



BIORREMEDIAÇÃO, TOXICIDADE E LESÃO CELULAR EM DERRAMES DE GASOLINA

Leandro de Freitas Spinelli

Porto Alegre
Abril de 2005

LEANDRO DE FREITAS SPINELLI

**BIORREMEDIAÇÃO, TOXICIDADE E LESÃO CELULAR
EM DERRAMES DE GASOLINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia.

Porto Alegre

Abril de 2005

LEANDRO DE FREITAS SPINELLI

**BIORREMEDIAÇÃO, TOXICIDADE E LESÃO CELULAR
EM DERRAMES DE GASOLINA**

Esta Tese de Doutorado foi julgada adequada para a obtenção do título de DOUTOR EM ENGENHARIA e aprovada em sua forma final pelo professor orientador e pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 15 de abril de 2005

Prof. Fernando Schnaid
D.Phil. pela University of Oxford
Orientador

Prof. Fernando Schnaid
Coordenador do PPGEC/UFRGS

BANCA EXAMINADORA

Prof. Pedro Alberto Selbach (UFRGS)
PhD. pela Wisconsin University, USA

Prof. Fátima Menezes Bento (UFRGS)
DSc. pela Universidade Federal do
Rio Grande do Sul

Prof. Rosane Maria Salvi (PUCRS)
DSc. Pela Universidade Federal
do Rio Grande do Sul

**Prof. Tácio Mauro Pereira de Campos
(PUCRJ)**
D.Phil. pela London University, UK

À minha Família.

AGRADECIMENTOS

Às Universidades:



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA
DO RIO GRANDE DO SUL

Aos Órgãos Financiadores:



Às Empresas:



Ao Orientador

Fernando Schnaid, PhD., UFRGS

Aos Professores

Jarbas Rodrigues de Oliveira, PhD., PUCRS

Pedro Alberto Selbach, PhD., UFRGS

Fátima Menezes Bento, PhD., UFRGS

Aos Profissionais da UFRGS

Adão dos Santos; Carlos Alberto Bissani, PhD; Clésio Gianello, PhD; Dércio Scholles, PhD; Eder dos Santos, MSc; Elemar Antonino Cassol, PhD; Enilson Luiz Saccol de Sá, PhD; Flávio Oliveira Camargo, PhD; Jader Ribeiro Amaro; João Diniz; José Ferreira da Silva; Leandro Bochi da Silva Volk, MSc; Marino José Tedesco, PhD; Neroli Cogo, PhD; Rodrigo Jacques, MSc

Aos Profissionais da PUCRS

Aldaiza N.S.Aguiar; Carlos Graeff-Teixeira, MD, PhD; Carlos Luiz Reichel, MD; Édison Figueira dos Santos; Fabiana S.C. Soares; Fabiane Cristine Andrade; Fernanda Bordignon Nunes, PhD; Ivo Vedana, PhD; Izabel Cristina S. de Almeida, MD, MSc; José Neri da Silva; Laura Schumacher Schuh da Trindade; Leoni Bernardes da Fonseca; Luciano Diogo, MD, MSc; Luiz Cláudio D'Ávila, MSc; Luiz Fernando Rodrigues; Manoel May Pereira, MD; Melissa Guerra Simões Pires, PhD; Paulo Harald Wachter, MD, PhD; Renata Cristina Machado Wiltuschnig; Rosane Maria Salvi, MD, PhD; Rosiane de Oliveira Gonçalves; Vinícius Duval da Silva, MD, PhD

Aos Profissionais da Copesul S/A

João Ruy Dornelles Freire e Rosmari da Rosa Siqueira

Aos Profissionais da Petrobrás S/A

Alexandre Comparsi; Janaína Spier; Paulo Jorge Ribu de Freitas

Aos Profissionais da Mu-Mu Alimentos

Henrique Tell Vontobel, Henrique Vontobel e Harlei Mattis

Aos Colegas e Bolsistas

Bruna Selbach; Gisele Lovatel; Jairo A. Schlindwein; Janine V. Nascimento; José Antônio Poloni; Juliana M. Thurow; Núbia de Oliveira; Rosângela Rodrigues; Thiago Bombardelli; Vasył Custódio Saciura; Vanessa Dominguez

Aos Amigos

RESUMO

SPINELLI, L.F. Biorremediação, toxicidade e lesão celular em um derrame de gasolina. 2005. Tese (Doutorado em Engenharia) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, UFRGS, Porto Alegre.

O presente trabalho abrange um estudo integrado que busca as relações existentes entre processos de biorremediação de solos e alterações das condições fisiológicas dos organismos que habitam os locais contaminados. Nos estudos envolvendo biorremediação, analisou-se como um derrame de gasolina, simulado através de ensaios de laboratório em microcosmos, altera a microbiota do solo e a dinâmica dos contaminantes ao longo do tempo. Para tanto, avaliou-se a população microbiana (através de métodos de contagem direta e métodos qualitativos com lâmina enterrada, e identificação dos microrganismos), o nitrogênio mineral, o pH e a condutividade elétrica do solo, evolução de CO₂, cromatografia gasosa, além de ensaios de permeabilidade, pluviometria e agregação de partículas do solo. Observou-se que materiais orgânicos melhoram as características gerais dos solos ao final dos tratamentos, e ao mesmo tempo retém o contaminante – no caso gasolina – por um maior período de tempo. Existe uma evidente influência dos microrganismos nos processos de biorremediação de gasolina e do diesel analisados, comprovada através de cromatografia gasosa. Através de testes em modelo animal, analisados através de parâmetros sanguíneos, histologia, pH e condutividade elétrica de macerados de órgãos, observou-se alterações importantes no metabolismo dos animais e, em especial, identificou-se um novo teste – baseado na variação de condutividade elétrica – que pode auxiliar na análise fisiopatológica de órgãos com supostas lesões. Uma integração entre as áreas de Engenharia Geotécnica, Agronomia, Medicina, Biologia, Farmácia e Bioquímica foi obtida, provando a necessidade de projetos multidisciplinares no futuro da pesquisa.

Palavras-chave: biorremediação; contaminação ambiental; derrame gasolina; toxicidade e lesão celular.

ABSTRACT

SPINELLI, L.F. Bioremediation, toxicity and cellular lesions in gasoline spill. 2005. PhD. Thesis – Post Graduation Program in Civil Engineering, UFRGS, Porto Alegre.

This research consists of an integrated study to verify the relationships between bioremediation processes and physiological and biochemical alterations of the living organisms in contaminated sites. Bioremediation studies of gasoline spills were simulated by laboratory tests. Soil microbiology (direct plate counting, qualitative methods -buried lamina- and identifying), mineral nitrogen, pH and electrical conductivity, CO₂ evolution, gaseous chromatography, and also permeability, pluviometry and aggregation tests of soil particles were analyzed. It was observed that organic materials increase soil characteristics at the end of all treatments when compared to a control, and at the same time, maintain the contaminant – gasoline – for a larger period in soils. There is an obvious influence of the activity of the microorganisms in the bioremediation process of gasoline and diesel oil. Highest levels of moist maintain contaminants in soil, well identified by gaseous chromatography. Experimental tests with animal model (blood parameters, histology and pH and electrical conductivity of macerated organs) proved to be important in the prediction of alterations in animal metabolism, and in particular, a new test based on electrical conductivity to analyze pathologic lesions in organs such as kidney, lungs and bone marrow was identified. Integration among geotechnical engineering, agronomy, medicine, biology, and pharmacy and biochemistry was obtained which demonstrates the need of multidisciplinary projects.

Key words: bioremediation; environmental contamination; gasoline spill; toxicity and cellular lesion.

ABREVIATURAS

Acetil co-A: acetil coenzima A

ADP: adenosina difosfato

ALT: alanina aminotransferase

AST: aspartato aminotransferase

ATP: adenosina trifosfato

BTEX: benzeno, tolueno, etil-benzeno e xileno

CHCM: concentração hemoglobínica corpuscular média

CPK: creatinaquinase

CPK-MB: creatinaquinase fração MB

CS: citrato sintase

EDTA: ácido etileno diamino tetra-acético

ENA: anomalias nucleares eritrocitárias

EPA: Environmental Protection Agency

EROD: etoxiresorufina-O-dietilase

Hb: hemoglobina

Hct: hematócrito

HE: hematoxilina eosina

LDH: lactato desidrogenase

MPN: número mais provável

MTBE: metil terc-butil éter

MWD: diâmetro médio padrão

NAD⁺ e NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada e na forma reduzida

NPK: solução de nitrogênio, fósforo e potássio

PAH: hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

PCR: reação em cadeia da polimerase

RBC: células vermelhas sanguíneas

SNC: sistema nervoso central

SVOC: compostos orgânicos semi-voláteis

TPH: hidrocarbonetos de petróleo totais

VCM: volume corpuscular médio

VOC: compostos orgânicos voláteis

WAF: fração acomodada em água

WBC: células brancas sanguíneas

γ GT: gama glutamil transferase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Esquema montado para a realização da pesquisa	p.5
Figura 2.1: Habitat de solo contendo partículas minerais (Sa: areia, Si: silt, C: argila), matéria orgânica (OM), água (W), raízes (R), e microrganismos do solo [bactéria (B), actinomicetos (A), esporos de micorrizas e hifas (My), hifas de fungos saprofíticos (H), nematódio (N), protozoário ciliado (CP), e um mite (M)] (Sylvia et al., 1999).....	p.9
Figura 2.2: Bactérias no solo. A microscopia pode ser usada para a observação de bactérias no seu habitat natural. Bactérias visualizadas por fluorescência (Prescott et al., 1999).....	p.10
Figura 2.3: Estágios da formação de um biofilme: ancoragem, colonização e crescimento das estruturas (CBE, 2005).....	p.12
Figura 2.4: a) Secção transversal da colocação de sondas sensíveis ao O ₂ , em áreas de vazio e de aglomerados no biofilme, revelando que a região dos canais de água é aeróbia; região central do aglomerado é anaeróbia; b) Biofilme de cianobactérias, do gênero <i>Synechococcus</i> (CBE, 2005)	p.13
Figura 2.5: Diagrama de um reator preparado para o tratamento de um solo escavado contaminado (Fogel et al., 1989)	p.16
Figura 2.6: Tratamento de lençol freático in situ contaminado com hidrocarbonetos utilizando trincheira de infiltração e um poço de injeção (Morgan e Watkinson, 1989).....	p.18
Figura 2.7: Exemplo de uma placa utilizando o método proposto por Brown e Braddock (1990).....	p.19
Figura 2.8: Volatilização do benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos de um solo sob vários regimes de umidade (Frankenberger, 1992).....	p.27
Figura 2.9: Mineralização do diesel em ambiente aeróbio e anaeróbio (Frankenberger, 1992).....	p.31
Figura 2.10: Desaparecimento do TPH em diferentes profundidades (Zhou e Crawford, 1995).....	p.38

Figura 2.11: Efeito da concentração de etanol na degradação aeróbica de benzeno em microcosmo de aquífero (Corseuil e Alvarez, 1996)..	p.39
Figura 2.12: Distribuição vertical das fases dos hidrocarbonetos (EPA, 1996).....	p.41
Figura 2.13: Progressão do hidrocarboneto vazado de um tanque de armazenamento subterrâneo (EPA, 1996).....	p.42
Figura 2.14: Processos gerais que governam a gasolina na subsuperfície (Powers et al., 2001).....	p.45
Figura 3.1: Formação Botucatu no Estado do Rio Grande do Sul (Nuñez, 1991).....	p.59
Figura 3.2: Localização da jazida (Spinelli, 1999).....	p.60
Figura 3.3: Cromatograma típico de um óleo diesel.....	p.64
Figura 3.4: Visão geral dos experimentos: a) pote com solo + adição, mostrando ainda as lâminas enterradas e o sistema de captação de CO ₂ ; b) Visão do conjunto.....	p.66
Figura 3.5: Método da lâmina enterrada: a) esquema geral da lâmina enterrada; b) escolha das regiões representativas para as análises.....	p.68
Figura 3.6: Metodologia para contagem direta de microrganismos.....	p.70
Figura 3.7: Sistema utilizado para filtrar a gasolina.....	p.72
Figura 3.8: Placas de Elisa (multi-poços) utilizadas para quantificação de microrganismos degradadores de gasolina	p.72
Figura 3.9: Diagrama da estrutura morfológica de <i>Aspergillus sp.</i> (Maza et al., 1999).....	p.74
Figura 3.10: Diagrama de <i>Penicillium sp.</i> (Maza et al., 1999).....	p.74
Figura 3.11: (a) Visão geral do equipamento mostrando o headspace com amostras de solo e (b) amostras.....	p.77
Figura 3.12: Sistema de injeção dos voláteis.....	p.77
Figura 3.13: Cromatografia do solo controle com a solução padrão.....	p.77

Figura 3.14: Equipamento utilizado para os ensaios de agragados: a) aparato completo e b) detalhe do solo submergido.....	p.79
Figura 3.15: a) Visão geral dos tubos utilizados nos ensaios de permeabilidade e pluviometria; b) esquema dos ensaios com suas condições de contorno	p.80
Figura 3.16: <i>Rattus norvergicus</i> utilizados na pesquisa.....	p.82
Figura 3.17: Disposição dos animais ao redor do solo contaminado.....	p.82
Figura 3.18: Equipamento utilizado para medir parâmetros no sangue, urina e proteínas dos rins e pulmões dos animais.....	p.84
Figura 3.19: Visão geral da maceração dos órgãos dos animais.....	p.87
Figura 3.20: Ensaios de condutividade elétrica e pH.....	p.87
Figura 4.1: Liberação de CO ₂ durante os testes preliminares: a) ao longo dos 170 dias e b) visão expandida para 32 dias.....	p.91
Figura 4.2: CO ₂ total acumulado durante o período de ensaio preliminar (170 dias).....	p.92
Figura 4.3: Liberação de CO ₂ dos ensaios de biorremediação com a gasolina da REFAP: a) ao longo dos 220 dias e b) visão expandida para 32 dias.....	p.93
Figura 4.4: Liberação de CO ₂ total acumulado durante o período de ensaio (213 dias).....	p.94
Figura 4.5: Liberação de CO ₂ comparativa entre os dois lodos utilizados.....	p.95
Figura 4.6: Liberação de CO ₂ comparativa entre a gasolina de posto de combustível (com álcool) e a da REFAP (sem álcool).....	p.96
Figura 4.7: Comparativo entre o CO ₂ total das gasolinas utilizadas na pesquisa	p.97
Figura 4.8: Resultados observados nos testes com lâmina enterrada. A e B são, respectivamente, aumentos de 100x e 400x. 1) Solo Controle; 2) Solo + Lodo; 3) Solo + Gasolina; 4) Solo + Gasolina + Lodo; 5) Solo + Diesel; 6) Solo + Diesel + Lodo.....	p.99

Figura 4.9: Contagem de fungos ao longo do período de observação.....	p.100
Figura 4.10: Contagem de bactérias ao longo do período de observação	p.101
Figura 4.11: Medidas de pH do solo aos 65 e 95 dias medidos nos ensaios preliminares com gasolina e óleo diesel provenientes de um posto de combustível.....	p.104
Figura 4.12: Medidas do pH do solo nos ensaios com gasolina sem álcool	p.105
Figura 4.13: Medidas da condutividade elétrica nos ensaios com gasolina sem álcool.....	p.106
Figura 4.14: Nitrogênio mineral do solo nos tratamentos com a gasolina de posto de combustível (170 dias).....	p.107
Figura 4.15: Nitrogênio mineral do solo nos tratamentos com a gasolina da REFAP aos 65 e 170 dias.....	p.108
Figura 4.16: Curvas comparativas entre o solo com gasolina e com um bioestimulante (NPK) em relação à esterilização do solo e efeitos da microbiologia para o Benzeno.....	p.109
Figura 4.17: Curvas comparativas entre o solo com gasolina e com um bioestimulante (NPK) em relação à esterilização do solo e efeitos da microbiologia para o Tolueno.....	p.110
Figura 4.18: Curvas comparativas entre o solo com gasolina e com um bioestimulante (NPK) em relação à esterilização do solo e efeitos da microbiologia para o MTBE	p.110
Figura 4.19: Curvas comparativas entre o solo com gasolina e com um bioestimulante (NPK) em relação à esterilização do solo e efeitos da microbiologia para o C ₈ aromático.....	p.111
Figura 4.20: Curvas comparativas entre o solo com gasolina e com um bioestimulante (NPK) em relação à esterilização do solo e efeitos da microbiologia para o C ₉₊ aromáticos.....	p.112
Figura 4.21: Curvas comparativas dos ensaios de biorremediação em relação ao Benzeno.....	p.113
Figura 4.22: Curvas comparativas dos ensaios de biorremediação em relação ao Tolueno.....	p.113

Figura 4.23: Curvas comparativas dos ensaios de biorremediação em relação ao MTBE	p.114
Figura 4.24: Curvas comparativas dos ensaios de biorremediação em relação ao C ₈ aromático.....	p.115
Figura 4.25: Curvas comparativas dos ensaios de biorremediação em relação aos C ₉₊ aromáticos.....	p.115
Figura 4.26: Alteração do pH com o grau de contaminação com gasolina e diesel.....	p.117
Figura 4.27: Alteração do pH na água com o grau de contaminação com gasolina e diesel.....	p.117
Figura 4.28: Alteração da condutividade com o grau de contaminação com gasolina e diesel.....	p.118
Figura 4.29: Alteração da condutividade elétrica na água com o grau de contaminação com gasolina e diesel.....	p.119
Figura 4.30: Alteração da granulometria do solo com o grau de contaminação aos 180 dias.....	p.121
Figura 4.31: Alteração da granulometria do solo com o grau de contaminação aos 240 dias.....	p.121
Figura 4.32: Alteração do MWD no solo com o grau de contaminação aos 180 e 240 dias.....	p.122
Figura 4.33: Alteração das concentrações de Benzeno nas diferentes profundidades em relação ao tempo e ao regime pluviométrico aplicado	p.125-6
Figura 4.34: Alteração das concentrações de Tolueno nas diferentes profundidades em relação ao tempo e ao regime pluviométrico aplicado.....	p.128-9
Figura 4.35: Alteração das concentrações de MTBE nas diferentes profundidades em relação ao tempo e ao regime pluviométrico aplicado.....	p.131-2
Figura 4.36: Alteração das concentrações de C ₈ aromático nas diferentes profundidades em relação ao tempo e ao regime pluviométrico aplicado.....	p.134-5

Figura 4.37: Alteração das concentrações de C ₉₊ aromáticos nas diferentes profundidades em relação ao tempo e ao regime pluviométrico aplicado.....	p.137-8
Figura 4.38: Concentração dos diferentes contaminantes no tanque de solo contaminado nos diversos tempos de estudo.....	p.140
Figura 4.39: Concentração dos diferentes contaminantes no tanque de solo contaminado nos tempos inicial e com 48h.....	p.141
Figura 4.40: Alterações no WBC dos animais durante o período de ensaios.....	p.142
Figura 4.41: Alterações no RBC dos animais durante o período de ensaios.....	p.143
Figura 4.42: Alterações na hemoglobina dos animais durante o período de ensaios	p.144
Figura 4.43: Alterações no hematócrito dos animais durante o período de ensaios	p.144
Figura 4.44: Alterações no VCM dos animais durante o período de ensaios.....	p.145
Figura 4.45: Alterações no HCM dos animais durante o período de ensaios.....	p.145
Figura 4.46: Alterações no CHCM dos animais durante o período de ensaios	p.146
Figura 4.47: Alterações nas plaquetas dos animais durante o período de ensaios	p.146
Figura 4.48: Alterações nos linfócitos dos animais durante o período de ensaios.....	p.148
Figura 4.49: Alterações na creatinina sérica dos animais durante o período de ensaios.....	p.149
Figura 4.50: Alterações na creatinina urinária dos animais durante o período de ensaios.....	p.150
Figura 4.51: Alterações na uréia excretada pela urina dos animais durante o período de ensaios.....	p.150

Figura 4.52: Alterações na uréia sérica animais durante o período de ensaios.....	p.151
Figura 4.53: Alterações na AST dos animais durante o período de ensaios.....	p.152
Figura 4.54: Alterações na ALT dos animais durante o período de ensaios.....	p.152
Figura 4.55: Alterações na fosfatase alcalina dos animais durante o período de ensaios.....	p.153
Figura 4.56: Alterações nas proteínas totais no soro dos animais durante o período de ensaios.....	p.154
Figura 4.57: Alterações nas proteínas urinárias dos animais durante o período de ensaios.....	p.154
Figura 4.58: Alterações do sódio dos animais durante o período de ensaios.....	p.155
Figura 4.59: Alterações do potássio dos animais durante o período de ensaios	p.155
Figura 4.60: Alterações da glicose dos animais durante o período de ensaios.....	p.156
Figura 4.61: Alterações da LDH dos animais durante o período de ensaios	p.157
Figura 4.62: Alterações da Creatinaquinase dos animais durante o período de ensaios.....	p.158
Figura 4.63: Alterações das Frações MB dos animais durante o período de ensaios.....	p.158
Figura 4.64: Alterações da Troponina “I” dos animais durante o período de ensaios.....	p.159
Figura 4.65: Alterações do Cálcio Total dos animais durante o período de ensaios.....	p.160
Figura 4.66: Alterações do pH do macerado de rim dos animais durante o período de ensaios.....	p.161

- Figura 4.67: Alterações da condutividade elétrica dos macerados de rins dos animais normalizada por peso de rim durante o período de ensaios..... p.162
- Figura 4.68: Alterações da condutividade elétrica dos macerados de rins dos animais normalizada por peso de rim e por proteínas dos diversos períodos de ensaios..... p.162
- Figura 4.69: Alterações do pH dos macerados de pulmão dos animais durante o período de ensaios..... p.163
- Figura 4.70: Alterações da condutividade elétrica dos macerados de pulmão dos animais normalizada por peso de pulmão durante o período de ensaios..... p.164
- Figura 4.71: Alterações da condutividade elétrica dos macerados de pulmão dos animais normalizada por peso de pulmão e por proteínas durante o período de ensaios..... p.164
- Figura 4.72: Alterações do pH do plasma dos animais durante o período de ensaios..... p.166
- Figura 4.73: Alterações da condutividade elétrica do plasma dos animais normalizada por proteínas durante o período de ensaios p.166
- Figura 4.74: Alterações do pH urinário dos animais durante o período de ensaios..... p.167
- Figura 4.75: Alterações da condutividade elétrica da urina dos animais normalizada por proteínas urinárias durante o período de ensaios p.167
- Figura 4.76: Alterações histológicas da medula óssea em aumentos de 50x (coluna da esquerda) e 400x (coluna da direita), para o grupo controle (a, b), 0-24h de exposição (c, d), 24-48h (e, f), 48-72h (g, h) e 48h cumulativas (i, j) p.169-70
- Figura 4.77: Alterações histológicas dos pulmões em aumentos de 50x (coluna da esquerda) e 400x (coluna da direita), para o grupo controle (a, b), 0-24h de exposição (c, d), 24-48h (e, f), 48-72h (g, h) e 48h cumulativas (i, j) p.171-2

Figura 4.78: Alterações histológicas dos rins em aumentos de 50x (coluna da esquerda) e 400x (coluna da direita), para o grupo controle (a, b), 0-24h de exposição (c, d), 24-48h (e, f), 48-72h (g, h) e 48h cumulativas (i, j) p.173-4

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Concentrações de oxigênio e dióxido de carbono na atmosfera de um solo tropical nas condições úmido e seco (Russell, 1973).....	p.10
Tabela 2.2: Problemas relacionados a Biofilmes. Esta tabela resume os vários sistemas nos quais os biofilmes se formam com conseqüências indesejáveis (Adaptado de CBE, 2005).....	p.13
Tabela 3.1: Propriedades físicas e químicas do solo.....	p.61
Tabela 3.2: Características do lodo.....	p.62
Tabela 3.3: Composição química da gasolina do posto de combustível.....	p.62
Tabela 3.4: Composição química da gasolina da REFAP fornecida pela empresa.....	p.63
Tabela 3.5: Características do campo no microscópio.....	p.68
Tabela 3.6: Meios de Cultura utilizados.....	p.69
Tabela 3.7: Meios de Cultura para biodegradadores específicos.....	p.71
Tabela 4.1: Número de microrganismos avaliados pelo método da lâmina enterrada.....	p.98
Tabela 4.2: Microrganismos encontrados no lodo puro e no solo nos diferentes tratamentos ao final dos ensaios.....	p.102

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – A PESQUISA	p.1
1 INTRODUÇÃO	p.1
1.1 RISCOS AO AMBIENTE E AOS SERES VIVOS	p.1
1.2 JUSTIFICATIVA	p.2
1.3 OBJETIVOS DA PESQUISA	p.2
1.4 HIPÓTESES DA PESQUISA	p.3
1.5 O ESTUDO	p.4
1.6 PROTEÇÃO DOS DIREITOS DOS ANIMAIS	p.4
CAPÍTULO 2 – BIORREMEDIAÇÃO, TOXICIDADE E LESÃO CELULAR ...	p.6
2.1 BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS	p.6
2.1.1 Introdução	p.6
2.1.2 Microbiologia de Solos e seu Microambiente	p.8
2.1.3 Biofilmes	p.11
2.1.4 Metais Pesados nos Solos	p.14
2.1.5 Biorremediação	p.14
2.1.6 Considerações sobre População Microbiana de uma Área Contaminada com Hidrocarbonetos	p.18
2.1.7 Volatilização e Cromatografia	p.26
2.1.8 Mineralização dos Hidrocarbonetos de Petróleo	p.29
2.1.9 Propriedades Físico-Químicas dos Solos Contaminados e Parâmetros Ambientais	p.31
2.1.10 Formação de Agregados	p.36
2.1.11 Percolação de Contaminantes	p.38
2.1.12 Considerações Finais de Biorremediação	p.46
2.2 TOXICIDADE E LESÃO CELULAR CAUSADAS POR HIDROCARBONETOS	p.47

2.2.1 Introdução	p.47
2.2.2 Exposição Ambiental e Alterações Fisiológicas e Bioquímicas Causadas pelos Hidrocarbonetos	p.50
2.2.3 Alterações Elétricas Celulares	p.56
2.2.4 Considerações Finais em Toxicidade e Lesão Celular.....	p.57
CAPÍTULO 3 – METODOLOGIA DA PESQUISA	p.58
3 INTRODUÇÃO	p.58
3.1 SOLO UTILIZADO	p.58
3.2 LODO	p.59
3.3 FERTILIZANTE MINERAL	p.60
3.4 GASOLINAS	p.61
3.5 DIESEL	p.64
3.6 TEMPERATURA E UMIDADE	p.64
3.7 ENSAIOS DE BIORREMEDIAÇÃO	p.65
3.7.1 Liberação de CO ₂	p.65
3.7.2 Avaliação da População do Solo pelo Método da Lâmina Enterrada (Rossi-Cholodny)	p.67
3.7.3 Quantificação de Bactérias e Fungos	p.68
3.7.4 Identificação de Microrganismos	p.72
3.7.5 Avaliação do pH e da Condutividade Elétrica do Solo	p.73
3.7.6 Nitrogênio Mineral do Solo	p.75
3.7.7 Cromatografia Gasosa	p.76
3.7.8 Parâmetros de Contaminação do Solo	p.78
3.7.9 Ensaio de Agregados	p.78
3.7.10 Ensaio de Permeabilidade e Pluviometria	p.79
3.7.11 Caracterização do Solo em Relação a Metais Pesados	p.81
3.8 ENSAIOS DE TOXICIDADE E LESÃO CELULAR	p.81

3.8.1 Hemograma e Plaquetas	p.83
3.8.2 Dosagem da Creatinina e Uréia Sérica e Urinária, AST, ALT, γ GT, Fosfatase Alcalina, Proteínas Totais e Proteinúria, Sódio, Potássio, Glicose, LDH, CPK, CPK-MB, Troponina “T” e Cálcio Total	p.84
3.8.3 Histologia da Medula Óssea, dos Rins e dos Pulmões	p.85
3.8.4 Condutividade Elétrica e pH	p.86
3.8.4.1 Condutividade Elétrica e pH Renal e Pulmonar	p.87
3.8.4.2 Condutividade Elétrica e pH do Sangue e da Urina	p.88
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	p.88
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS	p.89
4.1 ENSAIOS DE BIORREMEDIAÇÃO EM ARENITO BOTUCATU	p.89
4.1.1 Liberação de CO ₂	p.89
4.1.2 Avaliação da População do Solo pelo Método da Lâmina Enterrada (Rossi-Cholodny)	p.97
4.1.3 Quantificação Microbiana: Bactérias e Fungos	p.98
4.1.4 Identificação de Microrganismos	p.101
4.1.5 Condutividade Elétrica e pH do Solo	p.102
4.1.6 Nitrogênio Mineral do Solo	p.106
4.1.7 Cromatografia Gasosa	p.107
4.1.8 Parâmetros de Contaminação do Solo	p.116
4.1.9 Ensaios de Agregados	p.120
4.1.10 Ensaios de Percolação e de Pluviometria	p.123
4.1.11 Presença de Metais Pesados no Solo	p.139
4.2 ENSAIOS EM MODELO ANIMAL	p.139
4.2.1 Cromatografia Gasosa do Solo Utilizado nos Ensaios com Modelo Animal	p.139
4.2.2 Hemograma e Plaquetas	p.140

4.2.3 Creatinina e Uréia Sérica e Urinária, AST, ALT, γ GT, Fosfatase Alcalina, Proteínas Totais e Proteinúria, Sódio, Potássio, Glicose, LDH, CPK, CPK-MB, Troponina “T” e Cálcio Total	p.148
4.2.4 Condutividade Elétrica e pH Celular	p.160
4.2.4.1 Condutividade Elétrica e pH Renal e Pulmonar	p.160
4.2.4.2 Condutividade Elétrica e pH do Sangue e da Urina.....	p.165
4.2.5 Histologia da Medula Óssea, Rins e Pulmões	p.168
4.2.6 Considerações Finais sobre Toxicidade e Lesão Celular.....	p.172
4.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	p.174
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES	p.176
5.1 BIORREMEDIAÇÃO DO SOLO	p.176
5.2 TOXICIDADE E LESÃO CELULAR EM MODELO ANIMAL	p.179
SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS	p.183
REFERÊNCIAS	p.184

CAPÍTULO 1 – A PESQUISA

1 INTRODUÇÃO

1.1 RISCOS AO AMBIENTE E AOS SERES VIVOS

Os hidrocarbonetos presentes nos combustíveis têm sido objeto de pesquisa, especialmente devido aos acidentes envolvendo derrames ambientais decorrentes de problemas durante o transporte, distribuição e armazenamento destes produtos. Diversos estudos na literatura tratam de processos de recuperação e biorremediação de áreas contaminadas, assim como da intoxicação aguda ou crônica de benzeno e tolueno em frentistas, pintores, artistas gráficos etc. Nos processos de biorremediação, os microrganismos nativos do solo (ou indígenas) utilizam os hidrocarbonetos do petróleo como fonte de carbono (C) e energia ao seu crescimento nos solos. A degradação completa destes hidrocarbonetos resulta em produtos finais atóxicos como dióxido de carbono (CO₂), água (H₂O) e biomassa celular. Diversos tratamentos podem ser utilizados para acelerar a retirada dos hidrocarbonetos do solo, como compostos orgânicos ou soluções nutritivas (Bioestimulação) aos microrganismos, como soluções com nitrogênio, fósforo e potássio (NPK). Além disso, poucos estudos mostram de forma eficaz a relação entre a exposição a estes hidrocarbonetos durante um processo de contaminação (derrame) e os efeitos em animais quanto a lesões pulmonar, renal, hematológica ou hepática. Não foi bem avaliado, até o momento, o que ocorre com uma população que viva ao redor de vazamentos de combustíveis. Muito se ouve a respeito de grandes derrames de gasolina e óleos em geral, mas não são delimitados os tempos em que as pessoas devam permanecer afastadas dos locais destes derrames durante o tratamento ambiental. Os problemas ambientais têm, portanto, natureza eminentemente MULTIDISCIPLINAR, envolvendo profissionais de várias áreas do conhecimento.

1.2 JUSTIFICATIVA

Áreas contaminadas com hidrocarbonetos têm sido um problema cada vez mais constante. Neste estudo, foi escolhido o solo da denominada Formação Botucatu para as análises da contaminação, pois é um solo de boa representatividade no Estado do Rio Grande do Sul. A dificuldade na escolha do processo adequado de biorremediação (superficial ou profunda) e sua execução são objeto de estudo cada vez mais freqüente. Além disso, a remoção de famílias ou comunidades inteiras dos locais acometidos pelas contaminações acarretam em elevados custos. Basicamente, buscam-se respostas para as seguintes questões: no caso de um derrame de gasolina em um solo (neste caso Arenito Botucatu), qual a profundidade que os hidrocarbonetos podem atingir? Qual a influência da pluviometria no local? Que parâmetros podem ser utilizados em um processo de biorremediação superficial? Qual a importância de bioestimulantes? Um lodo industrial teria uma melhor aplicação que um fertilizante mineral? Qual a fase mais crítica no que tange intoxicação e lesão para as populações locais durante um processo de biorremediação? O que ocorre com estas populações durante exposições agudas em diferentes tempos de derrame?

1.3 OBJETIVOS DA PESQUISA

O objetivo desta pesquisa é realizar um estudo multidisciplinar envolvendo técnicas de biorremediação de gasolina e diesel (estudo preliminar) em um solo contaminado artificialmente em laboratório, visando a avaliação da influência de alguns parâmetros como o pH, condutividade elétrica, migração dos hidrocarbonetos no solo, com e sem pluviometria, através da utilização de cromatografia gasosa, população microbiana, nitrogênio mineral, formação de agregados e avaliação de metais pesados. Também tem como objetivo definir e estudar a toxicidade celular renal, hepática, hematológica e pulmonar provocada através da aspiração de voláteis de gasolina em ratos expostos a um solo contaminado propositalmente em laboratório. Foi avaliada a relação entre a condutividade elétrica dos órgãos macerados e a sua histologia. Foram avaliados os seguintes grupos em microcosmos:

- solo controle;

- solo + lodo resíduo de uma indústria alimentícia;
- solo + gasolina;
- solo + diesel (piloto);
- solo + gasolina + lodo resíduo de uma indústria alimentícia;
- solo + diesel + lodo resíduo de uma indústria alimentícia (piloto);
- solo + gasolina + lodo resíduo de uma indústria alimentícia + NPK;
- solo + gasolina + NPK;

A intoxicação e a lesão celular provocada em animais foram estudadas através da exposição (24 e 48 horas) do contaminante aos diferentes grupos, em um solo contaminado artificialmente com gasolina:

- ratos controle;
- ratos expostos por 24h aos voláteis desde o tempo zero, trocados a cada 24h;
- ratos expostos por 48h para analisar efeitos cumulativos;

1.4 HIPÓTESES DA PESQUISA

As características de um solo contaminado podem ser melhoradas através de processos bioquímicos e microbiológicos. A avaliação do pH e da condutividade elétrica dos solos e fluídos pode auxiliar na caracterização, identificação e mapeamento de áreas contaminadas. A análise da migração da contaminação de hidrocarbonetos no solo através de cromatografia pode ser útil na previsão do estágio em que se encontra o processo de biorremediação. Parâmetros como a evolução de CO₂, nitrogênio mineral e microbiota podem servir como indicativos da capacidade do solo em remediar contaminações. E a análise da dispersão dos contaminantes através de ensaios de cromatografia gasosa nos solos contaminados, com e sem pluviometria controlada, pode servir como modelo para prever futuros comportamentos do

binômio solo-contaminante em ambiente natural. O controle e a remediação de solos impõe o conhecimento dos fenômenos de interação solo-microorganismos-bioquímica.

Populações que vivem em locais onde houve vazamentos de gasolina podem apresentar alterações renais, hepáticas e medulares que perduram durante o processo de biorremediação do combustível. A exposição aguda aos hidrocarbonetos pode acarretar danos aos tecidos em função do tempo necessário para a retirada dos poluentes do solo. Estudos com cobaias podem auxiliar no entendimento dos processos decorrentes de toxicidade e lesão celular causados pela inalação dos contaminantes do solo.

1.5 O ESTUDO

O estudo consistiu em duas etapas (Figura 1.1):

- a) Ensaio de Biorremediação: realizados e analisados no Laboratório de Microbiologia Agrícola e do Ambiente e no Laboratório de Fertilidade da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; análises complementares de Microbiologia: realizadas no Laboratório de Microbiologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; Análises especiais de cromatografia foram feitas na Copesul S/A;
- b) Ensaio de Toxicidade e lesão celular em modelo animal: realizados no Laboratório de Biofísica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e analisados pelos Laboratórios de Bioquímica, Microbiologia e Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS;

1.6 PROTEÇÃO DOS DIREITOS DOS ANIMAIS

A pesquisa em modelo animal foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS (Ofício nº 492/04-CEP em 20 de julho de 2004), considerando os procedimentos apresentados na Lei nº 6.638 (08/05/1979) e na Declaração Universal dos Direitos dos Animais, UNESCO, Bruxelas (28/01/1978).

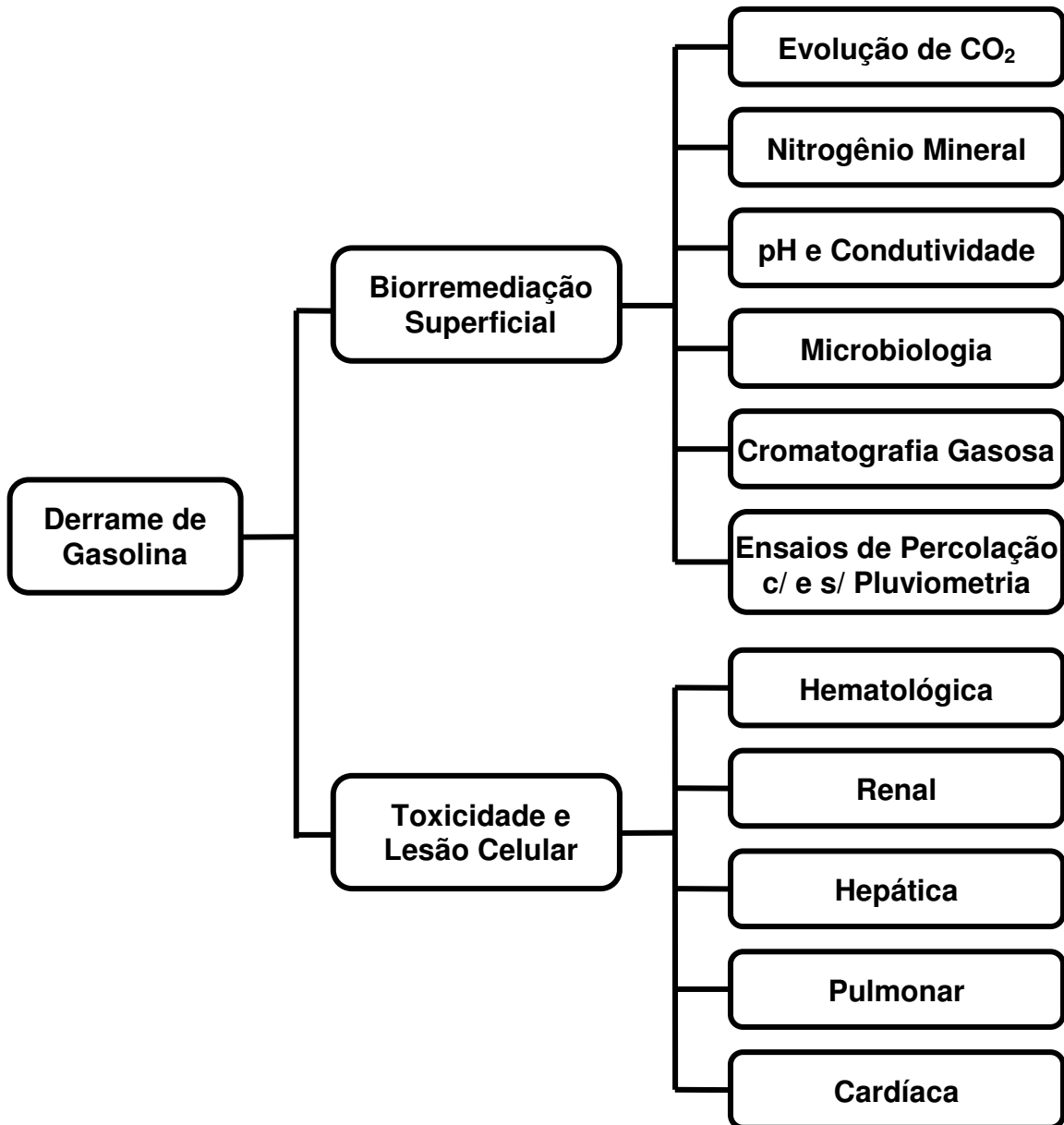


Figura 1.1: Esquema montado para a realização da pesquisa

CAPÍTULO 2 – BIORREMEDIAÇÃO, TOXICIDADE E LESÃO CELULAR

2.1 BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS

2.1.1 Introdução

Zhou e Crawford (1995) observam que a contaminação de solos com gasolina, diesel, óleos em geral e outros produtos de petróleo através de vazamentos, derrames e por outras fontes tem se tornado importante foco de pesquisa. Compostos contidos na gasolina como o benzeno, tolueno, etil-benzeno e isômeros de xileno (BTEX) são contaminantes especialmente perigosos e estão entre as prioridades na lista de remediação do *Environmental Protection Agency (EPA)*. Vazamentos advindos de tanques de combustíveis são uma das maiores fontes de contaminação de gasolina, e é estimado que mais de 10% dos 3,5 milhões de tanques de armazenamento de produtos de petróleo estejam vazando nos EUA e tenham causado mais de 300.000 incidentes ambientais. Os vazamentos não apenas contaminam os ecossistemas dos solos, mas são também uma potencial fonte de contaminação para os aquíferos a longo prazo (Zhou e Crawford, 1995).

Os hidrocarbonetos contaminantes de solos e lençóis freáticos podem ser removidos destes locais através de diversos métodos, como por exemplo “air spraying”, extração de vapor do solo e biorremediação. Estratégias para uma biorremediação “in situ” barata e limpa incluem a atenuação natural, bioestimulação, “bioventing”, “bioaugmentação”, “land-farming”, compostagem e fitorremediação. Estes mais diversos métodos podem ser vistos em um grande número de publicações que relatam processos de biorremediação e biodeterioração de gasolina (Solano-Serena et al., 1999; Cunha e Leite, 2000; Passman et al., 2001) e diesel (Richard e Vogel, 1999; Olson et al., 1999; Bento e Gaylarde, 2001; Gallego et al., 2001; Bento et al., 2004) em solos. Frankenberger (1992) apresenta os princípios básicos da biorremediação, que está se tornando um método bastante popular na limpeza de hidrocarbonetos devido à sua simplicidade e aplicabilidade a grandes áreas, baixo custo e

eficiência, favorecendo a completa destruição dos contaminantes. Microrganismos nativos dos solos podem utilizar os hidrocarbonetos como fonte de carbono (C) e energia para o seu crescimento e proliferação nos solos. A degradação completa dos hidrocarbonetos (mineralização) pela população microbiana resulta na formação de produtos inócuos como dióxido de carbono (CO₂), água (H₂O) e biomassa celular como produtos finais (Frankenberger, 1992; Alexander, 1994; Paul e Clark, 1996).

O ‘land farming’ ou ‘land treatment’ tem sido freqüentemente utilizada pela indústria para degradar resíduos e se tornou um processo freqüente para o tratamento de materiais ricos em hidrocarbonetos que foram derramados sobre o solo (Alexander, 1994). A biodegradação de óleos pode ser estimulada pela adição de nutrientes, promoção de aeração, fornecimento de umidade adequada e incidência luminosa (Frankenberger, 1992; Alexander, 1994; Prescott et al., 1999; Tedesco et al., 1999; Selbach e Camargo, 2001). A umidade do solo é um fator limitante para as rápidas transformações microbianas, sendo então necessárias formas de manter níveis de umidade ótimos para os organismos aeróbicos. Estas técnicas já são padronizadas para o controle de aterros sanitários na Engenharia Civil.

Os efeitos de co-solvência também são importantes, já que a gasolina brasileira contém álcool, componente que é miscível em água. O incremento da solubilidade dos componentes benzeno, tolueno, etil-benzeno e xileno (BTEX) em água é devido ao fato do álcool migrar para a fase aquosa (Corseuil e Fernandes, 1999). Uma vez que a gasolina brasileira contém aproximadamente 22-24% de etanol (Cunha e Leite, 2000; Cordazzo et al., 2000), os efeitos de co-solvência devem ser considerados, não somente pelos BTEX serem relativamente solúveis em água, mas por também serem cancerígenos (Frankenberger, 1992; Friedman, 1996; Klaassen, 2003; Kumar et al., 2005).

Existem diversas técnicas que direta ou indiretamente monitoram os processos dinâmicos que ocorrem durante a biorremediação. Para tanto, são necessárias informações básicas, como a concentração de óleo residual, densidade de microrganismos degradadores de óleo, propriedades químicas e físicas do solo (como a evolução de CO₂, alterações do pH ou condutividade elétrica do solo, nitrogênio inorgânico), o potencial de biodegradação e as taxas ideais de fertilizantes químicos a serem aplicados (Frankenberger, 1992; Alexander, 1994; Tedesco et al., 1999). Estas técnicas foram utilizadas em uma das etapas deste trabalho experimental para avaliar o comportamento de um lodo orgânico como promotor da

decomposição de diesel e gasolina no solo de Arenito Botucatu, comparadas a adição de um fertilizante mineral (NPK) e também a um solo sem qualquer tratamento. Os resultados obtidos neste tipo de testes de laboratório podem servir de base para se poder prever a remediação de uma área contaminada por hidrocarbonetos, uma vez que os fatores limitantes dos microcosmos foram adequadamente considerados. Derrames de diesel e gasolina em solos podem ocorrer como consequência de acidentes durante o transporte, armazenamento ou bombeamento, e o conhecimento de alternativas de remediação é imprescindível (Spinelli et al., 2005).

Dada a complexidade do problema decorrente da variedade de processos associados à biorremediação, esta revisão aborda alguns dos fenômenos considerados essenciais à presente análise, como microbiologia de solos, biofilmes, efeitos decorrentes da presença de metais pesados e técnicas de biorremediação existentes, além de aspectos ligados a toxicidade e lesão celular.

2.1.2 Microbiologia de Solos e seu Microambiente

Algumas características dos solos influenciam diretamente a disponibilidade de nutrientes e os processos microbiológicos e bioquímicos (Prescott et al., 1999). Um diagrama esquemático de um solo típico é mostrado na Figura 2.1. A parte orgânica decorre de plantas, animais, insetos e outros materiais adicionados, os quais são gradualmente transformados em humus rico em nutrientes. Estes variados componentes formam agregados heterogêneos de vários tamanhos, contendo uma complexa rede de poros. Bactérias e fungos utilizam diferentes estratégias funcionais para aproveitar esta complexa matriz física. A maioria das bactérias do solo se localiza na superfície das partículas do solo e necessitam água e nutrientes na sua imediata vizinhança (Figura 2.2). Bactérias são mais frequentemente encontradas em superfícies de menor porosidade (2 a 6 μm em diâmetro). Nesta condição, é menos provável que sejam o alimento de protozoários, ao invés de outras que se expõem no exterior da superfície de grãos de areia ou partículas de matéria orgânica (Prescott et al., 1999; Paul e Clark, 1996).

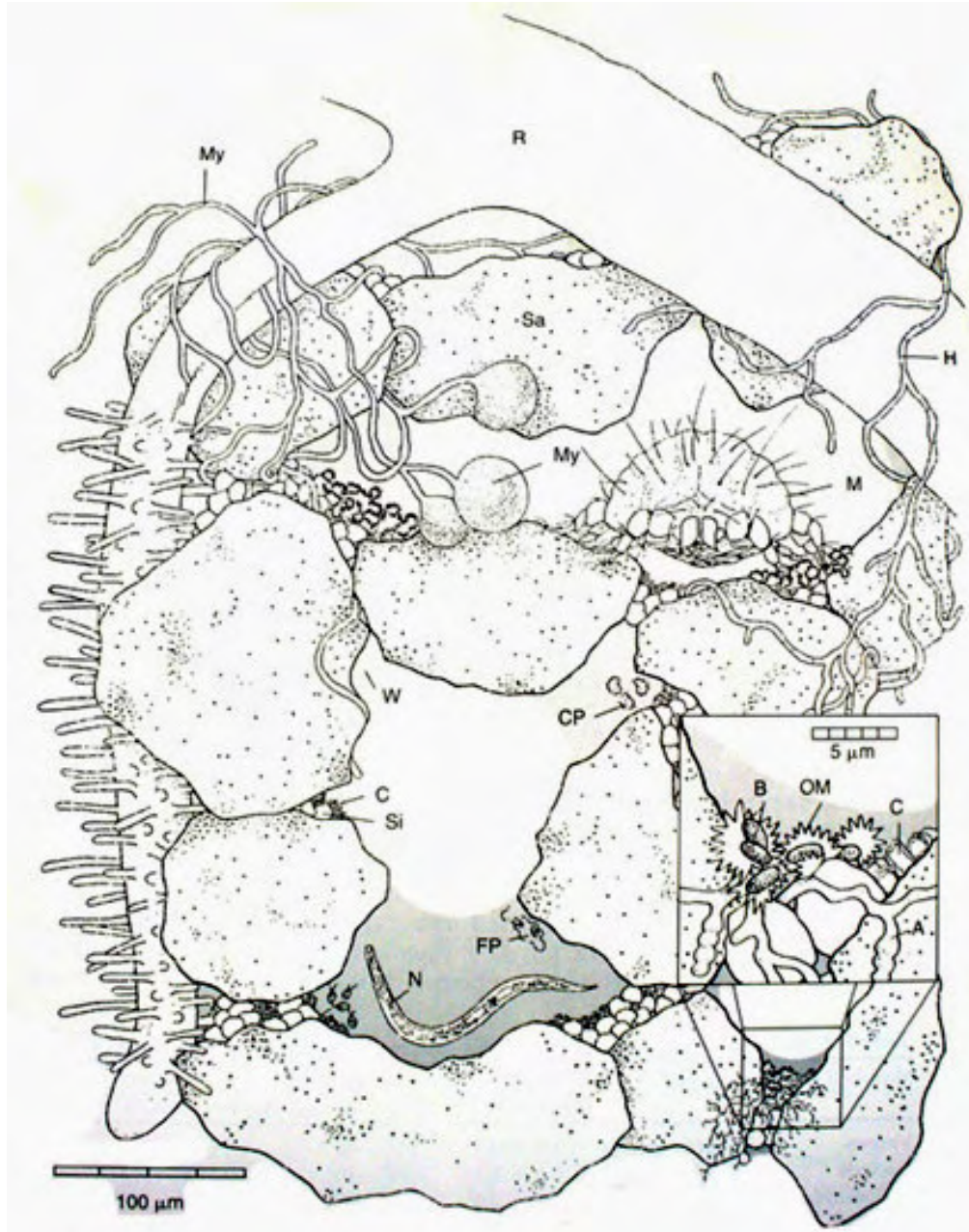


Figura 2.1: Habitat de solo contendo partículas minerais (Sa: areia, Si: silt, C: argila), matéria orgânica (OM), água (W), raízes (R), e microrganismos do solo [bactéria (B), actinomicetos (A), esporos de micorrizas e hifas (My), hifas de fungos saprofitos (H), nematódio (N), protozoário ciliado (CP), e um mite (M)] (Sylvia et al., 1999)

Os fungos filamentosos, em contraste, tendem a se localizar fora dos agregados. Estes organismos, através de crescimento filamentosos, formam pontes entre regiões separadas, nas quais a umidade é mantida (Prescott et al., 1999). Os fungos filamentosos podem mover nutrientes e água por grandes distâncias nos solos. Protozoários, insetos de solo, nematódios e outros animais de solo também estão presentes. Muitos destes organismos se alimentam de bactérias e fungos.

