).

Os microrganismos transferem elétrons para o Fe(III) reduzindo-o a Fe(II), tornando possível a oxidação de compostos orgânicos. A depender da composição do solo, o Fe(III) pode ser o receptor mais abundante e biodisponível para a oxidação de material orgânico em sistemas anaeróbios (LOVELY, ANDERSON, 2000; ANDERSON *et al.*, 1998).

Assim sendo, importante avaliação refere-se a verificação da disponibilidade de ferro reduzido em função das condições de pH e Eh do ambiente existente nos ensaios (Figura 4.2).

Ao analisar a Figura 4.2, a relação entre os valores de pH medido e as variações verificadas nos valores do potencial redox das colunas, ao longo dos experimentos, indicou a disponibilidade de Fe⁺² nas amostras de solos em todos os ensaios. Sendo assim, pode-se correlacionar a presença/aumento na concentração de Fe⁺², frente às condições de pH e Eh dos ensaios, à possibilidade de processo de biodegradação anaeróbia dos compostos orgânicos. Outras discussões serão abordadas no trabalho em relação a esse aspecto

Figura 4.2 – Diagrama de especiação de ferro no solo sob diferentes condições de pH e Eh (USEPA, 2003)



Como mencionado na seção 3, ao final dos ensaios procedeu-se ao fracionamento das colunas de solos para observação visual e realização de análises de FDA, visando a avaliação das variações da atividade microbiana degradadora ao longo da coluna. As imagens das Figuras 4.3 e 4.4 correspondem à observação visual de todas as fatias e especificamente da fatia *a* da coluna 4, respectivamente. O solo de Duque de Caxias contaminado com BTE corresponde à coluna 4.

É visualmente perceptível a tonalidade de cor mais escura, se comparada à cor natural do solo, apresentada pela fatia *a* da coluna 4 (Figura 4.4). Ao observar a Figura 4.3, verifica-se que a fatia *b* também apresentou este comportamento. Sabendo-se que o solo em estudo possui ferro em sua composição química e o

ensaio, como já mencionado, condições redutoras favoráveis, supõe-se ter ocorrido precipitação de ferro.

Figura 4.3 – Imagem das fatias da coluna 4



Figura 4.4 – Imagem da fatia a da coluna 4



Com o propósito de confirmar a suspeita acima, partiu-se do princípio que, uma vez exposto ao oxigênio, se o material escuro fosse mesmo ferro precipitado, seria todo reoxidado, e o solo recuperaria a sua tonalidade de cor.

Tendo em vista a futura necessidade de realização de análises complementares, parte das amostras dos solos referentes às fatias *a* e *b* foram armazenadas em frascos de vidro, posteriormente vedados e armazenados em refrigerador a temperatura adequada. O restante das amostras foi depositado em bandejas plásticas e expostas ao ar livre. Então, após aproximadamente uma semana, ao manusear os frascos, constatou-se que os solos haviam recuperado as suas cores naturais. Além disso, comportamento análogo foi percebido para os solos das bandejas. Sendo assim, pode-se inferir que o precipitado era ferro. Fernando (2009) em um estudo com esse solo verificou a mobilização do Fe(III) e sua redução na biodegradação de BTEX em condições saturadas e de anaerobiose.

Na imagem da Figura 4.5 é mostrada uma observação visual de todas as fatias da coluna 2. O solo de Viçosa contaminado com BTE corresponde à coluna 2.

Figura 4.5 - Imagem das fatias da coluna 2



Em relação às fatias da coluna 2, solo de Viçosa contaminado com BTE (Figura 4.5), observou-se que nenhuma delas apresentou tonalidade de cor escura. No entanto, após armazenamento em frascos no refrigerador, as amostras de solos referentes às fatias *b* e *c* apresentaram cor escura. Sendo assim, parte das amostras acondicionadas nos frascos foram depositadas em bandejas plásticas e expostas ao oxigênio. Após um dia verificou-se a recuperação da cor natural. Logo, mais uma vez, pode-se deduzir que ocorreu a precipitação do ferro.

Presume-se que a atividade microbiana aeróbia, após armazenamento do solo, tenha prevalecido até o esgotamento de O₂, continuando em anaerobiose. Esta hipótese sugere que a atividade microbiana deste solo se manteve elevada durante o ensaio, possivelmente em condições de microaerofilia, permitindo a ação de bactérias aeróbias e anaeróbias, enquanto no solo da coluna 4 (Duque de Caxias) parece mais provável ter prevalecido a atividade anaeróbia. O solo em estudo apresenta naturalmente baixas concentrações de nitrogênio e manganês, e elevada concentração de ferro.

4.1.3 Atividade Microbiana Degradadora

Os resultados e discussão apresentados neste item referem-se à atividade microbiana degradadora, medida em amostras do líquido percolante, efluente e solo, através da hidrólise de FDA e consequente produção de fluoresceína, em condição de aerobiose, para solos saturados com solução aquosa contaminante contendo benzeno (B) e tolueno (T).

As Tabelas 4.3 e 4.4 mostram a média e o desvio padrão dos valores de fluoresceína obtidos a partir da determinação da atividade microbiana degradadora dos solos das colunas 1 e 3 ao longo dos ensaios, com duração de 137 e 146 dias respectivamente. O objetivo é observar a variação da atividade microbiana entre os diferentes elementos analisados, para cada ensaio.

Tabela 4.3 - Valores das concentrações de fluoresceína ($\mu\text{g} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) ao longo do ensaio relativo à coluna 1

Dia	Coluna 1 - Solo Residual de Gnaisse (Viçosa)								
	Líqu. Percolante		Solo			Efluente		Reservatório	
	Média	d.p.	Fatias	Média	d.p.	Média	d.p.	Média	d.p.
0	n.d.*			0,3053	$\pm 0,2771$	n.d.*		n.d.*	
11	n.d.*			0,6318	$\pm 0,0000$	0,0028	$\pm 0,0009$		
21	0,0073	$\pm 0,0004$				0,0043	$\pm 0,0002$		
32	0,0006	$\pm 0,0006$				0,0017	$\pm 0,0003$		
46	n.d.*					n.d.*			
67	n.d.*			0,4253	$\pm 0,0309$				
79	n.d.*								
110	0,0004	$\pm 0,0000$		0,3955	$\pm 0,0346$				
137			F1a	0,7860	$\pm 0,1558$				
137			F1b	0,9613	$\pm 0,1415$				
137			F1c	0,8757	$\pm 0,2562$				
137			F1d	0,7950	$\pm 0,0569$				

*não detectado pelo método utilizado

Tabela 4.4 - Valores das concentrações de fluoresceína ($\mu\text{g} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) ao longo do ensaio relativo à coluna 3

Dia	Coluna 3 - Solo Residual de Gnaisse (Duque de Caxias)								
	Líqu. Percolante		Solo			Efluente		Reservatório	
	Média	d.p.	Fatias	Média	d.p.	Média	d.p.	Média	d.p.
0	0,0002	$\pm 0,0000$		0,0115	$\pm 0,0200$			n.d.*	
11	n.d.*			0,0585	$\pm 0,0150$	n.d.*			
21	0,0003	$\pm 0,0000$				0,0006	$\pm 0,0000$		
32	n.d.*					0,0004	$\pm 0,0000$		
56	0,0001	$\pm 0,0000$							
80	0,0009	$\pm 0,0000$		0,0406	$\pm 0,0109$				
108	n.d.*			0,0169	$\pm 0,0238$				
146			F3a	0,0593	$\pm 0,0799$				
146			F3b	n.d.*					
146			F3c	n.d.*					
146			F3d	0,0459	$\pm 0,0337$				

*não detectado pelo método utilizado

A partir das Tabelas 4.3 e 4.4 é possível verificar que, após a saturação das amostras de solo, condição em que os vazios entre as partículas sólidas estão preenchidos com água, houve uma queda na atividade microbiana aeróbia

degradadora, referente ao dia zero dos ensaios, em relação àquela medida nos solos naturais, $0,0317 \pm 0,006 \mu\text{g} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ (Duque de Caxias) e $0,607 \pm 0,000 \mu\text{g} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ (Viçosa). É observado o aumento da atividade microbiana a partir do 11º dia dos ensaios, sendo mais apreciável quando verificado o último dia de cada ensaio. Esta queda inicial se deve, provavelmente, à fase de adaptação da microbiota à nova condição geoquímica imposta ao solo. De forma geral, em relação às demais amostras analisadas, ao longo do ensaio, observa-se um ligeiro aumento da atividade. A seguir serão apresentadas outras justificativas para tais ocorrências e também novas observações.

Nas Figuras 4.6 e 4.7 é possível perceber que a atividade microbiana nas amostras de efluente e líquido percolante das colunas 1 e 3 apresentaram valores baixos, com ordem de grandeza na terceira e quarta casas decimais. Este comportamento é esperado uma vez que naturalmente a água tende a apresentar atividade muito menor quando comparada ao solo.

Neste contexto, Paul e Clark (1989) afirmam que os microrganismos necessitam de CNP e micronutrientes para realizar certas atividades enzimáticas e assegurar o crescimento microbiano. Logo, para o incremento de biomassa requerem principalmente nitrogênio e fósforo. Assim sendo, a disponibilidade desses nutrientes na região contaminada é um fator crítico para a biodegradação (CORSEUIL; ALVAREZ, 1996). Outro fator que deve ser considerado como limitante da atividade microbiana é a presença de biomassa autóctone insuficiente para a degradação dos contaminantes em água (CORSEUIL, 1994). Além disso, em muitos casos, a baixa solubilidade do oxigênio em água é a maior limitação na biodegradação aeróbia em subsuperfície (BORDEN, 1994). Portanto, estes são alguns fatores que contribuem para a baixa atividade em água.

A situação de estar em suspensão na água não é propícia ao desenvolvimento microbiano e é, em geral, apenas uma transição, como para deslocamento das células, por exemplo. A condição adequada para o desenvolvimento de comunidade microbiana é sobre um suporte sólido, no caso, as partículas de solo, que, pela mesma ocasião, podem fornecer os nutrientes necessários. É por essa razão que, na falta de suporte sólido suficiente, as bactérias

produzem o biofilme, criando um ambiente onde as células estarão agregadas e fixas, sendo o biofilme também um filtro para reter quaisquer compostos ou elementos em suspensão na água que possam servir ao seu desenvolvimento. Essa é a principal razão pela qual há pouca atividade mensurável em amostras de água: poucas células e condições inadequadas para atividade elevada.

Diante deste aspecto, as medidas de atividade nos efluentes foram encerradas antes do término dos ensaios. Entretanto, com o objetivo de acompanhar alguma possível variação da atividade referente aos líquidos percolantes, estas medidas foram realizadas até o término do ensaio. Porém, não foi observado mudança comportamental.

Ressalta-se que as análises de atividade nas amostras dos diferentes tipos de solos foram realizadas em ambiente com presença de oxigênio. Não há medidas em anaerobiose.