Devido às limitações de difusão dos gases por dentro e por fora dos agregados e a possibilidade dos espaços estarem saturados, grandes mudanças em sais dissolvidos e gases podem ocorrer nestes pequenos poros e microambientes. Solos geralmente têm altas concentrações de CO_2 , CO e outros gases em comparação com a atmosfera, e uma correspondente diminuição da concentração de O_2 (Tabela 2.1). Tais mudanças serão mais acentuadas em porosidades menores, onde muitas bactérias são encontradas. Podem ser formados gradientes de oxigênio e microambientes anaeróbios. Quando isso ocorre, o solo rapidamente passa de uma condição aeróbia, com alguns microambientes anaeróbios, para um meio predominantemente anaeróbio. À medida que se distancia da superfície, menos O_2 permanece disponível, especialmente em ambientes úmidos, menos permeáveis (Prescott et al., 1999).

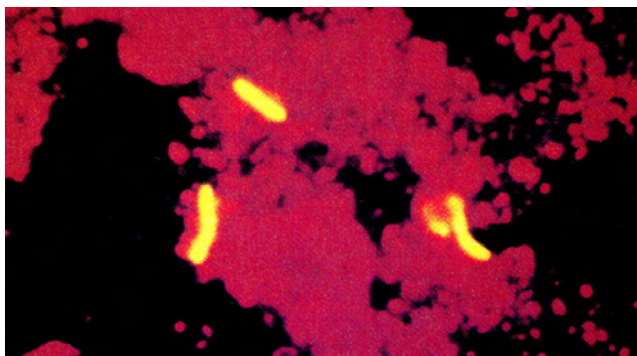


Figura 2.2: Bactérias no solo. A microscopia pode ser usada para a observação de bactérias no seu habitat natural (Prescott et al., 1999).

Tabela 2.1: Concentrações de oxigênio e dióxido de carbono na atmosfera de um solo tropical nas condições úmido e seco (Russell, 1973).

Profundidade (cm)	Oxigênio (%)		Dióxido de carbono (%)	
	Úmido	Seco	úmido	seco
10	13,7	20,7	6,5	0,5
25	12,7	19,8	8,5	1,2
45	12,2	18,8	9,7	2,1
90	7,6	17,3	10,0	3,7
120	7,8	16,4	9,6	5,1

Outros fatores físicos também influenciam os microrganismos. Em pH neutro, a maioria dos componentes sólidos do solo, incluindo os microrganismos, estão negativamente carregados. Íons positivamente carregados como os de hidrogênio e de amônio são atraídos a estas superfícies negativamente carregadas. Este fator pode alterar os microambientes. Argilas e humus – que consistem em matéria orgânica parcialmente degradada ou estabilizada – também atraem e combinam uma variedade de substâncias orgânicas e inorgânicas. Isso inclui muitos íons de metais e produtos de decomposição (Prescott et al., 1999).

2.1.3 Biofilmes

Durante os processos de biodegradação ocorre a formação de biofilmes (Maier et al., 2000; CBE, 2005). O biofilme é uma camada de matéria orgânica e microrganismos formado pela ancoragem e proliferação de bactérias à superfície de um objeto. Os biofilmes são caracterizados pela presença de polímeros extracelulares bacterianos que criam uma camada de limo em superfícies sólidas como metais, plásticos, partículas de solo, implantes médicos, tecidos vegetais ou animais (Figura 2.3 e Tabela 2.2). A secreção de polissacarídeos promove uma matriz de ancoragem de células bacterianas e forma a arquitetura interna da comunidade do biofilme. Esta matriz também influencia o funcionamento e sobrevivência dos biofilmes em ambientes hostís. O biofilme pode ser formado por bactérias de uma única espécie, mas mais frequentemente consiste de muitas espécies, assim como também de fungos, algas, protozoários, detritos e produtos de corrosão. Essencialmente, biofilmes podem se formar em qualquer superfície exposta a bactérias e um pouco de umidade. Uma vez ancorados a uma superfície, os microrganismos formadores do biofilme acarretam uma variedade de reações prejudiciais ou benéficas à saúde pública, dependendo das condições ambientais à sua volta. Biofilmes implicam em 65% das infecções bacterianas humanas, causam colmatação, contaminação de produtos, falha em equipamentos, e decréscimo de produtividade devido ao tempo para se limpar os sistemas e reparos (CBE, 2005).

Muitas bactérias são planctônicas – flutuam na água. Entretanto, a maioria das bactérias que causam problemas é sésil – aderem a superfícies – e vivem em biofilmes. Atualmente sabe-se que uma bactéria, ao ancorar-se a uma superfície, "liga" diferentes tipos de genes, os quais as "transformam" efetivamente em diferentes organismos. Recent es estudos têm revelado que

existem significativas diferenças no nível da expressão dos genes e envolvem ciclos de nutrientes entre os membros de uma espécie bacteriana (Maier et al., 2000; CBE, 2005).

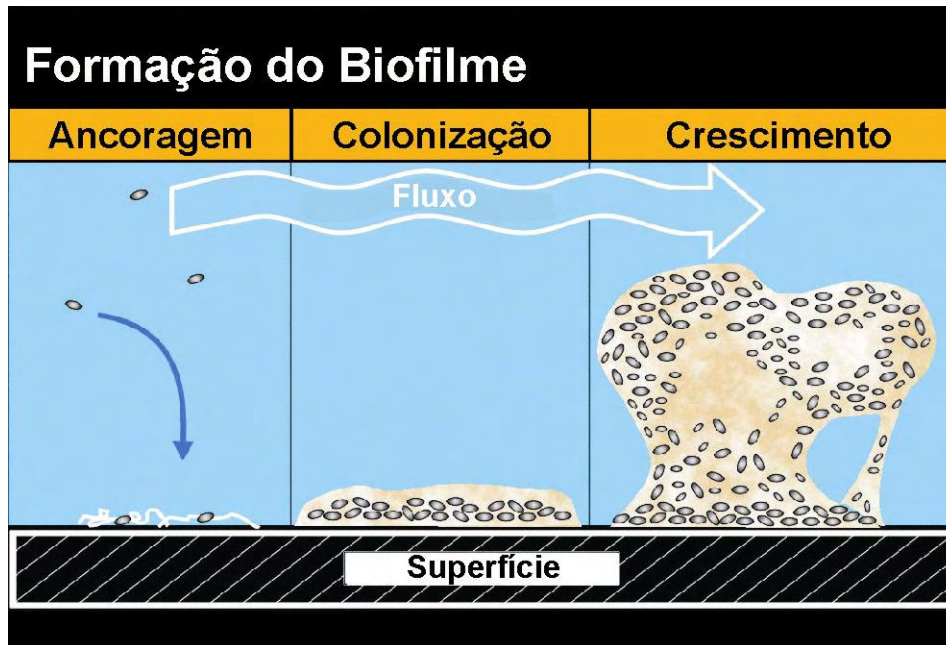


Figura 2.3: Estágios da formação de um biofilme: ancoragem, colonização e crescimento das estruturas (CBE, 2005).

O comportamento dos biofilmes bacterianos é muito mais complexo que o das células suspensas, pois as bactérias vivem em comunidades no biofilme. Dentro destas populações, aparentemente há uma "divisão de trabalho"; enquanto algumas células utilizam a energia disponível para acionar rotas metabólicas que afetam parte da degradação de compostos orgânicos, outras células adjacentes da mesma população utilizam os produtos degradados para produzir novas células que são adicionadas ao ambiente (Maier et al., 2000; CBE, 2005).

Na Figura 2.4 se observa a secção transversal de um biofilme e a introdução de sondas sensíveis ao O_2 , com áreas de vazios e de aglomerados no biofilme, revelando que a região dos canais de água é aeróbia. A região central do aglomerado é anaeróbia. Este é um fato muito importante, visto que um intenso aglomerado protege e permite a sobrevivência de células anaeróbias em seu interior. Ao contrário, regiões em que ocorre fluxo de água apresenta vida aeróbia, pois carrega O_2 em seus fluídos. E na Figura 2.4b observa-se uma fotografia de um biofilme utilizando-se um microscópio de varredura a laser ("tapete" microbiano termofílico encontrado no Parque Nacional Yellowstone, células de cianobactérias do gênero *Synechococcus* – CBE, 2005).

Tabela 2.2: Problemas relacionados a Biofilmes. Esta tabela resume os vários sistemas nos quais os biofilmes se formam com conseqüências indesejáveis (Adaptado de CBE, 2005)

Sistema	Impacto da formação do Biofilme
Torres de resfriamento de águas	Redução das transferências de calor e massa
Trocadores de calor	Redução das transferências de calor
Fabricação de papéis	Degradação da qualidade do produto
Processamento de alimentos	Contaminação
Processamento de fotografias	Manchas de impressão, falhas de equipamento
Osmose reversa	Redução da permeabilidade das membranas, degradação de materiais
Piscinas	Riscos à saúde, degradação de cosméticos
Drenos	Diminuição fluxo, colmat. geotêxteis
Equipamentos	Corrosão e biodeterioração
Recuperação de poços	Colmatação dos poços de injeção de água, fontes (produção de sulfeto de hidrogênio) e corrosão
Bombas de água potável	Riscos à saúde

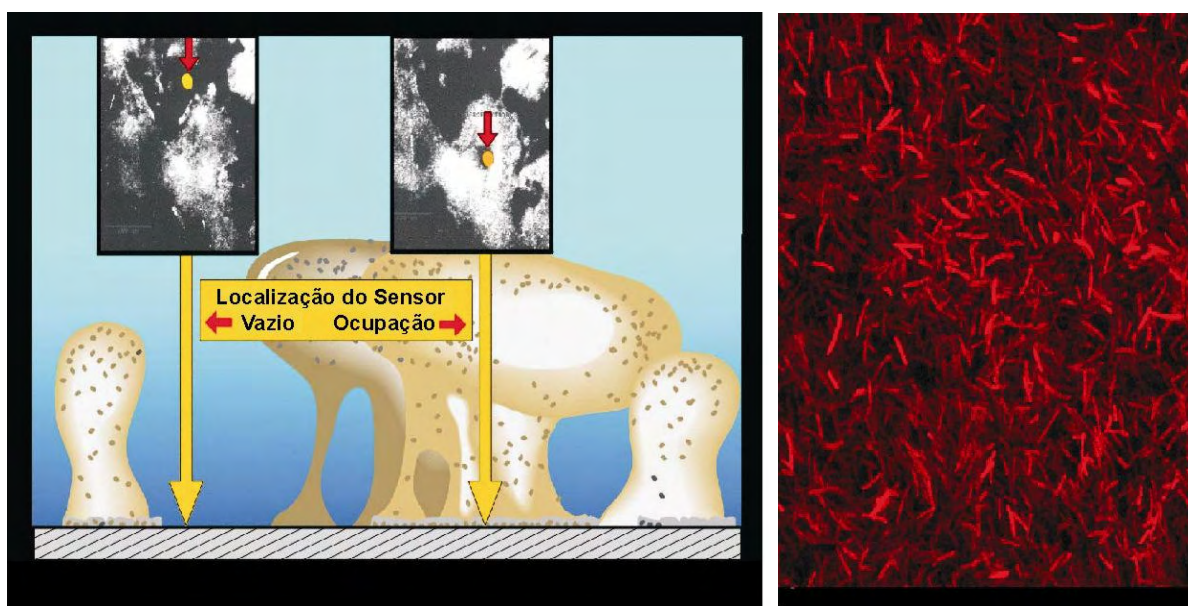


Figura 2.4: a) Secção transversal da colocação de sondas sensíveis ao O_2 , em áreas de vazio e de aglomerados no biofilme, revelando que a região dos canais de água é aeróbia; região central do aglomerado é anaeróbia; b) Biofilme de cianobactérias, do gênero *Synechococcus* (CBE, 2005)

2.1.4 Metais Pesados nos Solos

Frankenberger (1992) comenta que os efeitos inibitórios dos metais pesados podem influenciar na biodegradação de materiais orgânicos. A presença de metais pesados nas borras oleosas, óleos de motores entre outros acarreta em efeitos deletérios para os microrganismos oxidadores de carbono na decomposição de hidrocarbonetos. Jensen (1977) estudou os efeitos do chumbo na biodegradação de óleos em solos e mostrou que o elemento pode causar certas mudanças nas populações de solo. Tornabene e Edwards (1972) relatam que o chumbo pode ser imobilizado e está largamente associado às membranas celulares microbianas e não com a fração citoplasmática. Os solos apresentam naturalmente chumbo em torno de 15 a 100 ppm. (Frankenberger, 1992). Outros elementos de importância incluem o Zn, Cu, Cr, Ni e Cd. Em aplicações repetidas de lodos oleosos em procedimentos de ‘landfarming’, os metais pesados podem se acumular em níveis tais que reduzam a biodegradação. Entretanto, muitos destes elementos são fortemente imobilizados nos solos como resultado de formação de complexos com matéria orgânica e absorção a minerais argilosos. Os íons de cádmio são mais tóxicos aos microrganismos do que o chumbo, além da biodisponibilidade do cádmio em solos geralmente ser maior que a do chumbo para iguais concentrações (Frankenberger, 1992; Alexander, 1994).

Gomes et al. (1998) fazem uma revisão a respeito da biorremediação de metais por microrganismos. Os autores relatam que os íons metálicos são acumulados por microrganismos para manutenção de funções biológicas vitais, porém nem sempre são acumulados por necessidades ou exigências metabólicas. Mostram que os microrganismos isolados de processos industriais e ambientes poluídos apresentam altas concentrações de metais e têm alta tolerância a estes elementos. A resistência destes microrganismos está diretamente relacionada à sua habilidade de acumular os metais, sendo este processo dependente ou não do seu metabolismo.

2.1.5 Biorremediação

Conforme Alexander (1994), o objetivo da biorremediação é degradar poluentes orgânicos a concentrações que não sejam detectáveis ou, se detectáveis, a concentrações abaixo dos

limites estabelecidos como seguros ou aceitáveis pelos órgãos reguladores. Por estarem dispersos, representando riscos à saúde ou à ecologia, e estarem suscetíveis a detoxificação microbiana, grande interesse recai diretamente sobre óleos e seus derivados, gasolina e seus constituintes, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), alifáticos clorados como TCE e tetracloroetileno (também chamados de percloroetileno ou PCE), e hidrocarbonetos aromáticos clorados. Apesar de não serem biodegradados, metais são de especial interesse em biorremediação porque podem ser alterados e convertidos a uma forma menos danosa pelos microrganismos (Alexander, 1994).

Alexander (1994), Allard e Neilson (1997) e Boopathy (2000) mostram que certos critérios devem ser conhecidos quando se fala em biorremediação: (a) a existência de microrganismos que tenham a necessária atividade catabólica; (b) estes organismos devem ter a capacidade de transformar os compostos a uma taxa razoável e baixar suas concentrações a níveis que estejam dentro de normas estabelecidas; (c) não devem gerar produtos ainda mais tóxicos durante a remediação; (d) o local não deve apresentar concentrações ou combinações de químicos notoriamente inibitórios às espécies biodegradantes, ou meios de diluição devem existir; (e) os componentes alvo devem estar disponíveis aos microrganismos; (f) condições locais de campo ou no biorreator devem ser criadas para conduzir o crescimento microbiano ou sua atividade como, por exemplo, um suplemento adequado de nutrientes inorgânicos, suficiente O₂ ou outro acceptor de elétrons, umidade favorável, temperatura estável e uma fonte de C e energia para o crescimento caso o poluente seja cometabolizado; (g) os custos desta tecnologia devem ser menores ou, pelo menos não mais caros que outras tecnologias que possam também destruir os químicos. Nenhum destes critérios é trivial. Dificuldades em se entender qualquer um destes itens podem resultar em falhas nos processos de biodegração ou na inabilidade para se chegar aos objetivos estabelecidos.

Alexander (1994) discute variações dos processos de biorremediação, que incluem sistemas que provem a irrigação de água e nutrientes, uma barreira impermeável na parte inferior do solo e meios de coleta do material lixiviado, como em um colchão reativo (Figura 2.5). Uma camada impermeável pode ser feita tanto de argila como de materiais sintéticos. Estes tipos de reatores são utilizados em muitos locais nos quais a biorremediação é utilizada, em solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, BTEX, ou ainda ambos (Ryan et al., 1991). As camadas impermeáveis e os sistemas de coleta de lixiviação podem ser

necessários, uma vez que os tratamentos convencionais podem resultar em contaminação de camadas inferiores e de águas subterrâneas pelos compostos ou produtos de transformação microbianos que são carregados pelas águas de percolação (Alexander, 1994; Corseuil e Fernandes, 1999). Em alguns casos, tubulações perfuradas podem ser instaladas sobre as camadas impermeáveis para coletar os fluídos percolantes e areia pode ser posta à sua volta para melhorar a drenagem. Fluídos removidos do sistema podem ser levados a tratamentos, podendo ocorrer em um biorreator adjacente. Água e nutrientes também podem ser inseridos por meio de sistemas de irrigação, e toda a operação pode ser feita em um sistema fechado com plásticos, como em uma estufa, caso produtos voláteis tóxicos sejam emitidos (Alexander, 1994).

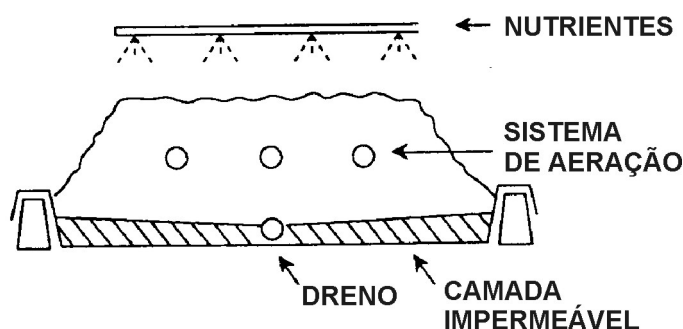


Figura 2.5: Diagrama de um reator preparado para o tratamento de um solo escavado contaminado (Fogel et al., 1989)

Estudos recentes mostram que certos surfactantes, especialmente os etoxilatos álcoois não-iônicos, em baixas concentrações também estimulam a biodegradação de hidrocarbonetos adsorvidos no solo. Este importante efeito promotor ocorre cada vez que pequenos compostos são liberados do solo pelos surfactantes (Foght et al., 1989; Aronstein et al., 1991; Bognolo, 1999; Bardi et al., 2000).

A biorremediação pode ser ainda incrementada por vários processos nos quais os sólidos contaminados são misturados constantemente com um líquido em um tratamento à base de lama. A operação lembra os procedimentos de lama ativada que é comum em tratamento de esgotos, e permite a aeração, mistura adequada e controle de muitos fatores que afetam a biodegradação. Níveis de O_2 dissolvido, o pH e a concentração de nutrientes inorgânicos podem ser monitorados e controlados. Alguns biorreatores são inoculados com uma única espécie ou ainda com uma mistura de microrganismos capazes de trabalhar de forma efetiva

sob condições controladas (Alexander, 1994). Procedimentos com lama podem ser combinados com tecnologias de lavagem para remover os contaminantes do solo (Compeau et al., 1991).

Alexander (1994) comenta que um procedimento comum para a biorremediação “in situ” de águas subterrâneas consiste na introdução de nutrientes e O₂ diretamente nos aquíferos, permitindo que a microflora indígena destrua as moléculas indesejadas. Este processo é algumas vezes chamado de biorrestauração. Vazamentos de tanques de armazenamento de gasolina resultam no aparecimento de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos nos solos. Apesar dos BTEX estarem inicialmente na fase de gasolina, cuidados devem ser tomados, pois são tóxicos e porque podem entrar na fase aquosa na forma de suspensão (Couseuil e Fernandes, 1999). Águas subterrâneas contaminadas com diesel e combustíveis de aviação JP-4 também são tratados de maneira similar.

Testes de laboratório podem determinar uma quantidade ótima de nutrientes a serem adicionados, e isso é especialmente importante para evitar pouca ou muita quantidade suplementada. Pouca quantidade de nutrientes pode resultar em transformações lentas, e muita pode colmatar os poços ao aquífero devido a grande quantidade de biomassa que será formada (biofilme), causando a parada do processo de remediação (Frankenberger, 1992; Alexander, 1994). Um procedimento comum nestes casos é adicionar os nutrientes em solução através de poços de injeção diretamente para a zona saturada ou através de galerias de infiltração para a região não-saturada ou região superfície-solo (Figura 2.6). A água é retirada dos poços e os nutrientes são repostos, refazendo-se a circulação. As concentrações dos contaminantes e nutrientes são medidas em intervalos regulares de tempo através de amostragem dos poços instalados entre os pontos de injeção e remoção. Em alguns casos, a água não é recirculada, mas disposta na superfície (Thomas e Ward, 1989).

Alexander (1994) mostra que a resposta dos microrganismos ao N, P e O₂ ou a eficácia da biodegradação é simples de ser determinada em laboratório e também em um biorreator, no qual as medidas podem ser feitas através dos fluxos de entrada e saída destes compostos. O mesmo não acontece quando temos uma biorremediação “in situ”. Os poluentes podem desaparecer do local como resultado de volatilização e biorremediação do composto do solo ou da água ou meramente por diluição em fluxos d’água. A forma para se acessar a atividade

microbiana em campo é determinar as mudanças na concentração dos contaminantes com o tempo.

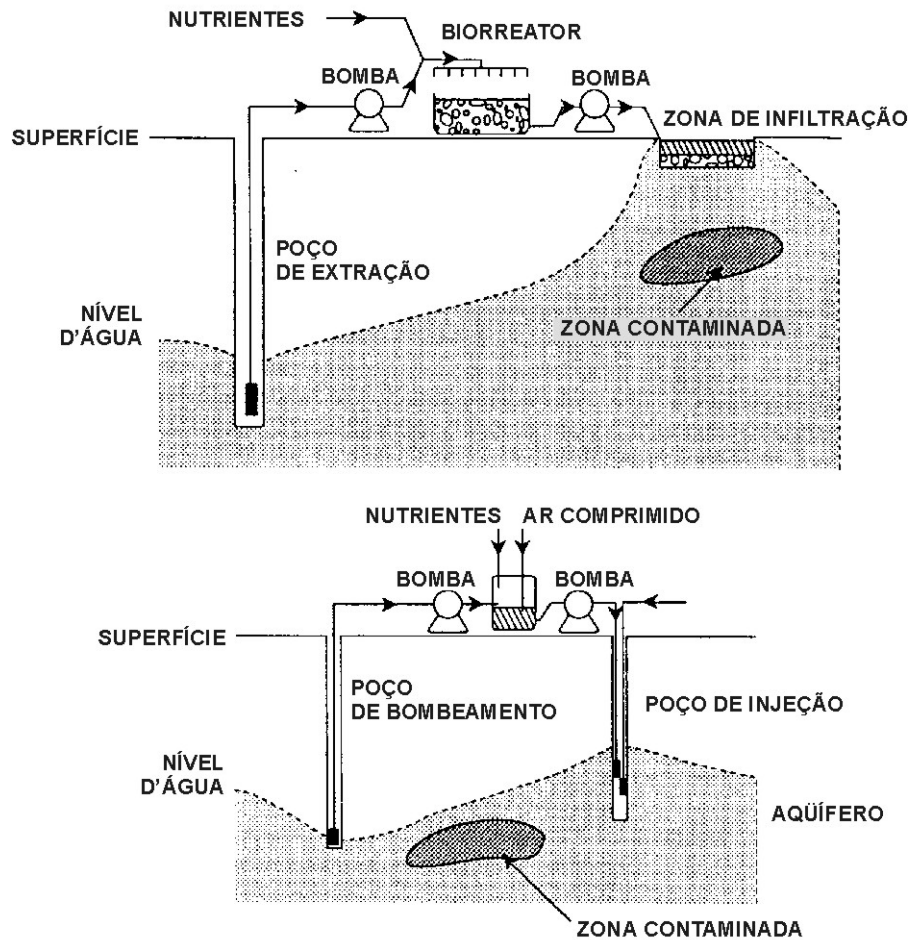


Figura 2.6: Tratamento de lençol freático “in situ” contaminado com hidrocarbonetos utilizando trincheira de infiltração (acima) e um poço de injeção (abaixo)(Morgan e Watkinson, 1989).

2.1.6 Considerações sobre População Microbiana de uma Área Contaminada com Hidrocarbonetos

Frankenberger (1992) relata que os mais recentes métodos de enumeração de microrganismos degradadores de petróleo incluem o plaqueamento em agar-óleo, em um meio com óleo-gel-silica e inoculação em um meio líquido pela técnica do número mais provável (MPN). Walker e Colwell (1976) sugeriram que o número de microrganismos degradadores deve ser expresso

como uma percentagem da população total bacteriana. Um ágar nutriente geralmente é utilizado para a contagem total e o MPN para os microrganismos degradadores específicos. Os oxidadores de hidrocarbonetos variam entre menos de 1% a 10% do total de bactérias do solo em estudo. Se houver uma população degradadora específica maior que 3% do número total de bactérias, o solo é considerado como tendo um alto potencial de degradação de hidrocarbonetos (Frankenberger, 1992). A população microbiana nativa pode ser aclimatada à presença de contaminantes orgânicos e a degradação ocorrerá naturalmente, podendo ser limitada por fatores ambientais.

Brown e Braddock (1990) desenvolveram um método para a enumeração de microrganismos degradadores específicos. A técnica se baseia na habilidade dos microrganismos degradadores em emulsificar o óleo quando na condição de única fonte de carbono em microcultivo. Os poços são considerados positivos quando a emulsificação de óleo é claramente indicada pela fragmentação do óleo. A Figura 2.7 ilustra como exemplo os resultados pela técnica do número mais provável (MPN) de cinco poços contendo uma amostra de sedimento marinho contaminado. As diluições de 10^{-2} e 10^{-3} são todas positivas para a emulsificação de óleo cru, sendo quatro ou cinco para diluição 10^{-4} positivas, e apenas uma de cinco da diluição de 10^{-5} é positiva. Posteriormente, Braddock e Catterall (1999) mostraram, através de pequenas modificações no método (utilizado nesta Tese), que é possível se estimar populações de heterotróficos totais assim como de degradadores de gasolina e óleo diesel.

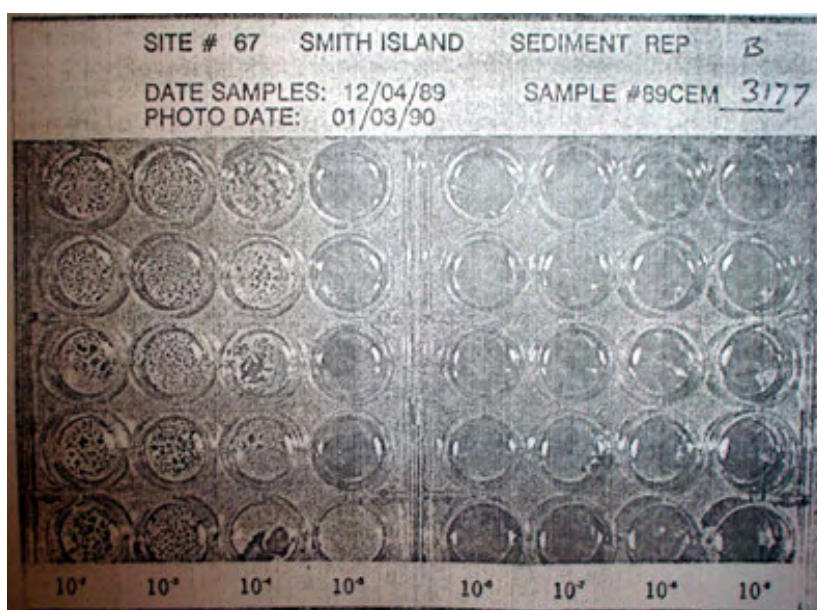


Figura 2.7: Exemplo de uma placa utilizando o método proposto por Brown e Braddock (1990)

Cunha e Leite (1997) realizaram seu estudo tentando otimizar condições ambientais em microcosmos não-esterilizados contaminados com gasolina e inoculados de *Pseudomonas putida*. Bioestimulação com NH_4NO_3 , K_2HPO_4 e H_2O_2 em diversas concentrações foram testadas. A concentração de nitrato de amônia ótima ficou em $30\mu\text{mol/g}$ de solo, o fósforo apresentou um efeito inibitório para qualquer concentração testada, e o peróxido de hidrogênio se mostrou ótimo em $0,1\text{mM}$.

Margesin e Schinner (1997) realizaram um estudo comparativo da eficiência dos microrganismos indígenas e inoculados (degradadores específicos adaptados ao frio) na biodegradação de diesel em solos alpinos e sua relação com um fertilizante mineral (C:N:P = 100:10:2). A atividade dos microrganismos indígenas na biodegradação do diesel melhorou significativamente com o fertilizante e mostrou que a bioestimulação parece apresentar melhores resultados quando comparada a “*bioaugmentação*”. Um fator interessante do estudo é o fato de nenhum tratamento com inóculo e fertilizante ter sido mais eficiente do que os microrganismos nativos bioestimulados.

Olson et al. (1999) estudaram as taxas de biodegradação de algumas classes de hidrocarbonetos (alcanos e aromáticos) separados de um óleo diesel comprado de um posto de combustíveis. Foi utilizado um inóculo de microrganismos degradadores específicos isolados de um solo contaminado, acompanhando-se seu crescimento em placas de Petri e as frações de hidrocarbonetos por cromatografia gasosa. Os hidrocarbonetos foram avaliados separadamente e em combinações. Os autores observaram uma correlação entre o crescimento microbiano e as perdas de biodegradação. A fração de aromáticos ainda se mantinha em altos níveis ao final do experimento em 35 dias, sugerindo que após a depleção de compostos de alcanos, o consórcio microbiano não conseguiu degradar de maneira eficaz os compostos aromáticos. Controles sem o inóculo tiveram muito poucas perdas. Nos tratamentos contendo microrganismos, observaram uma contagem, ao final de 35 dias, de mais de 50 vezes o número de células encontradas inicialmente. Olson et al. (1999) notaram que as taxas de eliminação dos hidrocarbonetos seguem uma ordem de degradação, sendo primeiramente degradados os n-alcanos, seguidos pelos isoalcanos e aromáticos.

Richard e Vogel (1999) estudaram um consórcio de bactérias capazes de degradar óleo diesel, composto por diversos tipos de *Pseudomonas sp.* e por *Achromobacter sp.* Conforme

Alexander (1994), o fato de encontrar *Pseudomonas sp.* não é surpresa, visto que tem alta frequência nos solos avaliados na literatura. Richard e Vogel (1999) observaram que após 50 dias de incubação, 90% do diesel inicial havia sido biodegradado pelo consórcio, não sendo encontrado nenhum composto aromático ao final do experimento. A eficácia do consórcio de bactérias avaliado evidenciou um benefício dos membros do consórcio não degradadores específicos na mineralização de hidrocarbonetos.

Cunha e Leite (2000) avaliaram a biodegradação de gasolina em diversos tratamentos contendo solo inoculado ou não com diferentes consórcios de culturas bacterianas. Os microrganismos capazes de crescer na presença de gasolina foram isolados do solo e vários sistemas de tratamento foram testados usando tanto as espécies isoladas quanto a *Pseudomonas putida* obtida de coleção de cultura. O sistema constituído somente da microflora autóctone apresentou valores médios de degradação de 50%. A associação de *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Burkholderia cepacia* e a microflora indígena do solo mostraram o melhor percentual de remoção dos hidrocarbonetos. O solo não foi esterilizado de forma a se avaliar condições ambientais. Cunha e Leite (2000) observaram que o crescimento de uma população específica causa um desequilíbrio na comunidade por competição por espaços físicos, nutrientes e água, reduzindo para pequenas quantidades os microrganismos que têm a melhor performance em biodegradar.

Capelli et al. (2001) analisaram a possibilidade de biorremediação de hidrocarbonetos de óleo cru utilizando microrganismos indígenas. Foram realizados ensaios de laboratório com microcosmos inoculados com bactérias indígenas com seguimento por 45 dias. O conteúdo total de hidrocarbonetos foi reduzido em média 70% ao final dos ensaios. Os hidrocarbonetos saturados e aromáticos foram os mais rápidos a serem degradados, com uma mínima degradação ocorrendo nas frações de resinas (20%) e as frações de asfaltanos permaneceram constantes. Ao contrário da situação onde ocorre uma contaminação acidental, a microflora indígena da pesquisa era exposta continuamente a altos níveis de contaminação. Foi observado que os hidrocarbonos interferem na quimiotaxia dos microrganismos não-degradadores pelos seus substratos, favorecendo o sucesso da microbiota degradadora. Cada espécie é capaz de degradar apenas um número limitado de moléculas da fração dos hidrocarbonetos, então um incremento da curva de crescimento pode ser um indicativo do aumento do número de espécies.

Mishra et al. (2001) conduziram um experimento *in situ* em uma área de 4.000m² (300 toneladas de lodo oleoso), contaminada com um lodo oleoso pertencente a uma refinaria, utilizando um consórcio de bactérias degradadoras específicas. O tempo de estudo foi 120 dias. Inicialmente, foram realizados testes preliminares para identificar um consórcio de bactérias que fossem capazes de degradar o lodo oleoso. O estudo envolveu uma parte da área como controle e em outra foi adicionada uma solução nutriente para fins de comparação com a área onde foi aplicado o consórcio de bactérias, validando a opção da adição de nutrientes e de um consórcio de bactérias. Os contaminantes foram medidos como hidrocarbonetos totais (TPH).

Mishra et al. (2001) observam que pelas características do lodo oleoso em ser heterogêneo, é praticamente impossível a degradação do material por apenas uma espécie, sendo necessária uma população mista com um substrato específico para realizar a tarefa. Os autores discutem que a “*bioaugmentação*” é uma técnica promissora nos processos de biorremediação e relatam que bactérias indígenas em um consórcio garantem aos microrganismos terem uma maior tolerância à toxicidade que os hidrocarbonetos possuem e são mais resistentes às variações ambientais.

Rahman et al. (2002) descrevem métodos para incrementar as taxas de biodegradação de gasolina em solos contaminados por biorremediação *ex situ*. Os autores utilizam dois tipos de lodos, surfactantes e um consórcio de bactérias constituído por *Micrococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Flavobacterium sp.* e *Pseudomonas sp.* O trabalho mostra que a situação onde todos os parâmetros analisados estão agrupados apresenta a melhor eficácia de degradação, aparentemente um resultado esperado.

Trindade et al. (2002) comentam que derrames de óleo nos solos argilosos têm estimulado diversos estudos na área de biorremediação. Isto porque há uma grande dificuldade de remediar estes solos devido às fortes interações entre o solo e os contaminantes, além da baixa permeabilidade, tornando praticamente impraticável a técnica tradicional de biorremediação *in situ*. Trindade et al. (2002) realizaram experimentos de forma a avaliar a eficiência da remoção de poluentes através da adição de microrganismos degradadores nativos de solos (*Nocardia nova*, *Pandoraea sp.*, *Rhodotorula glutinis*) e definir o melhor “pool” a ser utilizado no tratamento. Juntamente com esta abordagem, foi avaliada a influência de taxas de nutrientes em termos de C:N:P.

Ruberto et al. (2003) analisaram a resposta dos microrganismos indígenas à presença de um óleo utilizado nas estações científicas argentinas na Antártica. Foram criados microcosmos com solos antárticos suplementados com N e P em C:N:P de 100:12:3, valores maiores que os utilizados previamente na prática internacional. A *Acinetobacter sp.* foi utilizada como “bioaugmentação”, sendo previamente retirada e isolada de um rio cronicamente contaminado. As bactérias heterotróficas e degradadoras específicas foram identificadas ao longo dos ensaios.

Ruberto et al. (2003) observaram que no 10º dia de tratamento havia perdas de 54 a 61% em todos os tratamentos. Esta significativa diminuição foi atribuída à volatilização dos compostos mais voláteis do óleo. Neste momento, não havia diferenças significativas entre os tratamentos. Por volta do dia 20, todas as condições bióticas mostraram uma diminuição do conteúdo de hidrocarbonetos. A fertilização com N e P determinou maiores valores residuais de TPH, apresentando diferenças significativas para os outros tratamentos ao final dos ensaios. Comparados ao controle abiótico, a atividade dos microrganismos indígenas reduziu em 35% os TPH, enquanto a “bioaugmentação” em 65%. A presença do óleo, de forma geral, determinou um aumento na contagem microbiana, apesar de nos tratamentos com adição de N e P, a contagem ter diminuído, principalmente relacionada à microflora indígena. A “bioaugmentação” com o *Acinetobacter sp.* apresentou as maiores contagens. Ruberto et al. (2003) discutem que um dos mais importantes resultados da pesquisa é a resposta positiva da microflora indígena antártica a uma poluição aguda por hidrocarbonetos. Mostram também que o *Acinetobacter sp.* pode incrementar o processo de degradação do solo, sendo uma importante ferramenta em biorremediação de áreas frias.

Peressutti et al. (2003) estudaram as mudanças da bacteriocenose nos solos da Patagônia poluídos por óleos durante processos de biorremediação realizados em laboratório. Alguns tratamentos receberam bioestimulação com NH_4NO_3 e K_2HPO_4 , e foram feitos um controle abiótico e um outro apenas com bioestimulação sem contaminação. A enumeração bacteriana foi feita através da técnica do número mais provável (MPN), avaliando microrganismos heterotróficos e degradadores específicos.

Peressutti et al. (2003) relatam que as bactérias autóctones contidas no solo contaminado foram eficazes em reduzir significativamente o conteúdo poluente total no solo após sete

meses de estudo, sem um período de adaptação inicial, provavelmente devido à história de exposição prévia do solo a contaminações. Algum resíduo ainda encontrado foi atribuído à presença de hidrocarbonetos tóxicos, além da ausência de nutrientes e outros hidrocarbonos disponíveis. As bactérias gram negativas mostraram um efeito predominante nos processos de biorremediação durante os primeiros sete meses e, após, a bacteriocenose autóctone foi dominante com gram positivos. Conforme Peressutti et al. (2003), Greene et al. (2000) mostraram mudanças semelhantes das comunidades de solos contaminados, relatando uma sucessão de *Pseudomonas sp.* por *Rhodococcus sp.*

Prenafeta-Boldú et al. (2004) estudaram a biodegradação de uma mistura de BTEX e MTBE em microcosmos e descrevem os efeitos da inoculação de um fungo capaz de metabolizar tolueno denominado *Cladophialophora sp.*, confirmado no solo por sondas de DNA através de técnicas de biologia molecular. O fungo foi isolado previamente de um solo contaminado por BTEX. Também foi avaliado no trabalho o efeito do pH a longo prazo. Quatro diferentes tratamentos foram avaliados, sendo um solo não tratado com sua microflora nativa, um solo autoclavado inoculado com o fungo, um não autoclavado inoculado com o fungo e um solo autoclavado não inoculado (controle abiótico). Prenafeta-Boldú et al. (2004) observaram que a atividade biodegradadora foi induzida pelos microrganismos indígenas 3 dias após a adição da mistura de BTEX e MTBE. Enquanto os BTEX foram degradados em 8 dias, o MTBE não mostrou sinais de degradação. A biodegradação também foi observada no solo estéril inoculado com as conídeas do fungo, porém somente os compostos TEX foram consumidos. Em um segundo solo estudado, em condições de pH neutro, não-estéril, inoculado com o fungo, os tratamentos apresentaram pequenas variações nos BTEX, com taxas de degradação do etil-benzeno um pouco mais significantes que os demais compostos. Em condições ácidas, a atividade de biodegradação dos degradadores nativos foi consideravelmente menor que no caso de pH neutro. Observou-se que a biodegradação do benzeno sempre necessitou da atividade dos microrganismos indígenas e que a presença do fungo inoculado não mostra qualquer efeito na degradação do composto. O MTBE também não foi biodegradado significativamente neste tratamento, mostrando que o composto é mais recalcitrante que os BTEX.

Prenafeta-Boldú et al. (2004) mostram que o tolueno e o etil-benzeno servem como substratos ao crescimento dos fungos, enquanto os xilenos são cometabolizados e o benzeno não foi

degradado. O benzeno somente foi degradado pelos microrganismos nativos com taxas independentes da presença ou não do fungo. Ficou claro que não há antagonismo entre os degradadores de BTEX indígenas e o fungo introduzido.

Sabaté et al. (2004) apresentam um protocolo para biorremediação em duas fases. A primeira fase envolve a caracterização microbiana baseada na enumeração dos microrganismos heterotróficos e dos degradadores específicos e do conhecimento de sua atividade metabólica. Em uma segunda fase, sugerem a identificação dos tratamentos mais apropriados e a avaliação dos aditivos no microcosmo. Os autores utilizaram NH_4Cl e K_2HPO_4 em taxas de C:N:P de 100:10:1, aeração através da mistura do solo semanalmente, surfactante, inoculação de microrganismos degradadores específicos e glicose.

Mielniczuk (1991) e Sabaté et al. (2004) relatam que os tratamentos contendo glicose são os mais eficientes na biodegradação dos contaminantes. Sabaté et al. (2004) mostram que a inoculação de um consórcio de degradadores específicos de frações pesadas de petróleo não apresentou efeitos significativos. A comunidade microbiana natural, especialmente em solos contaminados cronicamente, usualmente degrada os óleos se há condições favoráveis (Alexander, 1994).

Diversos autores mostram a importância da utilização da capacidade de biodegradação e biorremediação de bactérias autóctones dos solos contaminados. Muitas vezes, apenas um bioestimulante pode incrementar e otimizar a remoção de contaminantes de solos sem que seja necessária a introdução de um consórcio de microrganismos. A microbiota previamente exposta a contaminações possui uma “memória biológica”, sendo mais eficaz na remoção dos contaminantes no caso de derrames contínuos. Entretanto, diversos autores consideram a introdução de consórcios de microrganismos como fator decisivo nos processos de biorremediação. Existem métodos que determinam as frações de microrganismos totais e degradadores específicos. Deve haver uma relação ótima de C:N:P, onde nenhum destes elementos deve estar na forma recalcitrante, podendo-se obter facilmente esta relação em ensaios de laboratório.

2.1.7 Volatilização e Cromatografia

A volatilização é um processo extremamente importante na biorremediação e, ao mesmo tempo, pouco considerada nos trabalhos atuais. O aumento da temperatura incrementa a volatilização dos compostos, sendo o inverso verdadeiro. Da mesma forma, a temperatura influencia no metabolismo celular, aumentando ou diminuindo sua atividade em uma relação diretamente proporcional. Além disso, as taxas de degradação são relacionadas ao número da população microbiana. A mineralização dos hidrocarbonetos em CO₂ como produto final da biorremediação é um fator importante para ser monitorado em qualquer estudo de laboratório, mostrando elevadas taxas nos solos contaminados em relação aos controles, maiores ainda nos solos bioestimulados ou com alguma inoculação.

McGill et al. (1981) estimaram que até 20 – 40% dos óleos crus podem volatilizar dos solos. As altas temperaturas no verão favorecem a volatilização principalmente quando os solos secam. A Figura 2.8 ilustra a capacidade de volatilização dos BTEX de um solo contaminado por gasolina sob diferentes regimes de umidade. A volatilização dos BTEX tende a aumentar com a diminuição da umidade. A taxa de volatilização é uma função da temperatura, composição dos óleos, radiação solar e espessura das camadas do contaminante nos solos. A volatilização e a biodegradação tendem a remover seletivamente as frações de hidrocarbonetos mais leves. Estas frações incluem as cadeias curtas de alifáticos e hidrocarbonetos aromáticos, como o benzeno, tolueno e xilenos (Frankenberger, 1992).

Donaldson et al. (1992) realizaram um estudo com painéis revestidos de polímeros sintéticos onde adicionavam 10 dos hidrocarbonetos mais comumente encontrados na gasolina e monitoravam suas perdas em 5 diferentes tratamentos, que incluíam um controle de solo seco, e outros com variantes de umidade. Alguns eram deixados secar naturalmente, enquanto outros eram umedecidos e revolvidos periodicamente, ou apenas uma vez durante os experimentos. Os tanques foram dispostos ao meio ambiente. Os autores observaram que as maiores taxas de volatilização passiva ocorreram nos solos com algum nível de umidade. Menores taxas de volatilização ocorrem à medida que o conteúdo argiloso aumenta, e a mistura contínua é importante na promoção de redistribuição dos químicos e taxas de perdas. As perdas de hidrocarbonetos ocorreram de forma mais acelerada durante os experimentos feitos no verão, em resposta a um maior aquecimento do solo e ventos quentes sobre a

superfície. Donaldson et al. (1992) mostraram que a volatilização pode ser utilizada para remediar solos contaminados por gasolina a menores custos.

Zhou e Crawford (1995) observaram que enquanto o solo controle autoclavado mantinha os TPH praticamente inalterados durante o período de estudos, os TPH dos outros tratamentos diminuíram gradualmente para todas as concentrações. Nas condições experimentais, as taxas de degradação foram diretamente relacionadas ao número da população microbiana.

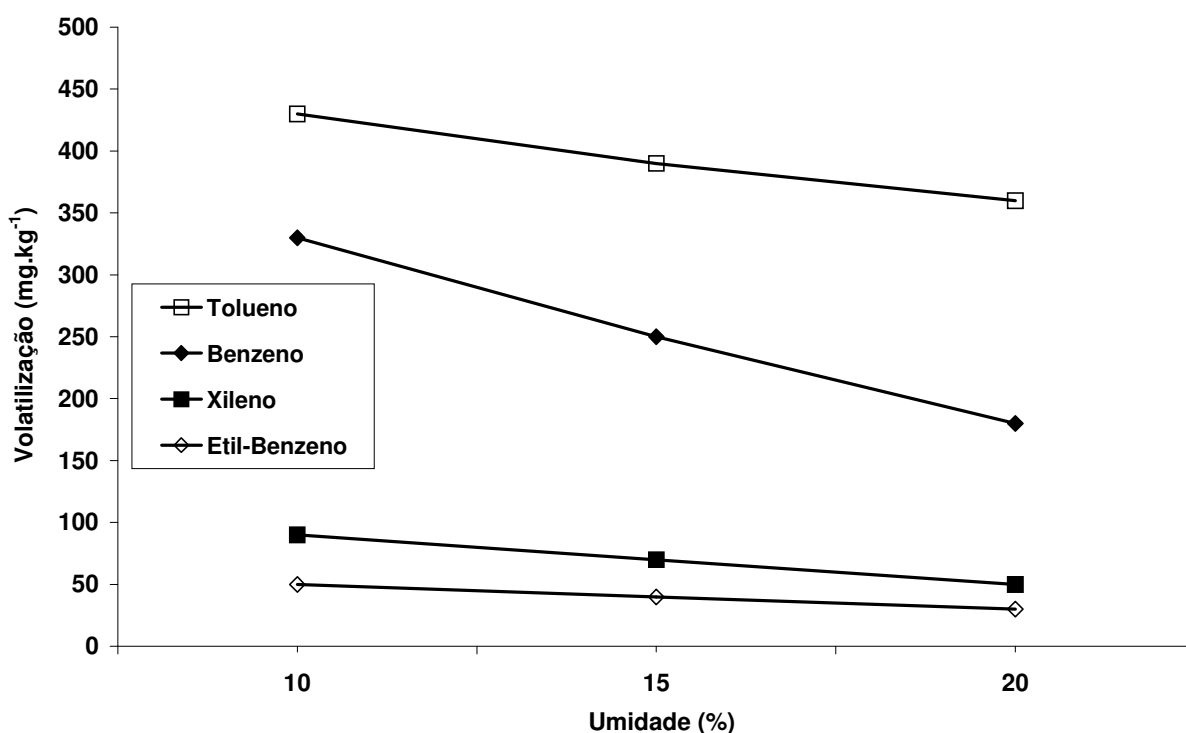


Figura 2.8: Volatilização do benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos de um solo sob vários regimes de umidade (Frankenberger, 1992)

Spilborghs (1997) estudou em um microcosmo o comportamento de um vazamento de gasolina a subsuperfície e aplicou a técnica “air sparging” objetivando a biorremediação do contaminante. Na pesquisa foi simulado um vazamento de tanques de armazenamento de combustíveis. O processo foi monitorado por 216 dias, mostrando uma total degradação dos BTEX aos 126 dias, com biodegradação mais intensa do tolueno (98 dias), seguido pelo benzeno (112 dias) e xilenos ao final do trabalho (126 dias).

Solano-Serena et al. (1998) avaliaram o potencial da microflora originária de solos contaminados e não-contaminados em degradar gasolina em condições não limitantes, ou seja,

a capacidade de degradação intrínseca da microflora. A performance dos microrganismos foi investigada através de uma gasolina modelo (GM23) constituída pelos 23 mais representativos hidrocarbonetos contidos em gasolinas comerciais. Foram realizadas análises cromatográficas e um acompanhamento por produção de CO₂. A degradação dos componentes do GM23 foi avaliada em diferentes tratamentos. No tratamento com amostra de solo não contaminado previamente, não foi observada a degradação dos hidrocarbonetos de cadeias longas até o tempo de 28 dias, mostrando que os alcanos de cadeias longas e ramificadas são menos suscetíveis à degradação microbiana, necessitando muitas vezes de associações de cepas e cometabolismo. O reforço da microflora com duas cepas originárias de solos contaminados mostrou uma maior atividade de degradação com a completa eliminação de todos os compostos aos 28 dias. Solano-Serena et al. (1998) observaram ainda que a completa eliminação ocorre independentemente dos compostos estarem isolados ou na mistura total. Então, notaram que a degradação da gasolina parece ser uma soma da degradação dos compostos individuais.

Solano-Serena et al. (1999) analisaram a biodegradação de gasolina utilizando uma microflora obtida de um lodo ativado de tratamento de uma estação de tratamento de águas. A cinética da degradação foi estudada em culturas em meio líquido utilizando como parâmetros o CO₂, O₂ e análise cromatográfica de diferentes compostos. Os autores observaram que 62% do carbono degradado era mineralizado em CO₂ e o resto era convertido em biomassa. Uma solução nutritiva contendo gasolina (400mg/L) foi degradada em 25 dias, com diferentes taxas ocorrendo para cada um dos hidrocarbonetos.

Solano-Serena et al. (2000) realizaram um estudo de seleção de população microbiana que fossem capazes de degradar hidrocarbonetos recalcitrantes de gasolina através de monitoramento de cultura e decomposição por “headspace”. A metodologia empregada foi a monitorização por cromatografia da produção e consumo de CO₂ e O₂. Neste trabalho, os autores compararam solos contaminados previamente com um não contaminado. Diversos hidrocarbonetos presentes na gasolina foram utilizados para selecionar a microflora especializada de várias amostras e foi constatado que o monitoramento de CO₂ é um método bastante eficaz para selecionar o isolamento de populações degradantes de produtos recalcitrantes.

Loehr et al. (2001) fizeram uma revisão sobre a emissão de compostos orgânicos voláteis (VOCs) e semi-VOCs (SVOCs) em processos de biorremediação através de estudos de casos. Sua avaliação focou como SVOCs de interesse hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), policlorados bifenis (PCBs) e pentaclorofenóis (PCP) e VOCs de interesse os BTEX. A proposta do trabalho foi documentar a extensão dos VOCs e SVOCs como parte dos processos de biorremediação. Tais informações são necessárias para identificar o quanto a volatilização contribui para as perdas de carbono orgânico e a magnitude das emissões gasosas. A volatilização, sorção e biodegradação podem simultaneamente afetar os compostos químicos. Um aumento da biorremediação ou adsorção diminui a volatilização porque há menos químicos para volatilizar. Portanto, fatores como a quantidade de químicos, as taxas de atividade microbiana, a volatilização por si só e a maneira de operação dos processos podem afetar as perdas dos VOCs e SVOCs.

2.1.8 Mineralização dos Hidrocarbonetos de Petróleo

Conforme Frankenberger (1992), Alexander (1994) e Maier et al. (2000), a completa destruição dos contaminantes ocorre quando os hidrocarbonetos são mineralizados em CO₂ como produto final da biorremediação. De acordo com os autores, a monitorização deste processo deve ser padronizada em todos os estudos para que se possam determinar os teores ótimos de agentes bioestimulantes adicionados aos solos. A detecção do CO₂ é muito mais sensível do que a monitorização do desaparecimento dos hidrocarbonetos de petróleo total (TPH) sob a adição de nutrientes. Da mesma forma, a depleção de substratos específicos não é um bom parâmetro para se monitorar a biodegradação, uma vez que produtos intermediários tóxicos podem ser formados. Geralmente a degradação inicia após 2 a 4 dias de um período de estabilização, atingindo taxas ideais dentro de uma a duas semanas do início da incubação (Frankenberger, 1992).

Conforme Frankenberger (1992), agentes emulsificantes microbianos incluem ácidos orgânicos e cadeias longas de ácidos graxos que aumentam a interface para a utilização microbiana de frações minerais solúveis e insolúveis de componentes dos óleos. O autor discute a extrema importância do papel da emulsificação no aumento da interface óleo-água, favorecendo a degradação microbiana. Relata também que os óleos pesados são mais difíceis

de serem atacados à medida que a viscosidade e o peso molecular aumentam. Os óleos mais viscosos são difíceis de se dispersar em meio líquido e têm menos superfície exposta para o crescimento microbiano.

Dobson e Wilson (1964) mostraram que solos tratados com hidrocarbonetos apresentavam taxas de respiração maiores que os solos não tratados (controles). A comparação permite refletir sobre o grau de contaminação e taxas de biodegradação na presença de hidrocarbonetos. Geralmente uma prévia exposição aos hidrocarbonetos resulta em maiores taxas de degradação. Rowell (1975) mostrou que as taxas de mineralização no solo aumentam progressivamente com o aumento das taxas de óleos aplicados, apesar de não ter apresentado um valor máximo alcançado. Seus estudos indicaram que a decomposição de óleo ocorre até mesmo em concentrações que aparentemente saturam o solo. Stone et al. (1940) mostraram que após 2 ou 3 transferências de culturas bacterianas expostas ao óleo, os procedimentos de biodegradação ocorriam mais rapidamente e o período de incubação era diminuído apreciavelmente, com emulsificação completa em 3 a 5 dias em temperatura ambiente. Entretanto, cultivos contínuos em placas com nutrientes diminuem a habilidade destas culturas em atacar os hidrocarbonetos, indicando que muitas das biotransformações são mediadas por plasmídeos.

Deeb e Alvarez-Cohen (2000) mostraram que apesar dos isolados utilizados na sua pesquisa serem capazes de biotransformar o o-xileno, eles não conseguiram mineralizar o composto em CO₂. Entretanto, os autores não conseguiram identificar o quanto a presença de etil-benzeno em uma mistura de compostos aromáticos afeta o potencial de mineralização. Evidenciaram que, em relação a este potencial, as misturas de culturas são mais efetivas que as culturas puras na mineralização de BTEX. Aparentemente as interações interespecies são necessárias para a completa biodegradação de múltiplos compostos nas misturas de hidrocarbonetos. O MTBE contido nas misturas não foi degradado por nenhuma das culturas para qualquer que fosse sua concentração, que por sua vez não apresenta efeito inibidor nas taxas de transformação de BTEX até um nível de 200mg/L.

2.1.9 Propriedades Físico-Químicas dos Solos Contaminados e Parâmetros Ambientais

A biorremediação é dependente de uma série de fatores ambientais que incluem a aeração, pH, umidade, temperatura e concentração de nutrientes. A presença de oxigênio é essencial para uma biodegradação efetiva dos óleos. A decomposição anaeróbica de hidrocarbonetos de petróleo conduz a taxas de degradação extremamente baixas (Figura 2.9) (Frankenberger, 1992; Alexander, 1994; Paul e Clark, 1996; Tedesco et al., 1999; Maier et al., 2000).

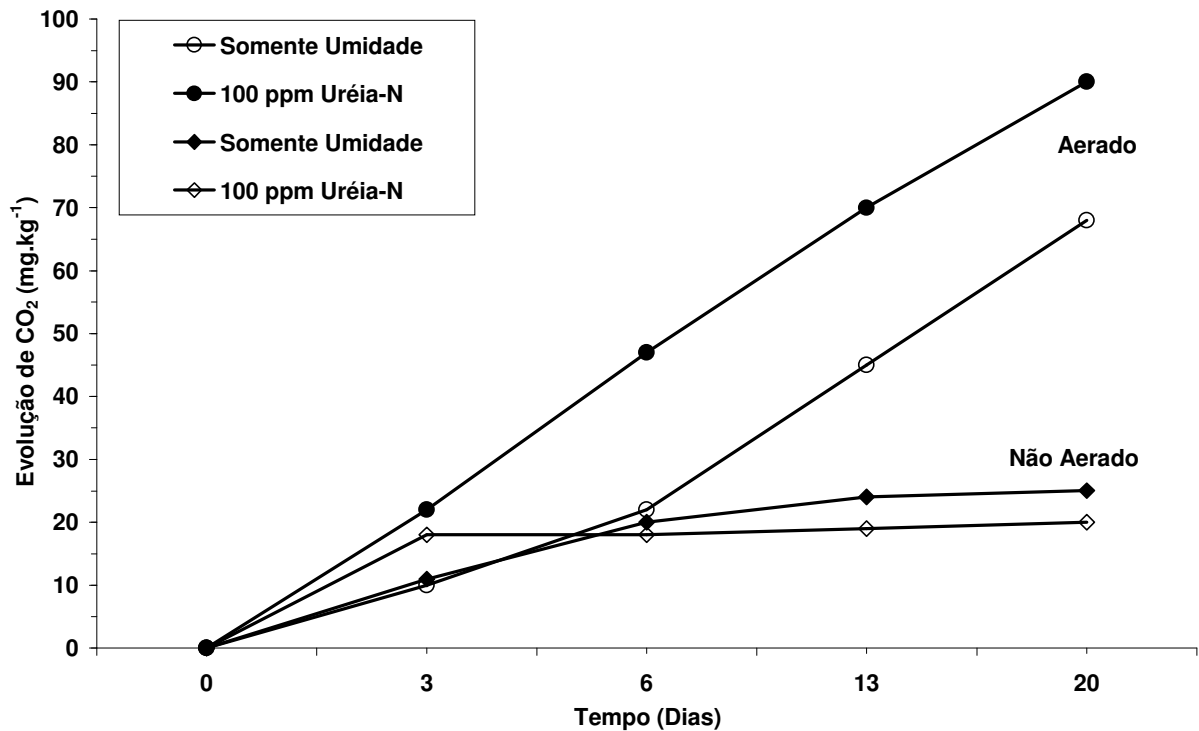


Figura 2.9: Mineralização do diesel em ambiente aeróbico e anaeróbico (Frankenberger, 1992)

Conforme Frankenberger (1992), um solo ideal para ser biorremediado adequadamente deve possuir textura arenosa com alta porosidade que permita uma diluição de oxigênio. Esta alta porosidade permitiria a aeração para a oxidação dos hidrocarbonetos, necessitando ainda silte e argila na matriz de solo para manter a umidade. O pH deve ser mantido em torno do neutro e geralmente os solos necessitam fertilizantes como nitrogênio e fósforo para promover uma adequada degradação de hidrocarbonetos de petróleo. O autor discute não haver necessidade de suplementação de nitrogênio em solos que contenham mais de 50mg/kg de nitrogênio orgânico ($\text{NH}_4\text{-N} + \text{NO}_3\text{-N}$) ao menos que o solo esteja severamente contaminado. E as

quantidades de fósforo necessárias para mineralizar os hidrocarbonetos de petróleo são bem menores que as de nitrogênio.

Loynachan (1978) mostrou que amostras perturbadas de solos aumentam a utilização de hidrocarbonetos devido ao aumento da área de contato para difusão de oxigênio. O conteúdo de oxigênio no subsolo pode ser aumentado através da adição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Na presença de catalase, o peróxido se transforma em água e O_2 , tendo sido utilizado como agente bioestimulante para biorremediação *in situ* (Frankenberger, 1992).

Dibble e Bartha (1979) realizaram um estudo em laboratório com a intenção de avaliar e otimizar os parâmetros de 'land farming'. A biodegradação de uma lama oleosa foi monitorada através da evolução de CO_2 e análises periódicas de hidrocarbonetos residuais. Os parâmetros estudados no solo foram a umidade, pH, nutrientes minerais, micronutrientes, suplementos orgânicos, taxas de tratamento e frequência e temperatura. A biodegradação da lama oleosa foi ótima para uma capacidade de campo de 30 a 90%, pH de 7,5 a 7,8, C:N e C:P de 60:1 e 800:1, respectivamente, e temperatura de 20°C ou maior. Micronutrientes e suplementos orgânicos não trouxeram benefícios. Além disso, aplicações pequenas e frequentes de hidrocarbonetos resultaram em melhores taxas de biodegradação quando comparadas a grandes aplicações.

A faixa de pH ideal para promover a biodegradação de óleos em solos está entre o neutro para levemente alcalino. A maioria dos estudos indica que o pH ótimo para degradação de hidrocarbonetos de petróleo está entre 7 e 8, e mostra que valores de pH acima de 9,5 inibem a degradação (Frankenberger, 1992). De acordo com o autor, solos ácidos podem ser tratados com $CaCO_3$ para incrementar a atividade biológica. O uso de Na_2CO_3 deve ser evitado porque é um forte alcalinizante, além de ser muito expansivo. O presente trabalho avaliou um processo de biorremediação em um solo ácido (Arenito Botucatu) sem qualquer correção de pH a fim de se verificar uma condição natural de biorremediação.

Frankenberger (1992) e Alexander (1994) mostram que a umidade do solo contaminado afeta a biodegradação de óleos devido à dissolução de compostos residuais, ação dispersiva e a necessidade da microbiota de manter uma alta atividade de metabolismo. A umidade excessiva limita o suplemento de oxigênio gasoso, sendo que a maioria dos estudos indica que a umidade ótima encontra-se entre 50 e 80% da capacidade de campo. Os autores sugerem

precauções quanto aos solos saturados no que tange a processos de lixiviação dos hidrocarbonetos residuais ou fertilizantes nitrogenados solúveis em água. Os extremos de umidade (ou formação de biofilmes) e dissecação do solo reduzem a eficácia da biorremediação. Conforme Frankenberger (1992), a umidade do solo deve ser mantida através de reaplicações de água a intervalos regulares.

A aplicação de nutrientes promove a atividade de bioemulsificantes pelos microrganismos, criando compostos intermediários solúveis em água capazes de migrar a maiores profundidades no solo (Verstraete et al., 1976). Entretanto, a maioria dos hidrocarbonos é hidrofóbica na natureza e absorvem à matéria orgânica, não sendo livremente transportados pelo solo (Frankenberger, 1992). Na presente pesquisa fez-se um estudo da migração de contaminantes sem se considerar a presença de nutrientes, e o solo utilizado apresenta pouca matéria orgânica. Hillel (1989) mostrou que a migração de hidrocarbonetos é dependente da textura do solo (permeabilidade, difusão e dispersão hidrodinâmica), uniformidade e configuração das camadas, umidade e viscosidade dos fluídos de óleo.

Basicamente todas as transformações biológicas são afetadas pela temperatura (Frankenberger, 1992; Alexander, 1994; Maier et al., 2000; Nelson e Cox, 2002). À medida que a temperatura aumenta, aumenta a atividade biológica até um valor onde começa a ocorrer desnaturação das enzimas. A temperatura ideal para a degradação de hidrocarbonetos varia de 18 a 30°C, ocorrendo a taxas mínimas em 5°C ou menos. Entretanto, os microrganismos se adaptam a temperaturas extremas. Baixas temperaturas diminuem a volatilização e aumentam a solubilidade dos hidrocarbonetos voláteis em água. Então, quando consideramos uma operação de “*land-farming*”, devemos considerar a incidência solar e o local de disposição. Estudos de laboratório devem ser conduzidos considerando a temperatura média de campo (Frankenberger, 1992).

As taxas de C:N e C:P para se converter 100% dos hidrocarbonetos em biomassa microbiana é 10:1 e 100:1, respectivamente (Frankenberger, 1992; Selbach e Camargo, 2001). O nitrogênio é a chave da produção de proteínas e ácidos nucleicos, enquanto o P é necessário na produção de ATP para funções metabólicas, além de também constituir ácidos nucleicos, fosfolipídeos e ácidos tecóicos. Os fertilizantes mais comuns utilizados em solos contaminados incluem nitrato de amônia, sulfato de amônia e uréia. A uréia não é muito utilizada porque os óleos refinados inibem a hidrólise da uréia a amônia e CO₂.

Zhou e Crawford (1995) realizaram um estudo dos efeitos do oxigênio, nitrogênio e temperatura na biodegradação de gasolina em um solo em micro e macro escala. Os componentes voláteis foram medidos por cromatografia gasosa em um headspace sobre o solo contaminado disposto em recipientes fechados. Os autores comentam que em um estudo de biodegradação é difícil separar as perdas devido à volatilização das que ocorrem via metabolismo microbiano. Foram realizadas também contagens de microrganismos em placas ao longo do tempo de experimentos. Diferentes concentrações de oxigênio (5, 6, 8, 10, 12, 18, 50 e 90%) foram consideradas nos microcosmos. Após ser simulado o vazamento de gasolina no solo, os hidrocarbonetos, a concentração de oxigênio e de CO₂ foram monitoradas via cromatografia. O efeito da adição de nutrientes foi avaliado via diferentes concentrações de vapores de amônia ou NH₄NO₃ e K₂HPO₄.

Zhou e Crawford (1995) mostraram os efeitos da temperatura durante o processo de biorremediação, simulando a temperatura do sub-solo do seu local de estudo (11°C), 25°C e a maior temperatura da superfície encontrada no verão (37°C). Os TPH iniciais eram de 1780 ppm e outros fatores eram constantes. Os valores de V_{máx} e k_s mostraram que as taxas de degradação aumentaram com a temperatura. A temperatura afeta a natureza física e a composição do petróleo, as taxas de metabolismo dos hidrocarbonetos e a composição das populações microbianas. Altas temperaturas aumentam a evaporação dos alcanos de cadeia curta e outros hidrocarbonetos de baixo peso molecular, geralmente causando toxicidade à membrana dos microrganismos, além de diminuir a viscosidade e solubilidade dos hidrocarbonetos na fase aquosa.

Zhou e Crawford (1995) observaram que maiores taxas de oxigênio não necessariamente resultam em maiores taxas de biodegradação aeróbica pelos microrganismos, sendo para o caso de estudo 10% a concentração ótima de oxigênio (a atmosfera tem 21%). Os autores explicam o fato observando que a atividade da nitrogenase é maior em concentrações de O₂ abaixo do valor atmosférico, e há muitas bactérias aeróbicas fixadoras de nitrogênio no solo.

Radwan et al. (2000) realizaram um estudo para verificar a biorremediação de hidrocarbonetos em solos desérticos através da utilização de fertilização do solo com uma mistura de glicose e peptona. A magnitude da atenuação foi bastante elevada para ser atribuída somente ao conteúdo de nitrogênio da peptona adicionada. A fertilização com KNO₃ contendo a mesma quantidade de nitrogênio da peptona mostrou uma melhora do efeito de

atenuação, mas menor em intensidade quando comparado ao composto de glicose e peptona. A mistura acarreta em um grande aumento da população de microrganismos, mantendo seu número alto até mesmo após a atenuação dos orgânicos.

Radwan et al. (2000) avaliaram a possibilidade de utilizar a água do mar na biorremediação de hidrocarbonetos no deserto por questões de custo, mas os resultados não foram satisfatórios, sendo necessária água doce. Além disso, observaram que os degradadores de hidrocarbonos respondem inicialmente à glicose e peptona e, após depletada a matéria orgânica adicionada, a população microbiana metaboliza os hidrocarbonetos.

Trindade et al. (2002) relatam que para o solo estudado, a otimização da biodegradação ocorreu quando o C:N:P foi ajustado em 100:1,25:1. É sabido que cada sistema apresenta sua condição de C:N:P ótima, dependendo do tipo de contaminante, concentração, biodisponibilidade, além da habilidade dos microrganismos na degradação do poluente. A taxa 100:10:1 é extremamente utilizada na literatura, porém em algumas situações específicas, o carbono do óleo não é completamente assimilado pela biomassa por ter compostos recalcitrantes ou metabolizados parcialmente. Trindade et al. (2002) discutem que o nitrogênio inorgânico pode ser melhor relacionado com a umidade do solo (N_{H_2O}) do que com o nível de substrato C:N para suprir mais adequadamente este nutriente evitando inibição. Uma superfertilização é dependente da umidade, que por sua vez pode reduzir a atividade dos microrganismos degradadores, sensíveis ao potencial de água no solo. Solos com maiores umidades podem diluir melhor o nitrogênio do que aqueles com baixa umidade. Deve-se lembrar, entretanto, que uma maior umidade diminui as taxas de transferência de O_2 . Deste novo conceito, a concentração ótima de N_{H_2O} é 2000 a 2500 mgN/kg de H_2O . As taxas de C:N de 100:1,25 e 100:5 utilizadas no trabalho de Trindade et al. (2003) resulta em valores de 5004 e 20015mgN/kg de H_2O , respectivamente.

A textura do solo é um parâmetro extremamente importante no processo de biorremediação, uma vez que mantém ou não umidade, e conseqüentemente aeração. A umidade ideal para otimizar os processos parece estar na faixa de 50 a 80% da capacidade de campo. A proliferação excessiva da microbiota promove a formação de biofilmes, que pode colmatar o solo, diminuindo sua aeração. O pH ideal, conforme diversos autores, está em uma faixa ao redor do neutro para levemente alcalino. Neste trabalho, buscou-se não alterar o pH do solo para avaliar a biorremediação em condições naturais.

2.1.10 Formação de Agregados

Um solo pode ser composto de material solto e partículas instáveis ou consistir em um material estruturado de partículas interligadas associadas em agregados, possuindo formas e tamanhos regulares. O arranjo, ou organização das partículas no solo (configuração interna da matriz de solo), é chamado de estrutura do solo. Burland (1990) definiu o termo “estrutura” de um solo natural como consistindo de duas partes: a malha que representa um arranjo espacial de partículas de solo e contatos interpartícula e “ligação” entre partículas, as quais podem ser progressivamente destruídas durante carregamentos (deformações plásticas). Ambos a malha e as ligações são fortemente afetados pelos processos de deposição, mudanças climáticas, atividade biológica e manejos dos solos, e são vulneráveis a forças destrutivas de natureza mecânica e físico-químicas (Khonke, 1968; Hillel, 1998).

Os agrônomos usualmente estão interessados, pelo menos para as camadas superficiais, em terem um solo solto e poroso e com boas condições de permeabilidade. Os engenheiros geotécnicos, por outro lado, necessitam de um solo denso e rígido para prover a máxima estabilidade e resistência ao cisalhamento e mínima permeabilidade. Ambos os casos necessitam do conhecimento das relações que envolvem a estrutura do solo. Há dois tipos principais de estabilidade: a capacidade do solo em reter sua estrutura sob ação da água e a sua capacidade de secar reterendo a estrutura sob ação de forças mecânicas externas como forças de compactação (Khonke, 1968; Hillel, 1998). Na prática da engenharia geotécnica, técnicas para melhorar as características do solo podem ser empregadas em diferentes tipos de solo, e abrangem uma variedade de métodos, como reforço, cimentação, compactação e remoção de água (Schnaid et al., 2001). O cimento Portland (material inorgânico) pode ser utilizado para melhorar as propriedades dos solos e resulta do processo de trocas de íons e floculação (Burland, 1989, 1990; Petley et al., 1993; Zhu et al., 1995; Cuccovillo e Coop, 1999). Dependendo da percentagem de cimento adicionado ao solo, um solo com baixa densidade gradualmente se modifica para uma estrutura cimentada na qual suas propriedades são função da mistura. Estas propriedades não se encaixam necessariamente em teorias clássicas de mecânica do solo (Leroueil e Vaughan, 1990).

A agregação de solo é um importante aspecto que pode decorrer de processos de biorremediação (Southam et al., 2001), sendo útil e importante sua consideração na

engenharia geotécnica, especialmente no estudo de taludes, barragens e estradas. A estrutura característica de solos é frequentemente atribuída a “oxidação” originada pelas variações no nível do lençol freático nos depósitos de argilas moles. Parte dos compostos de oxidação de ferro nos solos é catabolizada pelos microrganismos em formação de biofilmes. Algumas bactérias são conhecidas por fazerem a oxidação de Fe^{2+} enzimaticamente, como as *Thiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Sulfolobus* sp., *Acidianus* sp., e *Gallionella* sp. Todos os gêneros mencionados podem ser associados com a formação de “cimentos” em depósitos de ferro (Paul and Clark, 1996).

Khonke (1968) e Hillel (1998) mostram que a atividade microbiana afeta a agregação do solo e que se modifica conforme os microrganismos presentes, que podem incluir espécies de protozoários, bactérias, fungos e actinomicetos. O autor discute a importância das bactérias da rizosfera, que têm uma associação direta com as raízes de plantas, assim como os fungos, que formam redes extensivas de adesão através de finos filamentos conhecidos por hifas. A composição da microfauna e da microflora depende da temperatura e umidade, pH do solo e seu potencial de oxidação e redução, nutrientes e tipos e quantidade de matéria orgânica presente no solo (Alexander, 1977, 1994).

Os microrganismos do solo agregam partículas por meio de mecanismos complexos, como adsorção, modificações físicas, cimentação e excreção de produtos mucilaginosos (Khonke, 1968; Hillel, 1998). Neste contexto são importantes diversos produtos microbianos capazes de formar os agregados, como os polissacarídeos, hemiceluloses ou uronídeos e outros polímeros naturais (Coleman e Crossley, 1996). Estes materiais são conectados às superfícies de argilas por meio de pontes de cátions, hidrogênio e forças de Van der Waals, e mecanismos de adsorção de ânions. Os polissacarídeos, em particular, consistem em moléculas grandes, lineares e flexíveis capazes de formar ligações múltiplas com diversas partículas de uma só vez. Em alguns casos, os polímeros orgânicos localizam-se entre as partículas de argila e formam uma cápsula ao redor dos agregados. Em outros casos, soluções de agentes orgânicos ativos penetram nos agregados de solo e então formam cimentos insolúveis (apesar de ainda serem biologicamente biodegradáveis)(Khonke, 1968; Hillel, 1998). Todo este conhecimento foi empregado nesta Tese para demonstrar a agregação de partículas de solo em um microcosmo contaminado por gasolina, fator importante que deve ser analisado em de processos de biorremediação, conforme avalia Southam et al. (2001).

2.1.11 Percolação de Contaminantes

Zhou e Crawford (1995) apresentam na Figura 2.10 o desaparecimento dos TPH pela degradação microbiana a 25°C em amostras retiradas de diferentes profundidades, com conseqüentes tipos de formação de solo diferentes (argila e combinações com silte e cascalho). Foi colocada a mesma concentração inicial de TPH e mantidas outras variáveis constantes, conforme os autores. Zhou e Crawford (1995) observaram que as taxas de degradação dos TPH foram diretamente proporcionais à população microbiana existente no solo, como já visto no item 2.1.6. Os autores consideram que outros fatores como profundidade e tamanho de partículas não influenciam as taxas de biodegradação de forma tão óbvia. Entretanto, isso não é verdade, uma vez que os solos são, para efeitos práticos, diferentes, consistindo em um erro metodológico dos autores. O trabalho, apesar deste fato, apresenta uma importante contribuição.

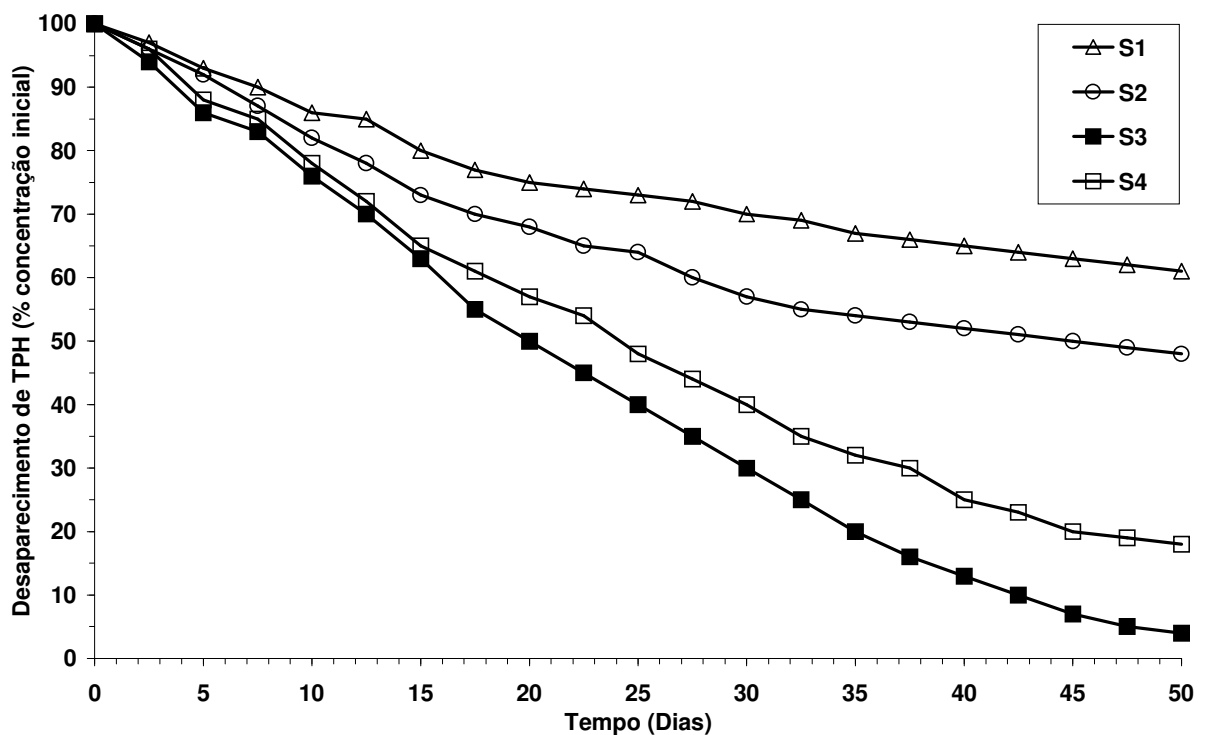


Figura 2.10: Desaparecimento do TPH em diferentes profundidades (Zhou e Crawford, 1995)

Corseuil e Alvarez (1996) discutem que progressos significativos foram feitos no entendimento da hidrogeoquímica e fatores microbiológicos que influenciam na biorremediação natural de aquíferos contaminados nos EUA e na Europa, mas que, entretanto, esta experiência deve ser extrapolada com cuidado para áreas contaminadas no Brasil, onde a

gasolina contém aproximadamente 22% de etanol. Conforme os autores, os hidrocarbonetos encontram-se em um estado reduzido, e sua oxidação pode ser feita termodinamicamente. Os microrganismos podem mediar a oxidação utilizando aceptores de elétrons durante seus processos de respiração. A utilização preferencial observada reflete um potencial decrescente de oxidação e aceptores de elétrons: oxigênio, nitrato, Fe^{3+} , sulfato e dióxido de carbono. A cinética da oxidação é mais rápida para os aceptores de elétrons de maior potencial de oxidação. A presença de etanol na gasolina brasileira representa um adicional significativo da demanda de oxigênio, diminuindo a degradação aeróbia dos BTX em aquíferos com limitação de oxigênio (Figura 2.11).

EPA (1996) mostra que após um episódio de vazamento de um tanque de armazenamento subterrâneo, os hidrocarbonetos se infiltram no solo e interagem com o mesmo, manifestando-se de diversas formas (Figura 2.12). Os compostos hidrocarbonetos de petróleo podem se particionar em cinco fases em subsuperfície: a) vapor (no gás do solo); b) residual (retido por ação da capilaridade); c) adsorvido (na superfície das partículas sólidas, incluindo matéria orgânica); d) dissolvido (na água); e) fase livre (hidrocarboneto líquido, móvel).

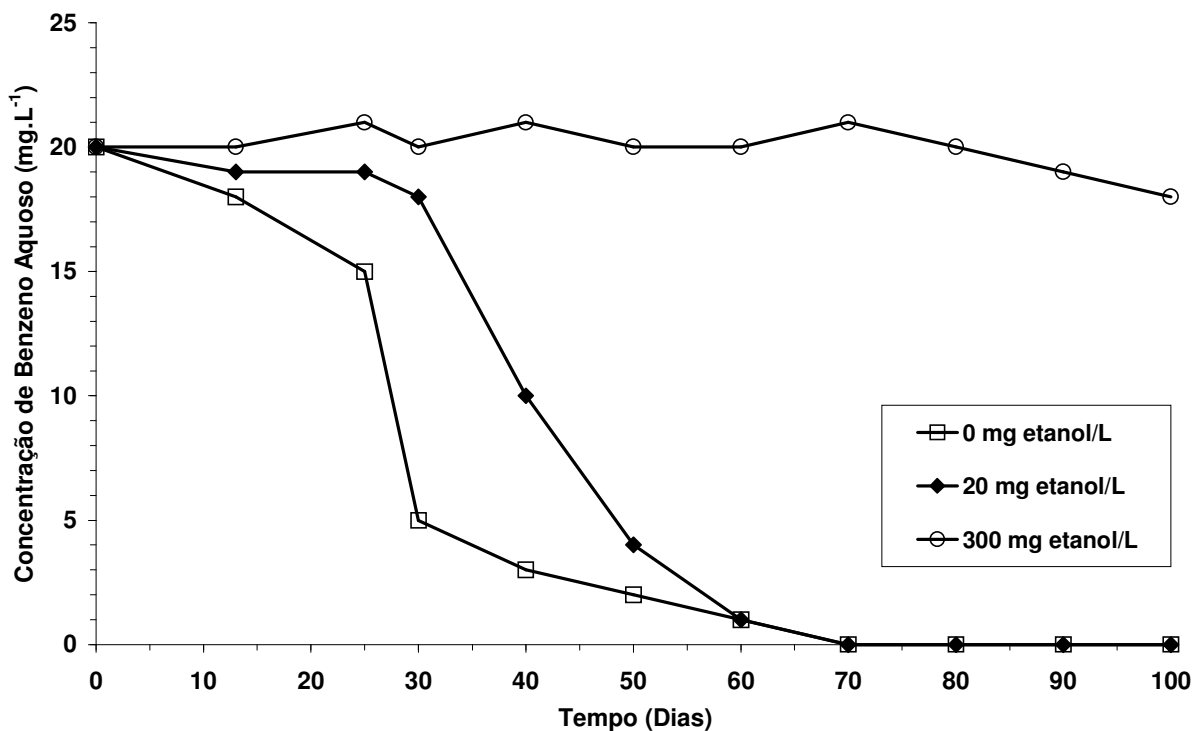


Figura 2.11: Efeito da concentração de etanol na degradação aeróbia de benzeno em um microcosmo de aquífero (Corseuil e Alvarez, 1996)

A massa de hidrocarbonetos das fases residual e livre irão se volatilizar e solubilizar parcialmente, para se tornar componentes do vapor do solo e da água subterrânea (EPA, 1996). Quanto aos hidrocarbonetos da fase vapor, estes são muito mais móveis e podem migrar a grandes distâncias ao longo do fluxo preferencial, como em fraturas, juntas, camadas de areia e linhas de utilidades subterrâneas. A proporção em que a massa inicial de contaminante se distribui nestas diversas fases pode ser estimada a partir do mapeamento das plumas de fase livre e dissolvida, da concentração do contaminante no solo e no vapor do solo. Deve-se atentar para o fato de que a retenção capilar consegue manter na forma imóvel quantidades significativas de hidrocarbonetos puros, que agem como fonte permanente de contaminação do aquífero e como fonte de vapores para a superfície (EPA, 1996).

EPA (1996) relata que após o vazamento, os hidrocarbonetos tendem a migrar descendentemente sob influência das forças gravitacionais e capilares. Enquanto a fonte de vazamento continuar fornecendo produto, o solo vai se tornando mais saturado de hidrocarbonetos e o centro de massa da pluma vai migrando descendentemente, deixando uma fase residual de hidrocarbonetos imóveis no solo ao lado a acima da frente de avanço da pluma. Se o volume de hidrocarbonetos vazados é pequeno em relação à capacidade de retenção do solo, os hidrocarbonetos tenderão a ficar retidos por capilaridade no solo e a massa total de contaminante ficará imobilizada. Para haver acúmulo de fase livre sobre o nível d'água, o volume vazado deve ser suficiente para exceder a capacidade de retenção do solo entre o ponto de vazamento e o nível d'água.

Na Figura 2.13 está representada a progressão do hidrocarboneto vazado de um tanque de armazenamento subterrâneo. A Figura 2.13A ilustra a massa de hidrocarbonetos antes de atingir a franja capilar. Se a fonte de produto cessasse neste momento, provavelmente não haveria fase livre. A Figura 2.13B ilustra o que ocorreria se o vazamento continuasse e o volume vazado fosse suficiente para iniciar o acúmulo de fase livre e o deslocamento da franja capilar. O produto livre começa a deslocar a franja capilar e alguns dos seus compostos solúveis dissolvem-se na água subterrânea. A Figura 2.13C ilustra o momento em que a fonte cessa. Os resíduos de hidrocarbonetos permanecem no solo abaixo do tanque. A pluma de fase livre se espalha lateralmente e uma pluma de contaminante dissolvido migra no sentido do fluxo subterrâneo (EPA, 1996).

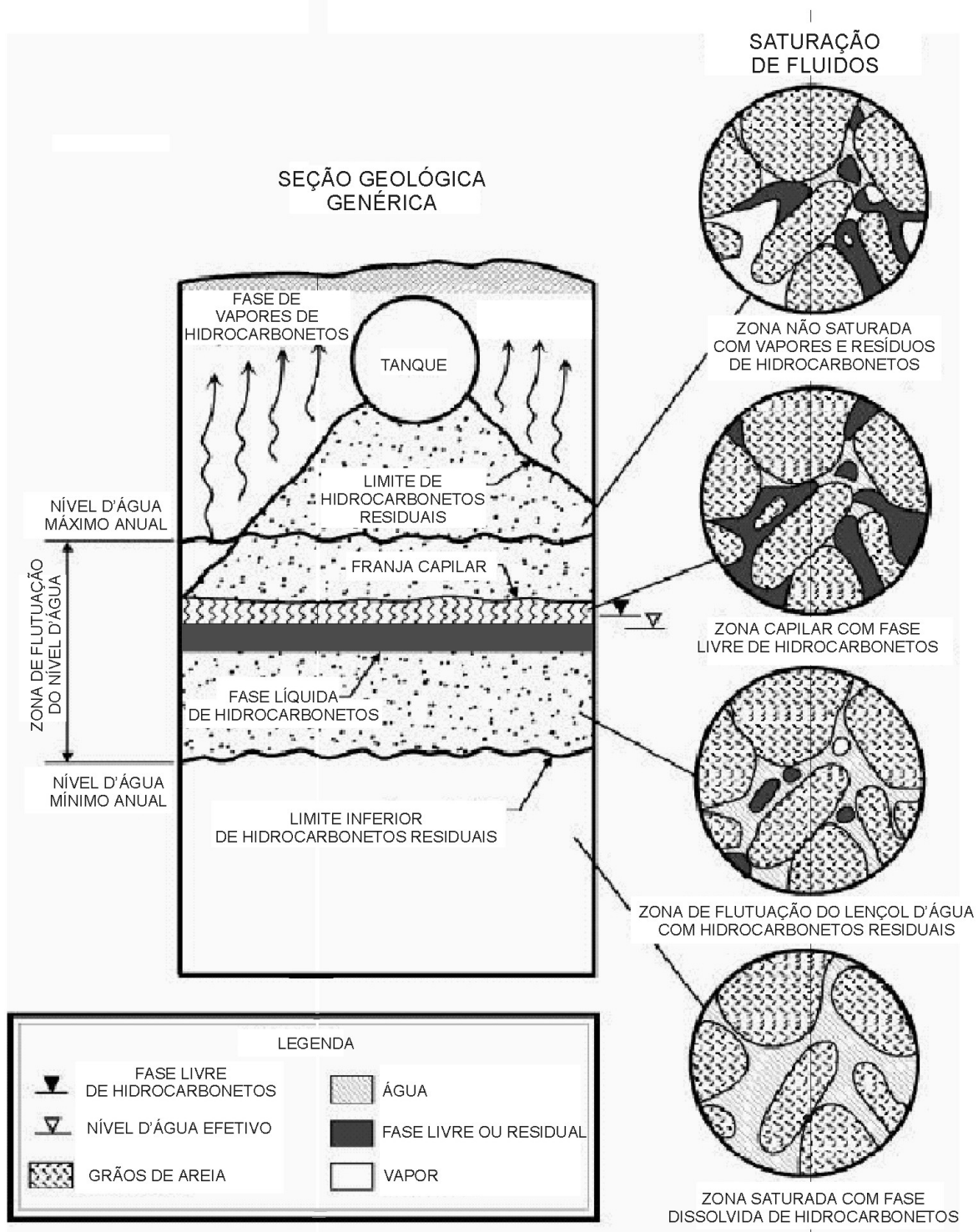


Figura 2.12: Distribuição vertical das fases dos hidrocarbonetos (EPA, 1996)

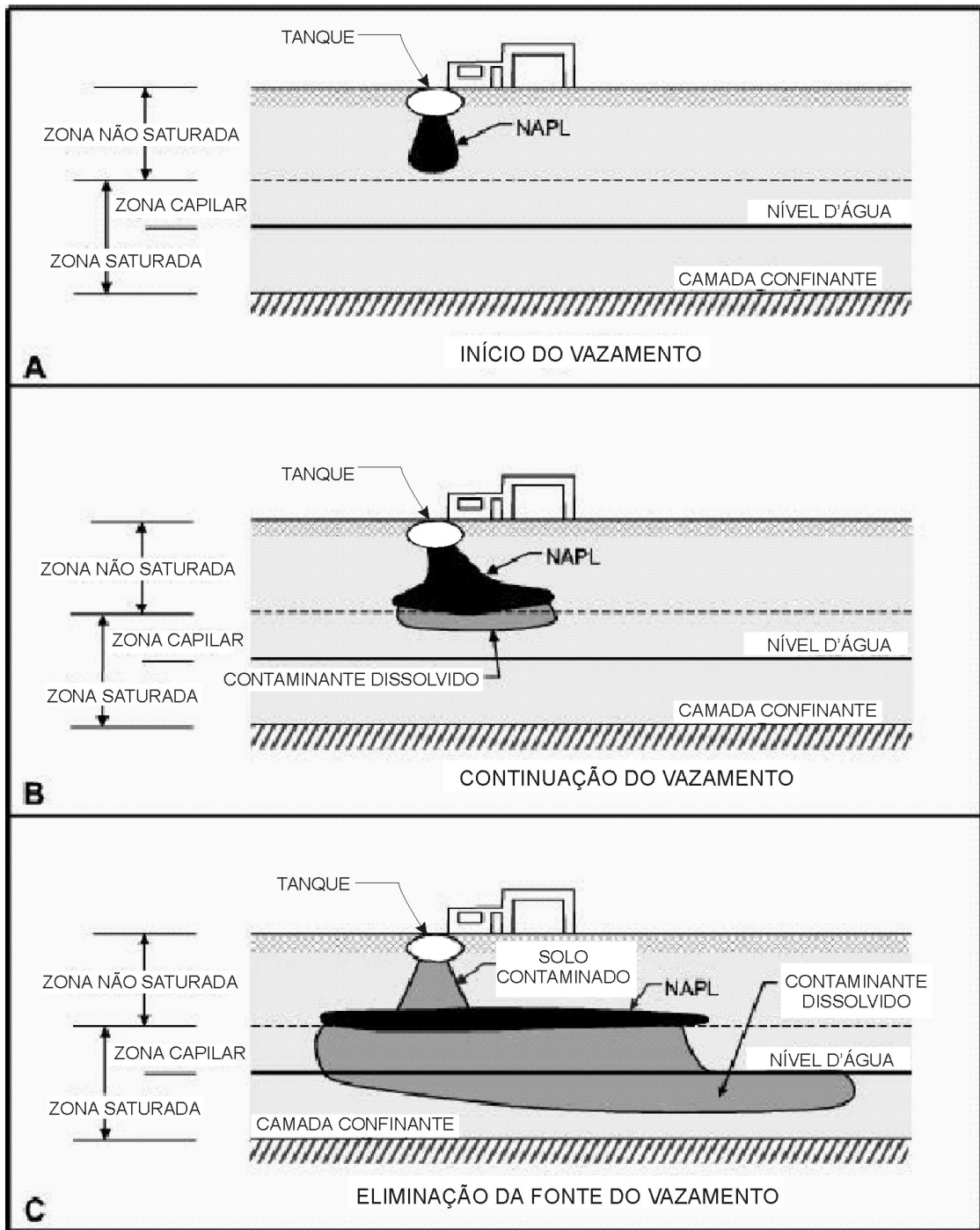


Figura 2.13: Progressão do hidrocarboneto vazado de um tanque de armazenamento subterrâneo (EPA, 1996)

Corseuil et al. (1998) investigaram os efeitos do etanol na degradação de compostos BTX sob condições de aceptores de elétrons comumente encontradas nos projetos de biorremediação em microcosmos de aquíferos. Os microcosmos foram feitos com material arenoso proveniente de um aquífero contendo pouca matéria orgânica (0,2%) e sabidamente nunca expostos anteriormente aos BTX. A água subterrânea foi coletada do mesmo local. Controles

e testes com nutrientes também foram executados. Além disso, foram recriadas situações anaeróbicas no mesmo experimento. Os resultados mostraram que o etanol é preferencialmente utilizado sobre os compostos de BTX e há um período sem degradação dos compostos enquanto o etanol é degradado. Conforme os autores, a preferência pelo etanol sobre os BTX mostra que o álcool é um substrato facilmente degradado que pode ser oxidado pelas enzimas constituintes da microbiota através de vias metabólicas centrais. Os efeitos de degradação do etanol anteriormente aos BTX também foi observado no meio aeróbio nos tratamentos com a adição de nutrientes. Uma vez que a gasolina brasileira possui grande parte de etanol, existe a possibilidade que nas águas subterrâneas impactadas por vazamentos, etc, o oxigênio disponível seja rapidamente consumido antes que a degradação dos BTX inicie. Esta observação é particularmente importante para o benzeno, o mais tóxico dos BTX e que se degrada muito lentamente em condições anaeróbicas. O fato sugere que o benzeno possa migrar sem bioatenuação até que o etanol seja biodegradado.

Corseuil et al. (1998) observaram que o tolueno foi degradado sob todas as condições de aceptores de elétrons testados, com taxas de degradação aumentando conforme o potencial de oxidação (aeróbio > desnitrificadores > redutores de ferro > redutores de sulfato > metanogênicos). O benzeno somente foi degradado em microcosmos aeróbicos, sendo recalcitrante para as demais condições estudadas durante um período de 99 dias de incubação.

Solano-Serena et al. (2000) relatam que a persistência da gasolina em um solo contaminado depende da migração dos contaminantes e dos processos de biorremediação. Cordazzo et al. (2000) realizaram um estudo numérico bidimensional para o escoamento de gasolina acrescida de álcool no solo para a região saturada em volumes finitos com um modelo de biodegradação de primeira ordem. Foi, portanto, considerado o efeito do etanol na biodegradação dos constituintes da gasolina, fenômenos de co-solvência e retardo da pluma. Também foi resolvido numericamente o campo de velocidades da água subterrânea através das equações de Darcy, que permitiram o modelamento de escoamentos mais complexos, envolvendo bombeamentos e sucções no solo. Cordazzo et al. (2000) verificaram que há preferencialmente a degradação do etanol por parte dos microrganismos, retardando a degradação dos compostos de BTEX.

Deeb e Alvarez-Cohen (2000) avaliaram o impacto das inerações do substrato nas taxas de biotransformação e potenciais de mineralização de monoaromáticos e metil terc-butil éter

(MTBE) que geralmente são encontrados em plumas de contaminação de lençóis freáticos. Os hidrocarbonetos de petróleo são contaminantes comuns dos lençóis freáticos, sendo de particular interesse os aromáticos e oxigenados da gasolina, primariamente o benzeno, tolueno, etil-benzeno, xilenos e MTBE. Deeb e Alvarez-Cohen (2000) utilizaram um consórcio de dois isolados microbianos de um aquífero contaminado por gasolina, controlando as perdas abióticas de volatilização através de solos controle estéreis contendo BTEX marcados com material radioativo. Os autores tentaram identificar as interações de substrato nas misturas de BTEX quanto a aspectos positivos (cometabolismo) e negativos (inibição). Observaram que a presença de etil-benzeno tem um efeito inibitório nas transformações de benzeno, tolueno e xilenos e, por outro lado, notaram que a presença de outros componentes em misturas binárias com o etil-benzeno possuem um efeito negativo sobre este composto. Deeb e Alvarez-Cohen (2000) mostram ainda que as vias de biodegradação obtidas através de culturas puras confirmaram que o tolueno e o etil-benzeno são degradados pela mesma via metabólica.

Powers et al. (2001) fizeram uma revisão do transporte de etanol e BTEX na subsuperfície após um derrame de gasolina contendo o álcool. O etanol aumenta a concentração aquosa dos BTEX devido a um efeito de co-solvência, e pode inibir a biodegradação dos compostos consumindo preferencialmente os aceptores de elétrons e os nutrientes. O etanol pode aumentar o espraiamento das plumas de BTEX. Os autores também afirmam que o efeito do etanol na atenuação natural dos BTEX é sistema-específico e depende da capacidade de assimilação dos aquíferos.

Considerando as políticas de incentivo para a expansão do uso de etanol como combustível e seu uso junto à gasolina tanto nos EUA como no Brasil, Powers et al. (2001) acreditam que o álcool será encontrado mais freqüentemente nas plumas do lençol freático contendo BTEX. Os autores consideram que um maior estudo dos efeitos do etanol e do transporte dos compostos de BTEX é necessário para se determinar se os benefícios econômicos e ambientais da adição de etanol à gasolina trarão efeitos negativos na qualidade dos lençóis freáticos e no meio ambiente em geral. Devemos, entretanto, avaliar também a possibilidade de combate aos vazamentos e a prevenção de futuros derrames utilizando toda a tecnologia disponível. A gasolina brasileira contém aproximadamente 22-24% de etanol (Cunha e Leite, 2000; Cordazzo et al., 2000; Powers et al., 2001).