Figura 4.6 - Atividade microbiana degradadora avaliada no líquido percolante e efluente da coluna 1 ao longo do ensaio

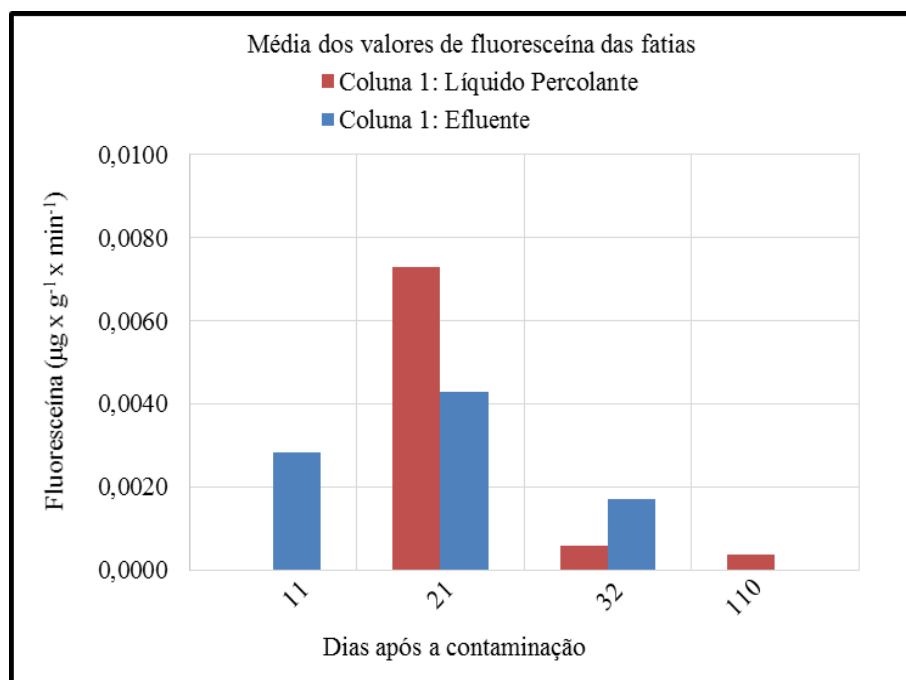
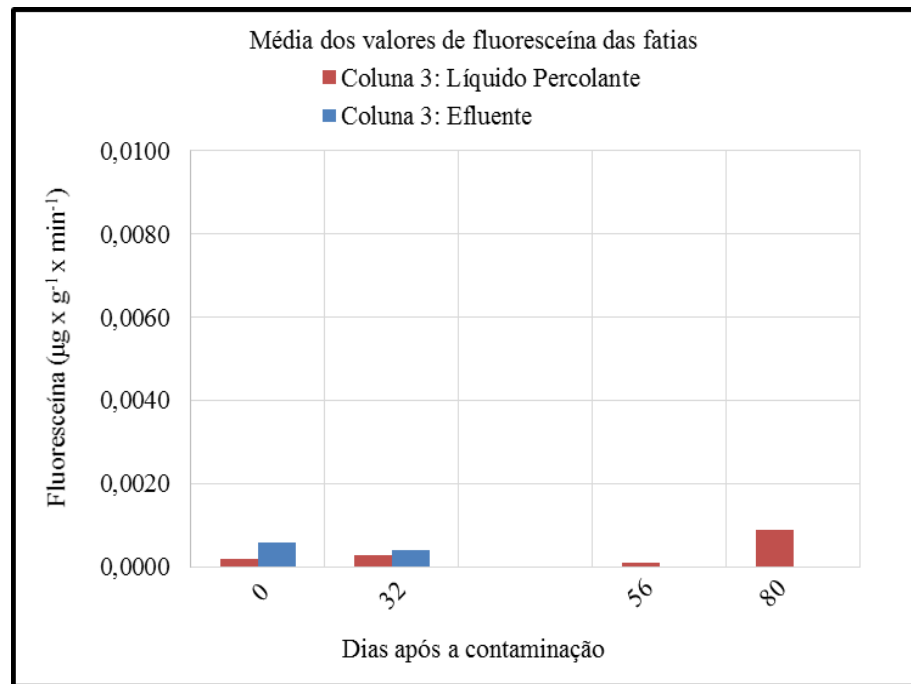


Figura 4.7 - Atividade microbiana degradadora avaliada no líquido percolante e efluente da coluna 3 ao longo do ensaio



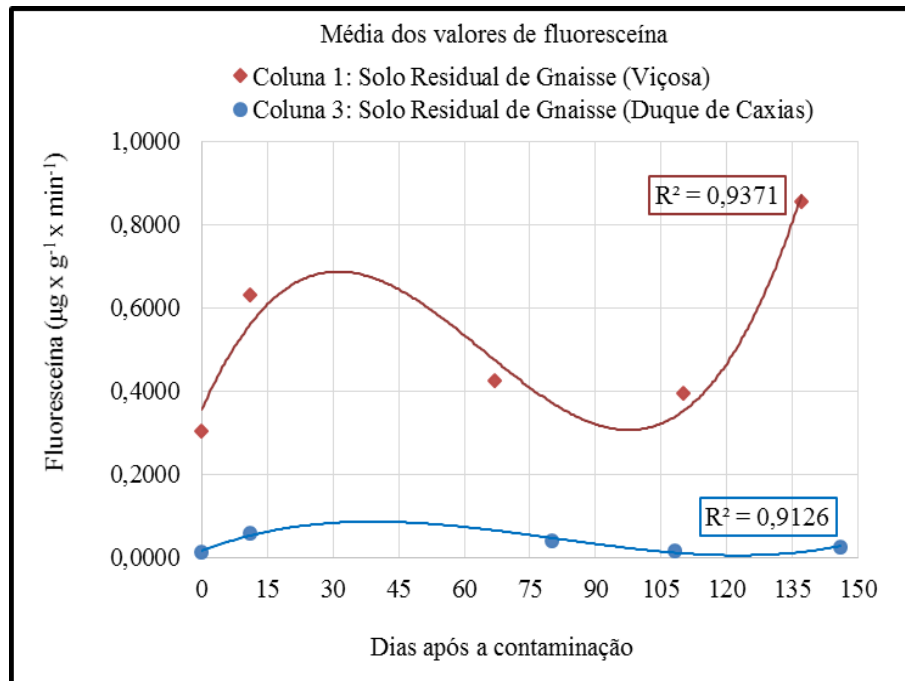
Os solos em estudo apresentaram populações microbianas ativas e adaptadas às condições oxidantes naturais. Dessa forma, continham ou eram capazes de produzir as enzimas necessárias à degradação da matéria orgânica. Segundo Rudd *et al.* (1996), além das bactérias, os fungos representam importante papel na degradação dos hidrocarbonetos no solo. À profundidade de 3 a 8 m, as bactérias são encontradas geralmente em quantidade muito maior que os fungos (MOREIRA, SIQUEIRA, 2006). De forma geral, o pH ideal para o metabolismo dos fungos é ligeiramente ácido, em torno de 5,0, enquanto que as bactérias são mais adaptadas a valores próximos a neutralidade, variando de 6 a 8 (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). Neste contexto, em função das condições de amostragem dos solos e ensaios, presume-se que a atividade microbiana desta pesquisa esteja relacionada à ação das bactérias na degradação dos compostos orgânicos. Além disso, estudos com os solo de Duque de Caxias têm sido realizados há 15 anos e raramente foram encontradas populações de fungos (ÖSTERREICHER-CUNHA *et al.*, 2004, 2007, 2009).

Após a coleta em campo, as amostras dos solos foram submetidas ao processo de saturação com água e, posteriormente, feita a introdução dos compostos contaminantes benzeno e tolueno por meio de solução aquosa. Portanto, foram impostas novas condições às amostras de solo em duas ocasiões. A atividade aeróbia dos microrganismos, medida nas amostras de solos recém saturadas, sofreu redução significativa. A saturação do solo com a presença de hidrocarbonetos monoaromáticos é impactante, sendo capaz de interferir no crescimento microbiano. Dessa forma, é necessário aos microrganismos um determinado período de tempo para que possam se adaptar ao ambiente e gerar energia, resultando no aumento da população. Ao longo deste período, populações de microrganismos geneticamente mais resistentes e com capacidade de degradação dos xenobióticos são selecionadas e iniciam a ativação ou produção de enzimas específicas para atacarem os compostos (e.g. ALCAMO, 1996).

Normalmente, a solubilidade e, conseqüentemente, a movimentação dos micronutrientes catiônicos (cobre, ferro, manganês e zinco), aumenta com a diminuição do pH do solo. Sob condições redutoras, a solubilidade do cobre e zinco diminuem e a do ferro e manganês aumentam. Neste contexto, a microbiota do solo pode capturar estes micronutrientes para a síntese de enzimas (ALCAMO, 1996). Em seguida, espera-se que os microrganismos deem início à degradação dos hidrocarbonetos de petróleo através de reações de oxirredução com o uso de aceptores de elétrons disponíveis no solo. Nesta pesquisa, o oxigênio (O₂) era o aceptor constantemente disponibilizado, ainda que em teores baixos, em função do abastecimento dos ensaios com solução aquosa. Em condições anaeróbias, o íon férrico, Fe(III), poderia ser utilizado, em virtude das características dos solos, que não contém nitrato, nem sulfato e pouco manganês, respeitando o processo termodinâmico de ordem sequencial na utilização dos aceptores (LOVLEY *et al.* 1994).

As Figuras 4.8 e 4.9 foram elaboradas baseadas nos valores das Tabelas 4.3 e 4.4. A Figura 4.8 demonstra a tendência do comportamento da atividade microbiana em cada ensaio ao longo do tempo.

Figura 4.8 - Atividade microbiana degradadora nos solos das colunas 1 e 3 avaliada durante o ensaio



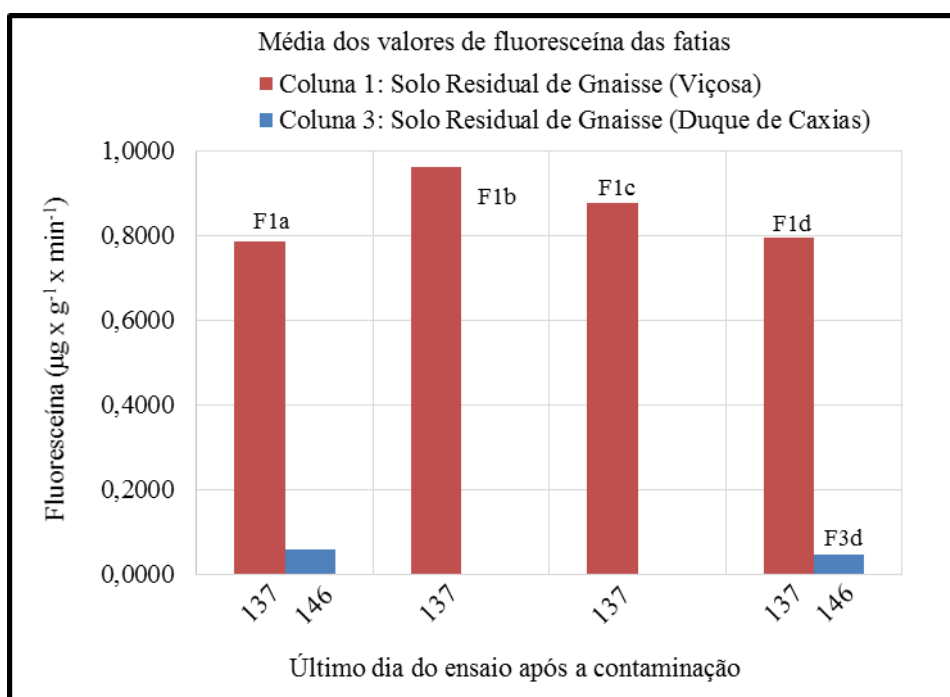
É possível perceber na Figura 4.8 que a atividade microbiana aeróbia ao longo do ensaio realizado com o solo de Viçosa apresentou maiores valores quando comparado àqueles verificados para o solo de Duque de Caxias. Pode-se considerar que uma menor atividade, medida em aerobiose, provavelmente corresponda a uma maior atividade anaeróbia. Logo, a diferença observada pode ser indicativa de uma maior predisposição do solo de Duque de Caxias para entrar em anaerobiose. Estes resultados vão ao encontro da hipótese que o solo de Viçosa permanece em condições de microaerofilia, com alguma atividade aeróbia, enquanto o solo de Duque de Caxias provavelmente entra em anaerobiose.