Conforme já visto anteriormente, a presença de químicos oxigenados tem um impacto na migração da gasolina na subsuperfície após um vazamento ou derrame, e conseqüentemente na saúde pública. Powers et al. (2001) relatam que há numerosos processos que afetam a concentração de contaminantes nos aquíferos, que incluem a infiltração da gasolina pela zona não-saturada, espalhando-se pelo nível d'água, com dissolução de compostos mais solúveis da gasolina para a água, sendo estes químicos transportados com o lençol freático até sua adsorção e biorremediação (Figura 2.14). A Figura 2.14 é uma modificação da Figura 2.13 (EPA, 1996).

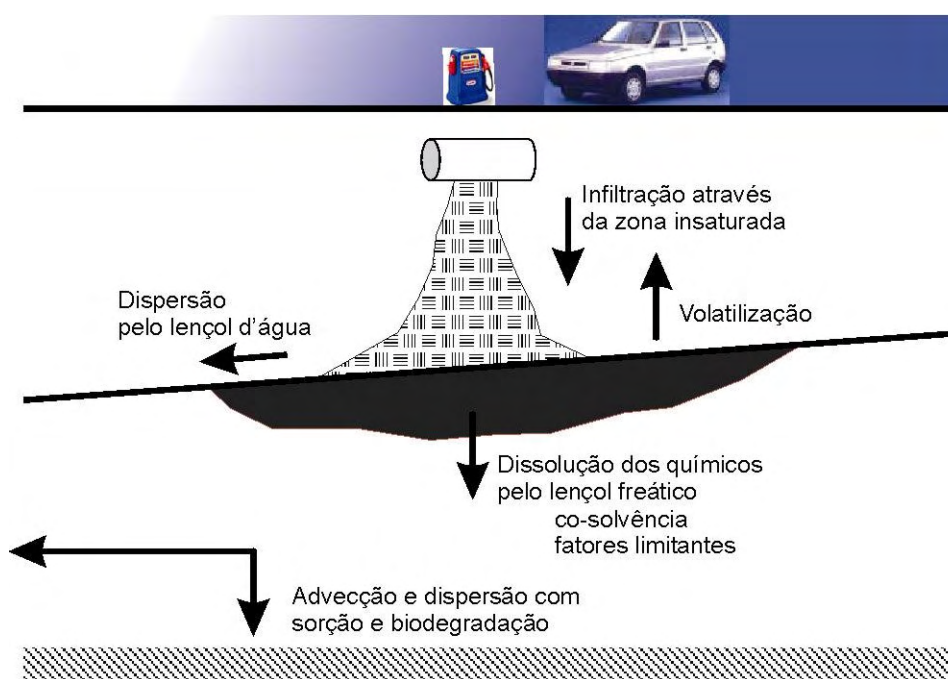


Figura 2.14: Processos gerais que governam a gasolina na subsuperfície (modificado de Powers et al., 2001)

A adição de etanol a gasolina afeta uma relação de equilíbrio ideal por efeitos de co-solvência, causados pela presença de altas concentrações de compostos orgânicos, como os álcoois, na fase aquosa. Estes co-solventes reduzem a polaridade da fase aquosa, ocasionando uma redução do coeficiente de atividade da fase aquosa e permitindo uma maior concentração de compostos orgânicos hidrofóbicos na fase aquosa (Powers et al., 2001). Corseuil e Fernandes (1999) mostraram que até mesmo pequenas concentrações de etanol na fase aquosa aumentam a solubilidade dos BTEX. Uma concentração de etanol aquoso de 10% aumenta a concentração de BTEX dissolvido em 30%.

Powers et al. (2001) discutem que os transportes de massa no lençol freático são controlados por processos de advecção e dispersão hidrodinâmica. A advecção é o principal meio de transporte de hidrocarbonetos na direção do fluxo de velocidades, enquanto a dispersão hidrodinâmica é responsável pelo transporte em outras direções.

De acordo com os químicos e condições de redox nos aquíferos, o etanol pode estimular processos microbiológicos que afetam as propriedades hidrodinâmicas dos aquíferos. A formação de agregados de células e biofilmes reduzem a porosidade e se torna um importante mecanismo de colmatção. Microrganismos podem também afetar a permeabilidade dos aquíferos contribuindo na dissolução mineral (CaCO_3) ou precipitação (FeS). A combinação do crescimento microbiano com a precipitação mineral pode resultar em uma significativa redução da porosidade e permeabilidade ao longo do tempo (Powers et al., 2001).

2.1.12 Considerações Finais de Biorremediação

Conforme Frankenberger (1992), um estudo ideal de solos contaminados deve incluir investigações das propriedades físicas e químicas do solo contaminado, dinâmica da população microbiana, metais pesados, depleção de TPH, BTEX ou outro parâmetro específico, e mineralização de hidrocarbonetos. As propriedades físico-químicas devem ser caracterizadas em termos de pH, nitrogênio inorgânico, fósforo inorgânico e análise de agregação de partículas. Os microrganismos devem ser enumerados em relação ao total da população e degradadores específicos. Metais pesados devem ser considerados, pois inibem a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo. A quantidade de CO_2 pode fornecer um índice confiável da degradação do petróleo. Tratamentos que considerem estudos em microcosmos devem incluir controles estéreis e não estéreis e aplicações de nutrientes. A melhor relação C:N:P deve ser estabelecida. Por fim, pode-se considerar um estudo de voláteis e TPH ou hidrocarbonetos específicos, através de técnicas cromatográficas. A presente Tese abrange todos estes itens e ainda efeitos de permeabilidade e agregação de partículas, e toxicidade e lesão celular causadas durante um procedimento de biorremediação de gasolina.

2.2 TOXICIDADE E LESÃO CELULAR CAUSADAS POR HIDROCARBONETOS

2.2.1 Introdução

A gasolina e o querosene, dois destilados do petróleo preparados pelo fracionamento do óleo cru, contém hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e vários outros hidrocarbonetos com cadeias ramificadas e insaturadas. Esses compostos são usados como combustíveis para iluminação, aquecimento e motores; veículos para alguns pesticidas; agentes de limpeza e solventes para tintas. Como geralmente são armazenados em garrafas que foram usadas para embalar bebidas, a gasolina e o querosene são causas comuns de intoxicações acidentais em crianças. Uma preocupação associada à exposição crônica à gasolina é que ela contém cerca de 2% de benzeno e, por essa razão, pode causar leucemia (Klaassen, 2003).

As intoxicações causadas pela ingestão de gasolina e querosene são semelhantes às provocadas pelo álcool etílico (Klaassen, 2003). Os sinais e sintomas incluem incoordenação, agitação, excitação, confusão, desorientação, ataxia, delírio e finalmente coma, que pode estender-se por algumas horas ou vários dias. A inalação de concentrações altas dos vapores da gasolina como, por exemplo, por trabalhadores que limpam tanques de armazenamento (Takamiya et al., 2003), pode causar morte imediata ou em algumas horas. Os vapores da gasolina sensibilizam o miocárdio, de forma que quantidades pequenas de epinefrina circulante podem desencadear fibrilação ventricular (muitos hidrocarbonetos exercem essa ação). Concentrações altas do vapor de gasolina também podem causar depressão rápida do SNC e óbito devido à insuficiência respiratória. Com a inalação de concentrações altas por algumas horas, o paciente pode desenvolver pneumonite (Klaassen, 2003).

As intoxicações causadas por hidrocarbonetos resultam da inalação dos vapores ou ingestão das preparações líquidas. A ingestão é mais perigosa porque os líquidos têm tensão superficial baixa e podem ser facilmente aspirados para o trato respiratório junto com os vômitos ou a eructação. A morbidade é atribuída à aspiração, que ocorre durante a ingestão ou por ocasião do tratamento. A lesão pulmonar não é causada pela absorção gastrintestinal da gasolina ou do querosene. A pneumonite química, complicada por pneumonia bacteriana e edema pulmonar secundários, é a seqüela mais grave da aspiração. O óbito causado pelo edema pulmonar

hemorrágico geralmente ocorre em 16 a 18h e raramente além de 24h depois da aspiração (Klaassen, 2003; Kumar et al., 2005).

O exame dos tecidos dos pacientes que evoluíram ao óbito demonstra pulmões pesados, edemaciados e hemorrágicos. Os alvéolos estão preenchidos por um exsudato rico em proteínas, células e fibrina, geralmente com um padrão semelhante ao da doença da membrana hialina. As paredes alveolares estão espessadas e podem romper-se, causando seqüelas menos comuns como enfisema e pneumotórax. Os linfonodos pulmonares estão inflamados e, em alguns casos, foram encontradas broncopneumonia e atelectasia (Klaassen, 2003; Kumar et al., 2005).

As medidas sintomáticas e de sustentação provavelmente são o melhor tratamento para as intoxicações por gasolina ou querosene (Ervin, 1983; Gosselin et al., 1984). Tendo em vista o risco de aspiração, os vômitos ou a lavagem gástrica devem ser evitados, a menos que os riscos estejam justificados pela presença de outras substâncias tóxicas no destilado do petróleo. A catarse pode ser induzida com sulfato de magnésio ou sódio. Antibióticos são usados se houver indicação específica, como por exemplo pneumonite bacteriana. A epinefrina e compostos relacionados devem ser evitados porque podem provocar arritmias cardíacas. O tratamento deve incluir a correção dos distúrbios hidreletrolíticos (Klaassen, 2003; Kumar et al., 2005).

O benzeno é um solvente excelente, sendo um composto amplamente usado nas sínteses químicas e componente natural dos combustíveis para automóveis. Entretanto, o benzeno tem causado efeitos tóxicos graves nos seres humanos expostos a concentrações altas. Depois da exposição aguda a uma grande quantidade de benzeno, por ingestão ou inalação dos vapores concentrados, o efeito tóxico principal ocorre no SNC (White e Proctor, 1997; Feldman et al., 1999; Cairney et al., 2002). Os sintomas causados pela exposição branda são tonturas, fraqueza, euforia, cefaléia, náuseas, vômitos, sensação de constrição torácica e marcha cambaleante. Se a exposição for mais grave, os sintomas progredem para visão embaçada, tremores, respiração superficial e rápida, irregularidades ventriculares, paralisia e inconsciência (Klaassen, 2003; Kumar et al., 2005).

Em geral, a exposição prolongada ao benzeno se deve à inalação do vapor ou ao contato com a pele. Os sinais e sintomas da exposição prolongada ao benzeno incluem efeitos no SNC e no

trato gastrointestinal (cefaléia, perda do apetite, sonolência, nervosismo e palidez), mas a manifestação tóxica principal é a anemia aplásica. As células da medula óssea que se encontram nas fases iniciais do desenvolvimento são as mais sensíveis ao benzeno (Andrews e Snyder, 1991) e a parada da maturação acarreta depleção gradativa das células circulantes. Uma preocupação importante é a relação entre exposição prolongada ao benzeno e leucemia (Rinsky et al., 1987; Mehlman, 1991). Os estudos epidemiológicos foram realizados com trabalhadores da indústria de pneumáticos e fábricas de sapatos, nas quais o benzeno é amplamente usado. Entre os trabalhadores que morreram devido à exposição ao benzeno, os óbitos foram causados por leucemia ou anemia aplásica, em percentagens praticamente iguais. O benzeno é classificado pela EPA e IARC como carcinógeno humano. Esse composto é metabolizado a uma série de produtos fenólicos com anéis fechados e seus conjugados (Snyder et al., 1993). A anemia aplásica e a leucemia provavelmente não se devem a um desses metabólitos, mas envolvem a ação conjunta de vários metabólitos (Snyder et al., 1993). No processo de produção desses metabólitos, são formados intermediários reativos que se ligam covalentemente com várias proteínas e DNA e podem ser responsáveis pelos efeitos tóxicos do benzeno na medula óssea (Kalf et al., 1987).

O tolueno é muito usado como solvente de tintas, vernizes, colas, esmaltes e produtos e como intermediário químico das sínteses de outros compostos orgânicos. O tolueno é depressor do SNC e concentrações baixas causam fadiga, fraqueza e confusão, podendo levar a arritmias ventriculares, inibição do reflexo vagal, depressão respiratória e anoxia. A intoxicação crônica também envolve o rim e o fígado (Raikhlin-Eisenkraft et al., 2001). É pelos efeitos dos solventes como o tolueno no SNC que os "cheiradores de cola" inalam seus vapores. Ao contrário do benzeno, o tolueno não causa anemia aplásica ou leucemia. Contudo, os solventes da cola costumam ser misturados e os "cheiradores" geralmente são expostos a outros solventes além do tolueno (Klaassen, 2003).

A presente pesquisa, como já enfatizado, buscou analisar e verificar o que ocorre com uma população que habite ao redor de um processo de biorremediação de gasolina. A literatura é vasta no que se refere a trabalhadores de fábricas de tintas, gráficas e postos de combustível em relação à concentração e metabolização de compostos BTEX, PAHs, PCBs, PCPs, suas rotas bioquímicas e acidentes com estes produtos envolvendo seres vivos (Wong e Raabe, 1997; Powley e Carlson, 1999; Jo e Song, 2001; Senzolo et al., 2001; Takamiya et al., 2003),

além de alterações neurológicas (White e Proctor, 1997; Feldman et al., 1999; Cairney et al., 2002). Entretanto, poucos trabalhos avaliaram histologia, hematologia, funções hepáticas e outras atividades enzimáticas (Caldwell, 1997; Gagnon e Holdway, 1999; Pacheco e Santos, 2001; Khan et al., 2001), genéticas (Andreoli et al., 1997; Pitarque et al., 1999; Ansari-Lari et al., 2003; Celik e Akbas, 2005) e reprodutivas (McKee et al., 2000; Roberts et al., 2001), endócrinas (Pacheco e Santos, 2001) ou o sistema urinário e cardio-respiratório (Khan et al., 2001; Long et al., 2003) como um todo. Nenhum trabalho avaliou de forma clara todo este conjunto em um modelo único, e nunca foi avaliado o que ocorre com uma população ao redor de um processo de biorremediação.

2.2.2 Exposição Ambiental e Alterações Fisiológicas e Bioquímicas Causadas pelos Hidrocarbonetos Presentes na Gasolina

Massad et al. (1985) realizaram uma investigação comparativa da exposição inalatória à exaustão de motores a gasolina e etanol. Ratos Wistar foram introduzidos em câmaras de inalação e expostos a várias concentrações de monóxido de carbono, gasolina e etanol no ar. Os ensaios mostraram que a concentração letal para 50% da amostra em 3h era maior para a gasolina do que para o etanol. Os autores observaram que a gasolina contém outras substâncias nocivas além do CO, sendo as responsáveis pela maior toxicidade.

Mehlman (1991) realizou um estudo epidemiológico com seres humanos e demonstrou um importante aumento de câncer em diversos órgãos como resultado à exposição de gasolina e seus componentes. Na análise dos componentes constituintes da gasolina, o autor estabeleceu relações inequívocas entre o benzeno e o 1,3-butadieno e o surgimento de câncer. Corseuil e Alvarez (1996) relatam que todos os compostos BTEX são poderosos depressores do sistema nervoso central (SNC), sendo que o benzeno, ainda, pode causar leucemia nos seres humanos. Caldwell (1997) discute que o benzeno é considerado tóxico para os mamíferos, mas somente em altas dosagens (100mg/L) e por longos períodos de exposição.

Laitinen et al. (1994) avaliaram a exposição de mecânicos a vapores de gasolina durante ajustes de sistemas de injeção, carburadores e outros reparos no seu ambiente de trabalho. Os autores observaram que o contato direto na pele com a gasolina ocorre seguidamente e é

significante, uma vez que a maioria destes trabalhadores não utiliza luvas protetoras, sendo que há penetração da gasolina pela pele – rota principal da exposição (cerca de 80%). Periago e Prado realizaram um estudo semelhante com atendentes de postos de combustível, observando uma relação significativa entre o volume de gasolina vendido e a concentração de BTX no ambiente, vista através de dosímetros 3M-3500 colocados nos frentistas.

Hakkola e Saarinen (1996) mediram a exposição de motoristas de caminhão tanque à gasolina e alguns de seus compostos durante o seu dia de trabalho, principalmente no carregamento e o descarregamento do caminhão, fato que ocorria em torno de quatro vezes ao dia. A concentração de benzeno encontrada foi de 1,1 a 18 mg/m³, e a exposição durante os percursos foi considerada insignificante.

Wang e Raabe (1997) avaliaram os riscos de desenvolver um mieloma múltiplo à exposição de benzeno em uma meta-análise com 250.000 trabalhadores envolvidos com petróleo. O mieloma múltiplo, ou mielomatose, é uma proliferação maligna de células da medula óssea. A análise indicou que os trabalhadores do petróleo não estão em risco aumentado para o mieloma múltiplo em resultado de sua exposição aos produtos do petróleo em seu ambiente de trabalho.

Caldwell (1997) avaliou as alterações das enzimas séricas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamil-transferase (γ GT) e a histologia do fígado, baço, guelras e rins de algumas espécies de peixes submetidos a um derrame de uma mistura de hidrocarbonetos aromáticos. O acidente envolveu um vagão de trem contendo 114.000L da mistura, vazada sobre o Rio Nemadji, Wisconsin, EUA. Caldwell (1997) mostrou através da análise histológica que o tecido das guelras dos peixes coletados na área contaminada apresentaram hiperplasia basal, fusão do epitélio lamelar, produção excessiva de muco e edema lamelar. Os outros órgãos não apresentaram alterações quando comparados aos controles. Das três enzimas avaliadas, a AST foi significativamente aumentada no *I. melas* e no *C. commersoni* ($P < 0,001$). O autor discute que apesar de não significativa, há uma tendência de elevação da AST nos demais peixes e da ALT em quase todas as espécies. A γ GT não foi detectada em nenhuma das espécies coletadas. Esta avaliação, entretanto, deve ser vista com extrema cautela, uma vez que parâmetros biológicos são bastante variáveis e, além disso, uma amostragem muito insignificante foi feita em alguns grupos, em especial nestes onde foram observadas as diferenças (N = 4 ou até mesmo 2!). Caldwell (1997) relata que

Gingerich e Dalich (1978) demonstraram que uma dose de 1,0mL/kg de monoclorobenzeno elevou a ALT de 27 para 56 U/L em trutas *Oncorhynchus mykiss* num período de 72h, retornando ao normal 24h após a retirada do contaminante. Caldwell (1997) sugere que as aminotransferases podem ser um bom indicador de exposição a contaminantes em peixes.

Powley e Carlson (1999) relatam que a toxicidade do benzeno está relacionada ao seu metabolismo. Os metabólitos envolvidos são o fenol, hidroquinona, catecol e provavelmente o óxido de benzeno. Inicialmente ocorre a formação do óxido de benzeno, com meia-vida de 8 minutos no sangue de ratos, sugerindo que saia do fígado para a medula óssea. Uma vez que este óxido é um composto eletrofílico estável, pode contribuir diretamente para a toxicidade do benzeno. Um outro mecanismo de toxicidade proposto é que a hidroquinona seria metabolizada na medula óssea a p-benzoquinona, que seria a responsável pelos efeitos leucemogênicos. Experimentos in vivo, entretanto, mostraram que o fenol ou a hidroquinona sozinhos não causam lesões significativas à medula óssea em ratos, apenas quando em conjunto (Powley e Carlson, 1999).

Gagnon e Holdway (1999) analisaram os efeitos metabólicos de uma exposição de um tipo de salmão, o *Salmo salar*, a águas contaminadas por óleo cru disperso e por sua fração acomodada em água (WAF). Foram avaliadas as enzimas aeróbicas citrato sintase e citocromo C oxidase, e a lactato desidrogenase pela fração anaeróbica em guelra durante uma exposição por quatro dias, seguidas por 8 dias de depuração em águas limpas. Relativamente ao início do tratamento, a atividade da LDH foi significativamente inibida pela exposição ao óleo disperso e a WAF. Ao final do tratamento, a atividade da lactato desidrogenase permaneceu diminuída, comparada ao início do tratamento, mostrando que a atividade desta enzima pode ser sensível, a longo prazo, como marcador de exposição a águas contaminadas.

Khan et al. (2001) avaliaram os efeitos de múltiplas exposições, em pequenas dosagens, de ratos submetidos a um óleo cru (0,25 a 1,25mL/kg) e um diesel comercial (mL/kg). A exposição dos ratos a esta dosagem não causou sintomas de intoxicação. Análises de sangue para indicadores hematológicos e clínicos não mostraram qualquer modificação significativa em relação ao controle. Os parâmetros laboratoriais avaliados no sangue foram a hemoglobina, glicose, uréia, proteínas totais séricas, albumina sérica, AST, ALT, fosfatase alcalina, LDH. Entre os ensaios complementares, o achado principal da pesquisa foi um aumento da atividade hepática da etoxiresorufina-O-dietilase (EROD), uma enzima associada

ao citocromo P-450 [CYP] 1A1/A2 nos ratos tratados com óleo cru e óleo diesel, sugerindo neo-sínteses de algumas isoformas (Khan et al., 2001). Conforme Nelson e Cox (2002), os citocromos são proteínas transportadoras de elétrons localizadas na membrana plasmática, essenciais na formação do ATP a partir do ADP.

Ahmed (2001) faz uma revisão sobre a toxicidade e os efeitos à saúde causados pela exposição à gasolina com MTBE e relata que composto é o aditivo mais utilizado na gasolina, compondo até 15% do volume. O MTBE é carcinógeno, apesar de seu potencial permanecer incerto. Estudos sugerem que o efeito carcinógeno se deva a dois de seus principais metabólitos, o formaldeído e o tributanol (Ahmed, 2001; Dekant et al., 2001). O Environmental Protection Agency (EPA) propôs sua eliminação como aditivo à gasolina nos EUA. Hong et al. (1997) discutem que a inalação do MTBE constitui a maior rota para a exposição ambiental ao produto. Estudos em ratos e em humanos mostraram que o MTBE inalado é eliminado pelos principalmente pelos pulmões e pelos rins na urina.

Senzolo et al. (2001) analisam a exposição ocupacional de trabalhadores de uma refinaria no norte da Itália à exposição de gasolina. Foram avaliadas as concentrações do ar de benzeno, tolueno, n-pentano e n-hexano durante as 8h do turno de trabalho e benzeno e tolueno na urina dos trabalhadores. O hábito de fumar foi considerado como fator de confusão na avaliação do benzeno, uma vez que a substância está presente no cigarro. Foi observada uma significativa correlação entre o benzeno ambiental e hemático e urinário, sendo mais significativo o primeiro. O benzeno continua por mais tempo no organismo, acumulando-se principalmente no tecido gorduroso, nervoso e medula óssea (Candura et al., 1995). Nenhum composto analisado atingiu os limites máximos estabelecidos pelos organismos de controle industrial.

Jo e Song (2001) avaliaram grupos de pessoas que trabalham próximos a fontes emissoras de compostos orgânicos voláteis (VOCs), exaustão de motores, emissões de vapor de gasolina, entre outros, durante seu horário de trabalho. Os autores constataram que para todos os trabalhadores analisados, as concentrações de VOCs na respiração pós-trabalho eram significativamente maiores que na condição pré, dependendo somente do composto e da profissão de cada grupo. O fator tabagismo foi considerado no estudo, de forma idêntica a Senzolo et al. (2001), sendo observado como a causa primária de exposição ao benzeno para todos os trabalhadores avaliados na pesquisa. Da mesma forma, Fruin et al. (2001) avaliaram a exposição ambiental ao benzeno em uma base aérea nos EUA no período de 1989 a 1997.

Observaram que as concentrações de benzeno no ar diminuiram no período. Atribuem o fato à diminuição do conteúdo de benzeno na gasolina e outras fontes menores de emissão, assim como a redução à exposição ao tabaco.

Pacheco e Santos (2001) avaliaram a biotransformação e as repostas endócrina e genéticas da *Anguilla anguilla* L. a águas contaminadas por hidrocarbonetos. Os animais foram expostos às frações solúveis em água (WSF) de diesel e gasolina, simulando ambientes de portos em laboratório e avaliando suas condições reais in situ. Foram estudadas as atividades do EROD e da ALT do fígado, cortisol, glicose e lactato do plasma, cortisol inter-renal e o aparecimento de anomalias nucleares eritrocitárias. Ambas as exposições ao diesel e gasolina induziram um aumento da atividade da etoxiresorufina-O-dietilase (EROD) no fígado, assim como o aparecimento de anomalias nucleares eritrocitárias (ENA) aos seis dias de exposição, revelando as propriedades tóxicas dos hidrocarbonetos. Os peixes expostos às frações de gasolina mostraram um aumento da atividade da ALT a curto prazo e lesão no fígado a longo prazo, vistas pela diminuição da atividade da ALT. Nos ensaios de campo, com peixes sobrevivendo em gaiolas na região do porto de Aveiro, Portugal, não foram vistas quaisquer alterações significativas, mostrando a influência de outros fatores ambientais, tais como o regime de marés e a toxicidade e distribuição dos poluentes aquáticos.

Pacheco e Santos (2001) relatam estudos de biotransformação em peixes que revelaram que a exposição aos PAHs induz as atividades enzimáticas dependentes do citocromo P-450 como a EROD. O naftaleno, o mais simples dos PAHs, e seus substitutos metil derivados estão representados nas parcelas de 0,4% nos óleos diesel (podendo chegar a 10% em alguns tipos) e 1% na gasolina. Os autores concluem que os estudos com a *A. anguilla* L. mostraram que o cortisol sangüíneo pode ser um importante marcador biológico do estresse tóxico nos peixes, inclusive para períodos curtos de exposição. E o EROD e o ENA se mostraram importantes marcadores nas contaminações de diesel e gasolina.

Takamiya et al. (2003) relatam um caso de intoxicação de gasolina aguda durante uma lavagem de um tanque, no qual a vítima sobreviveu por apenas 26h após o incidente. Antes da retirada do homem de 50 anos do tanque, contendo 4480 ppm de vapor de gasolina, foi necessária uma intensa ventilação por 30 minutos. Ao ingressar no hospital foram realizados exames de laboratório que indicaram disfunção renal. Na autópsia foram observadas lesões bolhosas na face, tórax e membros superiores, o coração continha sangue hemolizado, os

pulmões apresentavam superfícies vermelhas escuras com extravasamento pleural, com parênquima congesto e edematoso. Os rins estavam com a medula congesta e com o córtex anêmico, parte dos órgãos abdominais e cérebro com autólise. Havia forte odor de gasolina no trato alimentar.

Conforme Takamiya et al. (2003), a análise microscópica mostrou degeneração das fibras de colágeno abaixo das lesões bolhosas. Além da congestão e edema pulmonar, havia extravasamento de sangue e infiltração de neutrófilos nos alvéolos. Os rins apresentavam necrose, desaparecimento de núcleos celulares do epitélio tubular proximal, fluído eosinofílico nos espaços capsulares dos glomérulos e túbulos, com medula congesta. O baço apresentava hemólise. Wang e Irons (1961) já haviam mostrado que a exposição a 5000 – 16000 ppm de gasolina por 5 minutos causa a morte.

Long et al. (2003) investigaram os efeitos da exposição de hidrocarbonetos (óleo cru) em *Mytilus edulis planulatus* via diluição (WAF) em coluna d'água e sedimentos contaminados através de alterações em enzimas respiratórias. Foram medidas as atividades do citrato sintase (CS) e lactato desidrogenase (LDH) nos gaelra. As enzimas CS e LDH estão envolvidas na respiração celular e produção de adenosina trifosfato (ATP) a partir da glicose. O LDH é responsável pela regeneração de NAD⁺ (necessária no metabolismo da glicose e na subsequente produção de ATP) a partir de NADH para continuação da glicólise. A atividade do LDH é uma medida da capacidade anaeróbica da célula (Gagnon e Holdway, 1999). Em condições aeróbicas, o ciclo do ácido cítrico começa quando o piruvato, produto final da glicólise, passa para dentro da membrana mitocondrial e é convertido a acetil-coenzima A (Acetil coA). A CS cataliza a reação entre o Acetil coA e o oxalacetato para produzir CO₂, NADH e citrato e conseqüentemente ATP. A atividade do CS é uma medida da capacidade aeróbica da célula (Gagnon e Holdway, 1999).

Long et al. (2003) mostraram que o tratamento WAF não apresentou diferenças significativas para o controle com relação a LDH ou CS, apesar de mostrar algumas tendências de redução com o tempo e concentrações. No caso da exposição a sedimentos contaminados, a LDH aumentou sua atividade nos grupos contaminados entre os meses 2 e 4, após o início dos experimentos, principalmente nos grupos expostos a maiores níveis de contaminação, diminuindo aos 6 meses. A CS novamente não apresentou alterações. Os resultados mostram uma mudança do estado aeróbico para anaeróbico após 2 meses de exposição. A avaliação dos

tecidos mostrou que há uma acumulação de PAHs até além de 2 meses, diminuindo aos 6 meses. Da mesma forma que o trabalho de Caldwell (1997) há poucos indivíduos nos ensaios para uma avaliação mais precisa dos resultados, com desvios muito altos. Long et al. (2003), inclusive, não mostram desvio padrão, mas, sim, erro padrão, diluindo o desvio pela raiz do número de indivíduos. Concluem, após várias considerações, que as enzimas respiratórias não são marcadores efetivos de exposição aos hidrocarbonetos no *Mytilus edulis planulatus*.

2.2.3 Alterações Elétricas Celulares

Bonincontro et al. (1997) estudaram tráfego de íons intramembrana em apoptose por meio de cultura de células. O estudo das modificações da estrutura e da função da membrana foi feito por meio de medidas de condutividade elétrica da suspensão das células, como uma função da frequência do campo elétrico aplicado às amostras. A comparação entre as células normais e as apoptóticas mostrou que a morte celular programada causa uma diminuição da condutividade da membrana, indicando uma diminuição do tráfego de íons intramembrana.

Em estudos médicos, Thielecke et al. (2001) utilizaram medidas de impedância como meio de seleção bioeletrônica para terapias anti-câncer. Os autores mostram que as alterações na morfologia da agregação celular, como apoptose ou necrose, podem ser detectadas por monitoramento do comportamento elétrico das membranas e espaços extracelulares com alta resolução e reprodutibilidade.

Bonincontro e Risuleo (2003) analisaram espectroscopia dielétrica na investigação de propriedades conformacionais de proteínas. Neste estudo foram avaliadas a lisozima, o citocromo C e a metamioglobina. Os autores mostram que a espectroscopia dielétrica em radiofrequências é uma ferramenta poderosa no estudo das propriedades das proteínas.

Sola et al. (2003) utilizaram tecnologias de microeletrodos para monitorar isquemia-reperfusão em rins de ratos e as mudanças induzidas por manejos terapêuticos. Os autores observaram que a isquemia induz a um rápido aumento do potássio extracelular, assim como o módulo de impedância, seguido por uma fase lenta de crescimento, enquanto o pH cai rapidamente.

2.2.4 Considerações Finais em Toxicidade e Lesão Celular

Diversos autores mostram relações de causa e efeito entre exposição e concentrações de tóxicos nos organismos, e ainda mostram relações com câncer em longo prazo, principalmente leucemia. Outros autores relacionam a exposição aos hidrocarbonetos a alterações de AST, ALT, γ GT, LDH e EROD. Muitos destes trabalhos apresentam problemas metodológicos, com número de indivíduos pesquisados insuficientes ou ainda controles não específicos, como grupos compostos por 2 a 4 indivíduos, ou ainda comparar trabalhadores expostos a contaminantes ambientais a escolares, sem considerar o fator idade, ou ainda que os próprios escolares podem fumar. Entretanto, muitos destes trabalhos apresentam relações inequívocas entre exposição e efeitos/concentrações de contaminantes. Nesta pesquisa foram incluídos alguns destes parâmetros avaliados na literatura e diversos outros, tentando-se identificar parâmetros e padrões de toxicidade e lesão celular.

CAPÍTULO 3 – METODOLOGIA DA PESQUISA

3 INTRODUÇÃO

Os experimentos de biorremediação foram desenvolvidos em laboratório utilizando-se amostras de solo contaminado com hidrocarbonetos e dispostos em recipientes herméticos. Alguns aditivos foram condicionados ao solo contaminado de forma a estimular a decomposição dos hidrocarbonetos (fertilizante mineral e um lodo de agroindústria). Foram testadas diferentes combinações do solo contaminado com os aditivos.

No caso dos ensaios de toxicidade e lesão em modelo animal, foi considerado somente o solo contaminado pelos 50.000L/ha, sem qualquer bioestimulante, uma vez que se buscou avaliar a exposição dos animais frente a esta concentração de gasolina no solo.

3.1 SOLO UTILIZADO

O solo utilizado na pesquisa foi um horizonte C, substrato de arenito, pertencente a denominada Formação Botucatu. Apresenta-se como uma areia fina siltosa, mal graduada, fracamente plástica. A localização da formação Botucatu no Estado do Rio Grande do Sul pode ser vista na Figura 3.1. A jazida de onde foram coletadas as amostras pertence a um talude situado às margens da rodovia estadual RS-240, na localidade de Vila Scharlau, Município de São Leopoldo, RS (Figura 3.2). O material já foi exaustivamente estudado por Nuñez (1991), Prietto (1996), Spinelli (1999) e Spinelli et al. (2005). As propriedades físicas do solo estão apresentadas na Tabela 3.1 e são uma média dos valores encontrados por Nuñez (1991) e Prietto (1996). Os parâmetros da curva granulométrica, diâmetro efetivo (D_{10}) e coeficiente de uniformidade (C_u), seguem as definições apresentadas por Lambe & Whitman (1979). A mesma tabela também mostra uma análise química complementar do solo (Spinelli et al., 2004), visando parâmetros relacionados à microbiologia de solos, tais como macro e micronutrientes, etc.

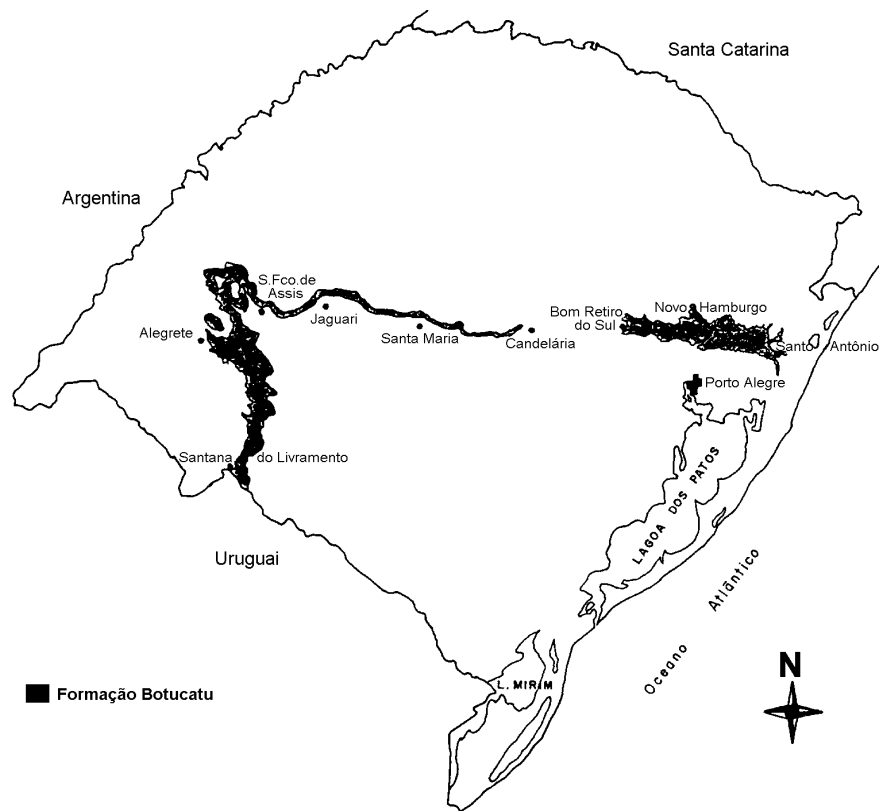


Figura 3.1: Formação Botucatu no Estado do Rio Grande do Sul (Nuñez, 1991)

3.2 LODO

O resíduo utilizado como “bioaugmentação” foi um lodo proveniente de uma estação de tratamento de efluentes líquidos de uma indústria alimentícia do Município de Viamão, RS. Ao longo da pesquisa foram feitas duas coletas deste material, ambas no mês de março, em anos diferentes, com suas características apresentadas na Tabela 3.2. É interessante observar que as duas amostras de lodo têm propriedades distintas, uma vez que se utilizou uma parcela para os ensaios piloto e posteriormente se buscou uma maior quantidade para o conjunto da pesquisa e armazenamento para o caso de serem necessárias repetições dos ensaios. O processo de tratamento na empresa envolve a incorporação dos rejeitos sólidos à água e sulfato de alumínio. O lodo precipita e a água é tratada e liberada ao meio ambiente. Nos ensaios, além dos nutrientes adicionados ao solo, existe umidade ótima de tratamento, devendo-se então considerar a água contida no lodo.

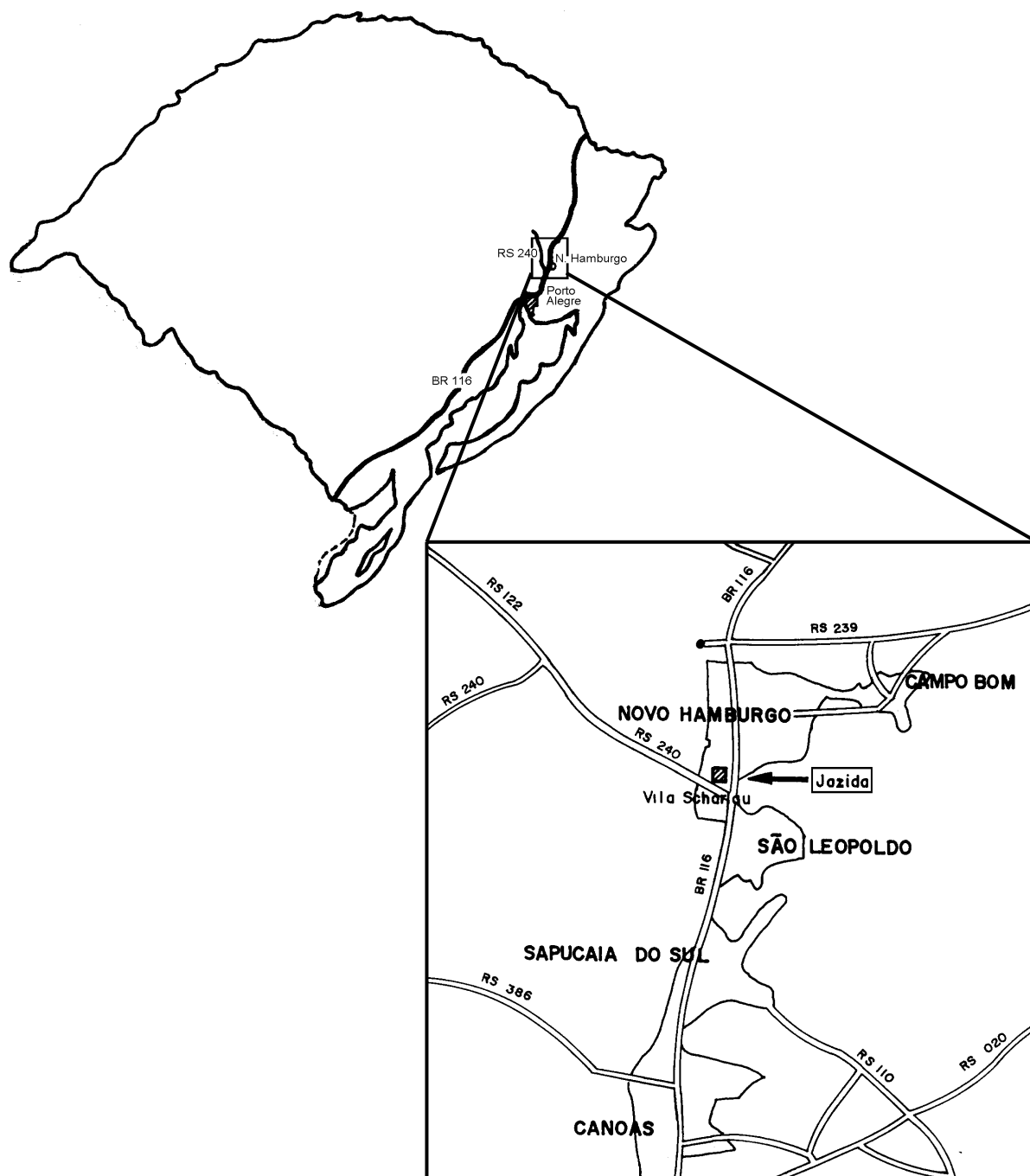


Figura 3.2: Localização da jazida (Spinelli, 1999)

3.3 FERTILIZANTE MINERAL

Neste trabalho buscou-se uma comparação entre um lodo industrial (“bioaugmentação”) e um fertilizante mineral (bioestimulador) como promotores do processo de biorremediação. O fertilizante mineral utilizado foi uma solução (NPK) contendo NH_4NO_3 (0,55g/50mL de água destilada) e KH_2PO_4 (1,75g/50mL de água destilada), utilizada como 2,5 mL/kg solo seco.

Tabela 3.1: Propriedades físicas e químicas do solo.

Propriedades	Valores	Propriedades	Valores
Limite de Liquidez (LL)	21,5 %	P – mg.L ⁻¹	1,7
Limite de Plasticidade (LP)	19,0 %	K – mg.L ⁻¹	14
Índice de Plasticidade (IP)	5,5 %	Al _{troc.} - cmol _c L ⁻¹	0,5
Limite de Contração (LC)	16,0 %	Ca _{troc.} - cmol _c L ⁻¹	0,7
Densidade (γ_s)	26,9 kN/m ³	Mg _{troc.} - cmol _c L ⁻¹	0,7
Diâmetro Efetivo (D ₁₀)	0,003 mm	Al + H - cmol _c L ⁻¹	2,3
Coefficiente de Uniformidade (C _u)	37	CTC - cmol _c L ⁻¹	3,8
% Areia Média (0,42 < ϕ < 2 mm)	3,3 %	S – mg.L ⁻¹	6,9
% Areia Fina (0,074 < ϕ < 0,42 mm)	48,2 %	Zn - mg.L ⁻¹	1,1
% Silte (0,005 < ϕ < 0,074 mm)	32,5 %	Cu – mg.L ⁻¹	0,4
% Argila (ϕ < 0,005 mm)	16,0 %	B – mg.L ⁻¹	0,7
pH (H ₂ O)	4,5	Mn – mg.L ⁻¹	43
Matéria Orgânica - %	1,2	Relação Ca/Mg	1,0
% SAT of CTC – Básico	38	Relação Ca/K	20
% SAT of CTC – Al	13,2	Relação Mg/K	20

3.4 GASOLINA

Inicialmente, durante a realização dos ensaios preliminares, foi selecionada aleatoriamente uma gasolina de um posto de combustíveis (Petrobrás) da região metropolitana de Porto Alegre, RS, com composição básica apresentada na Tabela 3.3. Posteriormente, foi obtida, para a continuidade da pesquisa, gasolinas sem álcool com origem direta da Refinaria Alberto Pasqualini/Petrobrás, cujas composições químicas foram fornecidas pela própria empresa, conforme apresentado na Tabela 3.4.

Tabela 3.2: Características do lodo.

Determinações	Valores (1 ^a) e (2 ^a) amostras	
Umidade (amostras secas a 75°C) – %	92	96
pH (amostra “in natura”)	5,0	5,0
Carbono orgânico – %	56	46
Nitrogênio (TKN) – %	3,3	3,5
Fósforo total – %	0,21	3,0
Potássio total – %	0,10	0,18
Cálcio total – %	0,13	0,94
Magnésio total – %	0,18	0,25
Enxofre total – %	0,25	0,85
Cobre total – mg/kg	96	66
Zinco total – mg/kg	324	201
Ferro total – %	0,28	0,45
Manganês total – mg/kg	34	62
Sódio total – %	0,11	0,83
Boro total – mg/kg	4,4	54
Chumbo Total – mg/kg	55	29
Níquel Total – mg/kg	27	< 5
Cádmio Total – mg/kg	< 2	< 2
Cromo Total – mg/kg	72	38
Mercurio – mg/kg	0,50	0,74

Tabela 3.3: Composição química da gasolina do posto de combustível (com álcool)

Componentes analisados	(% Massa)
Benzeno	0,73
Tolueno	2,79
C ₈ Aromático	3,83
C ₉₊ Aromático	9,25

Tabela 3.4: Composição química da gasolina da REFAP fornecida pela empresa.

Grupo de Hidrocarbonetos (% Massa)							
Identificação	Até C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀₊	Total
Parafina Normal	6,51	4,20	3,24	2,54	1,41	0,67	18,57
Parafina c/1 Ramif.	5,78	4,82	3,83	2,60	1,43	1,05	19,50
Parafina c/+1 Ramif.	0,02	0,61	0,33	0,76	0,87	0,20	2,78
Olefina Normal	2,78	1,42	0,92	0,81	0,35	0,12	6,40
Olefina c/1 Ramif.	2,67	1,83	1,78	0,00	0,00	0,00	6,28
Olefina c/+1 Ramif.	0,00	0,10	0,09	0,12	0,00	0,00	0,31
Naftênico Olefínico	0,26	0,74	0,41	0,11	0,52	0,08	2,13
Naftênico Parafínico	0,67	3,87	4,67	3,55	2,53	0,81	16,09
Aromáticos	0,00	0,74	2,89	5,46	7,27	9,57	25,94
Naf.Olef.e/ou Diolefina	0,15	0,09	0,62	0,58	0,42	0,00	1,85
Compostos não ident.	0,15						
Total	18,83	18,41	18,77	16,53	14,81	12,50	
Identificação	(% Massa)						
MTBE	0,000						
Etanol	0,000						
Benzeno	0,739						
Tolueno	2,894						
Etil-Benzeno	1,012						
M-Xileno	2,189						
P-Xileno	0,956						
O-Xileno	1,307						

3.5 DIESEL

Inicialmente, durante a realização dos ensaios preliminares, foi selecionado aleatoriamente um óleo diesel de um posto de combustíveis (Petrobrás) da região metropolitana de Porto Alegre, RS. Ao término destes ensaios, observou-se que não haveria a disponibilidade de cromatografias deste material por ausência de cromatógrafos com colunas específicas para diesel. Os testes piloto, entretanto, serão apresentados posteriormente no Capítulo 4. Porém, optou-se, para a continuidade da pesquisa, em não mais utilizar este combustível, mas, sim, concentrar os estudos com gasolina. Um cromatograma típico de um óleo diesel encontra-se na Figura 3.3.

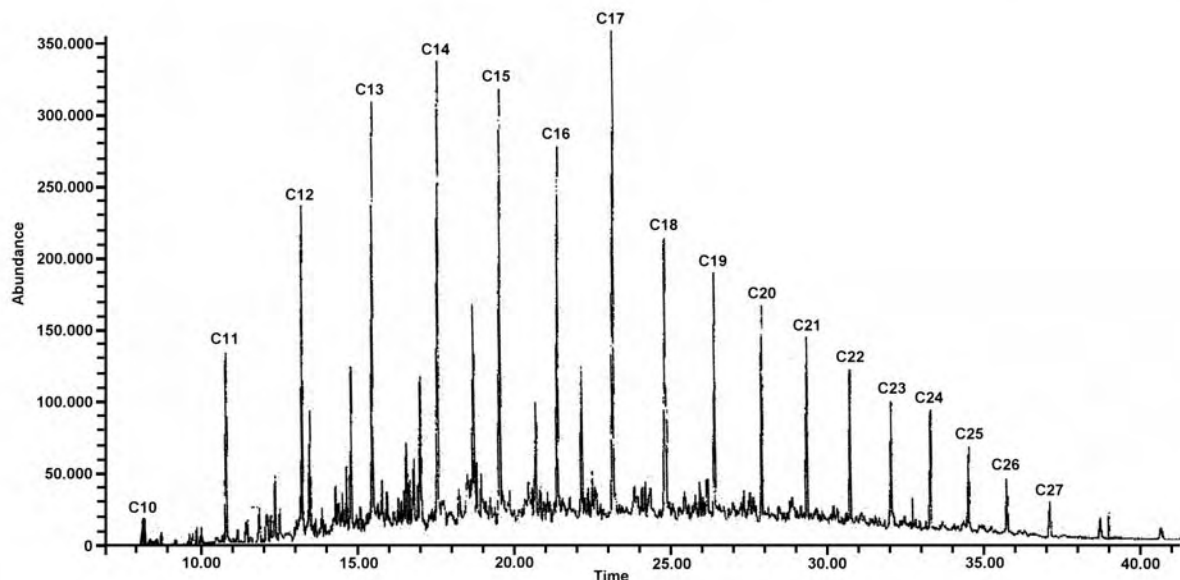


Figura 3.3: Cromatograma típico de um óleo diesel metropolitano (Bento, 2001)

3.6 TEMPERATURA E UMIDADE

Apesar de a temperatura externa ao laboratório variar muito durante o período de ensaio, a climatização do laboratório era praticamente constante, oscilando ao redor dos $20 \pm 5^\circ\text{C}$. Em um segundo momento, os ensaios foram realizados com temperatura ambiente para fins de comparação. A umidade das amostras foi de 11% (w/w), correspondendo a 80% da capacidade de campo do solo. A umidade ao longo do período dos ensaios foi mantida

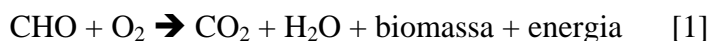
constante (durante os 180 dias), e medida através da variação do peso do conjunto pote-solo-contaminante. Toda a água utilizada na pesquisa provinha de destiladores do Laboratório de Análises de Solo, Águas e Plantas da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.7 ENSAIOS DE BIORREMEDIAÇÃO

Os experimentos de biorremediação foram desenvolvidos em laboratório utilizando-se amostras de solo (400g nos testes piloto e 500g posteriormente) contaminado artificialmente com hidrocarbonetos (gasolina e diesel nos testes piloto, aplicados como 50.000L contaminante/ha ou 25mL/kg de solo) dispostos em recipientes herméticos de 2L com cinco replicatas. Aditivos nas formas de fertilizante mineral e de lodo de agroindústria foram testados. Os processos de biorremediação foram acompanhados por diversas técnicas, relatadas a seguir.