A Figura 4.9 mostra a variação da atividade entre as fatias dos solos das colunas referente ao último dia de cada ensaio.

A variação de atividade microbiana entre os resultados de ambas as colunas caracteriza o comportamento de oscilação típico de sistemas biológicos. Toda atividade desenvolvida pelos microrganismos envolve ganho e perda de

energia. Sendo assim, para que a atividade seja mantida é essencial a obtenção de novas quantidades de energia em intervalos de tempo.

Figura 4.9 - Variação da atividade microbiana entre as fatias de solo das colunas 1 e 3 referentes ao último dia de cada ensaio. As letras 'a', 'b', 'c' e 'd' indicam a ordem das fatias em relação ao topo da coluna, local de entrada da solução contaminante



A degradação dos compostos orgânicos iniciais tem como consequência a modificação da composição química do ambiente. Então, é comum que populações anteriormente adaptadas ao meio sejam substituídas devido ao processo de seleção natural de microrganismos capazes de produzir enzimas mais eficientes. Ou, então, a população existente deverá produzir tais enzimas. Portanto, as pequenas variações de atividade ocorridas nos ensaios podem estar relacionadas a esse mecanismo natural da microbiota.

Os valores de atividade microbiana aeróbia referentes ao último dia de cada ensaio (Figura 4.8) foram obtidos a partir da média daqueles relacionados a cada fatia das colunas 1 e 3 (Figura 4.9) e se apresentam maiores em relação

aos demais. É compreensível esta ocorrência visto que, por um determinado período de tempo, os solos foram expostos ao ar, uma vez retirados das colunas. Além disso, a divisão em fatias permitiu uma amostragem mais homogênea da região central das amostras de solo.

As distinções entre a atividade da coluna 1 e da coluna 3 são naturais uma vez que dispomos de solos com diferentes características. O solo natural de Viçosa, por exemplo, apresentou maiores valores de atividade e teor de matéria orgânica. É notável, por exemplo, o comportamento semelhante da atividade microbiana em cada uma das colunas até aproximadamente o 11º dia de ensaio. Entretanto, observa-se também que a atividade da coluna 1 são maiores quando comparada à da coluna 3, sugerindo novamente o aumento da atividade anaeróbia no solo de Duque de Caxias.

Embora tenha ocorrido a adaptação da microbiota em ambos os ensaios, frente ao impacto causado pela saturação e contaminação com os compostos BT, a atividade da coluna 1 teve um aumento. É possível que, além deste solo ter apresentado maior teor de matéria orgânica, o que aumentaria a biodisponibilidade dos compostos orgânicos, a presença da água possa ter causado uma maior disponibilização de nutrientes à microbiota, contribuindo para este efeito. Já para a coluna 3, com baixíssimas medidas de atividade aeróbia, por possuir menor teor de matéria orgânica e talvez pouca mobilização de compostos pela água, ainda assim, não é possível fazer a proposição de ter logo entrado em anaerobiose, uma vez que não foi observado visualmente ferro precipitado, como verificado para a coluna 4 (BTE). No entanto, a coluna 3 poderia ter entrado em anaerobiose mas, por não haver etanol, mais tardiamente, e não ter chegado a utilizar o ferro, visto haver um pouco de Mn nesse solo e a faixa de Eh dessa coluna, entre 100 e 200mV, corresponder ao metabolismo facultativo dos microrganismos.

Após aproximadamente 35 dias, a atividade nos dois ensaios apresentou um decréscimo até o 110º dia, aumentando ao final do ensaio. A queda da atividade aeróbia, em virtude do período de tempo do ensaio, pode ser atribuída ao aumento da atividade anaeróbia. No entanto, é importante lembrar que era contínua a alimentação dos ensaios com a solução aquosa contendo

os compostos BT, o que significa constante reposição de O_2 . Assim, por alguma mudança das condições do sistema, o rápido consumo de O_2 pelas bactérias em relação à recarga, por exemplo, poderia criar condições de anaerobiose.

Durante os últimos dias de ensaio foi observado o aumento da atividade microbiana aeróbia, em especial, para o ensaio com a coluna de Viçosa. Mudanças nas condições do sistema podem ter sido a causa deste comportamento. É possível que a atividade microbiana anaeróbia tenha diminuído com o aumento da aeróbia ou um novo equilíbrio tenha sido estabelecido, com condições de baixíssimas concentrações de oxigênio (microaerofílicas), onde ambos os tipos de bactérias estariam agindo, o que não levaria à queda brusca do potencial redox, como observado anteriormente.

Na Figura 4.9, observa-se que as medidas de atividade nas fatias da coluna 1 (Viçosa) comparada às da coluna 3 (Duque de Caxias), apresentaram pouca variação ao longo da coluna, sugerindo que esteja em aerobiose. Em relação à coluna 3, nota-se que quase não é possível medir atividade aeróbia no meio da coluna, onde certamente há menor disponibilidade de O_2 , se comparada às extremidades, em que na entrada o O_2 entraria dissolvido na solução contaminante, e, na saída, em virtude da porta ficar aberta, poderia haver entrada de O_2 . Estas condições poderiam sugerir a coluna 3 em anaerobiose, mas não é possível confirmar esta hipótese, como já mencionado. Para a coluna 1, os adicionais de O_2 devido às condições das extremidades da coluna, seriam irrelevantes diante da quantidade de O_2 que já se encontra presente.

De modo geral, a atividade aeróbia da coluna 3 não se apresentou tão intensa quanto a da coluna 1. A princípio, pode-se associar esta disparidade em virtude das diferentes condições dos sistemas e às características físicas, químicas e microbiológicas entre os solos.

4.1.4 Influência do Etanol

O etanol apresenta uma característica estrutural que favorece a sua rápida biodegradação, bem como a sua taxa de mobilidade quando presente em

ambientes de subsuperfície. Desta forma, os mecanismos abióticos para a atenuação de contaminantes em ambientes subterrâneos não contribuem significativamente para a redução da mobilidade deste composto. Nesse caso, o transporte e destino do etanol serão predominantemente definidos pela biodegradação (WIEDEMEIER *et al.*, 1999a).

A biodegradação do grupo BTEX-Etanol presente na gasolina tem sido alvo de estudos em processos aeróbios e anaeróbios (CORSEUIL *et al.*, 1996; BARBARO, BARKER, 2000; KAO, WANG, 2000; LANDMEYER, BRADLEY, 2003; ÖSTERREICHER-CUNHA *et al.*, 2004; TIBURTIUS; PHELPS, YOUNG, 1999; SILVA, ALVAREZ, 2002; ÖSTERREICHER-CUNHA *et al.*, 2007; DOU *et al.*, 2007).

Em comparação aos constituintes da gasolina, o etanol pode ser degradado sob condições aeróbias e anaeróbias em tempo muito inferior, uma vez que ele participa diretamente do ciclo bioquímico celular, não sendo necessário o tempo suplementar para a ativação ou síntese enzimática como na presença do BTEX (CORSEUIL *et al.*, 1996; ÖSTERREICHER-CUNHA *et al.*, 2007). Desta maneira, a presença do etanol atrasa a degradação dos hidrocarbonetos, pois além de poder ser tóxico e inibitório para os microrganismos (CORSEUIL; MARINS, 1998), a sua degradação preferencial provoca uma alta demanda de oxigênio e uma elevada utilização dos nutrientes e receptores de elétrons disponíveis, que poderiam ser utilizados na biodegradação dos BTEX (CORSEUIL *et al.*, 1998; SILVA, 2002; RUIZ-AGUILAR *et al.*, 2003; DA SILVA, ALVAREZ, 2004; NUNES, CORSEUIL, 2005; COSTA *et al.*, 2006; ÖSTERREICHER-CUNHA *et al.*, 2007). As taxas de biodegradação do etanol, em condições aeróbias ou anaeróbias, bem como processos metabólicos da sua oxidação, são influenciados pelos receptores de elétrons presentes no local impactado. Portanto, é importante o aporte de mais informações a respeito do papel e efeitos da adição de etanol na biodegradação da gasolina.

Em solos saturados e águas subterrâneas contaminados com gasolina, é comum ocorrer um rápido esgotamento do oxigênio dissolvido, o que promove

condições favoráveis aos processos anaeróbios (ANDERSON, LOVLEY, 2000; CHEN *et al.*, 2008; ZWOLINSKI *et al.*, 2000).

Neste item, o foco principal foi avaliar a interferência da presença de etanol (E), que é usado comercialmente como aditivo no Brasil, na biorremediação da gasolina. Para isso, foi realizado o monitoramento da atividade microbiana degradadora, medida em amostras do líquido percolante, efluente e solo, em condição de aerobiose, para solos saturados com solução aquosa contaminante contendo benzeno (B), tolueno (T) e etanol (E).

As Tabelas 4.5 e 4.6 mostram a média e o desvio padrão dos valores de fluoresceína obtidos a partir da determinação da atividade microbiana degradadora dos solos das colunas 2 e 4 ao longo dos ensaios.

Tabela 4.5 - Valores das concentrações de fluoresceína ($\mu\text{g} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) ao longo do ensaio relativo à coluna 2

Dia	Coluna 2 - Solo Residual de Gnaisse (Viçosa)								
	Liq. Percolante		Solo			Efluente		Reservatório	
	Média	d.p.	Fatias	Média	d.p.	Média	d.p.	Média	d.p.
0	n.d.*			0,3379	±0,0000	n.d.*		n.d.*	
11	0,0099	±0,0000		0,5261	±0,0000	0,0041	±0,0004		
21	0,0053	±0,0000				0,0040	±0,0002		
32	0,0012	±0,0003				0,0020	±0,0007		
46	n.d.*					n.d.*			
67	n.d.*			0,1835	±0,0111				
79	n.d.*								
110	0,0007	±0,0000		0,1215	±0,0184				
137			F2a	0,4198	±0,0441				
137			F2b	0,5810	±0,1199				
137			F2c	0,5251	±0,0900				
137			F2d	0,6254	±0,0720				

*não detectado pelo método utilizado

É possível verificar na Tabela 4.5 que, após a saturação da amostra de solo da coluna 2, houve uma queda na atividade microbiana degradadora aeróbia, referente ao dia zero dos ensaios em relação àquela medida no solo natural ($0,607 \pm 0,000 \mu\text{g} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$). Como observado no item 4.2.3 para BT, esta queda inicial se deve, provavelmente, à fase de adaptação da microbiota à

nova condição geoquímica imposta ao solo. Entretanto, observa-se redução da atividade aeróbia, comparada àquela medida no solo natural ($0,0317 \pm 0,006 \mu\text{g} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$), para a coluna 4 (Tabela 4.6) apenas após o 80º dia de ensaio, com ligeiro aumento até este período. Neste caso, este pode ser um indicativo da criação mais tardia de condições anaeróbias. No entanto, as variações são baixas para esta suposição. Outras justificativas para tais ocorrências e também novas observações serão apresentadas a seguir.

Tabela 4.6 - Valores das concentrações de fluoresceína ($\mu\text{g} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) ao longo do ensaio relativo à coluna 4

Dia	Coluna 4 - Solo Residual de Gnaisse (Duque de Caxias)								
	Líquido Percolante		Solo			Efluente		Reservatório	
	Média	d.p.	Fatias	Média	d.p.	Média	d.p.	Média	d.p.
0	n.d.*			0,0373	$\pm 0,0338$			n.d.*	
11	n.d.*			0,1325	$\pm 0,0498$	n.d.*			
21	0,0003	$\pm 0,0000$				0,0001	$\pm 0,0002$		
32	n.d.*					0,0004	$\pm 0,0000$		
56	0,0001	$\pm 0,0000$				0,0001	$\pm 0,0000$		
80	0,0011	$\pm 0,0000$		0,0418	$\pm 0,0190$				
108	n.d.*			0,0066	$\pm 0,0028$				
146			F4a	0,0047	$\pm 0,0082$				
146			F4b	0,0027	$\pm 0,0046$				
146			F4c	0,0201	$\pm 0,0284$				
146			F4d	0,0101	$\pm 0,0175$				

*não detectado pelo método utilizado

As Figuras 4.10 e 4.11 representam o comportamento da atividade microbiana em relação ao líquido percolante e efluente das colunas 2 e 4.

Analisando-se os gráficos das Figuras 4.10 e 4.11, observa-se que os maiores valores de atividade microbiana aeróbia ocorreram para a coluna 2. Embora sejam visíveis picos na Figura 4.10, nota-se que os valores são muito baixos, com ordem de grandeza na terceira e quarta casas decimais. Portanto, este comportamento é similar, podendo ser justificado pelo observado no item 4.2.3.

Figura 4.10 - Atividade microbiana degradadora avaliada no líquido percolante e efluente da coluna 2 ao longo do ensaio

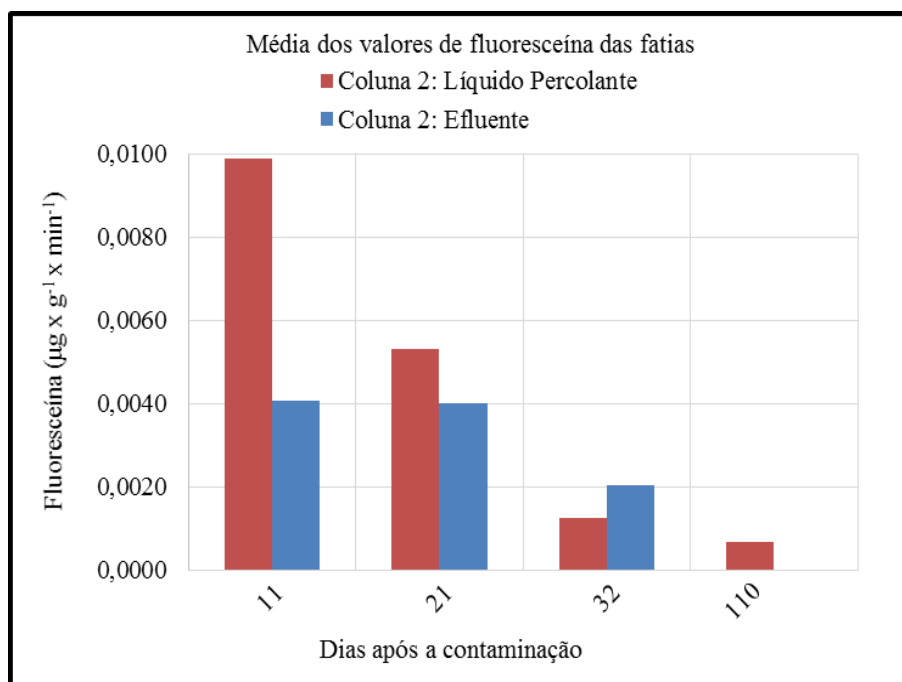
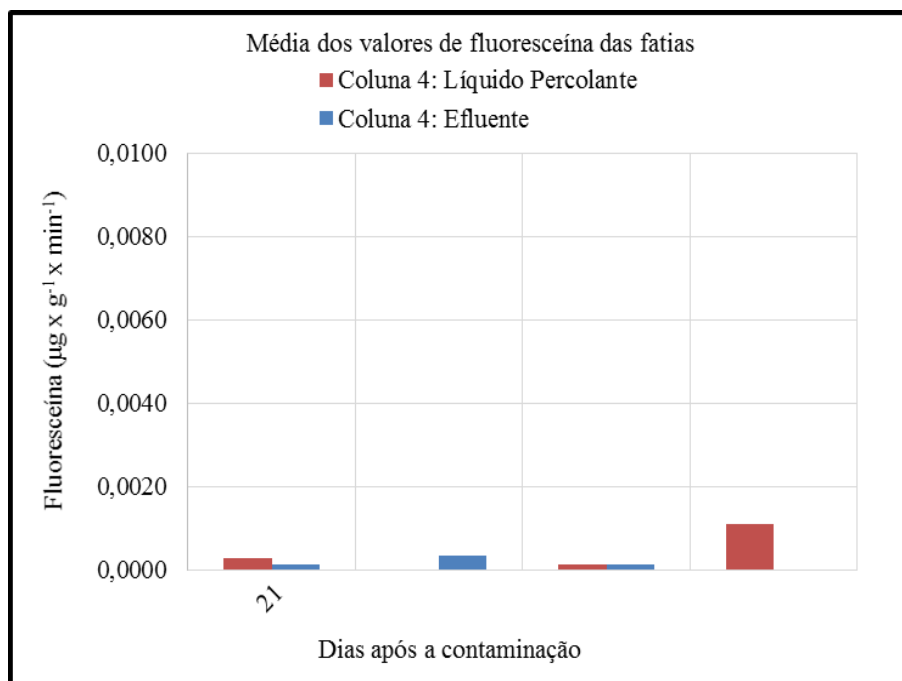


Figura 4.11 - Atividade microbiana degradadora avaliada no líquido percolante e efluente da coluna 4 ao longo do ensaio



Uma vez constatada a baixa atividade na água, comportamento esperado, as medidas nos efluentes foram encerradas antes do término dos ensaios. Entretanto, optou-se por realizar as medições de atividade no líquido percolante até o término do ensaio. Mais uma vez, não foi observado variação no comportamento.

As Figuras 4.12 e 4.13 foram elaboradas baseadas nos valores das Tabelas 4.5 e 4.6. A Figura 4.12 demonstra a tendência do comportamento da atividade microbiana em cada ensaio ao longo do tempo e a Figura 4.13 mostra a variação da atividade entre as fatias dos solos das colunas referente ao último dia de cada ensaio.

Assim como verificado no item 4.2.3, é possível perceber na Figura 4.12 que a atividade microbiana aeróbia, ao longo do ensaio realizado com o solo de Viçosa, apresentou maiores valores quando comparado àqueles verificados para o solo de Duque de Caxias, mais uma vez, sugerindo a predisposição do solo de Duque de Caxias para entrar em anaerobiose.

Figura 4.12 - Atividade microbiana degradadora nos solos das colunas 2 e 4 avaliada durante o ensaio

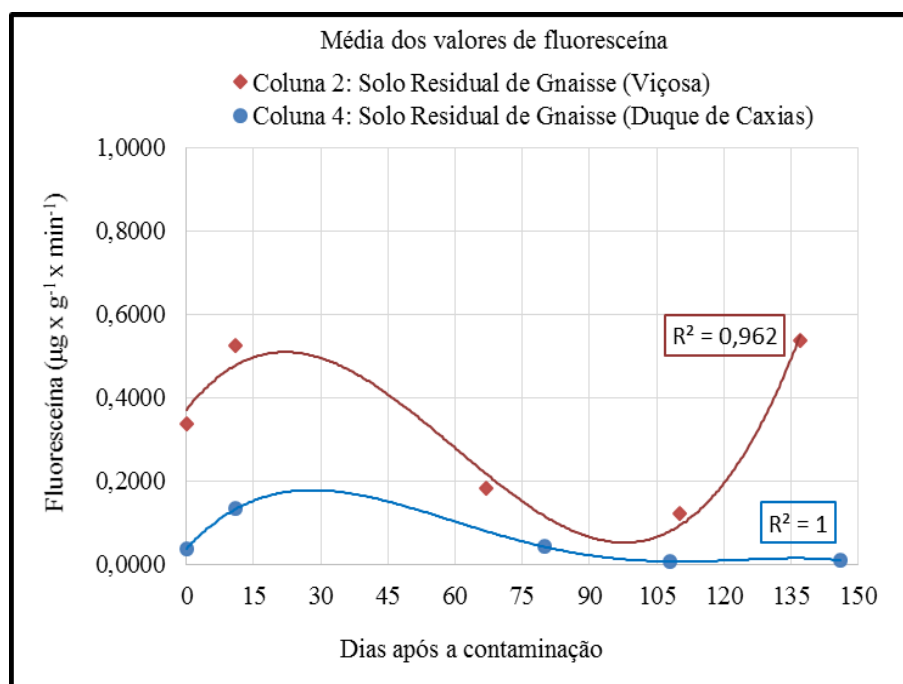
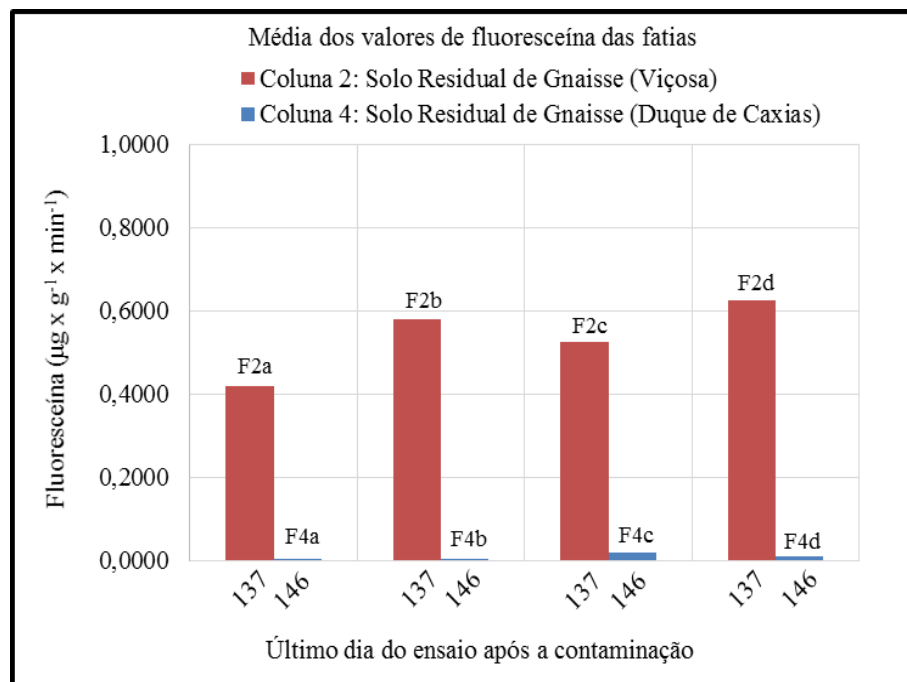


Figura 4.13 - Variação da atividade microbiana entre as fatias de solo das colunas 2 e 4 referentes ao último dia de cada ensaio



A tendência da atividade microbiana degradadora ao longo do tempo para os diferentes sistemas ensaiados é apresentada na Figura 4.12. Em todos os ensaios (colunas 2 e 4) foi evidenciado o aumento da atividade microbiana aeróbia até aproximadamente o 30º dia, comportamento que pode ser justificado pela adaptação da população e, conseqüentemente, utilização dos compostos orgânicos contaminantes para produção de energia, o que implicaria na redução da concentração de BTE. Entretanto, observa-se também que os resultados da atividade referente à coluna 2 são maiores quando comparados aos da coluna 4, sugerindo novamente o aumento da atividade anaeróbia no solo de Duque de Caxias.