3.7.1 Liberação de CO₂

A atividade microbiana pode ser observada através da evolução de CO₂ em experimentos com solo + adições de compostos orgânicos e/ou inorgânicos (Stotzky, 1965; Tedesco et al., 1995; Paul & Clark, 1996; Öhlinger et al., 1996). De forma geral, considera-se a equação 1, na qual um composto orgânico é oxidado pela população microbiana, liberando gás carbônico, água e energia, somando ou não materiais orgânicos à sua biomassa (mineralização ou degradação completa).

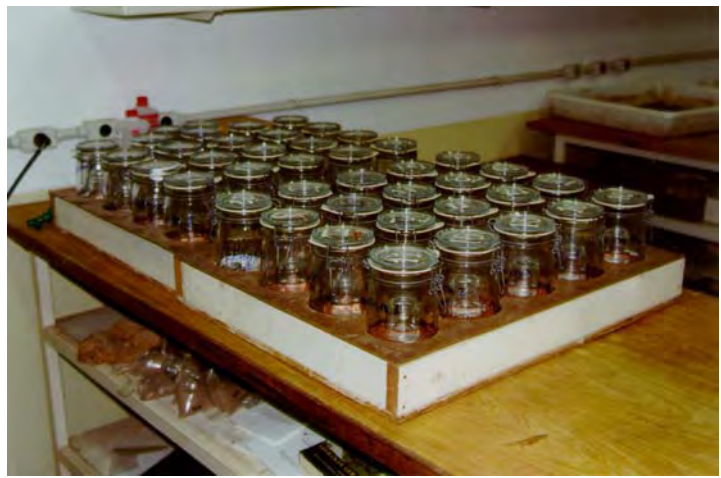


Uma visão geral dos recipientes herméticos utilizados para a realização dos ensaios pode ser vista nas Figuras 3.4a e 3.4b. Na Figura 3.4a temos o detalhe de um frasco (microcosmo) e na 3.4b, o conjunto dos primeiros ensaios realizados. As cinco repetições utilizadas nos testes piloto apresentaram uma baixa dispersão de valores, sendo possível, posteriormente, a realização de ensaios com apenas três repetições. Os tratamentos foram:

- a) Solo Controle (sem qualquer adição);
- b) Solo + Lodo de Indústria Alimentícia (20 t/ha);
- c) Solo + Gasolina (25 mL/kg solo);
- d) Solo + Gasolina + Lodo;
- e) Solo + Gasolina + Lodo + NPK;
- f) Solo + Gasolina + NPK;
- g) Solo + Diesel (25 mL/kg solo)(só utilizado nos testes piloto);
- h) Solo + Diesel + Lodo (só utilizado nos testes piloto);



(a)



(b)

Figura 3.4: Visão geral dos experimentos: a) pote com solo + adição, mostrando ainda as lâminas enterradas e o sistema de captação de CO₂; b) Visão do conjunto

Na execução dos ensaios de CO₂ são necessárias as seguintes soluções:

- a) Indicador de fenolftaleína
- b) BaCl₂
- c) NaOH 0,40M
- d) HCl 0,40M

A captura do CO₂ no microcosmo (frasco hermético, de forma a evitar trocas gasosas com o ambiente – Figura 3.4) era feita através de um pequeno recipiente de vidro contendo 20 mL de solução NaOH 0,40M. A importância do uso de frascos de vidros ao invés de plásticos justifica-se na medida em que o plástico se dissolve quando em contato com os hidrocarbonetos no solo. O CO₂ foi medido inicialmente no tempo 24h, 48h, 72h e então de 3 em 3

dias até a sua estabilização aos 180 dias. Para medir o CO₂, retirava-se o frasco contendo NaOH do pote hermético e adicionava-se neste 1 mL de BaCl₂ e mais duas gotas do indicador de fenolftaleína, para que então pudesse ser titulado com HCl 0,40M. Além dos tratamentos, eram sempre realizadas três provas em branco – solução de NaOH 0,40M em potes sem solo e sem contaminantes para se analisar isoladamente o CO₂ existente na atmosfera do pote – descontados posteriormente na titulação dos tratamentos. A quantidade de HCl (mL) utilizada na titulação para neutralizar a soda restante corresponde ao que não reagiu com o CO₂ e, portanto, por diferença, obtém-se o CO₂:

$$\text{CO}_2 \text{ (mg/500g solo)} = [V_{\text{branco(HCl)}} - V_{\text{amostra(HCl)}}] * \text{EqCO}_2 * 0,40\text{M(HCl)} * [\text{HCl}] / [\text{NaOH}] \quad [2]$$

3.7.2 Avaliação da População do Solo pelo Método da Lâmina Enterrada (Rossi-Cholodny)

O objetivo desta avaliação consiste em relacionar a ocorrência de diferentes grupos de microrganismos com os diferentes tratamentos. Este método permite uma análise qualitativa através da observação dos microrganismos no habitat natural, podendo-se visualizar as interações e as inter-relações destes com as partículas de solo (Paul & Clark, 1996; Prescott et al., 1999; Selbach & Camargo, 2001).

Para a realização dos ensaios, foram enterradas duas lâminas em cada uma das amostras de solo + tratamento, deixando-se 1/3 da lâmina para fora, de forma a facilitar sua remoção para análise. Nestas, observou-se o desenvolvimento de fungos, bactérias e actinomicetos, conforme o esquema da Figura 3.5a.

Para que se possa avaliar corretamente os microrganismos presentes nas lâminas, faz-se necessário analisar pelo menos três campos (representatividade) em uma região intermediária, conforme Figura 3.5b. A visualização dos fungos é feita em aumentos de 40 a 100x, e as das bactérias e hifas de actinomicetos com aumentos de 400 a 1000x. A Tabela 3.5 apresenta algumas características dos campos a serem observados ao microscópio.

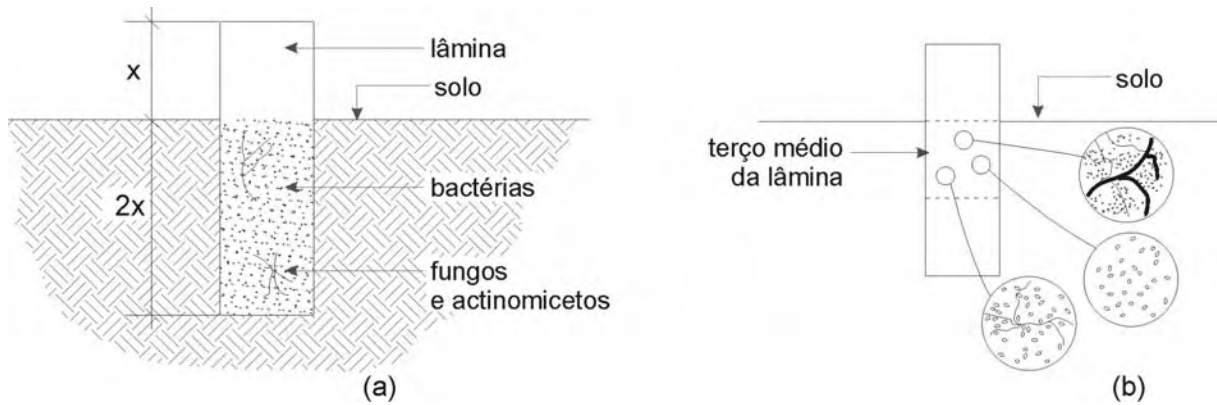


Figura 3.5: Método da lâmina enterrada: a) esquema geral da lâmina enterrada; b) escolha das regiões representativas para as análises

Tabela 3.5: Características do campo no microscópio

O que é observado	Característica	Tamanho
Partículas de solo*	Argilominerais	$\phi < 2 \mu\text{m}$
Bactérias	Formas de cocos, eventualmente bacilos	$0,5 \mu\text{m} < \phi < 2 \mu\text{m}$
Fungos	Hifas individualizadas	$3 \mu\text{m} < \phi < 10 \mu\text{m}$
Actinomicetos	Similares aos fungos, porém mais finos e tortuosos	

* Não foram demonstrados no esquema da Figura 3.5

Quanto aos procedimentos de ensaio, deve-se seguir um padrão: a) retirar a lâmina comprimindo esta contra um dos lados e puxando para cima, de forma a evitar atrito no lado oposto, que será o lado utilizado nas observações; b) mergulhar a lâmina em água destilada para retirar o solo aderido (com cuidado para não perder todo o material); c) com um papel úmido, limpar o lado oposto ao que será observado; d) fixar com calor brando; e) colorir com rosa bengala fenólico sobre a chama ou vapor d'água durante 15 minutos; f) retirar excesso de corante (mergulhar em água), deixar escorrer e secar; g) fazer as observações;

3.7.3 Quantificação de Bactérias e Fungos

O ensaio de quantificação de microrganismos totais do solo foi feito pelo método da diluição sucessiva em placas de Petri, utilizando-se como meio de culturas o PGY Agar para bactérias

e o PCRb para fungos (Tabela 3.6) nos tempos 4, 8, 15, 30, 60, 120 e 180 dias. Os sais eram diluídos, acrescidos aos açúcares, quando então era colocado o ágar e levado o conjunto à autoclave. No caso dos fungos, a estreptomicina era colocada no meio de cultura após o processo de autoclave, visto que o calor e a pressão destroem o antibiótico.

Tabela 3.6: Meios de Cultura utilizados

PGY Ágar		PCRb	
Glicose	4,00g	Glicose	10,00g
Peptona	2,00g	Peptona	5,00g
Extrato de Levedura	0,24g	KH ₂ PO ₄	1,00g
K ₂ HPO ₄	0,16g	Rosa Bengala	0,03g
MgSO ₄	0,04g	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50g
FeSO ₄	0,02g	Agar	20,00g
Agar	15,00g	H ₂ O	1.000mL
H ₂ O	1.000mL	Streptomicina	1%
pH	7,0	(0,3mL/100mL)	

Realizados os meios de cultura, estes eram dispostos nas placas de Petri, sendo todo o procedimento realizado em ambiente estéril, dentro da câmara de fluxo. Após a solidificação do meio, as placas eram colocadas na estufa a 28°C por 24h para garantir as condições de assepsia. Se houvesse crescimento microbiano (contaminação), as placas eram desprezadas.

As placas assépticas eram inoculadas com as amostras de solo. O procedimento está descrito em Alef e Nannipieri (1995) e Maier et al. (2000). Dez gramas de solo úmido (umidade conhecida) eram introduzidos em uma garrafa de vidro com 95mL de água destilada previamente autoclavada. O conjunto era agitado por 15 minutos. Deste frasco, pipetava-se uma alíquota de 1mL para um tubo de ensaio contendo 9mL de água destilada estéril. Após a homogeneização do tubo, outro 1mL era passado ao tubo seguinte, e assim por diante. As pipetas eram homogeneizadas antes de se colher o 1mL. Terminado o procedimento de diluição, escolhiam-se as diluições a serem analisadas e pipetava-se uma alíquota de 0,3mL

para as placas de Petri com o meio específico. Três repetições eram feitas de cada diluição. O líquido era espalhado nas placas por meio de uma alça de Drigalski e incubado com a placa invertida a 28°C. Após o tempo necessário ao crescimento dos microrganismos, em torno de 2-3 dias, as placas eram removidas da estufa e as colônias eram contadas por método direto (Figura 3.6).

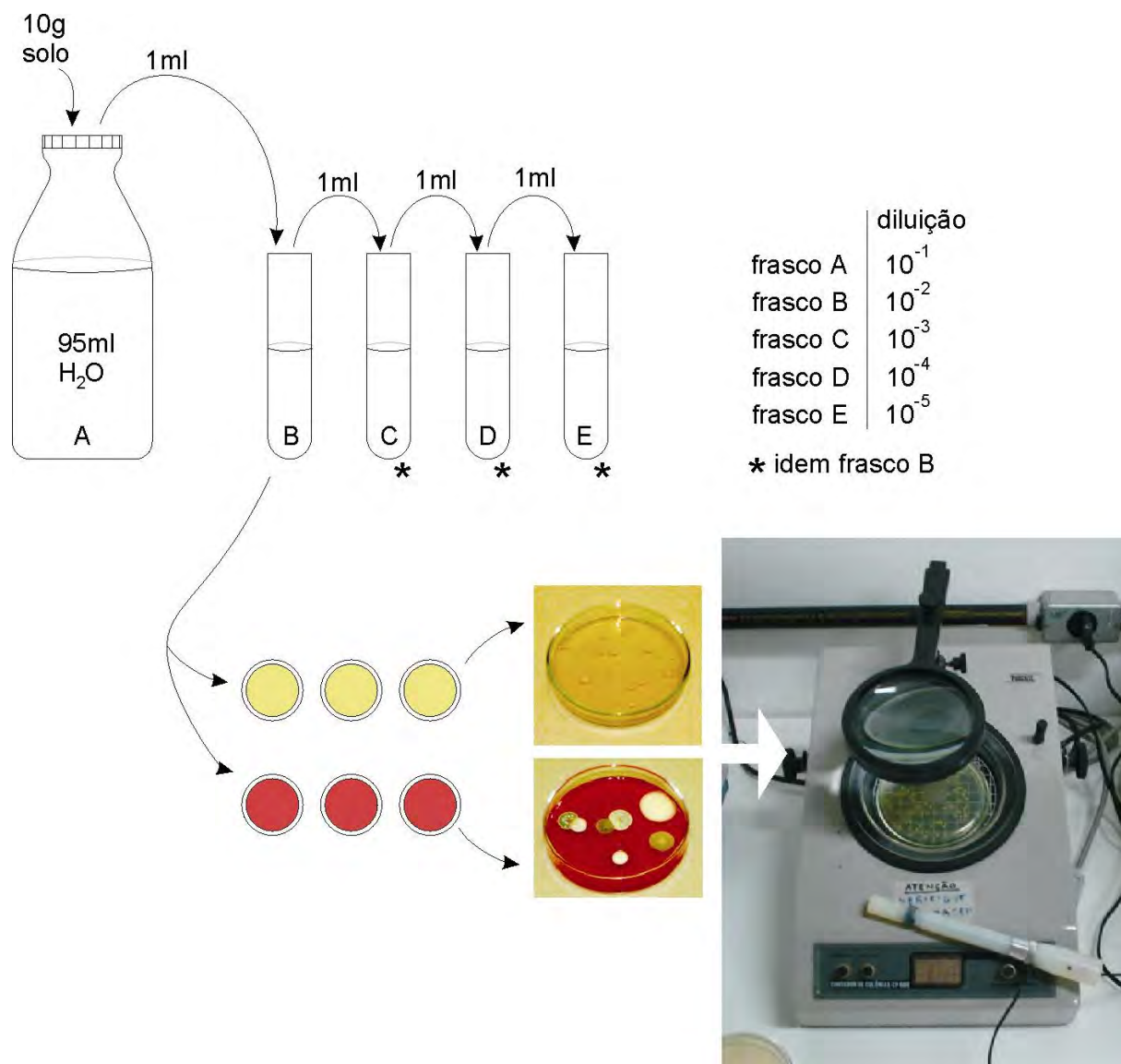


Figura 3.6: Metodologia para contagem direta de microrganismos

O ensaio de quantificação dos microrganismos degradadores específicos foi realizado por meio de contagem do número mais provável (Braddock e Catterall, 1999). O meio de cultura utilizado foi o meio mineral de Bushnell-Haas (Tabela 3.7), preparado em duas etapas. De uma solução denominada “A”, previamente feita, eram retirados 400mL, e, então, 100mL da solução “B”, contendo cloreto de trifetil tetrazolium (TTC), eram adicionados. Após feita a

solução “A”, esta era esterilizada a 121°C por 15 minutos a pressão de uma atmosfera. Os 500mL de solução final eram levados à autoclave.

Tabela 3.7: Meios de Cultura para biodegradadores específicos

Solução “A”		Solução “B”	
MgSO ₄	0,20g	TTC	0,025g
CaCl ₂	0,02g	H ₂ O	100mL
KH ₂ PO ₄	1,00g		
K ₂ HPO ₄	1,00g		
NH ₄ NO ₃	1,00g		
FeCl ₃	0,05g		
H ₂ O	1.000mL		
pH	7,2		

Utilizou-se, neste procedimento gasolina esterilizada. O procedimento de esterilização foi realizado do seguinte modo: a) um filtro previamente esterilizado (121°C por 15 minutos com pressão de uma atmosfera) de porosidade de 0,22µm era disposto sobre um funil de vidro equipado com um outro filtro de pedra porosa. O conjunto era acoplado a um “Kitazato”, ao qual se aplicava vácuo para a passagem da gasolina pelos filtros (Figura 3.7). Todo o conjunto era previamente esterilizado em autoclave.

O ensaio de enumeração de microrganismos degradadores de gasolina era então realizado, dispondo-se 250µL do meio de cultura “C” (400mL da solução “A” + 100mL da solução “B”) em cada um dos poços de placas de Elisa. A esta solução era adicionado 5µL de gasolina e 25µL das correspondentes diluições previamente realizadas para a contagem direta de microrganismos (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). O conjunto final era incubado por 7-15 dias para observar a ocorrência dos microrganismos degradadores específicos (Figura 3.8). A solução final é um indicador redox, ou seja, o crescimento microbiano nos poços é detectado pela mudança de cor do meio mineral, de incolor para róseo (redução do TTC).



Figura 3.7: Sistema utilizado para filtrar a gasolina

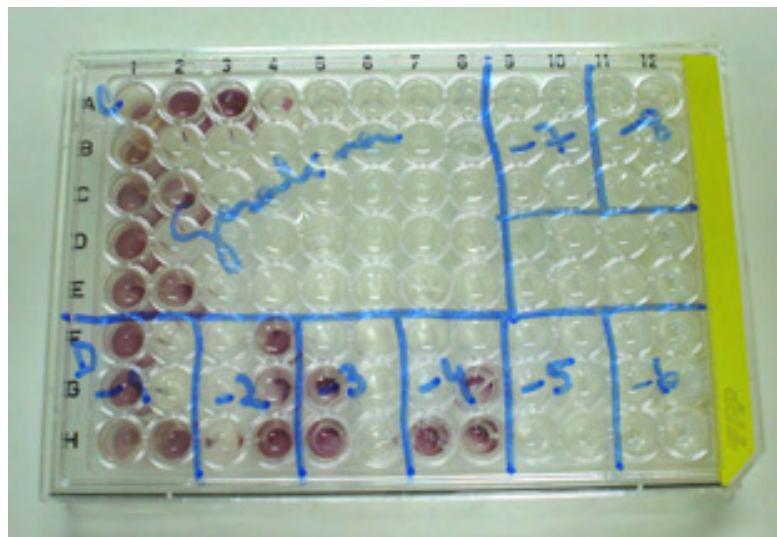


Figura 3.8: Placas de Elisa (multi-poços) utilizadas para quantificação de microrganismos degradadores de gasolina

3.7.4 Identificação de Microrganismos

Após a contagem direta dos microrganismos em placas, estes eram selecionados por representatividade dos solos correspondentes, e isolados para identificação. No caso das bactérias, estas eram retiradas da placa de Petri por uma alça de platina previamente flambada e inoculadas em uma nova placa de Petri com meio de cultura específico para bactérias,

visando a busca de uma cultura purificada. Após a purificação, as bactérias foram reinoculadas em um tubo de ensaio e levadas ao Laboratório de Microbiologia do Hospital São Lucas da PUCRS para identificação por meio de kits tradicionais de identificação.

Os fungos foram transferidos, através da passagem de uma alça sobre os seus conídios, para um novo meio de cultura (Sabaraud), disposto na quantidade de uma gota sobre uma lâmina, recoberto por uma lamínula. O conjunto era montado em câmara de fluxo e após terminado, guardado em uma placa de Petri esterilizada. Após 2-5 dias incubados em estufa a 28°C, eram analisados macroscopicamente, num primeiro momento, e sob microscopia óptica em seguida (Maza et al., 1999; Minami, 2003)(Figura 3.9). No caso do *Aspergillus fumigatus* (Figura 3.9A), este é unisseriado, isto é, tem somente uma camada de fiálides que cobre o terço da parte superior da vesícula. As fiálides sustentam as conídias, que saem por expulsão do final da fiálide. O *Aspergillus versicolor* e *A. niger* (Figuras 3.9B e C, respectivamente) são bisseriados, nos quais a vesícula é coberta com uma camada de uma estrutura de hifas curtas chamada metula (estruturas sustentando as fiálides) e outra camada consistindo de fiálides. As metulas e as fiálides de *A. niger* formam um arranjo irradiado (Figura 3.9C), o que não ocorre nas espécies de *A. versicolor* (Figura 3.9B). O *Aspergillus flavus* pode ter ambas, unisseriadas e bisseriadas, com a metula e as fiálides cobrindo a vesícula inteira. No caso do *Penicillium sp.* (Figura 3.10), as hifas septadas apresentam conidióforos ramificados e não-ramificados. Estes formam metulas (hifas de estruturas curtas, abaixo das fiálides) que aumentam a forma de frasco das fiálides. As conídias são redondas, lisas, ou rugosas e não-ramificadas (Maza et al., 1999; Minami, 2003).

3.7.5 Avaliação do pH e da Condutividade Elétrica do Solo

O procedimento utilizado para medir o pH e a condutividade elétrica do solo é resumido nas seguintes etapas: a) pesar 10g de solo; b) adicionar 20mL de água destilada; c) homogeneizar com um bastão; d) aguardar 20 minutos; e) ler os valores. A condutividade elétrica e o pH do solo foram medidos com um condutímetro Digimed DM31 e um pHmetro DM20 da mesma marca.

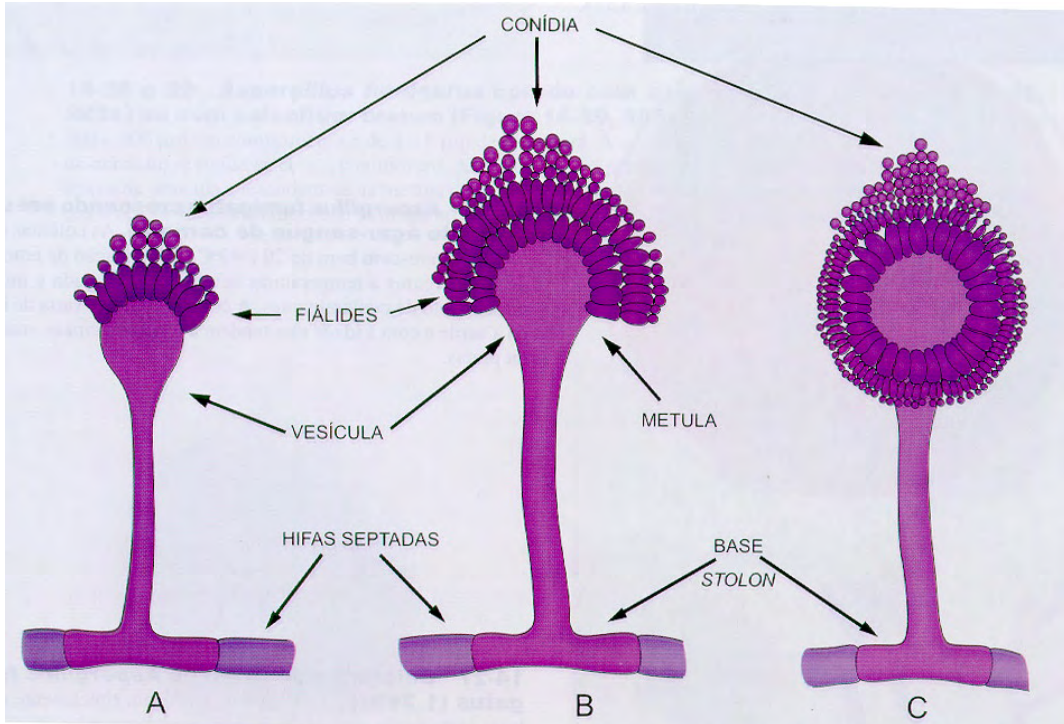


Figura 3.9: Diagrama da estrutura morfológica de *Aspergillus sp.* (Maza et al., 1999).

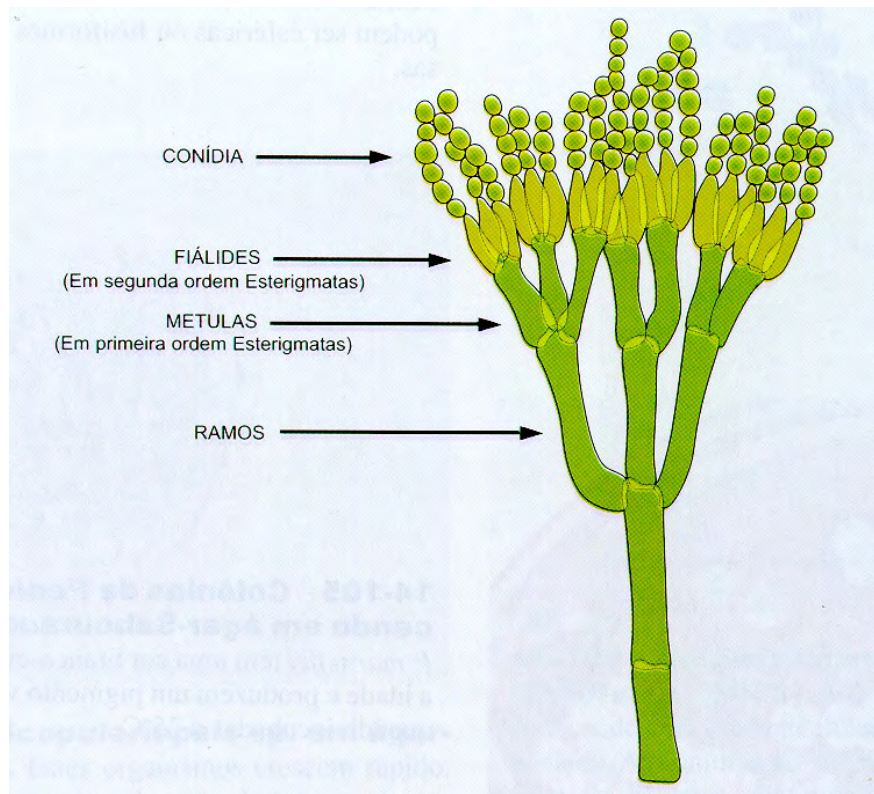


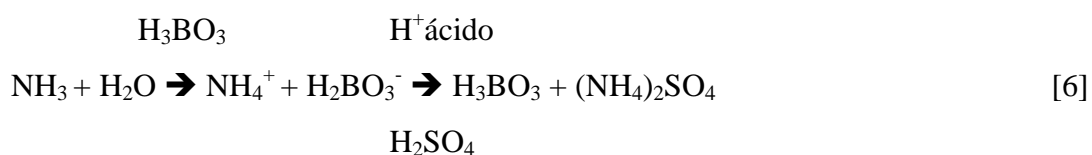
Figura 3.10: Diagrama de *Penicillium sp.* (Maza et al., 1999).

3.7.6 Nitrogênio Mineral do Solo

Inicialmente, nos testes piloto, foi realizada uma quantificação pontual de nitrogênio mineral nas amostras dos diversos tratamentos após a estabilização do CO₂ (180 dias), em que se verificou as frações de NH₄⁺ e NO₃⁻ + NO₂⁻. Posteriormente, nos ensaios com gasolina sem álcool da REFAP, foram realizadas as análises nos tempos 90 e 180 dias. As reações químicas que abrangem o processo são (Tedesco et al., 1995):



em que a liga devarada (complexo redutor) contém 50% de Cu, 45% de Al e 5% de Zn. E a destilação ocorre através da reação:



Os procedimentos do ensaio consistem em (Tedesco et al., 1995): a) pesar 5g de solo e adicionar 50mL de solução KCl 1M, medindo-se a umidade do solo; b) agitar por 20 minutos e deixar sedimentar por 15 minutos; c) retirar 20mL do sobrenadante para um frasco de “carga lateral”; d) adicionar 0,2g de MgO; e) destilar de 30 a 35mL (obtenção do NH₄⁺); f) adicionar 0,2g da liga devarada (obtenção do NO₂⁻ e NO₃⁻); g) titular com H₂SO₄ 0,0025M; h) titular prova em branco para eliminar eventuais contaminantes; i) adicionar 5mL de H₃BO₃ aos potes que receberão o destilado; Deve-se observar:

- a) 1mL H₂SO₄ 0,0025M
- b) massa M1 de NH₄⁺ = 18g
- c) massa M1 de N = 14g

Então: 1mL * 0,0025 * 18 * 14/18 = 0,035 * 2H⁺ = 0,07 mg = 70 µg

50mL em um frasco com 20mL → 2,5

$$N_{\text{mineral}} \text{ (mg/kg)} = \frac{(mLH^+ \text{ amostra} - mLH^+ \text{ branco}) * 70 \mu\text{g} * 2,5}{5 \text{ g.solo}} \quad [7]$$

3.7.7 Cromatografia Gasosa

Todas as amostras de solo contaminado foram analisadas de forma a se detectar a presença de gasolina e diesel através de ensaios com cromatografia gasosa. Inicialmente, nos testes piloto, os contaminantes originários de postos de combustíveis foram dosados ao final de 180 dias de tratamento (Spinelli et al. 2005). Após, nos testes com gasolina originária da REFAP, buscou-se verificar a biorremediação ao longo de um período maior de tempo, observando-se os hidrocarbonetos remanescentes no solo nos tempos zero, 2, 4, 8, 15 e 30 dias. Todas as análises de cromatografia foram gentilmente cedidas pela Copesul S/A. Foram também realizados ensaios com solo esterilizado a fim de se verificar os efeitos da microbiota sobre os compostos voláteis. Neste caso, utilizou-se apenas solo contaminado com gasolina com e sem NPK nos tempos zero, 12 e 26 dias.

Os ensaios foram feitos com um cromatógrafo gasoso AutoSystem XL acoplado a um Headspace Turbo Matrix 40 da Perkin Elmer com limite inferior de 3 mg/kg para os compostos de petróleo avaliados (Figura 3.11a). Amostras de 2,000g de solo eram introduzidas em potes de vidro cilíndricos de 22mL acrescidos de 10mL de água destilada. Os potes eram selados e colocados no Headspace (Figura 3.11b). O método de amostragem é pneumático, com pressão balanceada (sem seringas ou loop de gás). Os frascos contendo as amostras são inicialmente pressurizados com gás. Durante o período de injeção, o fluxo de gás ao cromatógrafo é substituído pelas amostras já pressurizadas. A rápida transferência dos compostos é assegurada sem que haja um reequilíbrio nas válvulas ou seringas com subsequente perda de material. Então, o benzeno, tolueno, MTBE, aromáticos C₈ e C_{9+Total} podem ser analisados (Figura 3.12). A temperatura das amostras era de 80°C, temperatura esta necessária para volatilizar todos os componentes a serem medidos. A coluna utilizada era feita de silicone com um filme de metil-silicone. A matriz do solo foi misturada inicialmente a uma solução (MRC) contendo os contaminantes que seriam avaliados em concentrações conhecidas de forma a se obter um padrão para fins de comparação com todas as amostras de gasolina a posteriori (Figura 3.13).

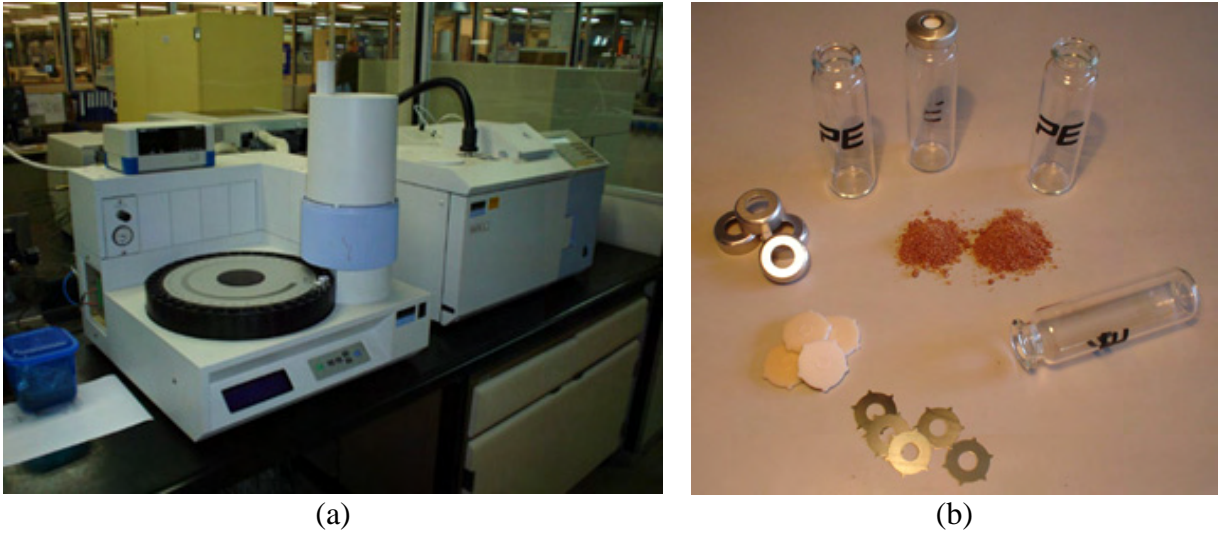


Figura 3.11: (a) Visão geral do equipamento mostrando o headspace com amostras de solo e (b) amostras

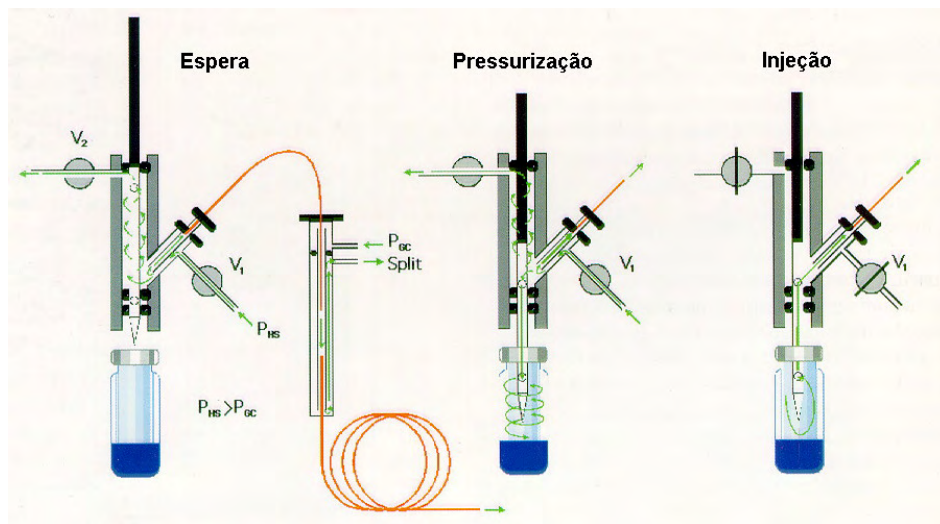


Figura 3.12: Sistema de injeção dos voláteis

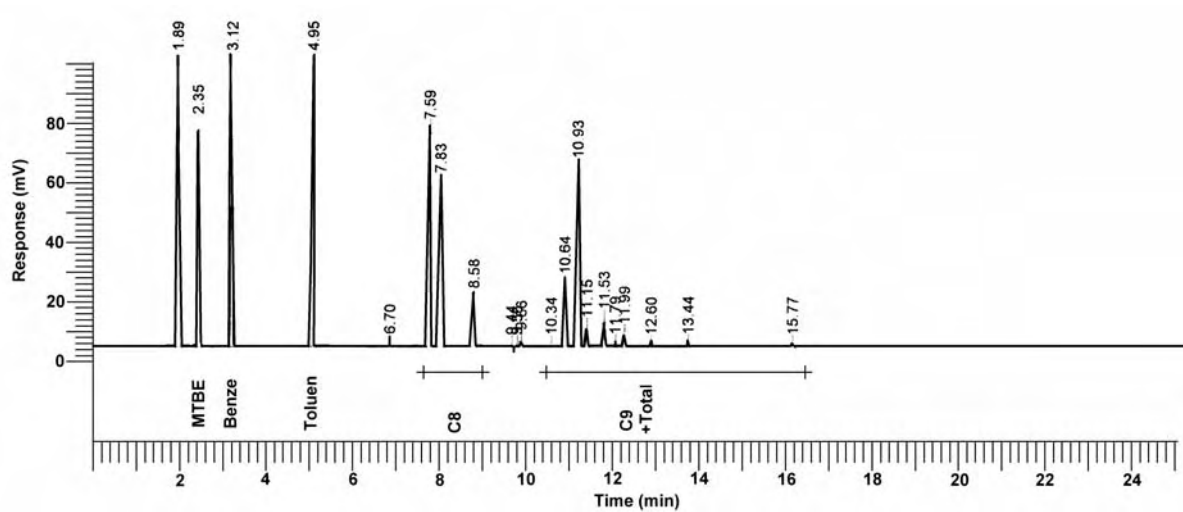


Figura 3.13: Cromatografia do solo controle com a solução padrão

3.7.8 Parâmetros de Contaminação do Solo

Como já foi discutido anteriormente, existem diversas dificuldades para se identificar contaminações e seus parâmetros em campo (pH e condutividade elétrica do solo). Algumas técnicas de investigação de campo tem sido utilizadas rotineiramente nas práticas nacional e internacional, normalmente combinando o cone a medidas de eletrorresistividade, temperatura e pH (Schnaid, 2000). Nesta pesquisa, o processo de biorremediação foi acompanhado por medidas pH e condutividade elétrica para verificar sua aplicabilidade em eventual uso “in situ”. Os procedimentos de ensaios são os mesmos vistos para a medição do pH e a condutividade elétrica neste Capítulo (Tedesco et al., 1995). Colocava-se o solo, a água e, a seguir, colocava-se o contaminante nas proporções de 1:2:0,1 (solo:água: contaminante) até 1:2:1 em volume, com incrementos de 0,1.

Todas amostras foram comparados a um solo controle, lembrando que estes parâmetros são analisados para a condição saturada. Para que fosse possível analisar o efeito do solo no pH e na condutividade elétrica para as diferentes cargas de contaminação, realizaram-se ensaios similares, porém apenas com água destilada e o contaminante. Medidas também foram tomadas da água, do diesel e da gasolina “in natura”.

3.7.9 Ensaio de Agregados

Amostras de solo dos ensaios de biorremediação foram coletadas nos tempos 180 e 256 dias, secas ao ar, e passadas na peneira de 7,960 mm para homogeneização. Foram pesadas 50g de cada amostra e colocadas sobre um conjunto de peneiras com malhas de diâmetros iguais a 4,760, 2,000, 1,000, 0,500 e 0,250 mm, submergindo-as por três segundos em água. Após, colocou-se o conjunto de peneiras com as amostras de solo em um aparelho de oscilação, de modo que o nível de água ficasse 1 cm acima do fundo da peneira superior, deixando-as imersas por dez minutos quando então o aparelho, de rotor excêntrico, era acionado por mais dez minutos (Figura 3.14). O material que ficava retido nas peneiras era transferido para latas de alumínio através de uma lavagem cuidadosa e levado à estufa a 105°C por 24 horas. A distribuição percentual dos agregados em diferentes tamanhos (e suas respectivas classificações) foi obtida pela razão entre a quantidade de material retido em cada peneira e a

quantidade total de solo da amostra, expressando-a em termos de diâmetro médio ponderado (DMP), conforme descrito por Kemper & Chepil (1965) e Volk (2001), em unidades de mm.



(a)



(b)

Figura 3.14: Equipamento utilizado para os ensaios de agregados: a) aparato completo e b) detalhe do solo submerso

3.7.10 Ensaio de Permeabilidade e Pluviometria

Nesta etapa da pesquisa buscou-se medir a concentração dos compostos da gasolina em relação à profundidade e sua relação com pluviometria em diferentes estágios de biorremediação. Para isso, foi adicionado ao solo (solo amolgado, seguindo as mesmas características dos ensaios de biorremediação) a umidade necessária para que a amostra

chegasse aos 11% (80% de sua capacidade de campo). Então, o solo foi disposto em um tubo de PVC ($\phi = 50\text{mm} \times 250\text{mm}$ de altura, conforme a Figura 3.15), com densidade média de $11,2 \text{ kN/m}^3$. A este tubo, era encaixado através de luvas, um outro tubo de mesmo diâmetro e comprimento. A outra metade era preenchida pela mesma quantidade de solo úmido e contaminada artificialmente com gasolina (25 mL/kg solo). Amostras das profundidades zero, 250 e 500mm eram coletadas nos tempos progressivos de zero, 3, 9 e 27 dias. Cada corpo de prova era destruído após a coleta, todas feitas em triplicatas. Da mesma forma, outros ensaios foram realizados, porém com pluviometria controlada de 25, 50 e 100mm. A simulação da pluviometria foi feita através da colocação da água no espaço de 1cm deixado no topo dos tubos. Adicionava-se cuidadosamente todo o volume calculado (25, 50 e 100mm) aos poucos, considerando-se a permeabilidade da água no solo. Nestes ensaios, objetivou-se também coletar o lixiviado após o tempo necessário para a saída do percolado do solo. Havia, portanto, a possibilidade de se controlar a drenagem. Os ensaios foram realizados todos nos mesmos tempos dos ensaios sem pluviometria, de forma a se comparar os resultados. Todas as amostras coletadas foram analisadas por cromatografia gasosa. A Figura 3.15b mostra um esquema dos ensaios, com suas condições de contorno.

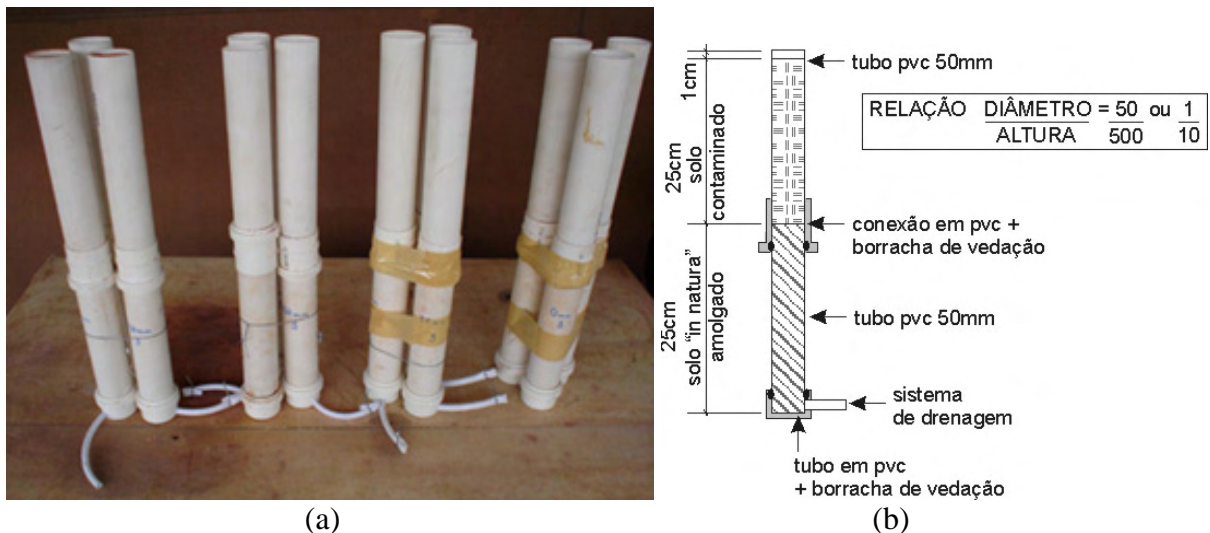


Figura 3.15: a) visão geral dos tubos utilizados nos ensaios de permeabilidade e pluviometria; b) esquema dos ensaios com suas condições de contorno

3.7.11 Caracterização do Solo em Relação a Metais Pesados

A presente pesquisa verificou a presença de metais pesados no lodo e no solo no início do período de ensaios. Novas análises de todos os solos tratados foram feitas ao final dos ensaios (180 dias). Os metais em estudo foram o cádmio, cromo, níquel, chumbo e mercúrio. O cádmio, cromo, níquel e chumbo foram medidos conforme o método proposto pelo EPA 3050/EAA – chama. O mercúrio foi medido pelo método de oxidação úmida/vapor frio.

3.8 ENSAIOS DE TOXICIDADE E LESÃO CELULAR

Para se analisar os efeitos da toxicidade dos químicos da gasolina, animais da espécie *Rattus norvegicus*, também conhecidos como ratos Wistar foram utilizados no estudo experimental (Figura 3.16). Os animais provinham do biotério da Faculdade de Biociências da PUCRS. Assim como em estudos realizados no campo da medicina, um mínimo de 6 animais eram submetidos aos testes. Em uma sala com pouca ventilação ($V = 64\text{m}^3$, com uma abertura de $0,20\text{ m}^2$), 6 gaiolas metabólicas foram dispostas ao redor de um recipiente contendo 4kg de solo contaminado com gasolina (25mL/kg)(Figura 3.17) e isoladas por papel pardo de forma que todos os voláteis passassem obrigatoriamente por cada gaiola. Buscou-se estudar os efeitos da exposição aos gases voláteis durante o período de biorremediação na pior condição, ou seja, sem qualquer composto bioestimulante. A partir de dados obtidos nas outras etapas desta pesquisa, observou-se que os compostos benzeno e tolueno não estavam mais presentes no solo já nos primeiros dias do processo e as frações aromáticas decaíam à metade em aproximadamente 15 dias. Então buscou-se um estudo que abrangesse este conhecimento, dispondo os animais em 3 diferentes grupos, passando por diferentes tempos de exposição ao contaminante. Tentou-se verificar um possível efeito cumulativo. Os grupos/tempos foram:

Tratamento: Nenhum (grupo controle)

A) Grupo A: 6 ratos, no ambiente não contaminado por 24h;

Tratamento: Solo + Gasolina

B) Grupo B: 18 ratos, trocados de 6 em 6 a cada 24h (3 dias de experimento);

C) Grupo C: 6 ratos, retirados do ambiente contaminado em 24h, para “trocas gasosas” e alimentação, e reintroduzindo-os após 1h (48h totais);



Figura 3.16: *Rattus norvegicus* utilizados na pesquisa



Figura 3.17: Disposição dos animais ao redor do solo contaminado com gasolina (25mL/kg)

Após a exposição ao contaminante pelo período indicado, os animais eram anestesiados com tiopental e sacrificados através de decaptação. Os fatores em estudo foram o hemograma e as plaquetas, creatinina sérica e urinária, uréia sérica e urinária, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamil transferase (γ GT), fosfatase alcalina, proteínas totais do sangue e macerados e proteinúria, sódio, potássio, glicose e desidrogenase

lática (LDH), creatinoquinase (CPK) e frações (CPK-MB), troponina “I” e cálcio total. A medula óssea foi analisada por histologia, assim como um dos rins e um pulmão (lâminas coradas por Hematoxilina-Eosina); além disso, foram realizados ensaios de condutividade elétrica e pH do outro rim, do pulmão, do sangue e da urina.

3.8.1 Hemograma e Plaquetas

O hemograma e a contagem de plaquetas foi realizada em um analisador eletrônico Coulter modelo STKS, que efetua a contagem e as diferenciações celulares integrando 3 medidas: volume (por impedância), condutividade (por rádio-freqüência) e dispersão do raio laser (Scatter). O aparelho pode medir o sangue total em um tubo de ensaio contendo anticoagulante (EDTA). Os controles fornecidos pela Coulter são atualizados mensalmente. Após colhido, o sangue era imediatamente introduzido no tubo de ensaio contendo EDTA e levado ao aparelho.

Os critérios de rejeição da amostra são amostras lipêmicas, coaguladas, hemolisadas e com volume abaixo ou acima da marca. Para fins de cálculos, estes são realizados automaticamente pelo aparelho (específico para eritrograma e leucograma respectivamente). O equipamento tem como valores críticos o hematócrito menor que 15%, hemoglobina igual ou menor que 4,5 g/dL, a CHCM (concentração da hemoglobina corpuscular média) deve estar entre 28 a 35%, que é o limite da saturação, leucograma com valores inferiores a 1500/ μ L e plaquetas menor que 20.000/ μ L. Quanto a linearidade e limites de detecção, no caso do leucograma, os valores ficam alterados pela presença de interferentes na amostra. Contagem de leucócitos muito elevadas devem ser diluídas. Presença de eritroblastos (hemácias nucleadas) devem ser descontadas do número de leucócitos.

3.8.2 Dosagem da Creatinina e Uréia Sérica e Urinária, AST, ALT, γ GT, Fosfatase Alcalina, Proteínas Totais e Proteinúria, Sódio, Potássio, Glicose, LDH, CPK, CPK-MB, Troponina “I” e Cálcio Total

O sangue, após retirado dos animais, era centrifugado por 10 minutos a 3.000 rpm. O mesmo procedimento foi feito com a urina. Então, 1,5mL do sobrenadante eram retirados e inseridos em um tubo de ensaio plástico, descartável, de 5mL de volume. Os tubos contendo as amostras eram centrifugados novamente por mais 6 minutos a 3.000 rpm quando então eram acondicionados em um equipamento de análises automatizado Bayer ADVIA® 1650 (Figura 3.18) com capacidade de realizar 1650 testes/hora. Inicialmente, o equipamento pré-dilui automaticamente todas as amostras a 1:5 (30 μ L amostra + 120 μ L solução salina), gerando 15 resultados em média (amostras variam em volume de 2 a 30 μ L, sendo que o sistema utiliza em média 2-3 μ L por teste). O fotômetro interno tem a possibilidade de medir 14 comprimentos de onda fixos (340, 410, 451, 478, 505, 545, 571, 596, 658, 694, 751, 805, 845 e 884 μ m). Todas as amostras são automaticamente corrigidas com um branco.

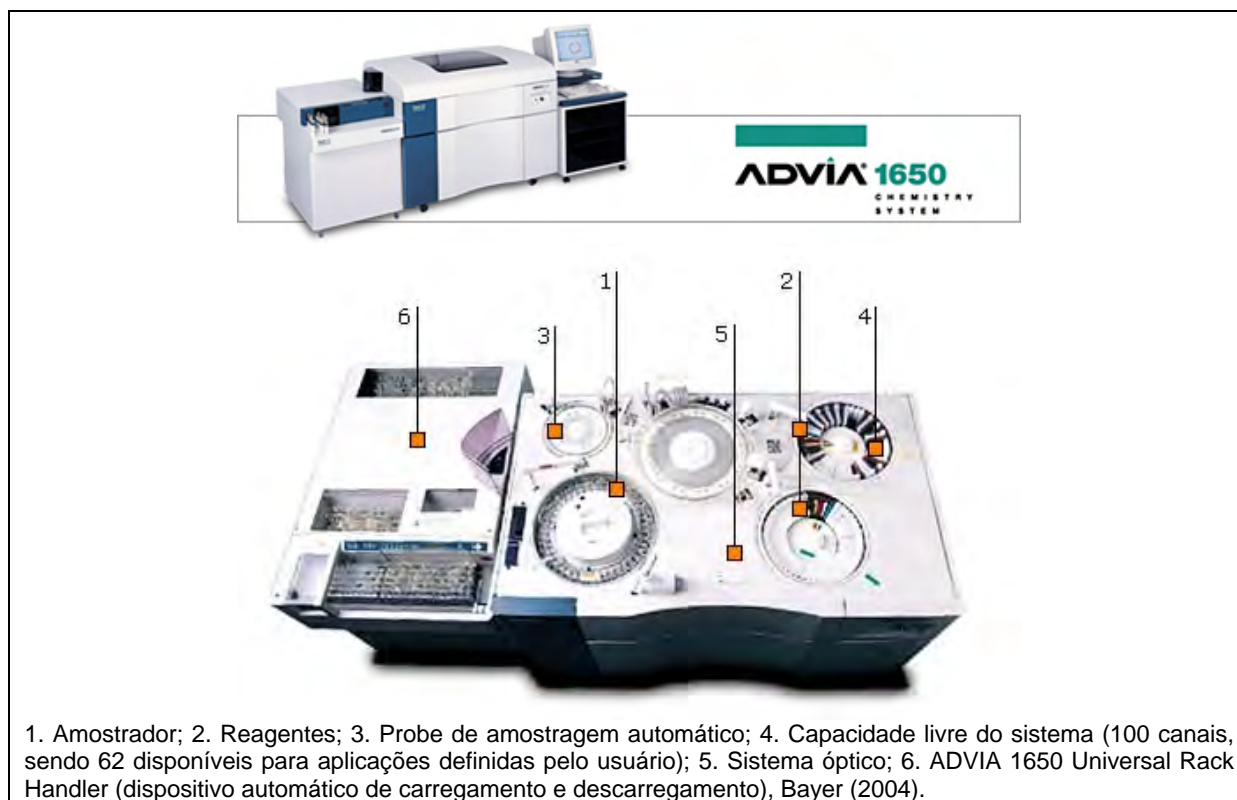


Figura 3.18: Equipamento utilizado para medir parâmetros no sangue, urina e proteínas dos rins e pulmões dos animais

3.8.3 Histologia da Medula Óssea, dos Rins e dos Pulmões

Ao final do período de ensaio destinado para cada grupo, a medula óssea, um dos rins e um dos pulmões de cada animal era retirado e acondicionado em um frasco com formalina para fixação dos órgãos, de forma a evitar a digestão dos tecidos por enzimas presentes no interior das células (autólise) ou por bactérias e para preservar a estrutura e composição molecular (Junqueira e Carneiro, 2004).

Para obter secções delgadas com o micrótomo, após terem passado pela fixação, os fragmentos de tecidos e órgãos devem ser infiltrados com substâncias que lhes proporcionem uma consistência rígida (Junqueira e Carneiro, 2004). Para tanto, foi utilizada a parafina. O processo de impregnar o tecidos com parafina é chamado inclusão ou embebição e foi precedido por duas etapas: desidratação e clareamento. A água é inicialmente extraída passando os fragmentos por diversos banhos de soluções de concentrações crescentes de etanol em água (etanol 70% a 100%). Após a desidratação, o etanol presente nos fragmentos foi substituído por uma substância intermediária miscível tanto em etanol como no meio da inclusão, ou seja, o xilol. Quando os fragmentos de tecidos são embebidos e saturados com o solvente orgânico, eles ficam transparentes ou translúcidos. A seguir eram colocados em parafina previamente derretida em uma estufa a 60°C. O calor causa a evaporação do solvente e os espaços existentes dentro dos tecidos são preenchidos com parafina. O tecido embebido em parafina se torna rígido depois de ter sido tirado da estufa (Junqueira e Carneiro, 2004).

Os blocos rígidos que continham os tecidos eram então levados a um micrótomo, onde eram seccionados por uma lâmina de aço de modo a fornecer cortes de 1-10 µm de espessura. Após serem seccionados, os cortes eram colocados para flutuar sobre uma superfície de água aquecida, de onde eram colocados sobre lâminas de vidro, onde aderem e onde eram posteriormente corados. Conforme Junqueira e Carneiro (2004), a seletividade com que os corantes coram os componentes dos tecidos pode ser maior ou menor. A maioria dos corantes se comporta como compostos ácidos ou básicos, e tende a formar ligações eletrostáticas (salinas) com radicais ionizados dos tecidos. Os componentes dos tecidos que se coram bem com corantes básicos são chamados de basófilos, e os que têm grande afinidade por corantes ácidos são chamados de acidófilos. O azul de toluidina e o azul de metileno são exemplos de corantes básicos. A hematoxilina comporta-se como um corante básico, ligando-se às

estruturas basófilas dos tecidos. Os principais componentes dos tecidos que ionizam e reagem com corantes básicos o fazem por conter ácidos na sua composição - ácidos nucléicos, glicosaminoglicanas e glicoproteínas ácidas. Corantes ácidos (por exemplo, orange G, eosina, fucsina ácida) coram principalmente os componentes acidófilos dos tecidos, como as mitocôndrias, os grânulos de secreção, proteínas citoplasmáticas e colágeno (Junqueira e Carneiro, 2004).

No presente trabalho foi utilizada a combinação de hematoxilina e eosina (HE). A hematoxilina cora em azul ou violeta o núcleo das células e outras estruturas ácidas (como porções do citoplasma ricas em RNA e a matriz da cartilagem hialina). A eosina, por outro lado, cora o citoplasma e o colágeno em cor-de-rosa (Junqueira e Carneiro, 2004). Pronta a lâmina, esta era analisada por microscopia óptica (Fiore, 1997; Vegue, 1999).

No caso das medulas ósseas, o processo iniciava pela desmineralização das peças. A solução corrosiva era feita em duas partes, uma contendo 100mL de HCl a 38% e 400mL de H₂O destilada, e a outra contendo 100mL de H₂NO₃ a 65% e 400mL de H₂O destilada, posteriormente unidas em uma única solução de 1000mL. As peças de medulas eram introduzidas nesta solução por 1h para que ocorresse o processo de desmineralização, quando então seguiam a rotina anteriormente descrita (impregnação, secção e coloração).

3.8.4 Condutividade Elétrica e pH

Neste trabalho, tentou-se verificar a aplicação de medidas de pH e condutividade elétrica a fim de identificar células patológicas de rins, pulmão e sangue, além da urina de animais submetidos a uma atmosfera tóxica de um solo contaminado artificialmente com gasolina, na concentração de 25mL/kg de solo, por um período mínimo de 24h. Tentou-se correlacionar estes valores a estados fisiológicos dos animais. A metodologia utilizada na medição da condutividade elétrica celular não é padronizada para uso em tecidos, sendo este passo inicial dado na presente pesquisa. Serão necessários novos trabalhos futuros, identificando alterações deste parâmetro com relação ao tempo, temperatura, etc.

3.8.4.1 Condutividade Elétrica e pH Renal e Pulmonar

Enquanto um rim e um pulmão do animal eram enviados à patologia, o outro era pesado e macerado (Figura 3.19.) com igual peso em água e, então, adicionado em 20mL de água destilada-deionizada (volume mínimo necessário para que fosse possível a leitura pelo equipamento) e homogeneizado com um bastão de vidro. O conjunto era selado com Parafilm© e deixado em um laboratório com umidade do ar e temperatura controlada (20°C) aclimatando-se por 6h. A condutividade elétrica e o pH do conjunto foram medidos com um condutivímetro Digimed DM31 e um pHmetro DM20 da mesma marca no sobrenadante. Uma visão geral dos equipamentos utilizados nos ensaios de condutividade elétrica e pH pode ser vista na Figura 3.20.

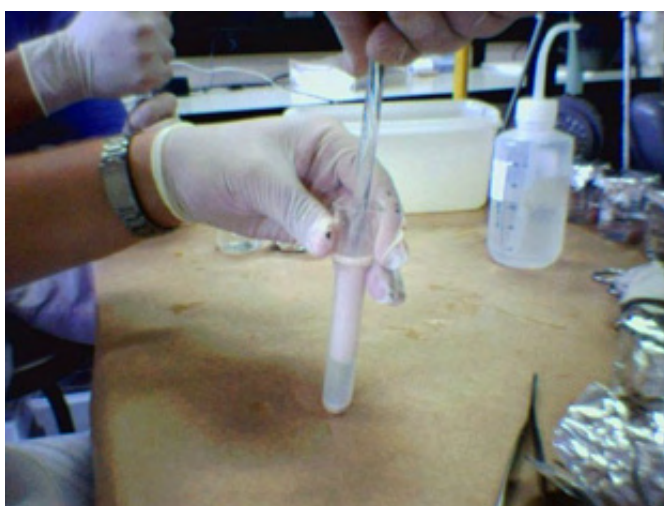


Figura 3.19: Visão geral da maceração dos órgãos dos animais

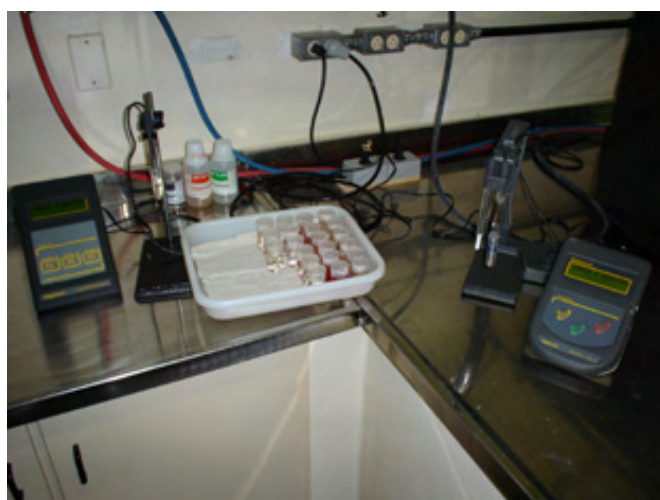


Figura 3.20: Ensaios de condutividade elétrica e pH

3.8.4.2 Condutividade Elétrica e pH do Sangue e da Urina

Após a coleta do sangue e da urina, estes eram acondicionados (5mL) em um tubo de ensaio, vedado com Parafilm®, e levados a uma centrífuga Eppendorff por 10 minutos a uma rotação de 3.000 rpm. O sobrenadante da urina (1mL) e do sangue (100µL ou 0,1mL) eram retirados e dispostos em um copo de Becker, onde se adicionava 19mL e 19,9mL de água destilada e deionizada, à urina e ao sangue, respectivamente. Os 20mL eram selados pelo Parafilm®, aclimatados a 20°C por 6h e medidas a sua condutividade elétrica e pH pelos mesmos equipamentos descritos no item anterior.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi feita através do programa SPSS para Windows v.11. Foi realizada inicialmente uma análise descritiva e um Teste de Homogeneidade de Variância de Levene. Quando os dados eram considerados homogêneos, era realizado o Teste de ANOVA, seguido do Teste de Post Hoc de Tukey ou Bonferroni. O Teste de ANOVA compara a hipótese nula $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$, em que k é o número de grupos experimentais ou amostras, fazendo uma análise de variâncias (Zar, 1999). Conforme o autor, problemas de comparação múltipla têm recebido atenção na literatura estatística e não há um acordo de qual o melhor teste para ser rotineiramente empregado. O teste de Tukey, o mais amplamente aceito e comumente utilizado, era aplicado aos ensaios de solo e o de Bonferroni, mais comumente utilizado na área médica, aos dos ratos. Os testes consideram a hipótese nula $H_0: \mu_B = \mu_A$ versus a hipótese alternativa $H_A: \mu_B \neq \mu_A$. A significância estatística foi considerada com $P < 0,05$. Quando os dados não eram homogêneos, uma análise de variância não-paramétrica era aplicada com o Teste de Kruskal-Wallis, especialmente preferível quando a amostra não apresenta populações normais, podendo ser aplicável quando as variâncias das populações são heterogêneas (Krutchkoff, 1988; Zar, 1999). No caso do teste de Kruskal-Wallis mostrar $P > 0,05$, considerava-se o teste de ANOVA e, caso contrário, aplicava-se o teste de Mann-Whitney. Em uma pequena parcela das amostras, nas quais as diferenças entre os grupos eram grandes, nem os testes de Levene/ANOVA e nem os testes de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney puderam ser aplicados, utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS

4.1 ENSAIOS DE BIORREMEDIAÇÃO EM ARENITO BOTUCATU

Neste capítulo são discutidos os resultados obtidos por cada uma das técnicas aplicadas na pesquisa. Ao final deste bloco será analisado o conjunto dos dados de forma a se entender todo o processo que envolve a biorremediação. Inicialmente são apresentados os dados obtidos nos testes piloto, que abrangem o estudo de diesel e gasolina com álcool num período de 170 dias, com avaliação da microbiologia pelo método da lâmina enterrada. Posteriormente, modificou-se o método para a quantificação dos microrganismos por contagem direta em Placas de Petri, e prolongou-se em mais 43 dias o tempo de observação do CO₂ para se observar melhor a estabilização das curvas. Na segunda etapa, como já discutido anteriormente, utilizou-se somente a gasolina da REFAP, sem álcool, como fonte de contaminação.

4.1.1 Liberação de CO₂

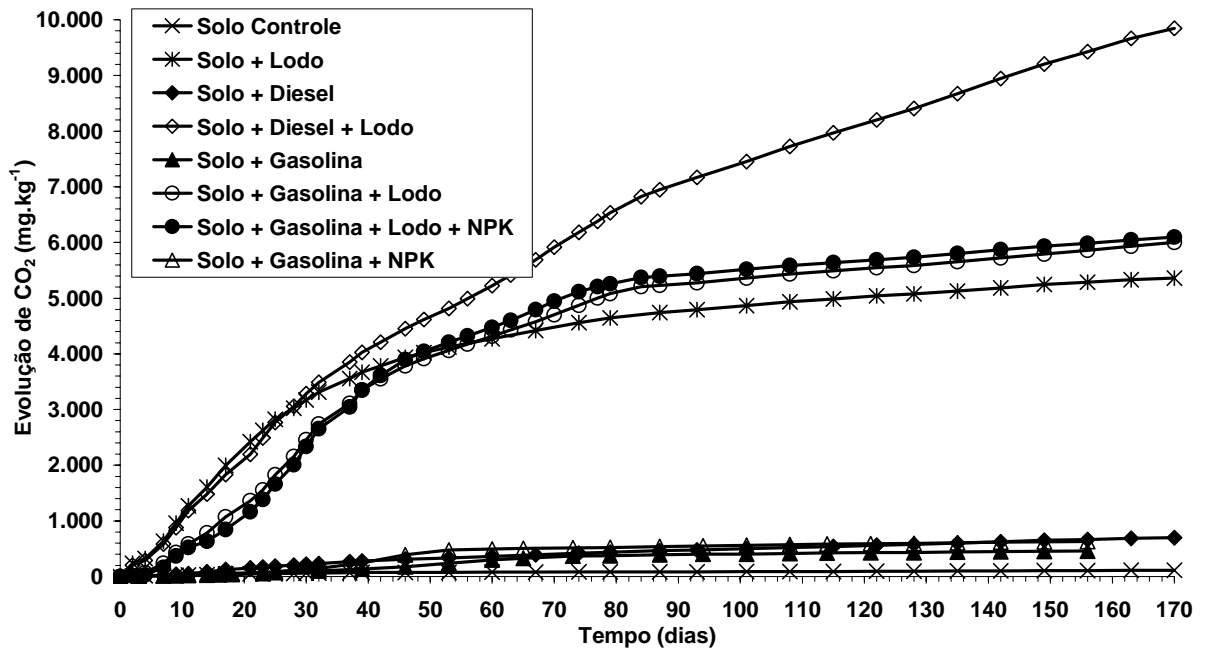
No teste piloto, a evolução do CO₂ foi acompanhada por um período de 170 dias, tempo considerado necessário para a obtenção da estabilização das curvas de CO₂ vistas na Figura 4.1. A quantificação do CO₂ representada pelas curvas pode ser analisada sobre quatro diferentes categorias: (a) solo controle; (b) solo com contaminantes (gasolina e diesel) e gasolina com a adição de NPK; (c) solo com lodo e suas adições à gasolina com e sem NPK; (d) solo com lodo e diesel. Todos os tratamentos foram sistematicamente comparados ao solo sem tratamento (controle). Os pontos inseridos nas figuras representam uma média de cinco repetições realizadas de forma a se verificar a reprodutibilidade, que nestes casos não mostraram praticamente nenhuma dispersão. A incorporação de gasolina e diesel ao solo com e sem adições produziu alterações na evolução cumulativa de CO₂ quando comparada ao solo controle. Os valores da ordem de 100 a 200 mg/kg de CO₂ medidos nas amostras controle são relativamente baixos quando comparados a outros valores de CO₂ de solos utilizados para fins agrícolas. Testes estatísticos foram aplicados aos 7, 14, 28, 60, 90 e 170 dias do início do

experimento para verificar a partir de que momento as diferenças entre os tratamentos foram significativas.

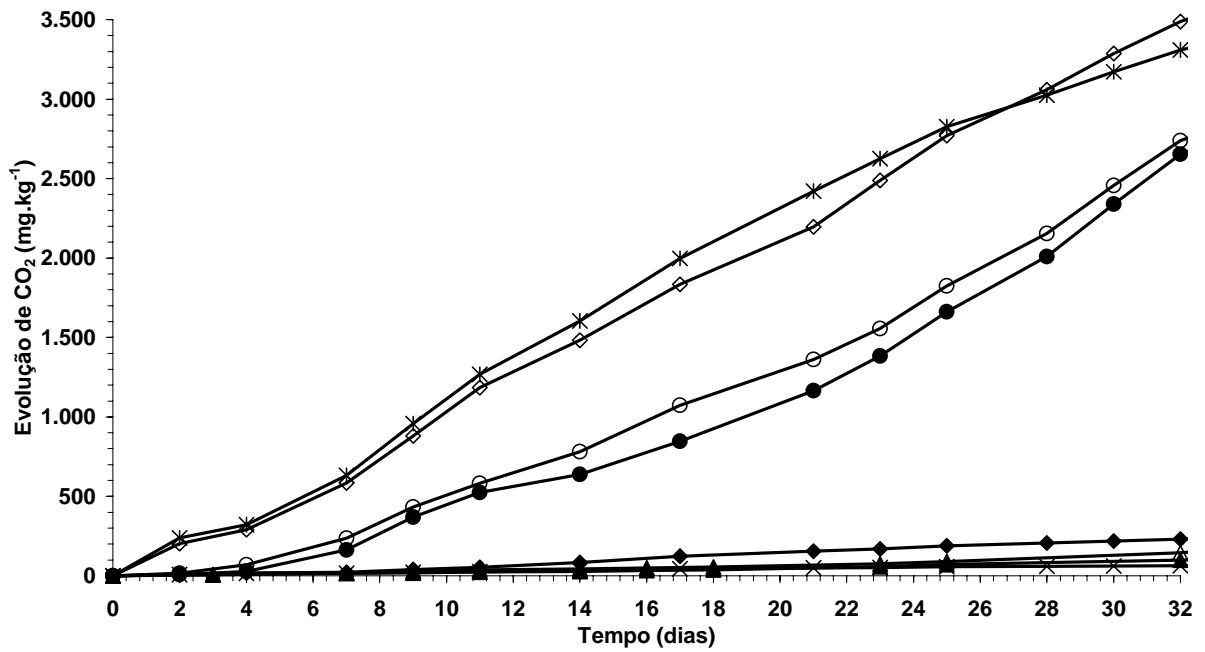
A adição de NPK ao solo contaminado com gasolina não produziu alterações substanciais nos padrões observados até 60 dias, quando então tratamento com bioestimulante passou a se tornar significativo ($P=0,008$). A bioestimulação com NPK à gasolina não apresentou significância estatística para contaminações puras com diesel ($P>0,05$) mesmo ao final dos 170 dias, apresentando, entretanto, significância quando comparadas ao controle ($P=0,008$).

A adição do lodo ao solo produziu uma significativa quantidade de CO_2 , principalmente por ser um material rico em carbono (Tabela 3.2), que estimula a atividade microbiana e pode ser uma importante fonte de ($P=0,008$ quando comparado ao controle, já desde o início do tratamento). O mesmo comportamento pode ser visto quando o lodo é adicionado ao solo contaminado com diesel e gasolina, mostrando um incremento da atividade microbiana (evolução de CO_2) quando comparadas com o solo contaminado sem adições. Aparentemente o lodo elimina/compensa a adaptação inicial da população microbiana por ser uma fonte prontamente disponível de carbono e energia, claramente observado na Figura 4.1a. A “bioaugmentação” no diesel apresentou significância estatística ($P<0,016$) com todos os tratamentos. Uma maior evolução de CO_2 nos tratamentos contendo lodo foi observada em todos os experimentos, fator atribuído à disponibilidade de carbono que acaba por contribuir para a geração de uma intensa atividade microbiana (Figuras 4.1a e 4.1b). Esta observação foi posteriormente confirmada pela avaliação qualitativa pelo método da lâmina enterrada, indicando que um aumento na evolução de CO_2 corresponde a um aumento da população microbiana (Tabela 4.1). É também interessante ressaltar que a adição de NPK às amostras contendo lodo não trouxeram qualquer benefício ($P>0,05$) ao processo de biorremediação já que o lodo por si só contém todos os elementos necessários ao crescimento microbiano (Figuras 4.1 e 4.2).

Enquanto a gasolina adicionada ao solo e sua bioestimulação com NPK começam a apresentar diferença significativa do controle aos 60 dias, o diesel adicionado ao solo já apresenta esta diferença aos 14 dias de tratamento, possivelmente pelo fato de não conter BTEX em sua composição.



(a)



(b)

Figura 4.1: Liberação de CO_2 durante os testes preliminares: a) ao longo dos 170 dias e b) visão expandida para 32 dias

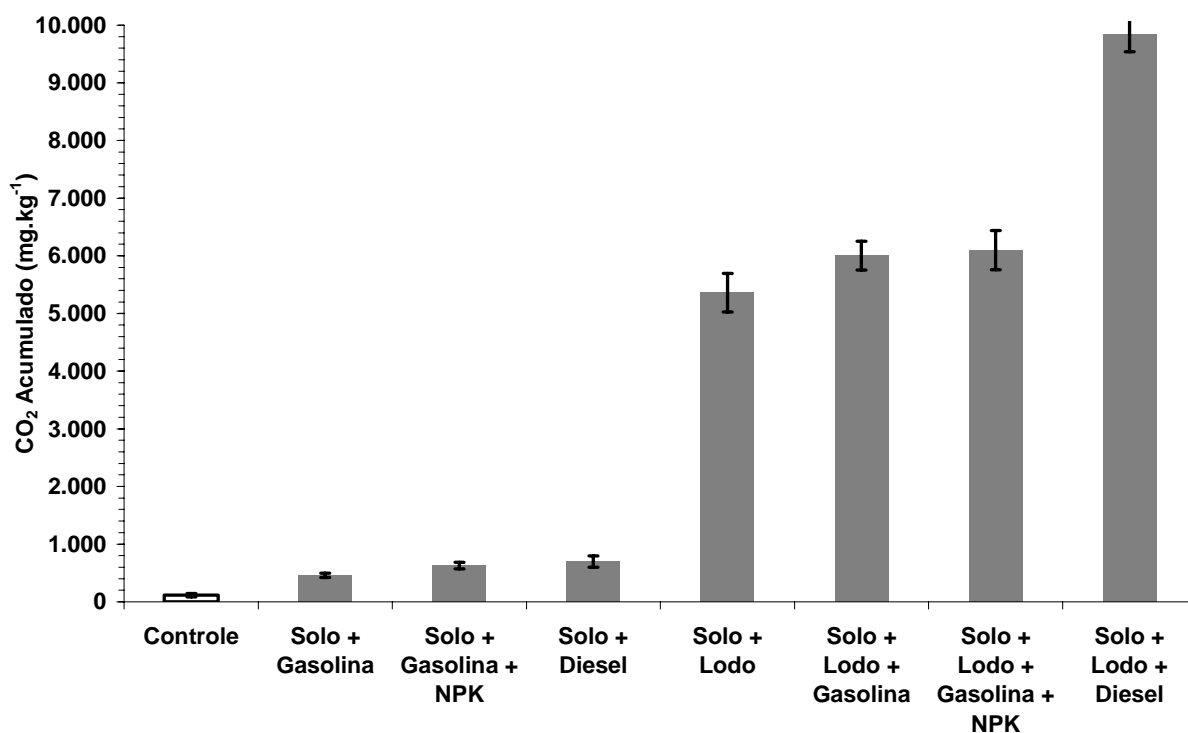
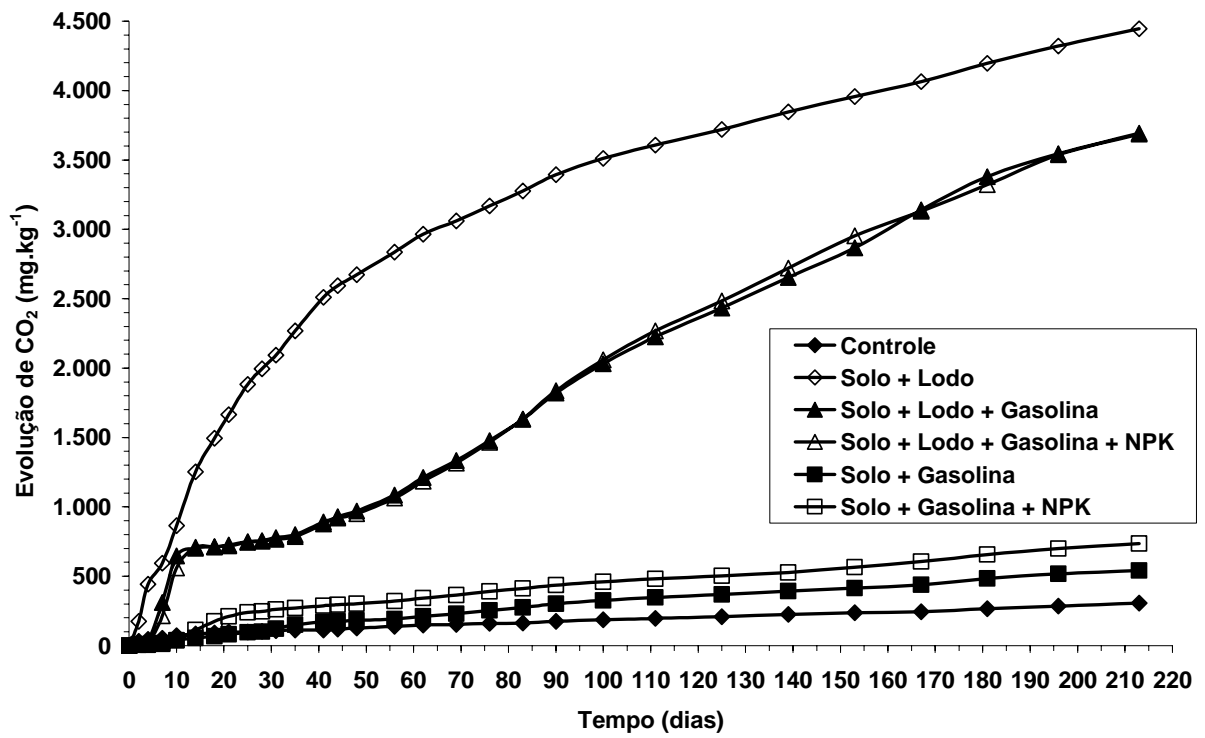


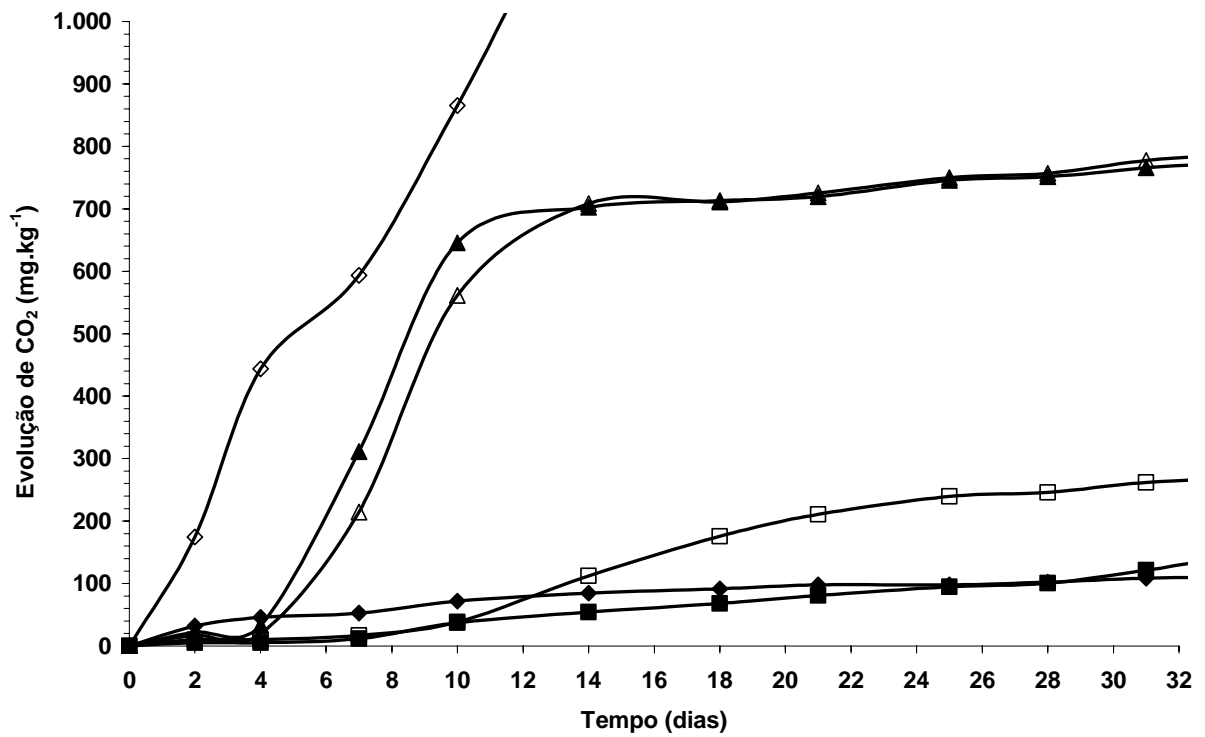
Figura 4.2: CO₂ total acumulado durante o período de ensaio preliminar (170 dias)

Na segunda etapa do trabalho, que envolveu apenas experimentos com gasolina da REFAP, a evolução do CO₂ foi acompanhada por um período de 213 dias (Figuras 4.3 e 4.4). A quantificação do CO₂ desta etapa representada pelas curvas das Figuras 4.3a e 4.3b pode ser analisada sobre cinco diferentes categorias: (a) solo controle; (b) solo com gasolina; (c) solo com gasolina e NPK; (d) solo com lodo e gasolina com e sem NPK; (e) solo com lodo. Todos os tratamentos foram sistematicamente comparados ao solo sem tratamento (controle). Os pontos inseridos nas figuras representam uma média de três replicatas realizadas de forma a se verificar a repetibilidade, que nestes casos também não mostraram praticamente nenhuma dispersão. A incorporação de gasolina ao solo com e sem adições produziu alterações na evolução cumulativa de CO₂ quando comparada ao solo controle. Testes estatísticos foram aplicados aos 7, 14, 28, 60, 90 e 170 dias do início do experimento.

A adição de NPK ao solo contaminado com gasolina não produziu alterações substanciais nos padrões observados até 60 dias, quando então tratamento com bioestimulante passou a se tornar significativo ($P=0,009$), de forma similar ao teste piloto, no qual se utilizou a gasolina de posto de combustível. Entretanto, o tratamento de gasolina e solo (“atenuação natural”) apresentou diferença estatisticamente significativa para o controle apenas aos 170 dias.



(a)



(b)

Figura 4.3: Liberação de CO_2 dos ensaios de biorremediação com a gasolina da REFAP: a) ao longo dos 220 dias e b) visão expandida para 32 dias

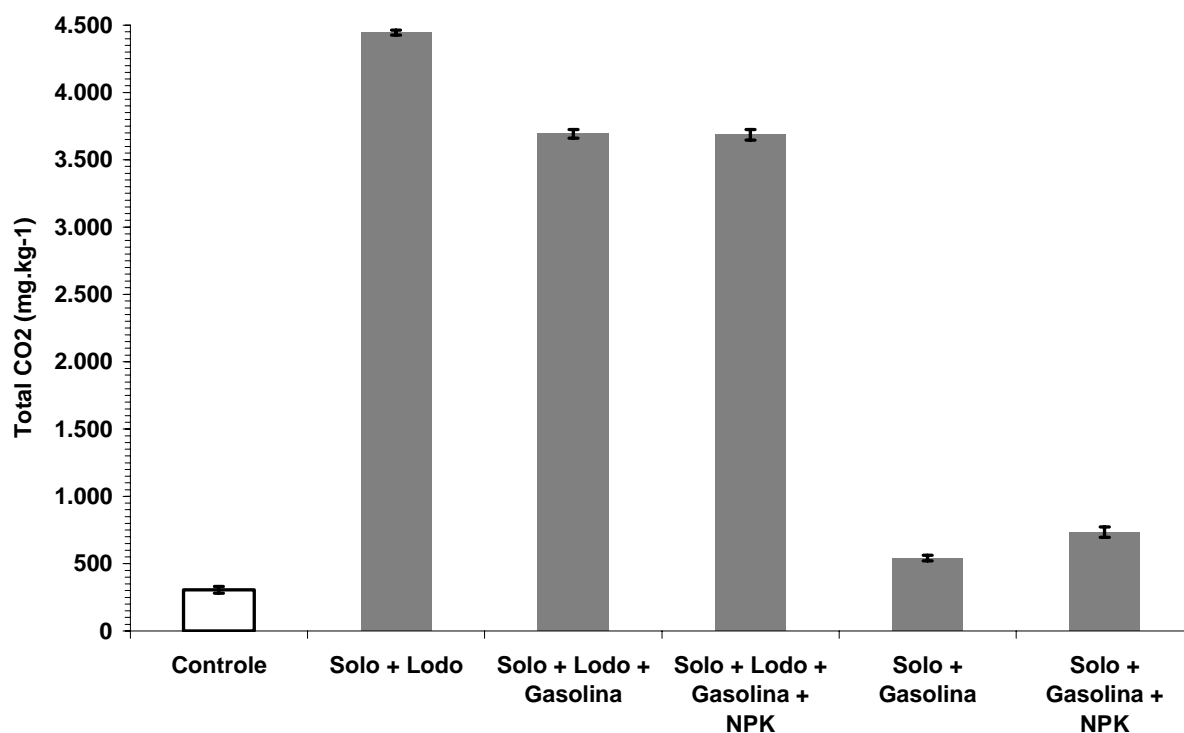


Figura 4.4: Liberação de CO₂ total acumulado durante o período de ensaio (213 dias)

A adição do lodo ao solo produziu uma significativa quantidade de CO₂ ($P < 0,001$ quando comparado ao controle, já desde o início do tratamento). O mesmo comportamento pode ser visto quando o lodo é adicionado ao solo contaminado com gasolina (25mL/kg de solo, $P < 0,001$) (Figura 4.3a e 4.3b). A discussão da importância do lodo na adaptação inicial da população microbiana já foi introduzida anteriormente. Da mesma forma que ocorreu nos testes piloto, nesta etapa envolvendo a gasolina da REFAP, a adição de NPK às amostras contendo lodo não trouxeram qualquer benefício ($P > 0,05$) ao processo de biorremediação já que o lodo por si só contém todos os elementos necessários ao crescimento microbiano (Figuras 4.3 e 4.4).

Um outro fator interessante é a diferença de comportamento dos tratamentos no início do processo de biorremediação vistos na Figura 4.3b. O lodo já inicia com uma atividade maior, enquanto a adição da gasolina com e sem NPK ao lodo parece iniciar o processo aos 4 dias. O solo com gasolina com e sem NPK inicia a evolução do CO₂ aos 7 dias, sendo que apenas aos 10 dias o NPK parece fazer algum efeito no tratamento.

A Figura 4.5 mostra uma comparação entre os lodos utilizados na pesquisa. Como já visto e discutido anteriormente, o lodo coletado em diferentes tempos apresenta diferentes

composições químicas (Tabela 3.2). Aos 7 dias do início do experimento já há uma diferença estatisticamente significativa ($P < 0,001$) que se mantém até o final dos experimentos. Apesar de terem diferentes composições químicas e liberarem quantidades distintas de CO_2 , os lodos apresentam o mesmo comportamento. O solo controle mostra diferenças significativas na liberação de CO_2 até o 14º dia, talvez devido à população microbiana e ao nitrogênio mineral do solo (discutido adiante), temperatura, período de coleta, etc. Durante o período de realização da pesquisa foram feitas duas coletas de solo, uma primeira para os testes preliminares com a gasolina de posto de combustível (com álcool) e uma segunda para os testes com a gasolina da REFAP (sem álcool). E isso é importante, uma vez que a armazenagem do solo pode modificar sua composição microbiológica (Alef e Nannipieri 1995). Por este motivo, o solo é o mesmo físico-quimicamente, identificado por Spinelli et al. (2005), porém a concentração do nitrogênio mineral pode ser diferente, devido a processos naturais de mineralização e lixiviação ocorridos na natureza (Alexander 1994, Paul e Clark 1996 e Selbach e Camargo 2001). A partir do 28º dia, entretanto, os solos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

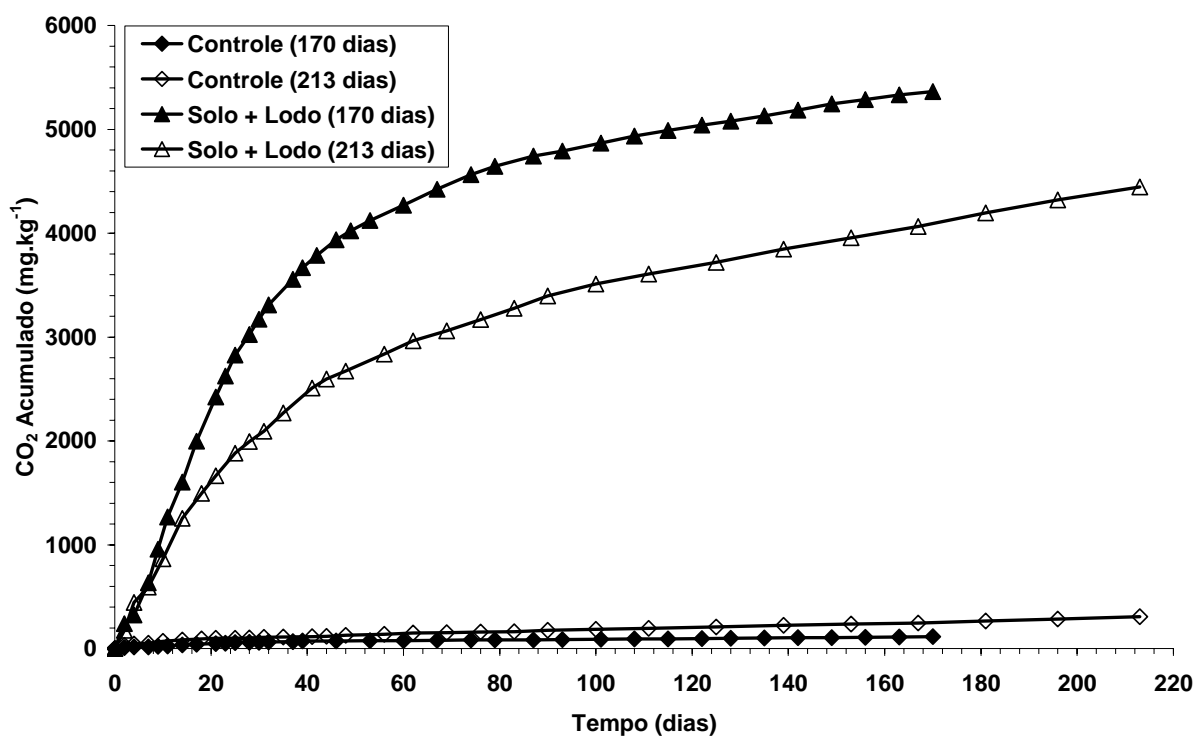


Figura 4.5: Evolução de CO_2 comparativa entre os dois lodos utilizados

Por fim, comparou-se o CO₂ acumulado das duas gasolinas utilizadas na pesquisa (Figuras 4.6 e 4.7). A atividade microbiana medida através da liberação de CO₂ não apresentou diferenças significativas ($P>0,05$) ao final do período de tratamento para as gasolinas utilizadas (posto de combustível e REFAP). Em todas as amostras contendo NPK observou-se um incremento na atividade microbiana do solo (Figura 4.6). O fertilizante mineral, como já observado em outros trabalhos (Alexander 1994, Paul e Clark 1996; Spinelli et al. 2005), apresenta uma importante função pela eliminação de fatores limitantes da atividade microbiana. A resposta da bioestimulação, através da adição de nutrientes é significativa quando comparamos as gasolinas com e sem o NPK ($P=0,032$ para a do posto de combustível e $P=0,002$ para a da REFAP), e mais ainda quando comparamos os níveis de CO₂ liberado destes tratamentos com o do controle ($P<0,001$). Na Figura 4.7 é apresentado o CO₂ total evoluído ao longo do período, mostrando as semelhanças de comportamento entre as gasolinas do posto de combustível e a da REFAP.

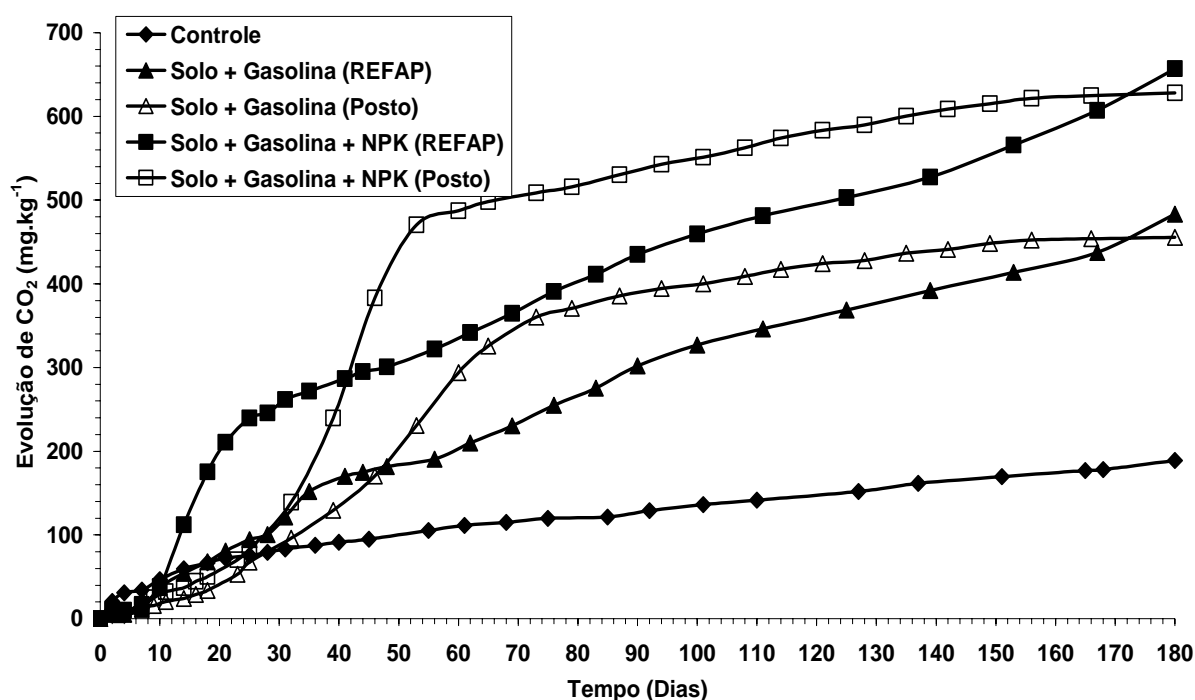


Figura 4.6: Liberação de CO₂ comparativa entre a gasolina de posto de combustível (com álcool) e a gasolina da REFAP (sem álcool)

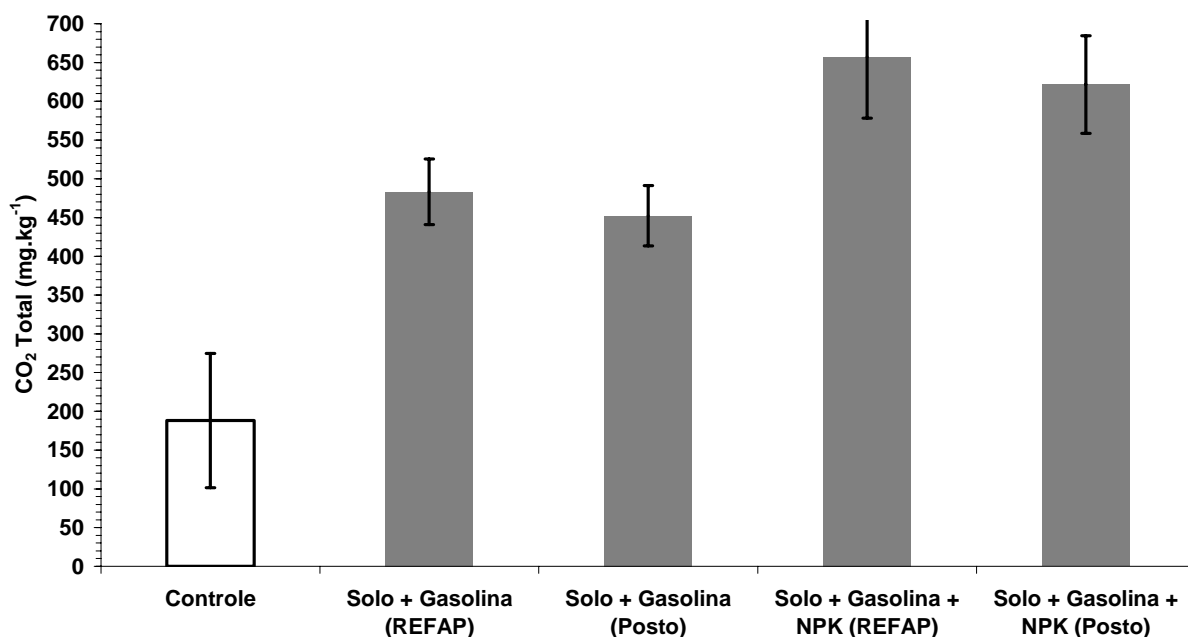


Figura 4.7: Comparativo entre o CO₂ total das gasolinas utilizadas na pesquisa

4.1.2 Avaliação da População do Solo pelo Método da Lâmina Enterrada (Rossi-Cholodny)

Nos testes preliminares, os microrganismos do solo foram caracterizados qualitativamente através do método da lâmina enterrada, e observados com microscopia óptica, 90 dias após o início do experimento. Assim como ocorreu com a avaliação do CO₂, importantes observações recaem novamente sobre as adições contendo lodo (Tabelas 4.1). Como já mencionado anteriormente, o lodo é rico em carbono e nutrientes essenciais, necessário aos microrganismos do solo para o seu crescimento. Este fato pode ser observado na Tabela 4.1 para os tratamentos onde as adições de lodo ao solo aumentaram a ocorrência de fungos, actinomicetos e bactérias. Nas amostras contaminadas com gasolina e diesel sem adições, não houve a ocorrência de fungos, encontraram-se apenas alguns actinomicetos (nenhum na gasolina) e uma pequena quantidade de bactérias. A abundância de bactérias no solo foi estimada pela contagem de células nos diversos campos da microscopia óptica nas lâminas enterradas, enquanto os fungos e actinomicetos pela sua presença macroscópica nas lâminas. Observando a Tabela 4.1 e a Figura 4.8 é possível identificar a alta abundância dos fungos (principalmente nos tratamentos com lodo) e actinomicetos nas lâminas de solo contaminado

onde o lodo e o fertilizante mineral foram incorporados. Amostras de solo sem adições mostram diferentes tipos de microrganismos. A adição de lodo produz um aumento significativo da atividade microbiana, a qual é mantida até mesmo após a adição dos contaminantes. Uma vez que o procedimento aqui utilizado não quantifica os microrganismos no solo, ao mesmo tempo tem sua importância para fornecer uma idéia da abundância dos microrganismos nos solos em teste.