Como já observado para as colunas 1 e 3, embora tenha ocorrido a adaptação da microbiota ao impacto em ambos os ensaios (colunas 2 e 4), a atividade da coluna 2 apresentou aumento significativo. Neste caso, a presença de água e o maior teor de matéria orgânica, em função do aumento da disponibilidade de nutrientes e dos compostos orgânicos à microbiota, respectivamente, podem ter contribuído para este efeito. Já a atividade da coluna 4, em virtude das

baixas medidas de atividade aeróbia, por possuir menor teor de matéria orgânica e talvez pouca mobilização de compostos pela água, pode ter entrado logo em anaerobiose. Hipótese que se confirma ao verificar o potencial redox na faixa de redução do Fe(III) e a precipitação de ferro em amostras de solos, ao final do ensaio.

Após aproximadamente 30 dias, a atividade nos ensaios apresentou um decréscimo até o 110º dia, aumentando ao final para a coluna 2. A queda da atividade aeróbia, em virtude do período de tempo do ensaio, pode ser atribuída ao aumento da atividade anaeróbia. Este aspecto pode ser relacionado à biodegradação preferencial do etanol, que levaria ao maior consumo de O₂ em relação à sua recarga através da solução aquosa, criando condições favoráveis à anaerobiose. É importante salientar que não basta a existência de um acceptor em quantidade, pois sua utilização só ocorrerá de modo significativo quando os processos aeróbios e anaeróbios mais favoráveis não forem mais preponderantes. À vista disso, as bactérias podem ter utilizado o Fe (III) presente no solo como acceptor para a biodegradação dos compostos BT.

Quanto ao aumento apreciável da atividade aeróbia, durante os últimos dias do ensaio da coluna 2 (Viçosa), pode-se relacioná-lo às mudanças nas condições do sistema. É possível que a atividade microbiana anaeróbia tenha diminuído com o aumento da aeróbia ou um novo equilíbrio tenha sido estabelecido, com condições favoráveis a ambos os tipos de bactérias, o que não levaria à queda brusca do potencial redox, como observado. Em relação ao ensaio de Duque de Caxias, quase não se observa elevação da atividade, sugerindo que esteja em processo de biodegradação anaeróbia.

Nunes e Corseuil (2007) constataram que, para o combustível com 24% de etanol, a massa de microorganismos desenvolvida com a biodegradação do etanol também foi responsável pela redução dos BTEX após o esgotamento deste composto, devido à intensificação da taxa de respiração anaeróbia.

Estudos realizados indicam que em regiões fortemente redutoras, os valores de potencial redox tendem a ser negativados, oportunidade em que se observaram menores valores de oxigênio dissolvido e de Fe(II), e elevada

concentrações de metano. Bactérias metanogênicas atuam em pHs aproximados de 6,6 e 7,4 (METCALF; EDDY, 2003). Portanto, observados o potencial redox, acceptor disponível e pH, não acredita-se na ocorrência do processo de metanogênese no presente estudo.

Na Figura 4.13, observa-se que as medidas de atividade nas fatias da coluna 2 (Viçosa) comparada às da coluna 4 (Duque de Caxias), apresentaram pouca variação ao longo da coluna, sugerindo que esteja em aerobiose. Em relação à coluna 4, nota-se que quase não é possível medir atividade aeróbia ao longo da coluna. Neste caso, a coluna 4 estaria em anaerobiose, como já relatado.

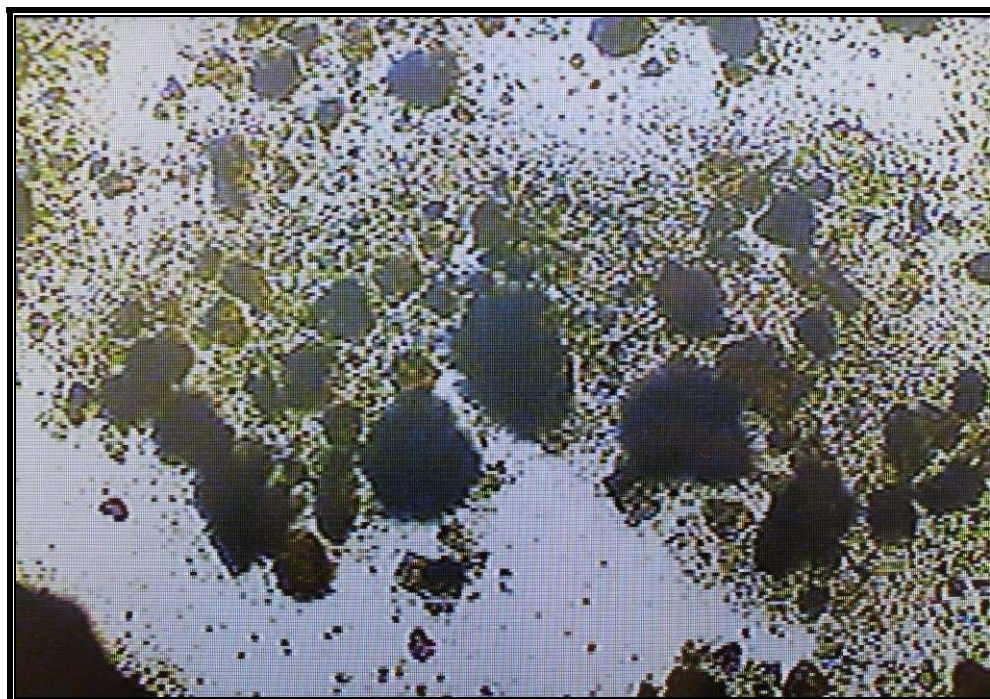
Outra análise importante: ao se comparar as colunas 1 (BT) com a 2 (BTE), verifica-se que a atividade medida em aerobiose é menor para a 2. Justifica-se esse comportamento pela biodegradação preferencial do etanol em relação aos BT, em que os microrganismos podem consumir o oxigênio disponível em velocidade maior que a sua reposição através da entrada de solução aquosa contaminante, possibilitando a criação de condições anaeróbias. No entanto, embora o potencial redox esteja na faixa de precipitação do Fe(II), ao final deste ensaio, como já observado, não foi visualizada a precipitação de ferro nas fatias de solo. Além disso, é importante lembrar que, somente após armazenamento em frasco, seguido de sua vedação, logo, sem aporte de O₂, percebeu-se a precipitação de ferro. Sendo assim, pode-se sugerir que a biodegradação aeróbia predominou nas colunas 1 e 2 (Viçosa) durante o período de ensaio. Em relação às colunas 2 e 4, observa-se que a 4 apresenta atividade aeróbia ainda menor, sugerindo uma maior atividade anaeróbia. Neste caso, a justificativa é facilitada visto que, além do potencial redox encontrar-se na faixa de redução de Fe(III) e a biodegradação preferencial do etanol, visualizou-se o precipitado de ferro nas amostras de solo após o fatiamento, ao final do ensaio, confirmando a criação de condições redutoras favoráveis à anaerobiose.

Por fim, ressalta-se que são similares os comportamentos e os processos na presença ou não do etanol. A principal diferença encontra-se na rapidez com que a microbiota entra em anaerobiose devido à degradação constitutiva do etanol e, conseqüente, esgotamento dos aceptores de elétrons.

4.1.5 Avaliação da formação de biofilme

É possível verificar na imagem do microscópio (Figura 4.14), apesar da baixa qualidade, que as células estão agrupadas ao redor das partículas de solo, sugerindo a presença de biofilme. Inclusive, na lâmina utilizada no microscópio, observou-se uma coloração mais acentuada nessa região, caracterizando a presença do biofilme.

Figura 4.14 – Imagem de uma amostra de solo da fatia F1b referente à coluna 1 visualizada em microscópio



Ghiorse e Wilson (1988), em condições subsuperficiais, afirmam que se encontram populações de microrganismos geralmente formadas por bactérias, fungos, algas e protozoários. O biofilme pode ser formado por população desenvolvida a partir de uma única ou de múltiplas espécies e consiste em camadas de células microbianas que se desenvolvem sobre superfícies sólidas. Colonizam todos os ambientes acessíveis a seres vivos. Geralmente está associado à proteção da microbiota contra o ambiente (agentes antimicrobianos, alterações no pH, etc.) ou à procura por otimizar as condições

ambientais para garantir sua sobrevivência. Torna possível a cooperação metabólica. Assim, haverá distintas condições físicas, químicas e biológicas e cada biofilme é único. Bitton e Gerba (1984) relatam que os principais mecanismos de biotransformação de contaminantes orgânicos em água subterrânea são efetuados nos biofilmes.