Tabela 4.1. Número de microrganismos avaliados pelo método da lâmina enterrada

Tratamentos	Bactérias/campo	Fungos/lâmina	Actinomicetos/lâmina
Solo Controle	50 a 100	< 5	< 5
Solo + Lodo	> 100	> 10	> 10
Solo + Gasolina	10 a 50	N.O.	N.O.
Solo + Gasolina + Lodo	> 100	5 a 10	5 a 10
Solo + Gasolina + Lodo + NPK	> 100	5 a 10	> 10
Solo + Gasolina + NPK	50 a 100	N.O.	N.O.
Solo + Diesel	10 a 50	N.O.	< 5
Solo + Diesel + Lodo	> 100	5 a 10	5 a 10

Nota: N.O.= não observados

4.1.3 Quantificação Microbiana: Bactérias e Fungos

A Figura 4.9 mostra a contagem de fungos realizada durante a segunda etapa de testes (180 dias) para a gasolina da REFAP. É possível identificar uma queda inicial do número de fungos em todos os tratamentos realizados devido ao novo ambiente (umidade, temperatura, aeração, etc). No solo natural (controle) e no tratamento com lodo há um rápido crescimento dos fungos. Em torno do 16º dia do início do experimento, há uma estagnação no crescimento em função de fatores limitantes e, no caso do solo controle, há uma queda no número de microrganismos até sua estabilização nos patamares do solo “inicial”. O lodo, por apresentar

muita matéria orgânica/nutrientes, e sendo também uma fonte de “bioaugmentação”, mantém um grande número de fungos.

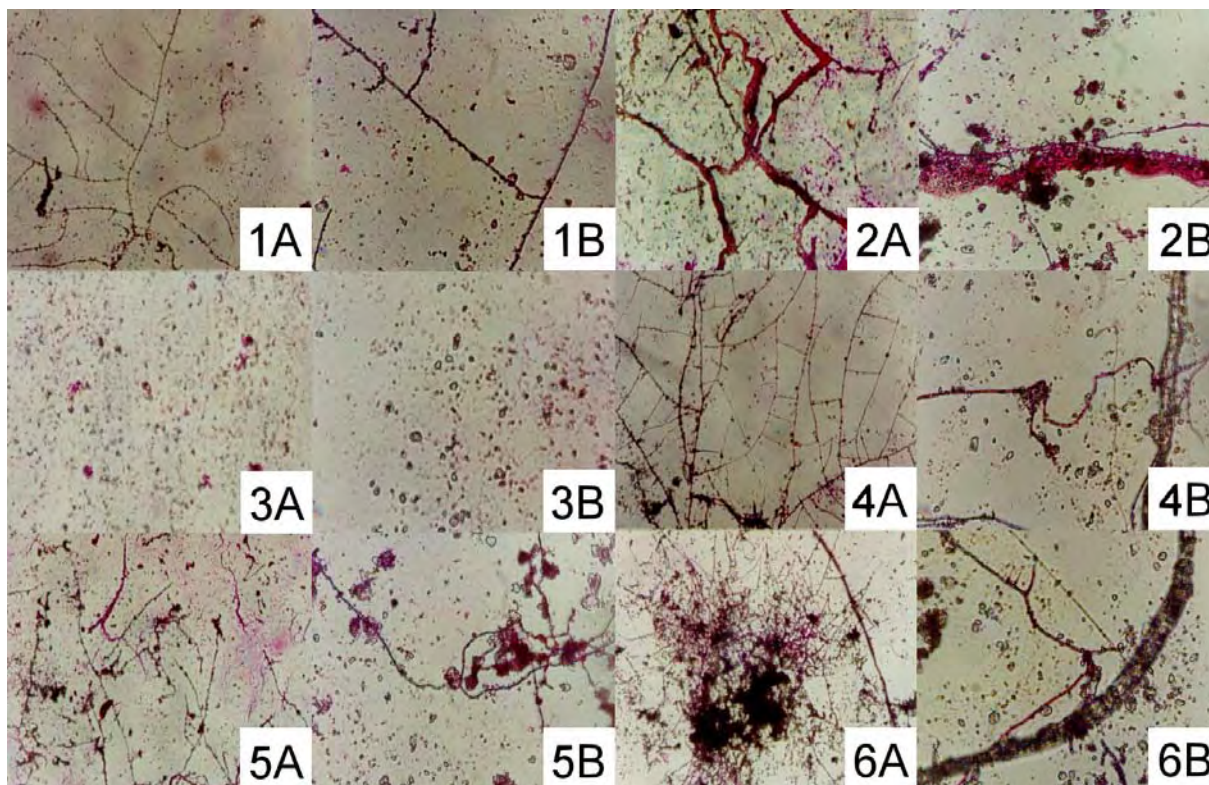


Figura 4.8: Resultados observados nos testes com lâmina enterrada. A e B são, respectivamente, aumentos de 100x e 400x. 1) Solo Controle; 2) Solo + Lodo; 3) Solo + Gasolina; 4) Solo + Gasolina + Lodo; 5) Solo + Diesel; 6) Solo + Diesel + Lodo

Nos solos contendo gasolina há uma grande queda inicial do número de fungos (Figura 4.9). Após uma estabilização inicial (16º dia) há um aumento no número de fungos nos tratamentos contendo lodo, sendo que este ultrapassa a quantidade dos microrganismos do solo controle tanto nos tratamentos com gasolina + lodo como nos com gasolina + lodo + NPK. Quando comparamos estes tratamentos ao solo com lodo, observamos um efeito deletério nos fungos efetivado pela gasolina. Entretanto, as condições finais do solo parecem ser boas quando comparamos ao solo controle, mostrando que a aplicação de um meio orgânico beneficiaria o solo em um derrame de gasolina no que diz respeito aos fungos. No caso dos tratamentos com solo e gasolina, e nos casos com bioestimulação com NPK, há a mesma queda no número de fungos inicialmente (como nos casos com lodo e gasolina com e sem NPK), porém necessitando de um maior tempo para a aclimatação da população fúngica. O número de fungos voltou praticamente ao normal (semelhante ao controle) aos 120 dias de tratamento no caso com bioestimulação e fica um pouco inferior ao controle no caso da “atenuação natural”.

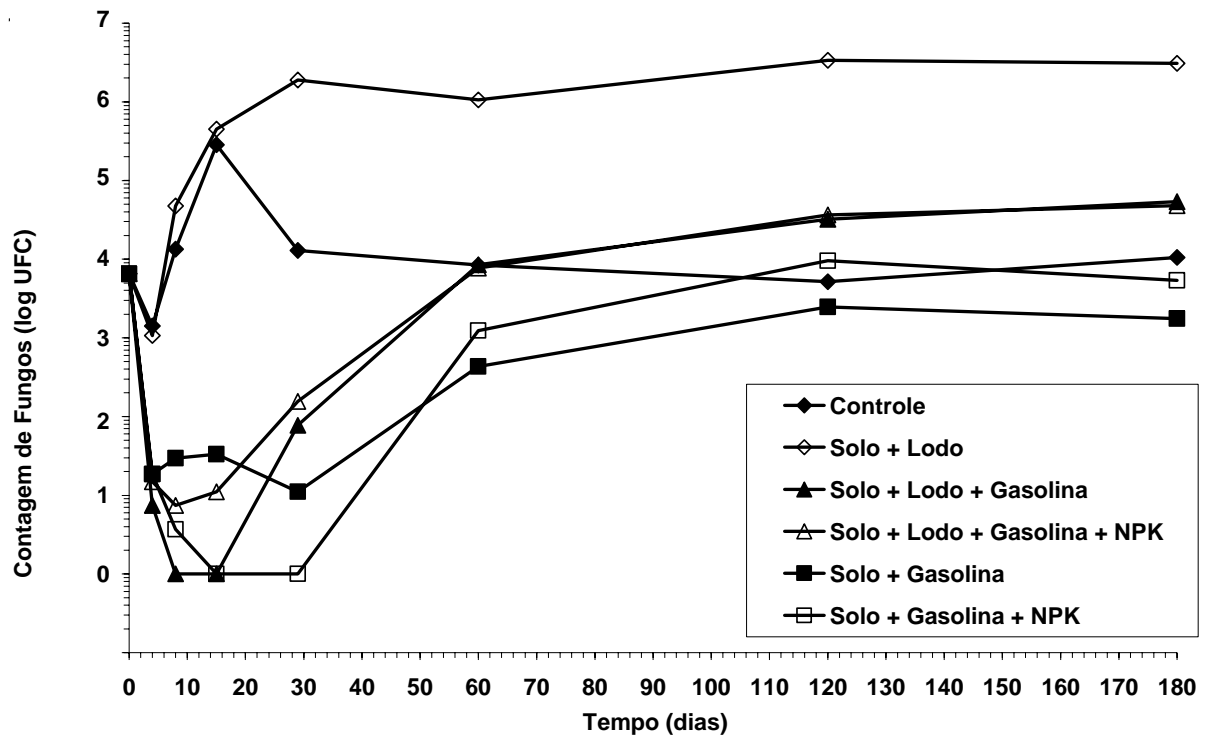


Figura 4.9: Contagem de fungos ao longo do período de observação

A Figura 4.10 apresenta a contagem de bactérias ao longo do período de 180 dias. Observa-se um rápido crescimento de bactérias no solo controle e no tratamento com lodo já ao início do período dos ensaios, atingindo valores praticamente constantes. Nos solos com gasolina há uma queda no número de bactérias em relação à contagem inicial que se recupera entre 4 e 16 dias dependendo do tratamento. O tratamento com gasolina e NPK apresenta uma estabilização desde o início do tratamento, com um processo de biorremediação mais intenso, eliminando os BTEX mais rapidamente (como veremos adiante no item de cromatografia) e, conseqüentemente, mantendo a concentração de bactérias. O tratamento apenas com gasolina mostra uma queda na contagem de bactérias que perdura por até 10 dias e, então, inicia sua recuperação. Maiores quantidades de matéria orgânica retêm os BTEX por um maior período de tempo, apesar deste tempo não ser muito significativo (em torno de 6 dias, ver item de cromatografia), justificando a maior queda no número de bactérias no início do tratamento, porém com melhor recuperação a posteriori pelos mesmos motivos.

A avaliação de bactérias degradadoras de gasolina, analisada pelo número mais provável, não mostrou qualquer quantidade de microrganismos crescendo nos meios de cultura. Conforme Frankenberger (1992), qualquer solo sem histórico de contaminação apresenta uma relação de microrganismos degradadores específicos / totais menor que 3%, confirmando os achados.

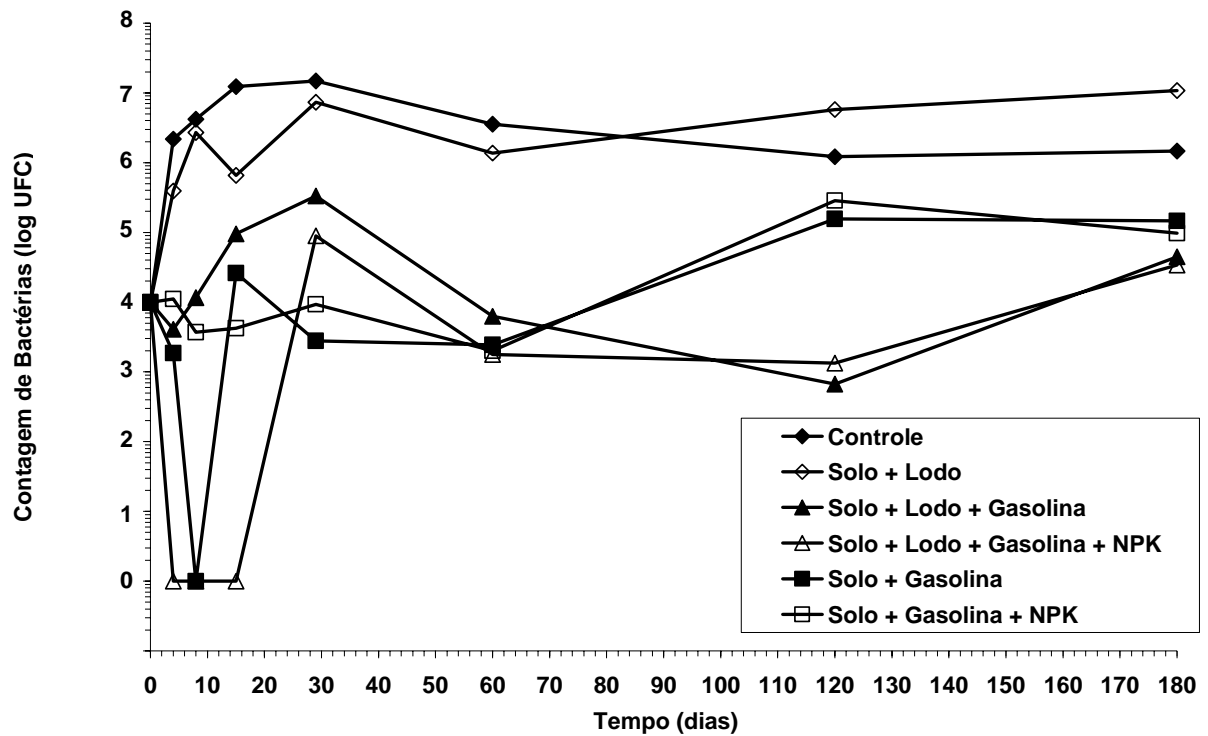


Figura 4.10: Contagem de bactérias ao longo do período de observação

4.1.4 Identificação de Microrganismos

Durante o período de ensaios foram realizados testes complementares visando a identificação dos microrganismos do solo. As bactérias não identificadas por testes bioquímicos comercialmente utilizados em análises clínicas foram genericamente classificadas por Gram e morfologia. Os resultados da identificação dos microrganismos são apresentados na Tabela 4.2. A *Pseudomonas sp.* foi encontrada em todas as amostras de solo tratado, sendo observada inicialmente no solo natural (controle). O *Aspergillus sp.*, espécie natural do solo, não foi encontrado de maneira significativa nas amostras de solo coletadas após a introdução dos contaminantes ou mesmo estimulantes. Na análise do lodo, foi possível a observação de um rico consórcio de microrganismos, uma vez que este contém muita matéria orgânica, além de *Penicillium sp.* e diversos tipos de bacilos gram-positivos. A gasolina proveniente da REFAP continha *Pseudomonas sp.* Combinações de gasolina e diesel com solo, especialmente na “atenuação natural”, aparentemente eliminaram alguns microrganismos, principalmente nos primeiros dias e, especialmente, os fungos, talvez devido a fatores limitantes e competição. A

observação não é aplicável quando consideramos a bioestimulação e a “bioaugmentação”. Deve-se ressaltar que os kits utilizados não contemplam microrganismos de solos.

Tabela 4.2: Microrganismos encontrados no lodo puro e no solo sob diferentes tratamentos ao final dos ensaios

Solo Controle	<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i>
Solo + Lodo	<i>Pseudomonas sp.</i> , Bacilos Gram+ , <i>Penicillium sp.</i>
Solo + Gasolina	<i>Pseudomonas sp.</i> , Bacilos Gram+
Solo + Gasolina + Lodo	<i>Pseudomonas sp.</i> , Bacilos Gram+ , <i>Penicillium sp.</i>
Solo + Gasolina + Lodo + NPK	<i>Pseudomonas sp.</i> , Bacilos Gram+, <i>Penicillium sp.</i>
Solo + Gasolina + NPK	<i>Pseudomonas sp.</i> , Bacilos Gram+, <i>Penicillium sp.</i>
Solo + Diesel	<i>Pseudomonas sp.</i> , Bacilos Gram+ <i>Penicillium sp.</i>
Solo + Diesel + Lodo	<i>Pseudomonas sp.</i> , Bacilos Gram+, <i>Penicillium sp.</i>
Lodo “in natura”	Bacilos Gram+ , <i>Penicillium sp.</i>

4.1.5 Condutividade Elétrica e pH do Solo

Inicialmente, nos testes piloto, não foi considerada a condutividade elétrica do solo, passando a ser avaliada somente nos ensaios com gasolina sem álcool. Serão analisados primeiro os testes piloto, que envolveram a gasolina e o diesel de um posto de combustíveis.

O pH do solo, como fator limitante aos microrganismos, é um importante parâmetro a ser monitorado. Apesar do fato de muitas espécies poderem sobreviver em pHs extremos, a maioria dos microrganismos requer um ambiente neutro. O solo “in natura” e o lodo utilizados apresentam pHs médios de 4.5 e 5.0, respectivamente. Matematicamente pode ser observada significância estatística em alguns testes ($P < 0,05$). Entretanto, por estas variações serem extremamente pequenas entre os grupos quando se trata de pH (ΔpH com aproximadamente 0,4), e por haver alguma oscilação em suas medidas da mesma ordem de grandeza, considerou-se que a adição dos contaminantes ao solo não produziu variação significativa de pH para fins práticos, com valores em 65 e 95 dias de tratamento na faixa de 4.5 a 5.0 sem qualquer tendência específica de aumento ou diminuição com o tempo (Figura 4.11). Aparentemente a capacidade de cargas do solo e das misturas contendo lodo mantiveram o pH durante o período dos experimentos. Snyder et al. (1976), citado por Frankenberger (1992), considerou que sob biodegradação de óleos, muito pouca variação de pH no solo ocorre com o tempo. A análise do pH a princípio, baseada nos testes piloto e nos tempos de medição efetuados, não traz qualquer informação fundamental para este estudo exeto por mostrar que a biorremediação de solos pode ser efetiva até mesmo em ambientes ácidos. Frankenberger (1992) relata que a variação de pH ideal para promover a biodegradação de solos está na faixa do neutro para levemente alcalino. A maioria dos seus estudos indicam que o pH de 7 a 8 é o ideal para a degradação de hidrocarbonetos. Entretanto, neste trabalho, o pH do solo não foi corrigido durante os testes de laboratório, uma vez que se esperava avaliar o pH no seu estado natural.

A análise do pH na segunda etapa dos ensaios, medida nos tempos 9, 44, 114 e 180 dias, mostra que há uma tendência de queda ao final do período – acidificação (Figura 4.12) – para praticamente todos os tratamentos. E este é um fato novo, uma vez que os ensaios anteriores mostravam que não havia tendências de aumento ou queda. Entretanto, se analisarmos mais cuidadosamente os resultados, veremos que as medidas de pH colhidas anteriormente (65 e 95 dias) estão sobrepostas às curvas da Figura 4.12. A acidificação do solo controle e dos tratamentos com gasolina com e sem NPK parece iniciar em torno do 100º dia de tratamento. É interessante observar que estes tratamentos apresentam um pH bastante próximo, com variação de pH em torno de 0,1 ao final do tratamento (180 dias). Estatisticamente, os tratamentos com lodo e gasolina com e sem NPK são os únicos que não apresentam diferença estatística significativa ($P > 0,05$) até os 180 dias. Entre 44 e 180 dias todos os demais

tratamentos apresentam diferença significativa, apesar de na prática isso significar uma variação de pH de 0,3, dentro da faixa de oscilação do equipamento. Ao final do tratamento, não há diferença significativa entre o solo controle e os tratamentos com gasolina com e sem NPK ($P>0,05$), assim como entre os com lodo e gasolina com e sem NPK ($P>0,05$). A variação de todos estes parâmetros é pequena e ocorre numa faixa menor que 1,0.

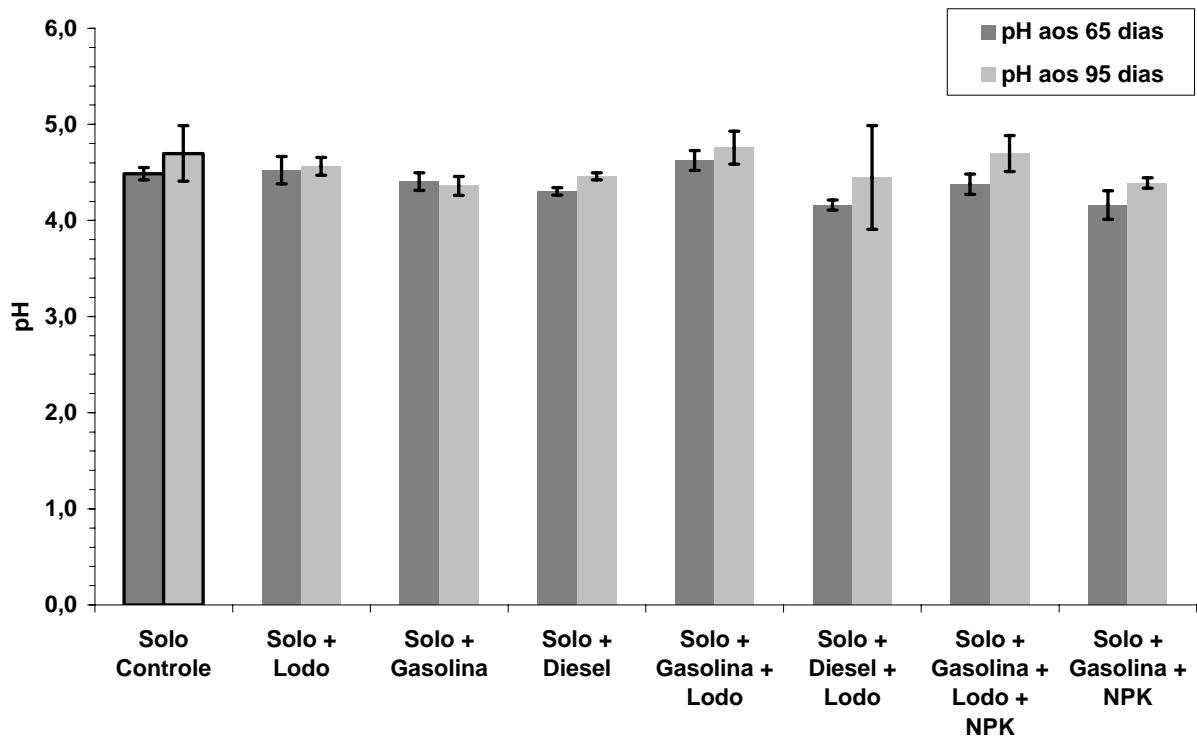


Figura 4.11: Medidas de pH do solo aos 65 e 95 dias nos ensaios preliminares com gasolina e óleo diesel provenientes de um posto de combustível

Nos ensaios realizados com a gasolina da REFAP procurou-se monitorar também a condutividade elétrica do solo e suas variações durante o processo de biorremediação. A contaminação por gasolina pura tende a manter estável a condutividade elétrica do solo ao longo do período de biorremediação, e diminui com a adição de NPK (que possui maior condutividade inicialmente), como se observa na Figura 4.13. No solo controle, ao contrário, observa-se uma tendência natural de aumento da condutividade, em uma relação inversamente proporcional ao pH, visto anteriormente. De forma geral, observa-se uma faixa de oscilação de condutividade elétrica entre 20 e 40 μ S na qual faz parte o solo natural e o solo contaminado por gasolina com e sem NPK em diferentes etapas de biorremediação. Estatisticamente, não há qualquer diferença significativa entre o grupo controle e os tratamentos com gasolina com e sem NPK para qualquer que seja o tempo de medição

($P>0,05$). Este dado é importante, uma vez que se busca estudar solos contaminados através de investigações de campo com o cone ambiental, no qual um dos parâmetros analisados é a condutividade elétrica (Schnaid, 2000). Neste caso específico, e somente através deste parâmetro, esta análise seria inviável.

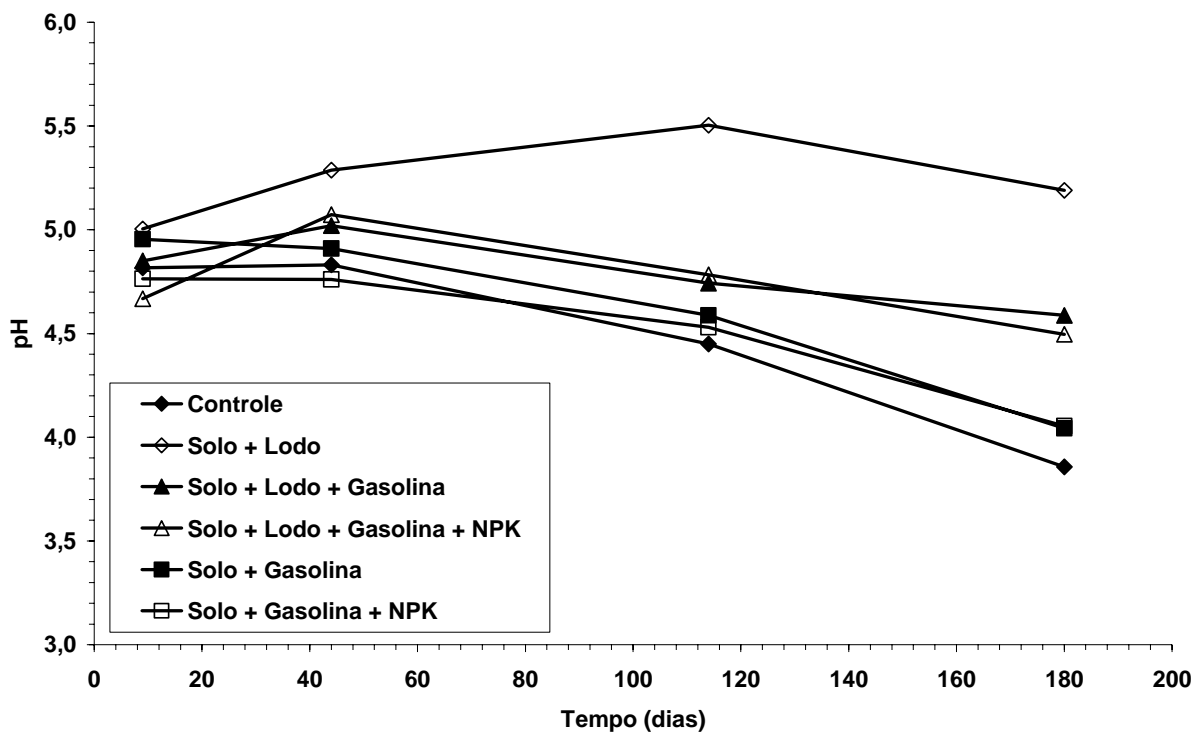


Figura 4.12: Medidas do pH do solo nos ensaios com gasolina sem álcool

No caso dos tratamentos com lodo, observa-se também uma tendência de aumento de condutividade elétrica com o tempo, idem ao solo controle. Fato semelhante ocorre também com o solo com lodo e gasolina. Quando consideramos o solo com lodo, gasolina e NPK vemos que há uma relação inversa, ou seja, o NPK parece causar uma redução da condutividade elétrica ao longo do tempo neste tratamento, principalmente nos primeiros 44 dias, mantendo-se então praticamente constante. Estatisticamente, não há qualquer diferença significativa entre os tratamentos com lodo e gasolina com e sem NPK para qualquer que seja o tempo de medição ($P>0,05$). Da mesma forma, o solo com lodo só apresenta diferença significativa ($P<0,001$) no tempo 114 para os tratamentos com gasolina com e sem NPK.

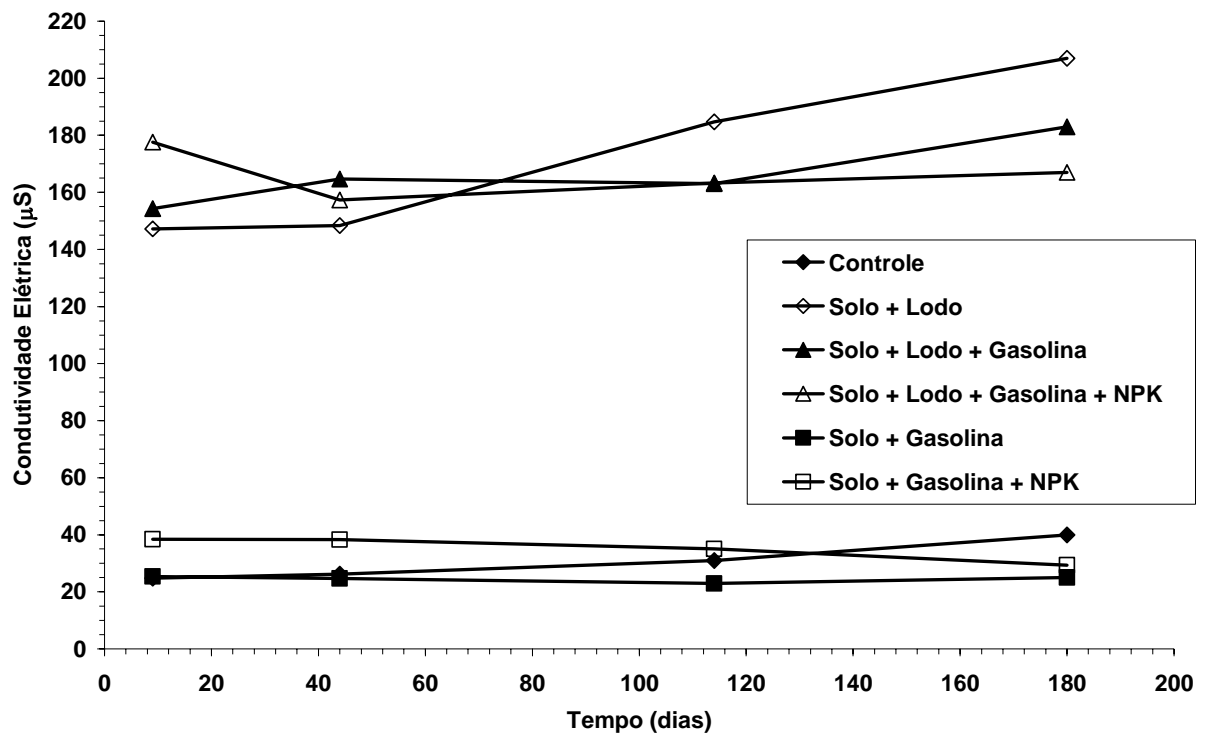


Figura 4.13: Medidas da condutividade elétrica nos ensaios com gasolina sem álcool

4.1.6 Nitrogênio Mineral do Solo

O nitrogênio mineral do solo é um fator importante que permite uma avaliação complementar da atividade microbiana. O ensaio de nitrogênio inorgânico foi realizado aos 170 dias de experimento com gasolina e diesel de postos de combustíveis e em dois momentos, aos 65 e 170 dias, para os testes com gasolina da REFAP. Nos ensaios com gasolina e diesel oriundos do posto de combustível, as maiores taxas na forma de amônia ocorreram principalmente nos tratamentos com a adição de nutrientes (lodo e NPK) com diferenças significativas quando comparados às amostras controle ($P < 0,05$), como ilustrado na Figura 4.14. E esta é uma indicação de que a disponibilidade de nutrientes nestes tratamentos melhoram as condições da atividade microbiana, podendo tornar mais eficaz os processos de biorremediação.

Nos ensaios com a gasolina da REFAP, agora mensurados em 65 e 170 dias (Figura 4.15), observa-se basicamente o mesmo anteriormente avaliado, ou seja, as condições onde se utilizou compostos orgânicos apresentam melhores condições de amônia ao final dos 170 dias de tratamento ($P < 0,05$), apesar de neste caso – gasolina da REFAP – o NPK não modificar a

condição final do nitrogênio mineral. A novidade desta análise está na avaliação do nitrogênio mineral aos 65 dias de tratamento, não realizada nos ensaios piloto. O lodo puro apresenta as melhores condições de nitrogênio mineral, principalmente com relação à amônia. É um material rico em nutrientes, além de ter intensa atividade microbiana e não apresentar níveis de contaminação. Quando adicionamos este a uma condição de vazamento de gasolinas, observamos que os microrganismos necessitam muito da amônia nos primeiros momentos do processo de biorremediação, não havendo então amônia em abundância como no lodo puro, porém não havendo diferenças significativas para o solo controle ($P < 0,05$).

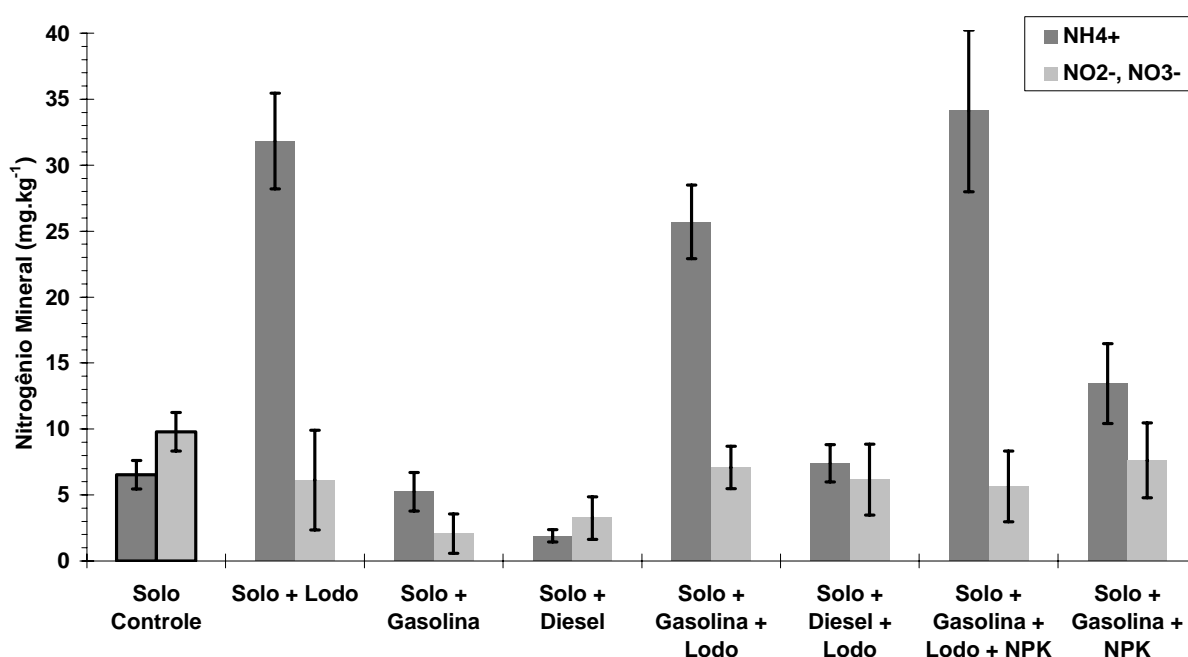


Figura 4.14: nitrogênio mineral do solo nos tratamentos com a gasolina de posto de combustível (170 dias)

4.1.7 Cromatografia Gasosa

Nos testes piloto, com ensaios envolvendo gasolina com álcool, a cromatografia gasosa foi aplicada a todos os tratamentos, incluindo o solo controle, somente aos 170 dias após feitas as misturas, para confirmar a ausência de benzeno, tolueno, MTBE, C₈ e C_{9+total} aromáticos de todas as amostras de solo. A cromatografia obtida de todas as amostras de solo ao final dos 170 dias de tratamento não mostrou qualquer sinal de contaminação (todos os contaminantes em concentração menor que 3 mg/kg).

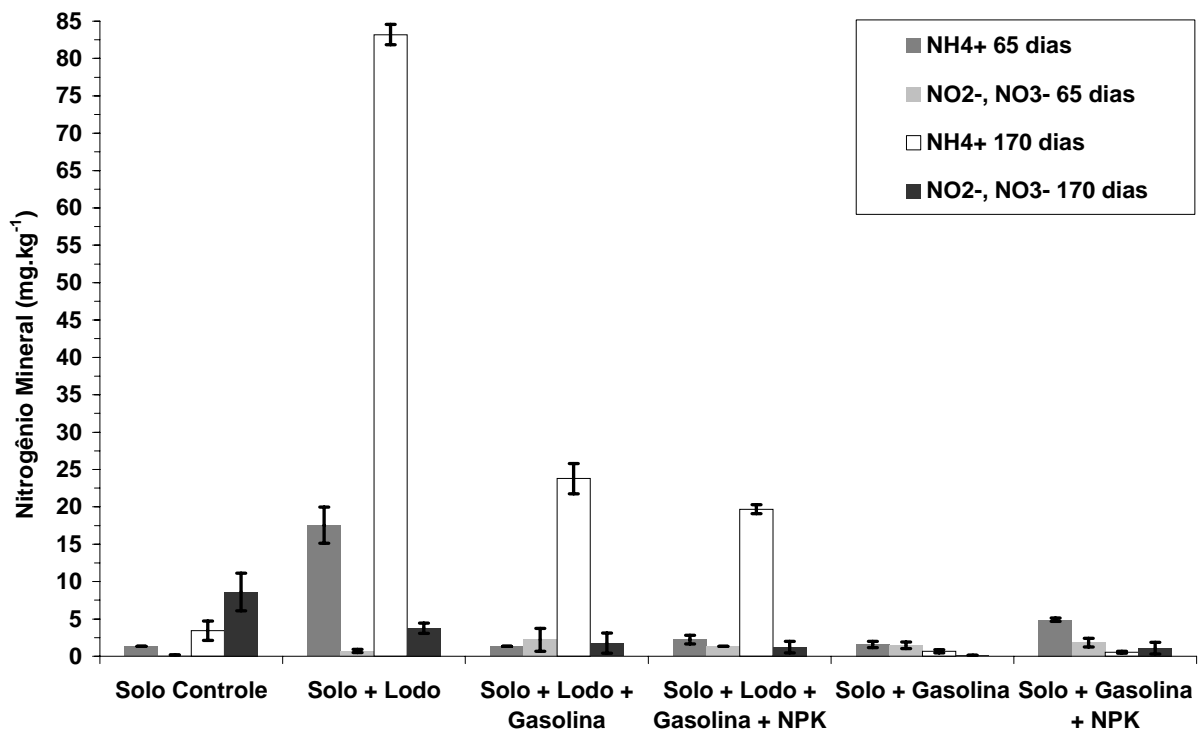


Figura 4.15: nitrogênio mineral do solo nos tratamentos com a gasolina da REFAP aos 65 e 170 dias

A seguir, para a segunda etapa com a gasolina sem álcool, foi feita uma análise preliminar com cromatografia gasosa em microcosmos estéreis e não-estéreis nos tempos zero, 12 e 26 dias para fins de verificação dos efeitos da microbiota nos compostos voláteis. Os testes foram realizados apenas nos tratamentos com gasolina com e sem o NPK. De forma geral, os dados obtidos mostram um significativo efeito da microbiota ($P < 0,05$) na biorremediação dos hidrocarbonetos analisados. O solo controle, não apresentado nas figuras, não contém qualquer nível de contaminação, observando-se os compostos analisados. As Figuras 4.16 e 4.17 apresentam as diferenças de comportamento ocorridas nos tratamentos do benzeno e tolueno durante um período de 26 dias. Apesar da volatilização destes compostos ser intensa, observa-se uma importante contribuição da microbiota, quando vemos que nos solos contendo os microrganismos já não há mais estes hidrocarbonetos no tempo de aproximadamente 24h do início dos experimentos. As medições não foram realizadas exatamente no tempo zero, pois as misturas foram efetuadas ao redor do meio-dia e transportadas à Copesul, sendo processadas na manhã do dia seguinte. Entretanto, quando consideramos o solo esterilizado, ainda há uma quantia razoável no solo com bioestimulante e maior ainda na condição de “atenuação natural”. Aos 12 dias de ensaio, só há benzeno no tratamento sem bioestimulação e, no caso do tolueno, houve uma redução significativa na condição com NPK, sendo que

praticamente não houve redução no tratamento com “atenuação natural”. Os solos foram inicialmente preparados em condições estéreis, e o fato do bioestimulante ter efeito nos tratamentos esterilizados provavelmente ocorra por haver algum grau de contaminação do solo por microrganismos na abertura dos potes, no início das medições, ou, ainda, por reação química dos compostos, acelerando a saída dos voláteis.

A análise da Figura 4.18 mostra o mesmo padrão observado anteriormente para o benzeno e o tolueno, com efeito importante da microbiota e com degradação / volatilização bem mais intensa. No tempo zero, praticamente só o solo esterilizado na condição com gasolina pura apresenta o contaminante MTBE. Aos doze dias, não encontramos mais este contaminante no solo.

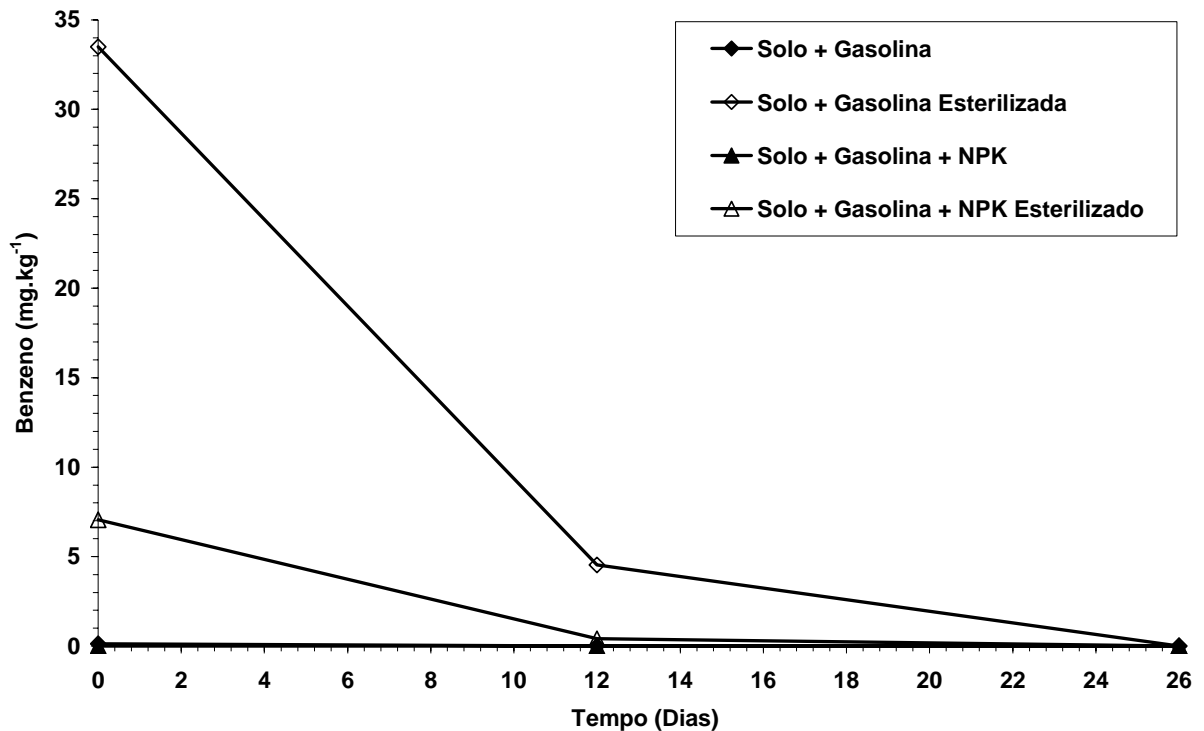


Figura 4.16: Curvas comparativas entre o solo com gasolina e com um bioestimulante (NPK) em relação à esterilização do solo e efeitos da microbiologia para o Benzeno

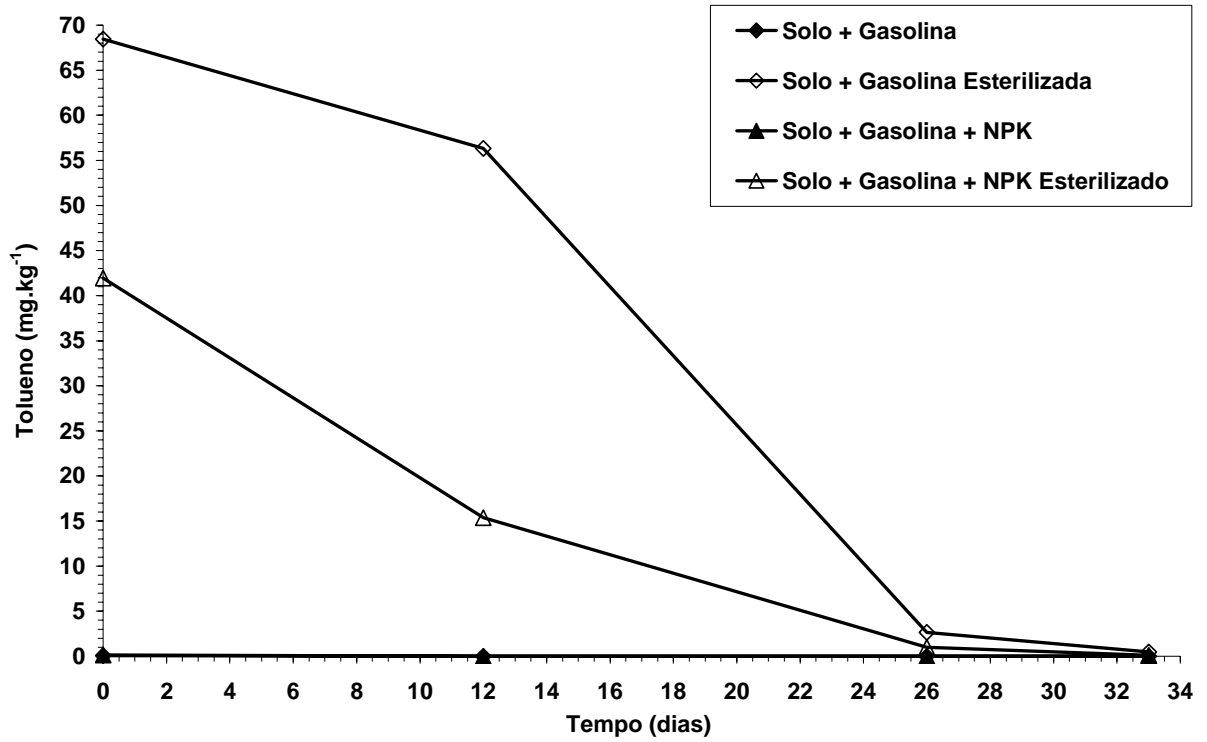


Figura 4.17: Curvas comparativas entre o solo com gasolina e com um bioestimulante (NPK) em relação à esterilização do solo e efeitos da microbiologia para o Tolueno

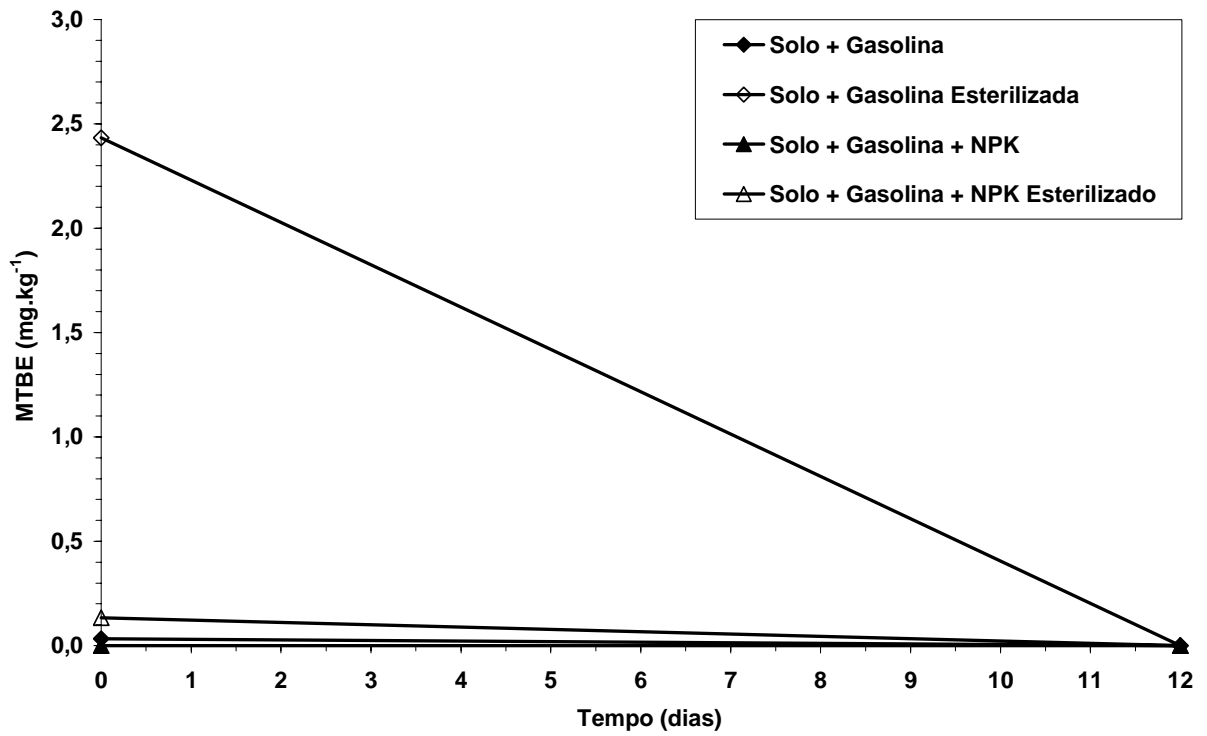


Figura 4.18: Curvas comparativas entre o solo com gasolina e com um bioestimulante (NPK) em relação à esterilização do solo e efeitos da microbiologia para o MTBE

A Figura 4.19 ilustra o comportamento do C_8 aromático do solo. Idem ao estudo feito anteriormente para o benzeno e o tolueno, a microbiota ajuda a remover rapidamente este hidrocarboneto já nas primeiras 24h. O fato novo desta figura consiste em haver um incremento de C_8 aromáticos aos 12 dias de tratamento, provavelmente pelo desdobramento de outros hidrocarbonetos em C_8 aromáticos ou muito similares nas curvas cromatográficas durante sua degradação.