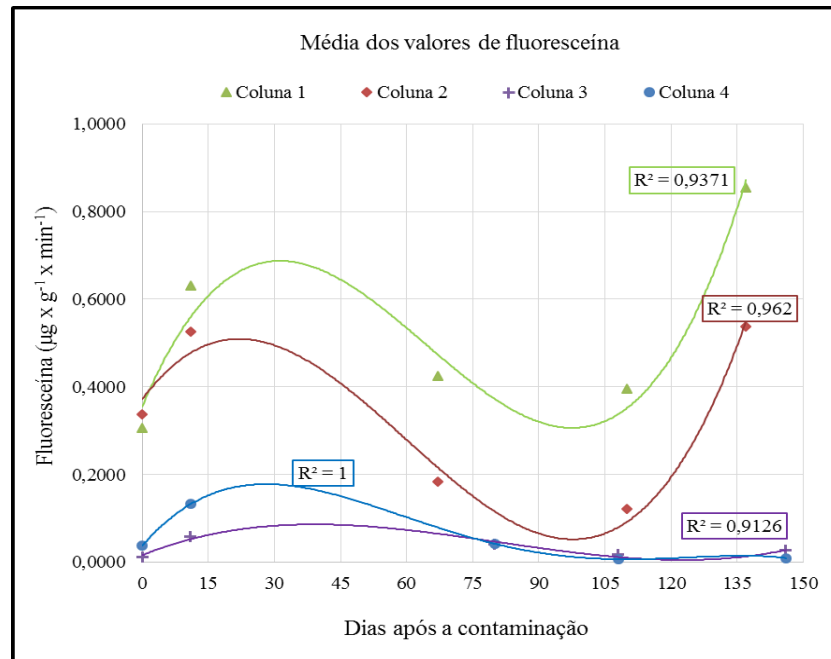
As condições de ensaio da coluna 1, saturada e com entrada constante de O₂, mas em baixas quantidades, podem ter levado a microbiota em busca de garantir a sua sobrevivência, favorecendo a formação de biofilme. É importante mencionar que a formação do biofilme depende também da composição e da estrutura do solo, sendo este um dado que pode ser explorado em estudos posteriores. Inclusive, a influência do biofilme na biodegradação e na diferença de comportamento entre os solos estudados.

4.1.6 Considerações

A tendência dos perfis de atividade microbiana aeróbia (Figura 4.15), como discutido anteriormente, sugere que as colunas com solo de Viçosa não tenham entrado em anaerobiose, ao passo que as colunas com solo de Duque de Caxias, em especial a coluna 4, sim. Suposição que se confirma com o potencial redox na faixa de redução do ferro e a observação da precipitação do Fe(II). Os solos apresentam naturalmente baixas concentrações de nitrogênio e manganês.

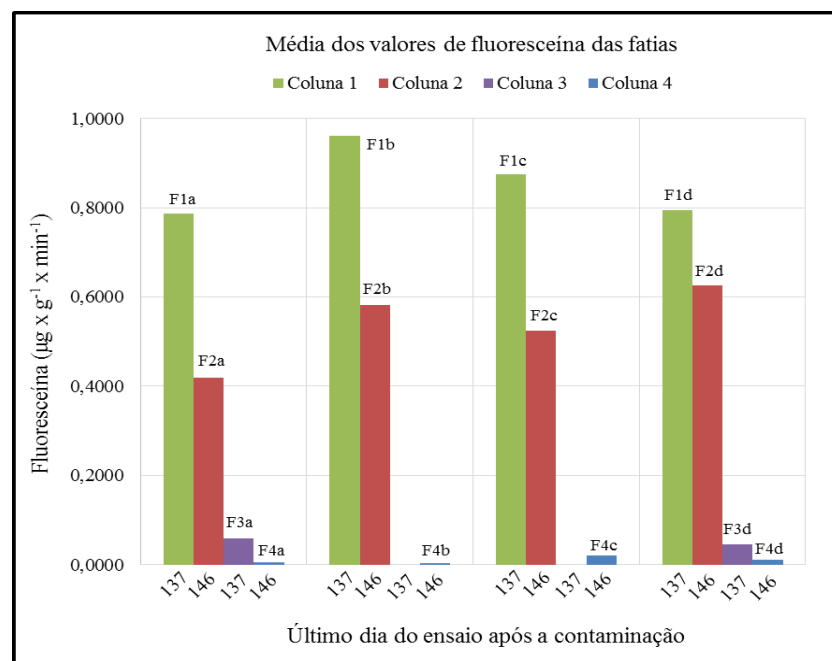
A diferença entre os perfis de atividade aeróbia é mais pronunciada para o solo de Viçosa, sendo menor para o solo com BTE. Este comportamento pode ser atribuído ao fato da biodegradação preferencial do etanol levar ao rápido consumo de O₂, não havendo a reposição proporcional com a injeção de solução aquosa contaminante. Neste caso, a atividade em anaerobiose é confirmada apenas após o término do ensaio, com armazenamento de amostras deste solo em frascos vedados, sem aporte de O₂, e, posterior, visualização de ferro precipitado. Para o solo de Duque de Caxias contaminado com BTE, por estar em anaerobiose, como já confirmado, a medida de atividade aeróbia tende a ser baixa independente da presença do etanol.

Figura 4.15 - Atividade microbiana degradadora nos solos das colunas 1, 2, 3 e 4 avaliada durante o ensaio



A Figura 4.16 apresenta a variação da atividade microbiana das fatias dos solos.

Figura 4.16 - Variação da atividade microbiana entre as fatias de solo das colunas 1, 2, 3 e 4 referentes ao último dia de cada ensaio



De maneira geral, as atividades microbianas oscilaram ao longo de todos os experimentos, comportamento natural da microbiota, considerando a baixa amplitude da faixa de oscilação.

Ao analisar a Figura 4.16, verifica-se que os maiores valores de atividade microbiana degradadora aeróbia ocorreu para o solo de Viçosa, na região central da coluna 1 (F1b e F1c). A atividade aumentou de montante (F1a) para a região central, reduzindo a jusante (F1d). Os valores de atividade a montante (F1a) e jusante (F1d) apresentaram-se próximos. De forma geral, as medições corresponderam a níveis de atividade mais elevados do que o medido no solo natural ($0,607 \pm 0,000 \mu\text{g} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$). Como já abordado, uma redução da atividade aeróbia pode estar associada ao aumento da atividade anaeróbia. Quanto às medidas de atividade em laboratório, com solo contaminado, serem maiores do que aquela do solo natural, este comportamento é esperado após a adaptação da população.

Embora não tenham sido realizadas medições de Fe(II) nos ensaios, sabe-se que o seu aumento no meio é refletido pela elevação da atividade microbiana anaeróbia. Fernando (2009) verificou a mobilização do Fe(III) e sua redução quando em anaerobiose, em microcosmos saturados, com amostras deformadas do solo de Duque de Caxias, contaminados com BTEX. É importante ressaltar que em condições aeróbias, o Fe(III) presente acaba por dar ao solo uma cor amarela ou avermelhada. Já em condições anaeróbias, os compostos de ferro são reduzidos e, por exemplo, pode ser visível a cor cinza devido ao Fe(II). Observação válida visto que esta tonalidade de cor foi verificada no ensaio com solo de Duque de Caxias (coluna 4) e, após armazenamento em frascos vedados, no solo de Viçosa (coluna 2).

A tipologia dos solos impactados é um aspecto importante visto que podem influenciar a eficiência de processos de remediação como, por exemplo, a atenuação natural. A textura do solo afeta propriedades do solo como a permeabilidade e a retenção de umidade, o que provoca efeito na capacidade de transporte e adsorção dos contaminantes (JACQUES *et al.*, 2007; MENEGHETTI, 2007).

Em alguns casos, a contaminação de solos por petróleo e seus derivados tem se tornado um problema mundial, principalmente, devido à dificuldade de reabilitação da área contaminada. Uma das principais dificuldades envolvendo a descontaminação dessas áreas está relacionada, entre outros fatores, à presença de argilominerais. É reconhecido que, quando presentes em quantidades elevadas no solo contaminado, podem reduzir consideravelmente a eficiência do processo de biorremediação. De modo geral, sabe-se que os solos argilosos apresentam baixa permeabilidade, o que pode comprometer a distribuição de oxigênio e a incorporação de nutrientes. Neste contexto, ressalta-se que o solo de Viçosa apresenta percentual elevado de argila e matéria orgânica, podendo este ser um fator de influência no atraso da biodegradação dos compostos. De acordo com Lovley (1991), as formas de ferro que são mais facilmente reduzidas são as amorfas e pouco cristalinas de hidróxidos, oxi-hidróxidos, e óxidos de Fe (III). Como a fração argila tem composição dominante de minerais secundários (argilominerais), logo, presença de formas de ferro mais insolúveis, é possível sugerir que os microrganismos possam ter dificuldades na redução das formas de ferro presentes. Entretanto, ainda assim, poderá haver esta mobilização, na ausência de O₂, se existirem compostos orgânicos para serem degradados, como observado nas amostras armazenadas da coluna 2 (BTE).

Em resumo, conforme os resultados dos ensaios, apenas os solos com etanol esgotaram o O₂ e precipitaram o Fe (II). No entanto, o solo de Viçosa com bastante atraso em relação ao de Duque de Caxias e só após de interrompido o aporte de O₂. Logo, o solo de Viçosa não entrou em anaerobiose durante o ensaio. Embora ambos sejam solos tropicais, algumas razões podem ser consideradas para esta diferença em virtude das características específicas dos solos. No solo de Viçosa, por exemplo, os microrganismos podem ter degradado preferencialmente a matéria orgânica natural aos compostos contaminantes, pois continha elevado percentual de matéria orgânica. Todavia o baixo percentual de matéria orgânica no solo de Duque de Caxias pode ser uma razão para a microbiota utilizar logo os contaminantes, consumindo todo o oxigênio para a degradação do etanol, entrando em anaerobiose. Outra questão está relacionada à possibilidade da rápida degradação dos compostos,

sem o esgotamento do O₂, mas depois de armazenado, sem aporte de O₂, ocorreu a precipitação do Fe (II). Estes dois aspectos poderiam levar ao atraso da biodegradação no solo de Viçosa. Entretanto, é mais provável que tenha ocorrido a pouca degradação durante o ensaio. No entanto, não é possível afirmar sem a análise química.

Velasquez (2015) simulou duas colunas em PVC com amostras indeformadas de solo. O estudo sugere o rápido esgotamento do oxigênio, na zona saturada, devido a presença do etanol, atrasando a biodegradação do benzeno e criando condições anaeróbias. Os resultados do ensaio em laboratório com a coluna de Duque de Caxias contaminada com BTE refletem as observações feitas por Velasquez (2015).

Por fim, a biodegradação dos compostos orgânicos é alcançada com eficiência em condições físicas, químicas e microbiológicas do solo e condições climáticas, que proporcionem relações satisfatórias entre microrganismos, solo e contaminante. As análises químicas poderiam informar as concentrações de B, T e E ao longo dos ensaios, permitindo a avaliação e confirmação de algumas hipóteses.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 Conclusões

Com relação à montagem do experimento e às análises realizadas, julgam-se relevantes as seguintes observações:

- ✓ As metodologias utilizadas no processo de montagem do aparato experimental, coleta das amostras de solo *in situ* e monitoramento apresentaram-se satisfatórias.
- ✓ O frasco de Mariote apresentou funcionamento satisfatório como reservatório da solução contaminante.
- ✓ A aplicação da força de compressão nas duas extremidades das colunas contribuiu para a redução substancial do fluxo preferencial.
- ✓ O uso de areia nas extremidades das colunas contribuiu para a distribuição de água na entrada e impediu o carreamento de partículas sólidas na saída. Além disso, a sua utilização em alguns pontos da coluna, facilitou a coleta do líquido percolante.
- ✓ Considerando as adaptações, as metodologias de amostragem nos pontos (portas) de monitoramento situados no corpo da coluna atenderam aos objetivos.
- ✓ Os solos estudados, sem histórico de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo, apresentaram bactérias com potencial de degradação de BT e Etanol na microbiota natural.
- ✓ Em relação ao início dos ensaios, após a saturação e contaminação com os hidrocarbonetos e etanol, observou-se que houve redução na atividade microbiana em relação àquela da condição natural, demonstrando que lhes foi necessário um período de tempo para adaptação à nova condição.
- ✓ Processos geoquímicos e microbiológicos, variáveis com as condições do meio, sugerem a possibilidade de disponibilizar e utilizar o ferro do solo para a biodegradação.

- ✓ É possível sugerir que a população microbiana foi a principal responsável pela biodegradação dos compostos BTE e mobilização do ferro, mesmo sem a análise química.
- ✓ Em função das condições de pH e potencial redox (Eh) dos ensaios, foi possível verificar a disponibilidade de Fe(III) e a precipitação de Fe (II), indicando condições anaeróbias.
- ✓ As curvas de atividade microbiana aeróbia dos ensaios com solo de Duque de Caxias ocorreram de forma similar, com baixíssima diferença entre aquele com BT e BTE.
- ✓ Os ensaios com o solo de Duque de Caxias indicaram baixa atividade aeróbia, mesmo com o aporte de O₂ através da constante alimentação com solução aquosa, indicando possível aumento no processo anaeróbio, em função de suas características.
- ✓ As curvas de atividade microbiana aeróbia dos ensaios com solo de Viçosa mostraram menores valores para aquele realizado com BTE comparado àquele com BT. Aspecto comportamental atribuído à biodegradação aeróbia e preferencial do etanol aos BT.
- ✓ Os experimentos com o solo de Viçosa possivelmente não entraram em anaerobiose, tendo a atividade aeróbia como processo preferencial, até o final do ensaio. No entanto, após armazenamento em frascos vedados, logo, sem aporte de O₂, apresentou a precipitação de ferro, indicando condições anaeróbias.
- ✓ Como reconhecido mundialmente, o processo de biodegradação pode ser utilizado como uma alternativa para o tratamento de áreas contaminadas com gasolina.

5.2 Sugestões

Tendo em vista as dificuldades encontradas para a realização dos ensaios em coluna e as conclusões obtidas neste trabalho, sugere-se as seguintes propostas para futuros trabalhos:

✓ Estabelecer previamente parceria com um responsável Laboratório de Química Institucional ou privado para a realização das análises de Cromatografia Gasosa (CG) ou outras de cunho ambiental antes ou à medida do andamento dos ensaios. Dessa forma, haverá informações complementares às de atividade microbiana e parâmetros físico-químicos (pH e Eh) para a discussão. Assim, será possível verificar a tendência de decaimento dos compostos BTE com o tempo.

✓ O sulfato de cálcio (CaSO_4), conhecido também como gesso, é um sal pouco solúvel em água. Assim, recomenda-se testar o uso de gesso líquido como material de preenchimento da região entre a parede interna do tubo em PVC e a superfície lateral da amostra indeformada de solo, com o objetivo de impedir ou minimizar o fluxo preferencial da solução contaminante. Neste caso, a amostra de solo com formato cilíndrico deverá ser moldada em laboratório, como realizado no trabalho de Meneguetti *et al.* (2011). Outra sugestão é testar a eficiência da técnica utilizada por Mareth *et al.* (2014) na redução do fluxo preferencial. Neste caso, será necessário realizar a coleta de blocos de solo em campo, confeccionar lisímetros em PVC e, com o auxílio de uma prensa hidráulica acoplada às colunas, proceder em laboratório à moldagem da amostra de solo.

✓ Verificar outras técnicas para a coleta de amostras do líquido percolante através dos portas posicionados no corpo da coluna em PVC para diferentes tipos de solo. A técnica aplicada permitiu apenas a coleta de amostras compostas em virtude da baixa permeabilidade do solo.

✓ Efetuar ensaios que permitam trabalhar com diferentes gradientes hidráulicos, que conseqüentemente influenciariam na velocidade do fluxo pela coluna. A velocidade da água e permeabilidade do solo têm um papel crucial no transporte de nutrientes e microorganismos e, portanto, na sobrevivência destes últimos a biodegradação dos contaminantes.

✓ Repetir o ensaio executado utilizando-se soluções contaminantes de composição múltipla para verificação da interação entre os diferentes compostos e também do comportamento do solo sob condições mais próximas às reais.

- ✓ Realizar medidas da atividade microbiana em anaerobiose para comprovar o papel deste processo de biodegradação no ensaio realizado.
- ✓ Avaliar a formação de biofilme nas diversas condições de ensaio e seu papel na biodegradação e no comportamento dos dois solos.
- ✓ Realizar estudos relacionados à modelagem computacional para a verificação do comportamento referente ao avanço da frente de contaminação (fluxo), considerando o mecanismo de sorção na simulação devido ao teor de matéria orgânica do solo. No caso dos solos estudados, este valor era baixo.

REFERÊNCIAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas: NBR 6457 (1986) – Amostra de Solo – Preparação para Ensaio de Compactação e Ensaio de Caracterização.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas: NBR 6459 (1984) – Solo – Determinação do Limite de Liquidez.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas: NBR 6508 (1984) – Determinação da Massa Específica.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas: NBR 7180 (1984) – Solo – Determinação do Limite de Plasticidade.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas: NBR 7181 (1984) – Análise Granulométrica.

ADAM, G.; DUNCAN, H. *Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils*. Soil Biology & Biochemistry, vol. 33, p. 943-951, 2001.

ALABURDA, J.; NISHIHARA, L. *Presença de compostos de nitrogênio em águas de poços*. Revista de Saúde Pública, vol. 32; p.160-165, 1998.

ALCAMO, E. *Cliffs Quick Review Microbiology*. Wiley Publishing, Inc. Indianópolis, Indiana, 1996.

ALEXANDER, M. *Introduction to soil Microbiology*. 4ª Ed., Jonh Wiley, New Work, 472p., 1967.

ALMEIDA, M. H.; CARVALHO, F. P. *Manual de Operação do Landfarming*. PETROBRÁS – REPAR, Araucária, 1995.

ALVAREZ, P. J. J.; HUNT, C. S. The effect of fuel alcohol on monoaromatic hydrocarbon biodegradation and natural attenuation. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, v.44, nº 2, p.83-104, 2002.

ALVAREZ, P. J. J.; ILLMAN, W. A., *Bioremediation and natural attenuation: process fundamentals and mathematical models*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 1st ed., 608p, 2006.

ALVAREZ-COHEN, L. Engineering challenges of implementing *in situ* bioremediation. In: NATIONAL RESEARCH COUNCIL, *In situ* bioremediation: When does it work? National Academy Press, Washington, D.C., p.136-152, 1993.

ANDERSON, M. P. *Using models to simulate the movement of contaminants through groundwater flow systems*. CRC- Critical Reviews in Environmental Control. Vol. 9, p. 97-156, 1979 (citado por ROWE, 1995).

ANDERSON, R.T.; LOVLEY, D.R. *Anaerobic bioremediation of benzene under sulfate-reducing conditions in a petroleum-contaminated aquifer*. *Environmental Science and Technology*, 34, 2261-2266, 2000.

BAPTISTA, P. M., RIZZO, A. C. de. L. *Acompanhamento do processo de Atenuação Natural de solo contaminado por petróleo*. XII Jornada de Iniciação Científica do CETEM/MCT, 2004.

BEAR, J. *Dynamics of Fluids in Porous Media*. American Elsevier Publishing Company, Inc., U.S., 764p.,1972.

BEDIENT, P. B.; RIFAI, H. S.; NEWELL, C. J. *Groundwater Contamination: Transport and Remediation*. Prentice Hall, 2nd ed., New Jersey, 604p.,1999.

BINGHAM, F.T. Metal toxicity to agricultural crops. In: SIGEL, H., ed. *Metal ions in biological systems*. New York, Marcel Dekker, 1985. v. 20. p. 119-56.

BITTON, G., DAVIDSON, J. M., AND FARRAH, S. R. *Water, Air, and Soil Pollut.* 12, 449, 1979.

BORDEN, R. C. *Natural bioremediation of hydrocarbon-contaminated ground water*. Handbook of Bioremediation. CRC Press, Boca Ratón, FL., p. 177-199, 1994.

BORDEN, R. C.; GOMEZ, C. A.; BECKER, M. T. *Geochemical indicators of intrinsic bioremediation*. Ground Water, vol. 33, nº 2, p. 180-189, 1995.

BORDEN, R. C; BEDIENT, P. B. - Transport of dissolved hydrocarbons influenced by oxygen-limited biodegradation; Theoretical development, water resources research 13, p1973-1982, 1986.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. *Variáveis de qualidade das águas*. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp>>. Acesso em: 13 dez. 2009.

CFSEMG - Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais. *Recomendações para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais – 5ª aproximação*. Viçosa, 359p.,1999.

CHAPELLE, F. H. *Ground water microbiology & geochemistry*. N.Y. John Wiley & Sons Inc., 424p., 1993.

CHAPELLE, F. H. *Ground water microbiology & geochemistry*. N.Y. John Wiley & Sons Inc. 424p., 1993.

CHIOU, C. T.; MALCOLM, R. L.; BRINTON, T. I.; KILE, D.E. *Water solubility enhancements of some organic pollutants and pesticides by dissolved humic and fulvic acids*. Environmental Sciences and Technologies, vol. 20, nº 5, p. 502-508, 1986.

CLEARY, R. W. (1991). *Qualidade da Água Subterrânea*, in Hidrogeologia Ambiental, Rubem La Laina Porto (editor), Editora ABRH.

CORSEUIL H. X.; KAIPPER, B. I. A.; FERNANDES, M. *Cosolvency effect in subsurface systems contaminated with petroleum hydrocarbons and ethanol*. Water Research, Orlando, vol. 38, nº 6, p. 1449 - 1456, 2004.

CORSEUIL H. X.; MARINS, M. D. *Efeitos causados pela mistura de gasolina e álcool em contaminações de águas subterrâneas*. Boletim Técnico Petrobrás, Rio de Janeiro, vol. 41, nº 3/4, p. 133 -138, jul/dez, 1998.

CORSEUIL, H. X.; FERNANDES, M. *Efeito do Etanol no aumento da solubilidade de compostos aromáticos presentes na gasolina brasileira*. Revista Engenharia Sanitária e Ambiental, vol. 4, nº 1 e 2, p. 71 – 75, 1999.

CORSEUIL, H. X.; HUNT, C. S.; SANTOS, R. C. F.; ALVAREZ, P. J. J. *The influence of the gasoline Oxygenate Ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation*. Water Research, Orlando, vol. 32, nº 7, p. 2065 – 2072, 1998.

CORSEUIL, H. X.; KULKAMP, M. S. *Simultaneous Spills of diesel and ethanol – a controlled release experiment*. In: 7TH International in situ and on-site bioremediation symposium, Orlando, FL. Columbus-Richland: Battele Press, p.1-5, 2003.

CORSEUIL, H.X.; MARINS, M.D. *Contaminação de águas subterrâneas por derramamentos de gasolina: O problema é grave?* Revista Engenharia Sanitária e Ambiental, vol. 2, nº2, p. 50 – 54, 1997.

CUNHA, C.D. *Avaliação da biodegradação de gasolina em solo*. Dissertação de mestrado. Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 97p., 1996.

CUNHA, C.D. *Avaliação da biodegradação de gasolina em solo*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 97p., 1996.

DAVEE, K. W.; SANDERS, D. A. *Petroleum hydrocarbon monitored natural attenuation: essential framework for remedial managers*. Environmental Eng. vol. 128, nº 9, p. 862 – 867, 2000.

DE CAMPOS, T. M. *Aspectos teóricos e práticos de contaminação de águas subterrâneas: Estudos de Campo e Laboratório*. In: Seminário sobre Geotecnia

Ambiental: Contaminação de Solos e Águas Subterrâneas, Porto, Portugal. 2001. CD-Room/SPG/FEUP.

DEEB, R. A.; SHARP, J. O.; STOCKING, A.; McDONALD, S.; WEST, K. A.; LAUGIER, M.; ALVAREZ, P.J. J.; KAVANAUGH, M. C.; ALVAREZ-COHEN, L. *Impact of Ethanol on Benzene Plume Lengths: Microbial and Modeling Studies*. Journal of Environmental Engineering, vol. 128, p.868-875, 2002.

DIBBLE, J.T. & BARTHA, R. *Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 37, nº 4, p.729-739, 1979.

FERNANDO, A.F.B. Fe(III) como aceptor de elétrons na biodegradação de gasolina-etanol em solo tropical residual. Dissertação de Mestrado, Potifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, PUC-Rio, RJ, 112p, 2009.

FERREIRA, J.; ZUQUETTE, L. V. *Considerações sobre as interações entre contaminantes constituídos de hidrocarbonetos e os compostos do meio físico*. Geociências, vol. 17, nº 2, p. 527 - 557, 1998.

FETTER, C. W. *Contaminante Hydrogeology*. Macmillan Publishing Company, U. S., 458p., 1993.

FONTES, M.P.F. *Mineralogia dos solos*. Notas de aula, Universidade Federal de Viçosa, 2006.

GARLAND J.L. , MACKOWIAK C.L., ZABALOY M.C. *Organic waste amendment effects on soil microbial activity in a corn–rye rotation: Application of a new approach to community-level physiological profiling*. Applied Soil Ecology 44, 262–269. 2010.

GELHAR , L. W. ; MANTOGLU, A.; WELTY, C.; REHFELDT, K. R. *A review of field - scale physical solute transport processes in saturated and unsaturated porous media*. Electric Power Research Institute EPRI EA – 4190 Project 2485 – 5, 1985 (citado por ROWE, 1995).

GHIORSE, W. C.; WILSON, J. T. *Microbial ecology of the terrestrial subsurface*. Adv. Appl. Microbiol. V. 33. pp. 107-172, 1988.

GREEN, V.S.; STOTT, D.E.; DIACK, M. *Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples*. Soil Biology & Biochemistry, vol. 38, p.693-701, 2006.

GUIGUER, N. *Poluição das águas subterrâneas e do solo causada por vazamentos em postos de abastecimento*. Waterloo Hydrogeologic, Inc. 356p., 2000.

JACQUES, R.J.S. *Biorremediação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos no solo*. Tese de Doutorado. Departamento de Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 188p, 2005.

JACQUES, R.J.S.; BENTO, F.M.; ANTONIOLLI, Z.I.; CAMARGO, F.A.O. *Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos*. Ciência Rural. vol.37, nº.4, p. 1192-1201, 2007.

JORGE, C.; MOURA, C. R.; LOPES, M. L.; GOMES - COELHO, A. *Interacção de compostos orgânicos voláteis da gasolina com três tipos de solos. Parte I – Desenvolvimento do estudo de retenção*. Geotecnia, Revista da Sociedade Portuguesa de Geotecnia, nº 113, p. 55 – 83, 2008.

JORGE, C.A. *Contaminação/Descontaminação de solos com gasolina. Influência das características dos solos*. Tese de Dourado. Laboratório Nacional de Engenharia Civil, Universidade do Porto, Portugal, 450p, 2003.

LA GREGA, M.D. et al. Hazardous waste management. USA: McGraw Hill, Inc., 1994. 1146 p.

LANGENBACH, T. Biodegradação de xenobiontes, potencialidades e limites. In: ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Ed.) Microorganismos de importância agrícola. Brasília: EMBRAPA SP-1, 1994, cap. 7

LINKFIELD, T. G.; SUFLITA, J. M.; TIEDJE, J. M. *Characterization of the acclimation period before anaerobic dehalogenation of chlorobenzoates*. Appl. Environ. Microbiol., v. 55, p.2773-2778, 1989.

LOVLEY, D.R.; ANDERSON, R.T. *Influence of dissimilatory metal reduction on fate of organic and metal contaminants in the subsurface*. Hydrogeology Journal 8:77-88, 2000.

LOVLEY, D.R.; COATES, J.D. *Novel forms of anaerobic respiration of environmental relevance*. Current opinion in microbiology, 3:252-256, 2000.

LOVLEY, D.R.; PHILLIPS, E.J.P.; LONERGAN, D.J. *Enzymatic versus nonenzymatic mechanisms for Fe(III) reduction in aquatic sediments*. Environ. Sci. Technol., 25:1062-1067, 1991.

MADIGAN, T. M.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 10ª edição, São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MARETH, L.E.B; SCHAID, F.; MACIÉL, L. D.; REGINATTO, C.; CECCHIN, I.; THOMÉ, A. *Comparação da Técnica de Atenuação Natural aplicada em campo e em laboratório em um Solo Argiloso Residual*. In: VII Congresso Brasileiro de Mecânica dos Solos e Engenharia Geotécnica e VII Congresso Luso-Brasileiro de Geotecnia. Goiânia, GO, Brasil, 2014.

MARTINS, C.P. *Construção, instrumentação e monitoramento de um lisímetro in situ para avaliação da biodegradação de benzeno e tolueno em solo residual de gnaisse*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Civil. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 117p, 2010.

MARTINS, C.P.; AZEVEDO, I. D.; SILVA, W. R.; VARGAS, E. A; CUNHA-ÖSTERREICHER, P.; AZEVEDO, R. F.; TINÔCO, A. A. P. *In Situ Evaluation of benzene and Toluene Biodegradation in a Large Block of Gneissic Residual Soil*. Soils and Rocks, vol. 35, nº 3, p. 223-236, 2012.

MELQUIADES, R.A.; LOBO, I.; GUEDES, C.L.B.; PINTO, J.P. *Análise de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos em solos por headspace e*

cromatografia gasosa/detector de ionização de chama. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, vol.27, nº.2, p.113-120, 2006.

MENEGHETTI, L.R.R; SCHAID, F.; THOMÉ, A.; CAVELHÃO, G. Montagem de um Experimento Piloto in situ para Avaliação do Bioventing de um Solo Argiloso Contaminado com Biodiesel. In: VII Congresso Brasileiro de Engenharia Ambiental e V Simpósio Brasileiro de Geossintéticos. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2011.

METCALF & EDDY. Inc. *Wastewater Engineering treatment Disposal Reuse*. 4. ed. New York, McGraw - Hill, 1815p. 2003.

MEURER, E. J. *Fundamentos de química do solo*. Porto Alegre: Gênese, 2000.

MITCHELL, J.K. *Fundamentals of Soil Behavior*. John Willey & Sons, New York. 856p, 1976.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. Lavras: Ed. UFLA, 2002.

NASCENTES, R. *Estudo da mobilidade de metais pesados em um solo residual compactado*. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 153p, 2006.

NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, B.; NEVES, J. C. L. *Fertilidade do solo*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Viçosa, 1ª edição, 206p, 2007.

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

ÖSTERREICHER-CUNHA, P.; VARGAS JR, E.A.; GUIMARÃES, J.R.D.; DE CAMPOS, T.M.P.; NUNES, C.M.F.; COSTA, A.; ANTUNES, F.S.; PAIS DA SILVA, M.I. & MANO, D.M. *Bioventing of a gasoline-ethanol contaminated undisturbed soil*. J. Haz. Mat., vol. 110, p. 63-76, 2004.

ÖSTERREICHER-CUNHA, P.; VARGAS, E.A.; GUIMARÃES, J.R.D.; LAGO, G. P.; ANTUNES, F. S.; SILVA, M.I.P. *Effect of ethanol on the biodegradation of gasoline in an unsaturated tropical soil*. International Biodeterioration & Biodegradation, vol. 63, p. 208-216, 2009.

PAUL, E.A. & CLARK, F.E. *Soil Microbiology and Biochemistry*. San Diego, Academic Press, 1989.

POWERS, S.; HUNT, C. G.; HEERMANN, S. E.; CORSEUIL, H. X.; RICE, D.; ALVAREZ, J. J. *The transport and fate of ethanol and BTEX in groundwater contaminated by gasohol*. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, Philadelphia, v. 31, nº 1, p.79 - 123, 2001.

ROWE, R. K.; QUIGLEY, R. M. & BOOKER, J. R. *Clayer Barrier Systems for Waste Disposal Facilitie..* E & FN SPON, 1st ed., London, 390p, 1995.

RUDD, L. E.; PERRY, J. J.; HOUK, U. S.; WILLIAMS, R. W.; CLAXTON, L. D. *Changes in mutagenicity during crude oil degradation by fungi*. Biodegradation, v.7, p.335-343, 1996.

SANTOS, R. C. *Impacto do Etanol na Biodegradação de Compostos Hidrocarbonetos Monoaromáticos em Aqüíferos Contaminados por Derramamento de Gasolina*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, UFSC, 1996.

SCHNEIDER, M. R. *Intemperismo de fontes de contaminação em aquíferos impactados por derramamentos de gasolina e álcool e a influência sobre o risco à saúde humana*. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 192p., 2005.

SILVA, R.L.B. *Contaminação de poços rasos no bairro Brisamar, Itaguaí, RJ, por derramamento de gasolina: concentração de BTEX e avaliação da qualidade da água consumida pela população*. Tese de Doutorado.

Departamento de Saneamento Ambiental. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 182p., 2002.

SKIPPER, H. D. *Bioremediation of contaminated soils*. In: SYLVIA, D. M. et.al. (Ed.) *Principles and applications of soil microbiology*. New Jersey: Prentice Hall, p. 469-481, 1999.

SPILBORGHS, M. C. F. *Biorremediação de aquífero contaminado com hidrocarboneto*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, USP, SP, 112p., 1997.

SPINELLI, L. F. *Biorremediação, toxicidade e lesão celular em derrames de gasolina*. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 218p., 2005.

THIELE, J. M.; ZEIKUS, J.G. *Control of interspecies electron flow during anaerobic digestion significance of formate transfer versus hydrogen transfer during syntrophic methanogenesis in flocs*. Appl. Environ. Microbiol. p. 54 v. 20, 1988.

USEPA - U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. *Overview of the federal underground storage tank program*, 2003b. Disponível em: <<http://www.epa.gov/swrust1/overview.htm>> Acesso em: 14 abril 2013.

VELÁSQUEZ, L. G. R. *Análise numérica da degradação de misturas benzeno - etanol em meios subterrâneos*. Dissertação de Mestrado (em revisão), Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, PUC-Rio, RJ, 112p, 2015.

ZOBELL, C.E. *Action of microorganisms on hydrocarbons*. Bacteriological Review, vol. 10, p.1-49, 1946.