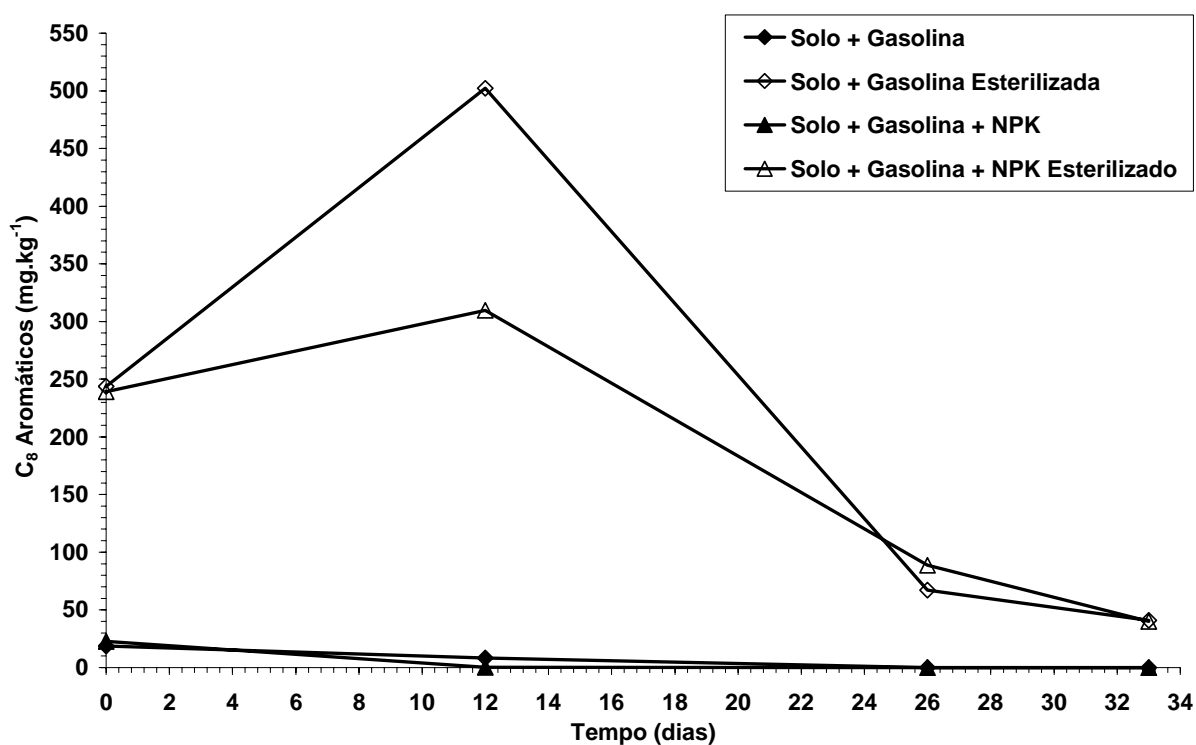


Figura 4.19: Curvas comparativas entre o solo com gasolina e com um bioestimulante (NPK) em relação à esterilização do solo e efeitos da microbiologia para o C_8 aromático

A Figura 4.20 ilustra o comportamento do C_{9+} aromático do solo. Ao contrário dos outros componentes da gasolina, as frações C_{9+} são mais difíceis de serem degradadas levando maior período de tempo para removidas dos solos. Similar a análise feita para os C_8 aromáticos, há também um incremento de C_{9+} aromáticos aos 12 dias de tratamento provavelmente pelo desdobramento de outros hidrocarbonetos em C_{9+} aromáticos ou muito similares nas curvas cromatográficas durante sua degradação. A bioestimulação novamente pode ser considerada nos tratamentos esterilizados por contaminação das amostras durante procedimentos de abertura dos frascos. Diferentemente das demais análises, os C_{9+} aromáticos ainda perduraram no solo após 26 dias.

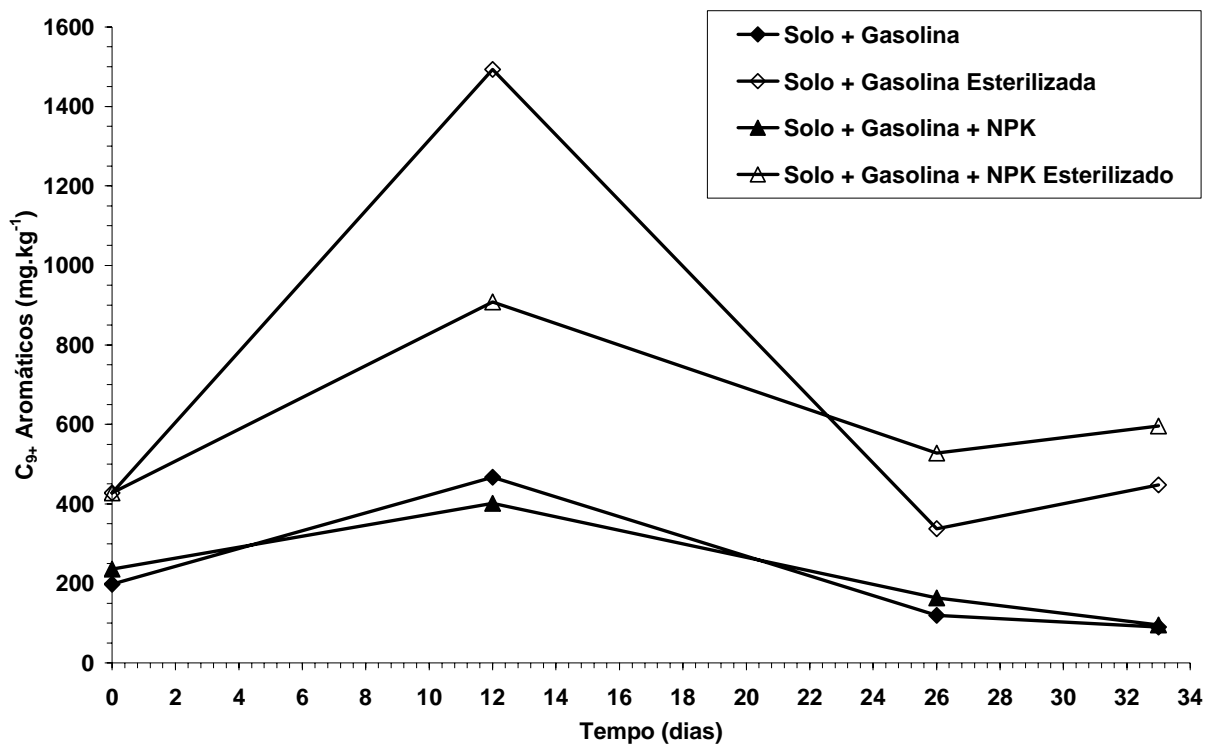


Figura 4.20: Curvas comparativas entre o solo com gasolina e com um bioestimulante (NPK) em relação à esterilização do solo e efeitos da microbiologia para o C₉₊ aromáticos

Nas Figuras 4.21 e 4.22 são ilustradas a biorremediação do benzeno e tolueno de todos os tratamentos realizados nesta pesquisa. Nesta etapa, o solo não foi esterilizado, de forma a simular uma situação mais próxima à encontrada na natureza e os tempos de medição foram zero, 14, 22, 36 e 70 dias. A linha de base é o limite inferior de contaminação de 3mg/kg de solo. A consideração mais importante a ser feita é o fato de o lodo industrial, importante fonte de matéria orgânica, reter os hidrocarbonetos em sua matriz por um período maior de tempo. A redução aos mesmos níveis encontrados para os demais tratamentos leva em torno de 6 dias a mais para ocorrer, ficando ainda uma parcela residual até o 35º dia.

A Figura 4.23 apresenta as alterações na biorremediação do MTBE em relação ao tempo. Observamos que o tratamento com bioestimulação é eficiente na remoção do contaminante do solo, quando comparado com a “atenuação natural” já ao início do tratamento. Praticamente não há mais contaminação nas primeiras 24h de tratamento. Entretanto, o lodo, material rico em matéria orgânica, mantém o contaminante por um período maior de tempo em sua matriz, aparentemente por 25 dias. E este é um fator relevante na decisão da descontaminação, uma vez que o solo fica com mais nutrientes e microrganismos ao final do tratamento, mas às custas de uma retenção por maior período de tempo do contaminante.

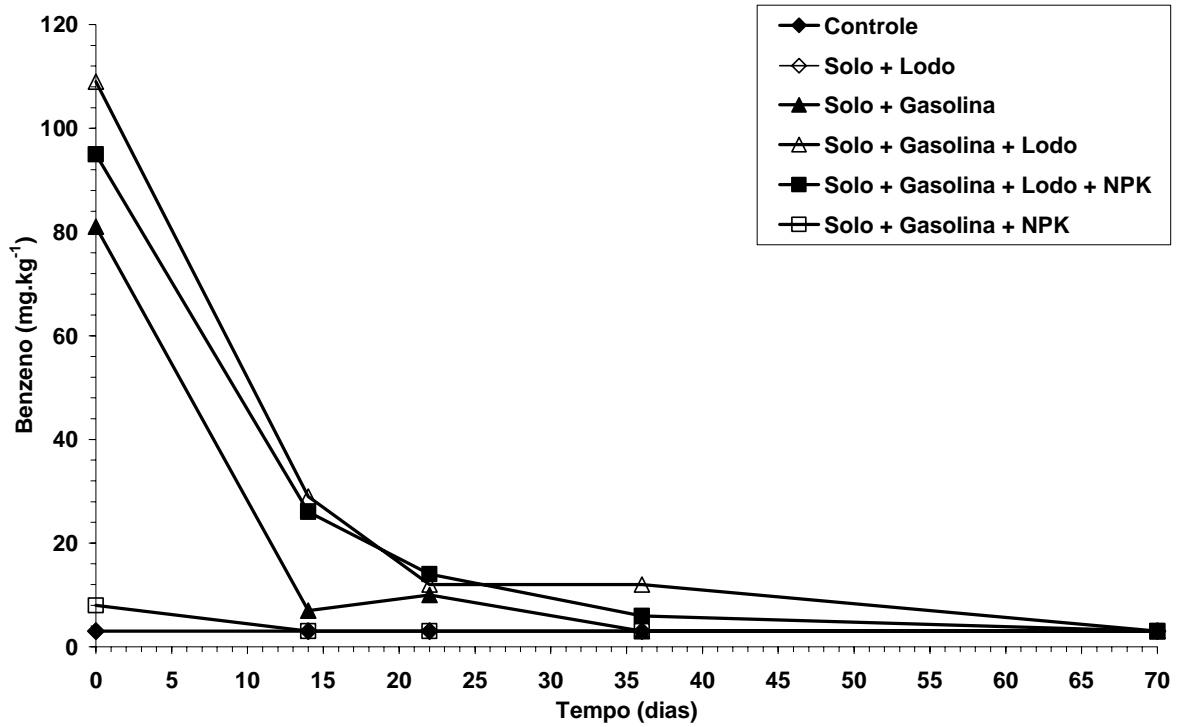


Figura 4.21: Curvas comparativas dos ensaios de biorremediação em relação ao Benzeno

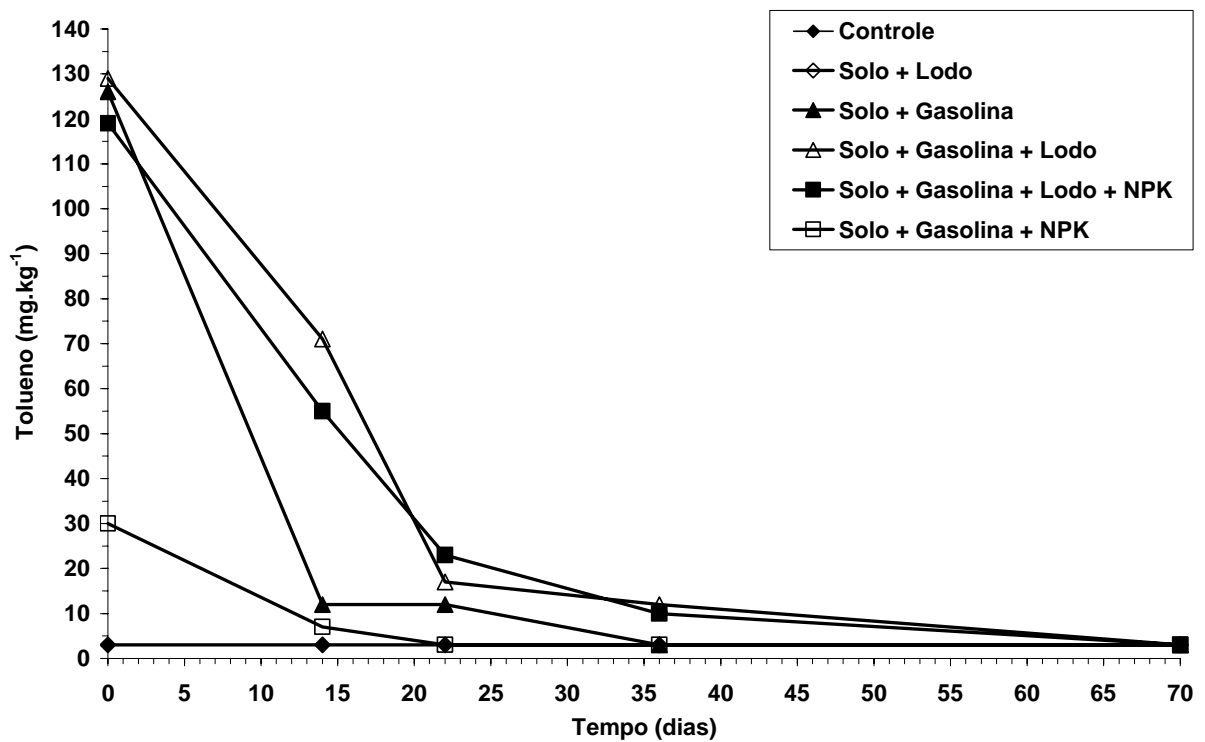


Figura 4.22: Curvas comparativas dos ensaios de biorremediação em relação ao Tolueno

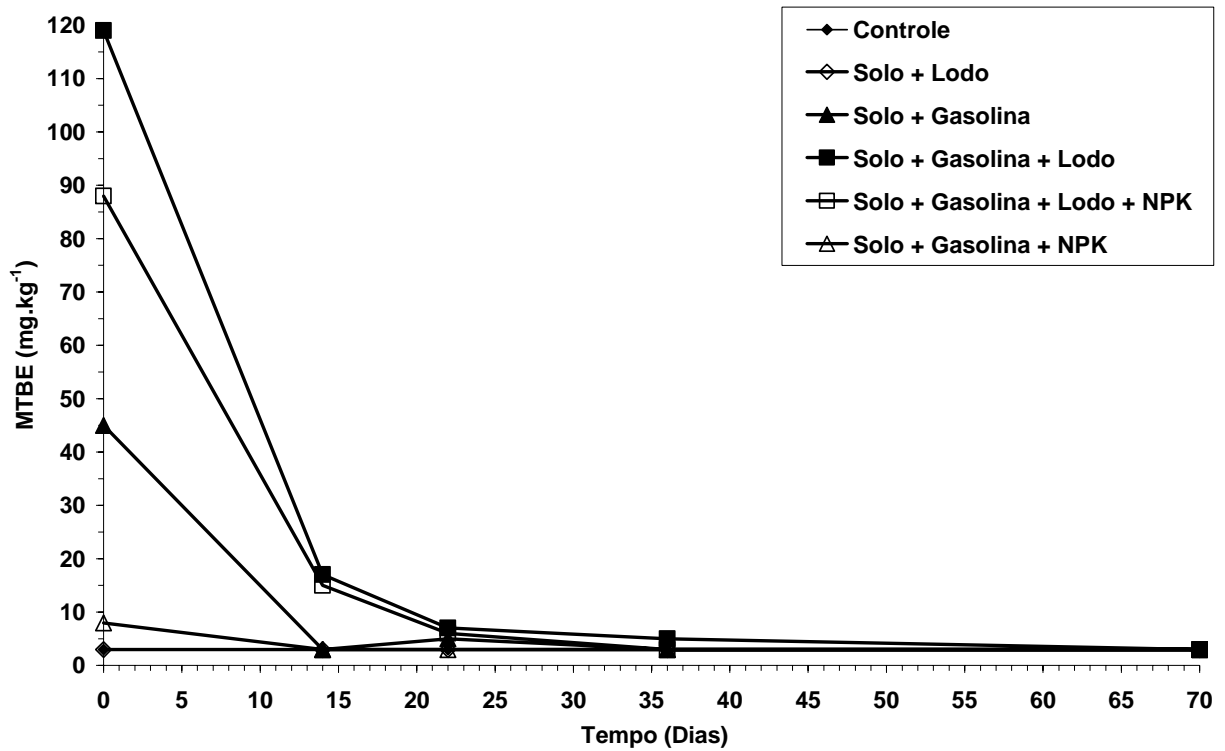


Figura 4.23: Curvas comparativas dos ensaios de biorremediação em relação ao MTBE

A Figura 4.24 mostra as curvas obtidas da biorremediação de C_8 aromáticos. Novamente se observa o maior tempo de remoção de hidrocarbonetos de solos tratados com o lodo industrial e a maior dificuldade de remoção de hidrocarbonetos aromáticos, em especial os com cadeias maiores (Figura 4.25). Até o período de 70 dias foi possível praticamente a completa remoção dos hidrocarbonetos C_8 aromáticos e em quase todos os tratamentos no caso de C_{9+} aromáticos, enquanto que nos compostos contendo lodo ainda havia consideráveis quantidades deste último.

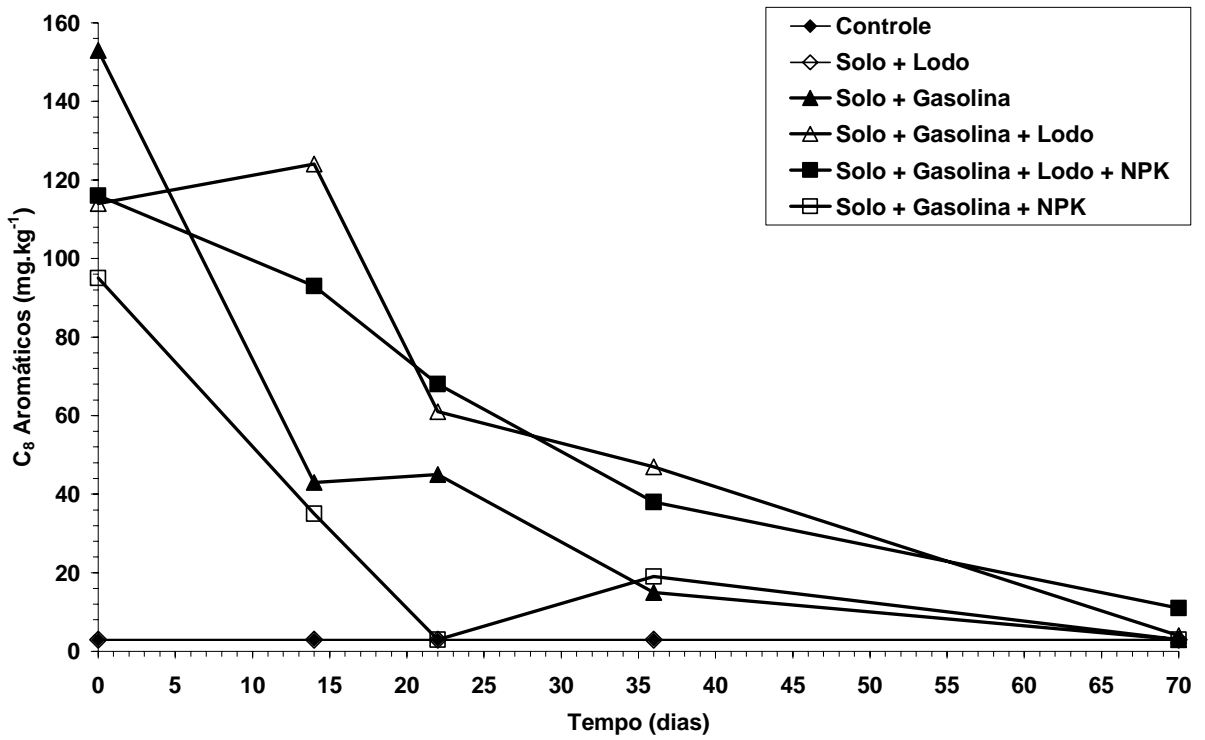


Figura 4.24: Curvas comparativas dos ensaios de biorremediação em relação ao C₈ aromático

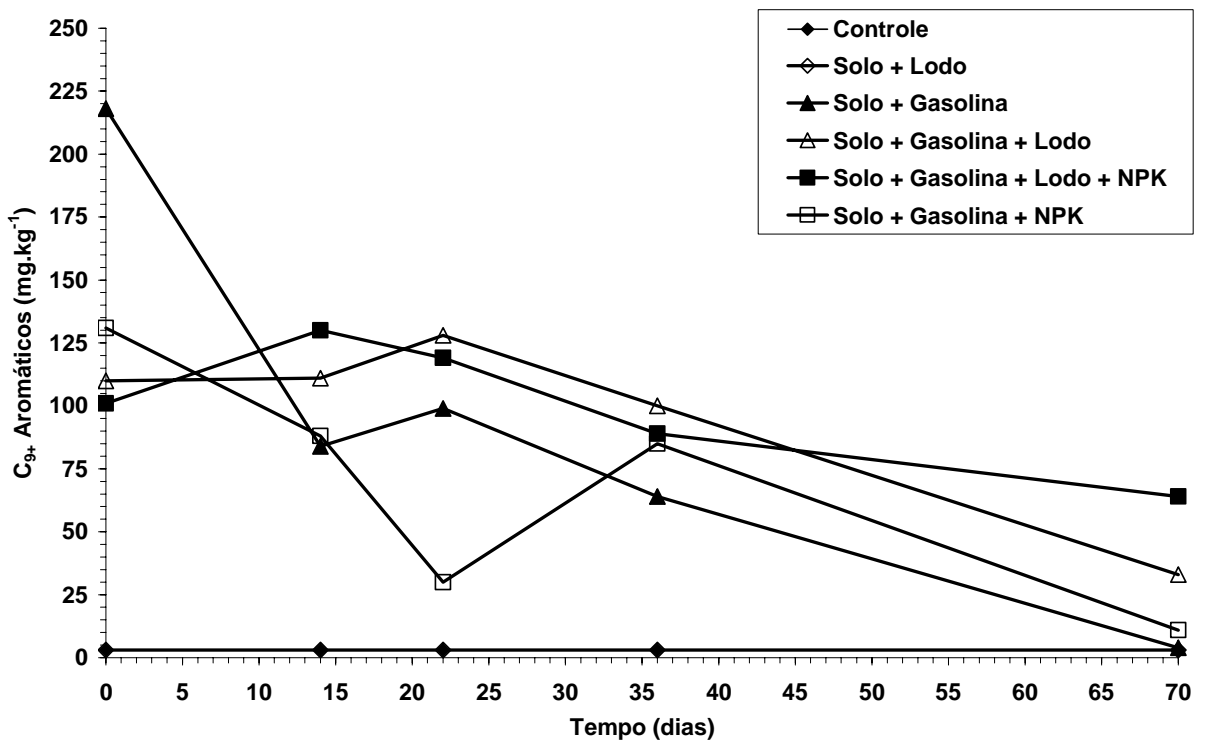


Figura 4.25: Curvas comparativas dos ensaios de biorremediação em relação aos C₉₊ aromáticos

4.1.8 Parâmetros de Contaminação do Solo

Como já foi discutido anteriormente, existem diversas dificuldades para se identificar contaminações e seus parâmetros. Então, realizou-se um estudo complementar, independente dos tratamentos estudados até o momento, buscando-se alguns parâmetros que pudessem identificar a presença dos contaminantes e suas concentrações, no caso o pH e a condutividade elétrica. Foram realizados ensaios com solo e água contaminados com várias concentrações de gasolina com álcool, conforme descrito no Capítulo 3.

A variação do pH é apresentada na Figura 4.26 para o arenito com diversas doses de contaminantes, neste caso utilizando gasolina e diesel de postos de combustível. Todos os dados foram comparados com o solo controle, lembrando que estes parâmetros são analisados para a condição saturada. Para o caso da gasolina, observa-se que o pH aumenta com o incremento do contaminante, atingindo um patamar aos 6mL/20mL água em 4,9.

Estatisticamente é observado diferenças entre os níveis de contaminação, podendo-se dividir em grupos de 1 a 2, 3 a 5 e 6 a 10 mL gasolina/20mL água destilada. Entretanto, para fins práticos, novamente temos diferenças de valores muito pequenas, na ordem de 0,3 entre os tratamentos e 0,6 para o controle.

No caso do diesel não há qualquer variação quando se aumenta ou diminui a quantidade do contaminante. Entretanto, há um aumento no pH quando comparamos os grupos contaminados com o solo controle, também muito pequeno para ser utilizado com finalidade prática, na ordem de 0,1.

Para que se pudesse analisar o efeito do solo no pH para as diferentes cargas de contaminação, foram realizados ensaios similares, porém apenas com água destilada e o contaminante (Figuras 4.27). Diversas medidas foram feitas da água, do diesel e da gasolina “in natura”.

Comparando-se as Figuras 4.26 e 4.27, observamos que o solo é o principal responsável pela variação do pH em presença de gasolina. Íons de hidrogênio são introduzidos na solução pelo solo, que por sua vez parece ionizar a solução de água e gasolina com o incremento do contaminante, aumentando o pH. No caso da contaminação por diesel, não há qualquer

interação aparentemente significativa entre o solo e a solução água/diesel quando analisamos o pH.

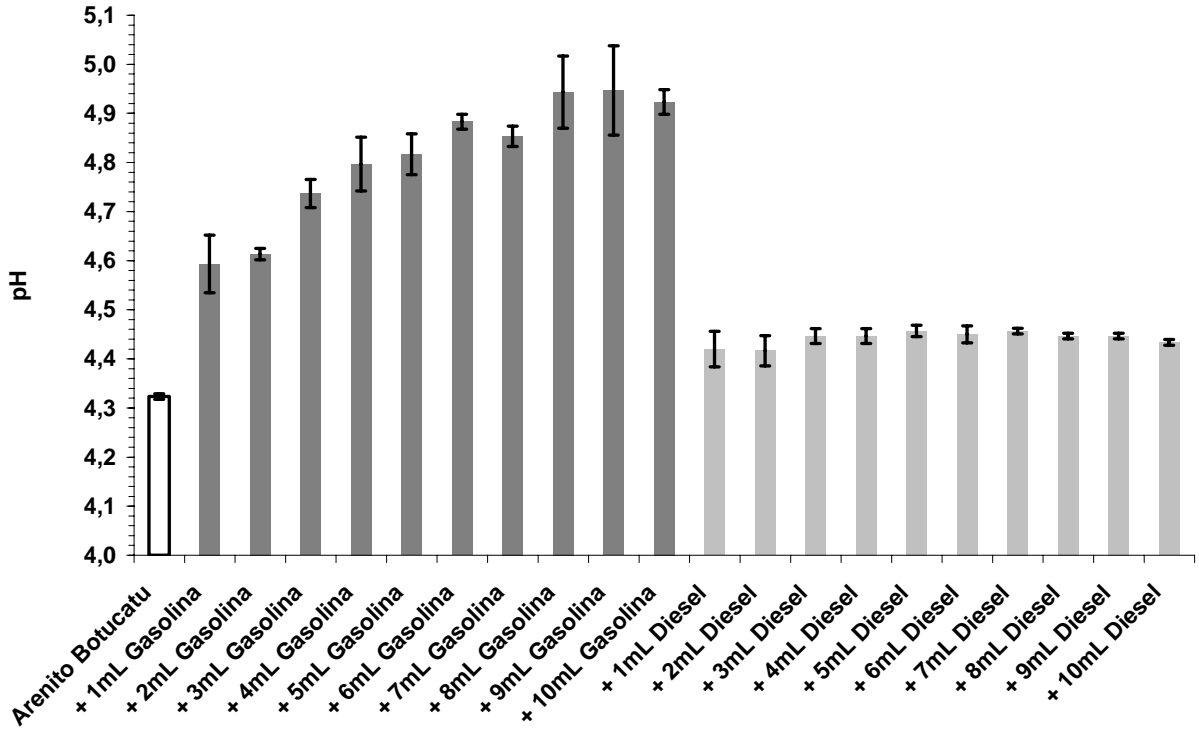


Figura 4.26: Alteração do pH com o grau de contaminação com gasolina e diesel

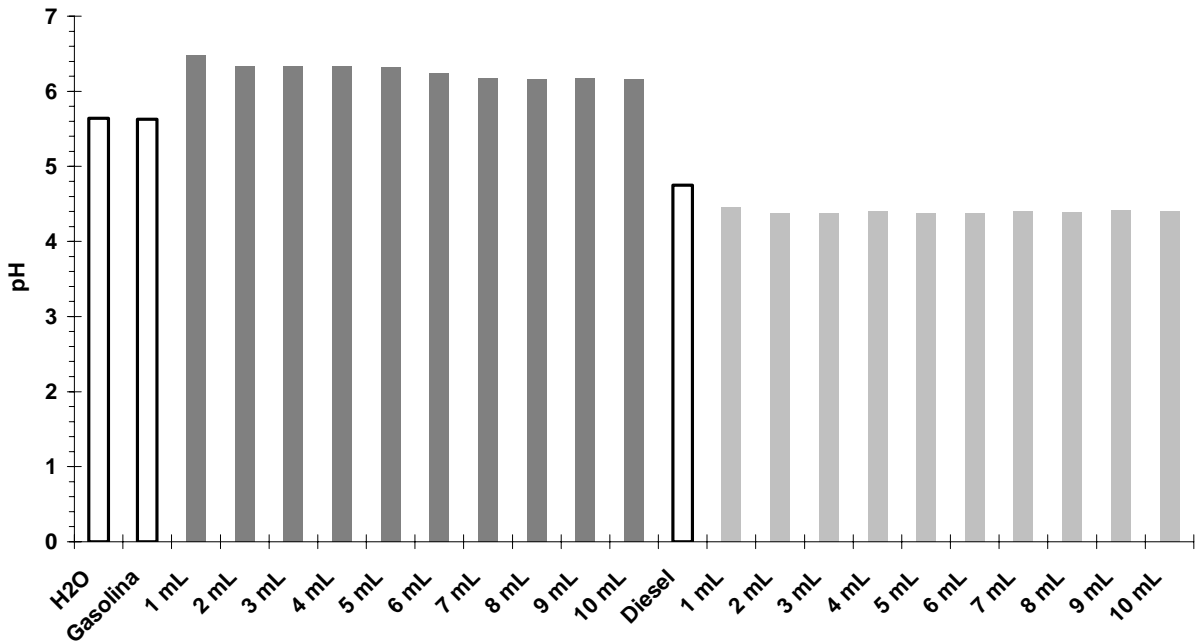


Figura 4.27: Alteração do pH na água com o grau de contaminação com gasolina e diesel

A variação da condutividade elétrica do solo contaminado por gasolina e diesel é apresentada na Figura 4.28. Na avaliação da variação da condutividade elétrica na gasolina, podemos observar que há, inicialmente, um aumento da condutividade, que decai com o incremento do contaminante até 6mL/10g solo. A partir deste ponto, a condutividade aumenta, mas muito pouco. Observa-se, então, que o eletrodo fica instável, quando a gasolina passa a se apresentar dividida do solo. Caso tal derrame ocorresse em campo, seria possível separar fisicamente a gasolina livre da contida no solo. Poderíamos considerar então uma curva exponencial decrescente até 6mL/10g solo, a partir de onde a condutividade é constante. A análise estatística mostra que a adição de 1mL de gasolina ao solo é diferente de 2 e 3mL, quando qualquer contaminação não tem mais diferença significativa. Se considerássemos apenas este parâmetro como indicador de contaminação por gasolina, seria muito difícil a identificação de uma contaminação por 2mL/10g solo, uma vez que não há diferença estatística significativa entre este e o grupo controle. A sensibilidade dos equipamentos de medição em campo necessitam ser bastante precisas para detectarem tais variações.

No caso do diesel, temos uma exponencial decrescente até 8mL/10g solo, a partir de onde a condutividade elétrica se torna constante em 8 μ S. Da mesma forma analisada anteriormente, contaminações de até 3mL/10g solo poderiam ser confundidas com o solo controle.

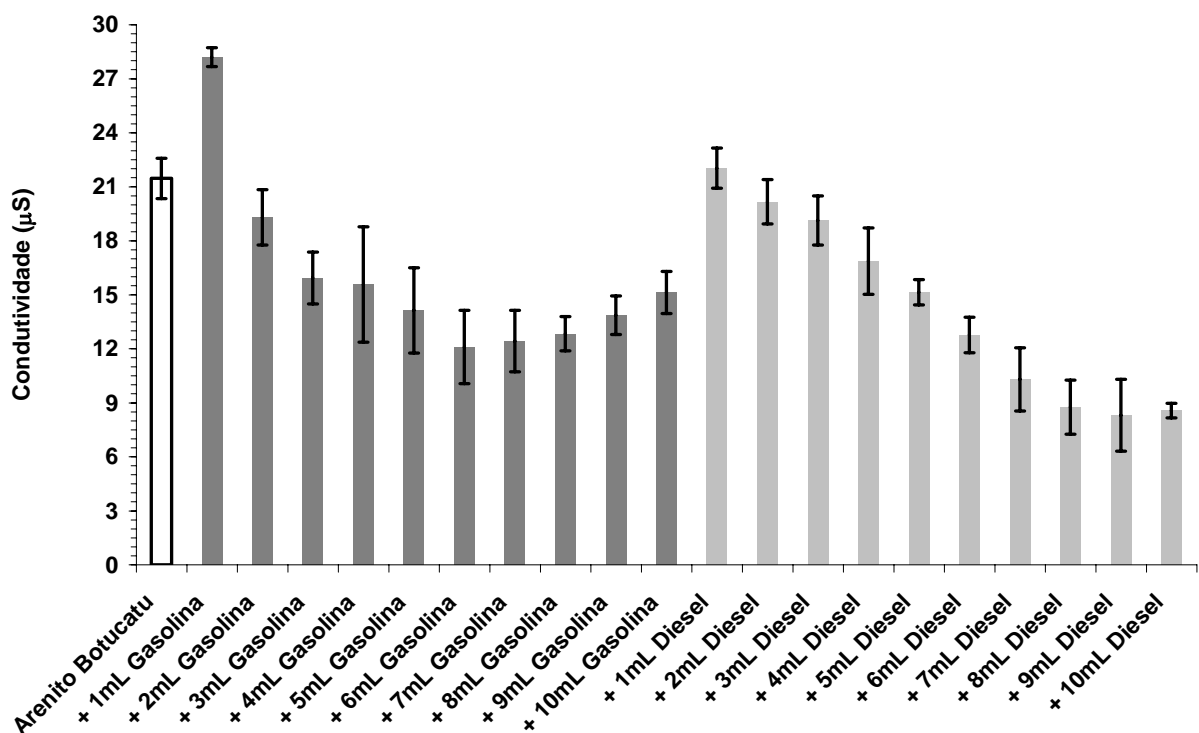


Figura 4.28: Alteração da condutividade com o grau de contaminação com gasolina e diesel

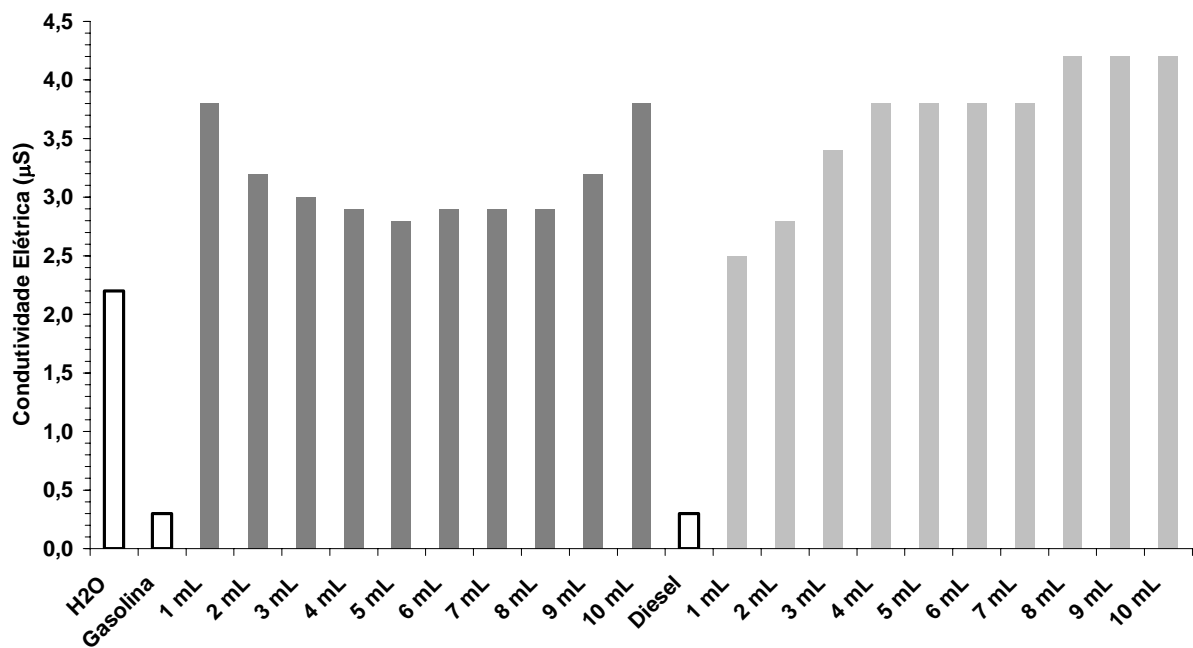


Figura 4.29: Alteração da condutividade elétrica na água com o grau de contaminação com gasolina e diesel

Também neste caso, para que fosse possível analisar o efeito do solo na condutividade elétrica com diferentes níveis de contaminação, foram realizados ensaios apenas com água destilada e o contaminante (Figuras 4.29). Para fins de comparação, foram feitas medidas com a água, o diesel e a gasolina “in natura”.

A comparação das Figuras 4.28 e 4.29 mostra algo interessante. Tanto a gasolina como o diesel têm condutividade elétrica próxima a zero (Figura 4.29). Quando colocamos a gasolina na água, observamos um grande aumento de condutividade, devido à solubilização de alguns compostos, aqui não identificados. Com níveis crescentes de gasolina em água, notamos uma queda inicial na condutividade, que aumenta novamente após 9 mL. Provavelmente estamos diante de um efeito de tamponamento. A água provavelmente vai neutralizando os íons até 8 mL, quando não há mais cargas disponíveis, aumentando novamente a condutividade elétrica para maiores cargas de contaminação. Quando o solo está presente, temos a ajuda das cargas e íons deste no tamponamento. No caso da gasolina em água, os efeitos práticos desta observação são muito pequenos, justamente pelo fato de haver variações mínimas de incrementos/decréscimo de apenas 0,5µS.

No caso do diesel em água parece não haver tamponamento, com aumento constante na condutividade elétrica, talvez porque o contaminante libere maior quantidade de cargas. Da

mesma forma anteriormente considerada na gasolina, para o diesel também há pouca variação de condutividade elétrica para fins práticos, na ordem de $1,5\mu\text{S}$. Quando o solo está presente, ocorre uma diminuição da condutividade elétrica, uma vez que o solo consegue tamponar de uma forma mais eficaz o contaminante. Neste caso, pode ser que haja um efeito de diluição simultaneamente, contribuindo para a queda rápida da condutividade.

4.1.9 Ensaio de Agregados

As Figuras 4.30 e 4.31 apresentam as percentagens de solo retido em cada peneira para todos os tratamentos realizados. Pode-se observar que há um aumento significativo da formação de agregados de solo durante os processos de biorremediação, claramente observados após 180 e 240 dias de tratamento. Todos os tratamentos (“bioaugmentação” e bioestimulação) e até mesmo o solo com “atenuação natural” mostraram agregação de solo, com correspondente diminuição das partículas mais finas. Nos tratamentos com “bioaugmentação”, este aumento chega a ser maior que 100%. A gasolina por si só é uma fonte de carbono (compostos alifáticos e aromáticos – ver Capítulo 3, item gasolinas) para os microrganismos, assim como o lodo, contendo 46% de carbono orgânico e nutrientes como P e K. Na Figura 4.30 (agregação de partículas aos 180 dias), pode-se observar que o tratamento com “bioaugmentação” promoveu a maior formação de agregados, seguido pelo solo com o lodo, bioestimulação e pelo controle. Praticamente isso corresponde ao controle < solo + gasolina < solo + lodo. O tratamento com gasolina com NPK teve um maior efeito aos 180 dias e diminuiu aos 240 talvez por diminuição da disponibilidade de nutrientes.

A Figura 4.31 mostra que a cimentação natural perde um pouco de suas propriedades de agregação após a estabilização de um novo ambiente no microcosmo, definido pela estabilização da evolução de CO_2 (Spinelli et al., 2005) aos 180 dias de tratamento. Aos 240 dias, apenas o lodo continua tendo um aumento de agregação, provavelmente por não conter gasolina nas amostras. Todos os tratamentos contendo lodo apresentaram um maior efeito na formação de agregados devido a melhor disponibilidade de substratos para a microbiota. O aumento de microrganismos é um fator importante na agregação de solo, principalmente devido a efeitos mecânicos de hifas de fungos e exopolissacarídeos de bactérias. Devido ao fato da agregação de partículas ter componentes biológicos, físicos e químicos, sugere-se um

acompanhamento destes efeitos através de microscopia eletrônica, além de medidas de sucção em futuros trabalhos.

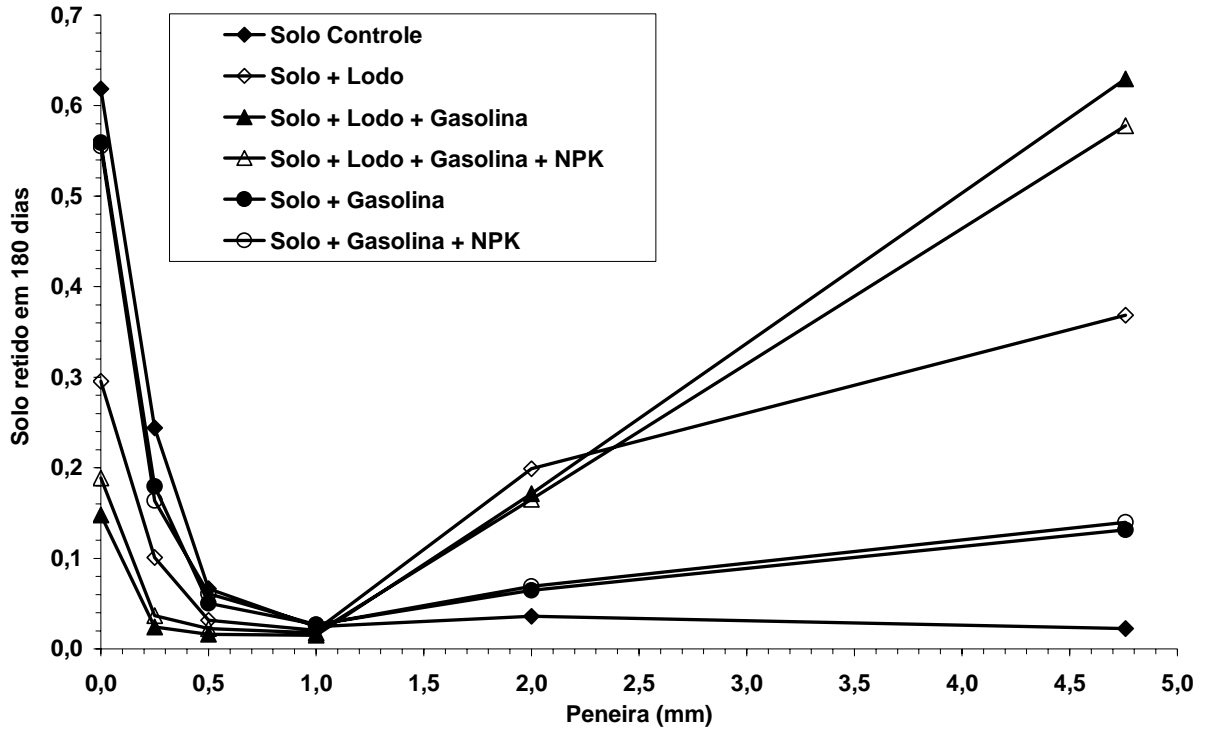


Figura 4.30: Alteração da granulometria do solo com o grau de contaminação aos 180 dias

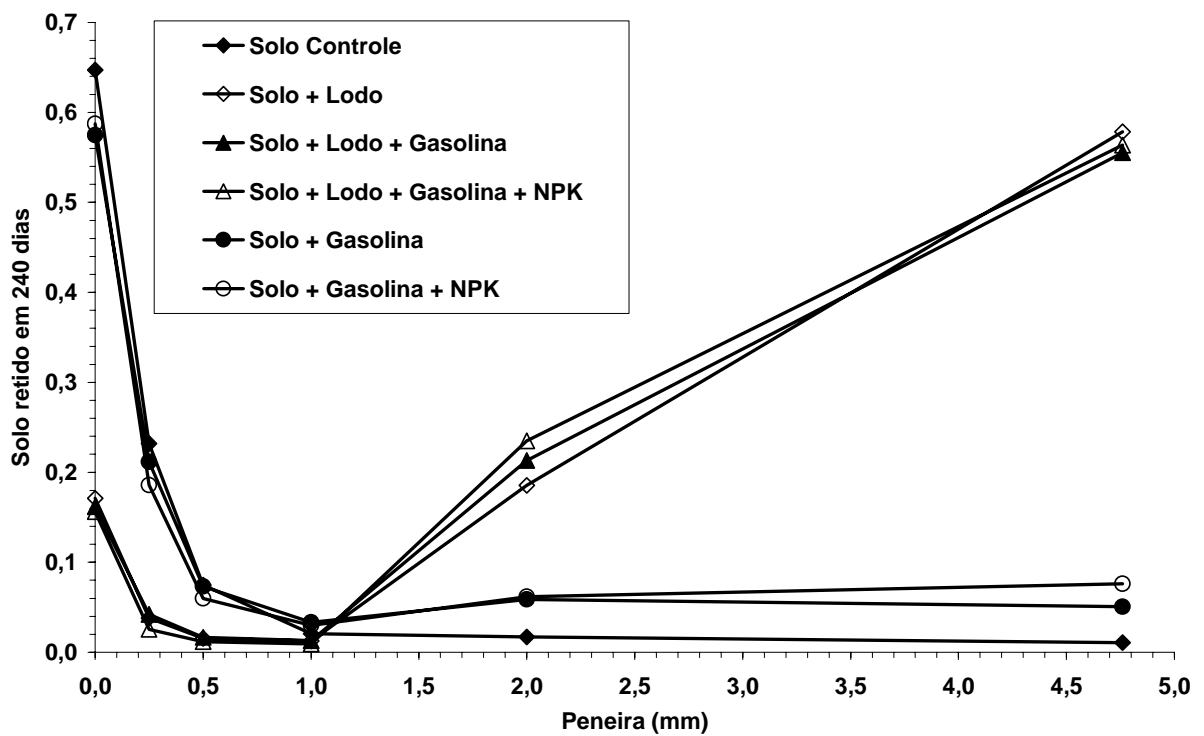


Figura 4.31: Alteração da granulometria do solo com o grau de contaminação aos 240 dias

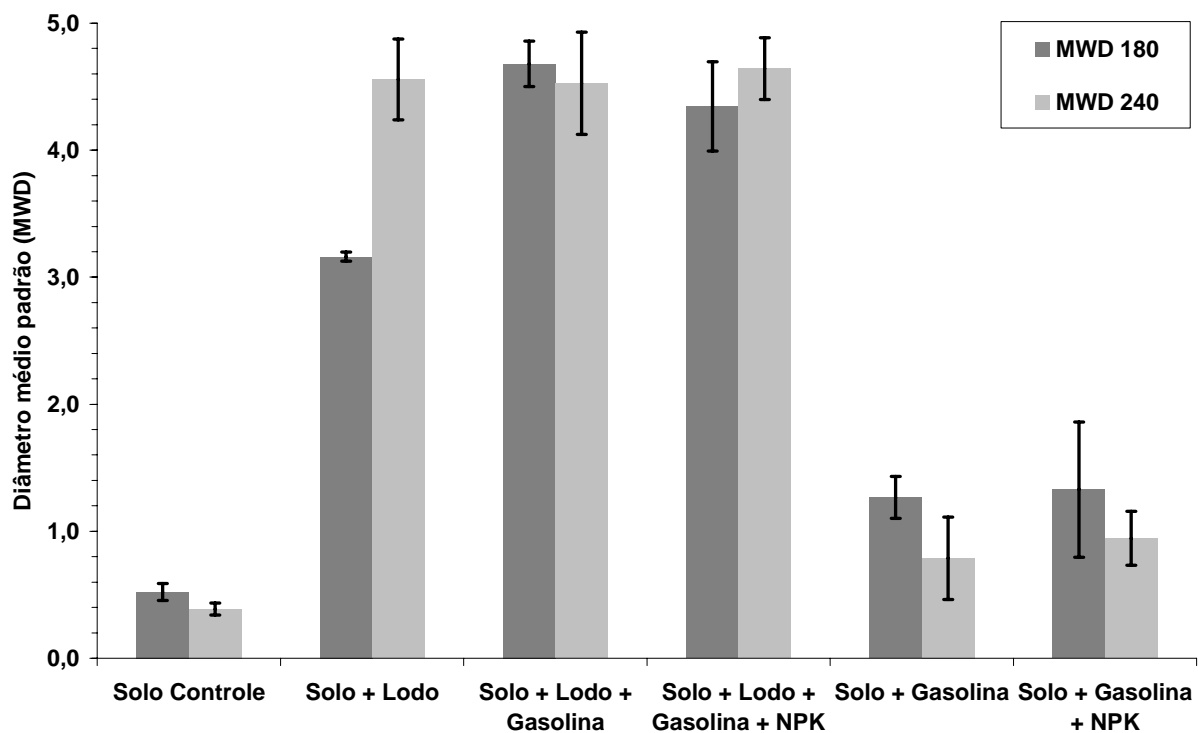


Figura 4.32: Alteração do MWD no solo com o grau de contaminação aos 180 e 240 dias

O aumento de resistência e estabilidade de cimentação intra-agregados e produtos orgânicos pode promover estabilidade dos agregados por reduzir a trabalhabilidade e expansibilidade. Alguns materiais orgânicos são hidrofóbicos, ou se tornam assim que desidratam, então o complexo orgânicos-argila podem ter reduzida sua afinidade pela água (Khonke, 1968; Hillel, 1998).

A Figura 4.32 apresenta o diâmetro médio padrão (MWD) de agregados de solos para cada um dos tratamentos nos tempos 180 e 240 dias. Quando comparamos os mesmos tratamentos em diferentes tempos, observamos que o lodo continua agregando o solo aos 240 dias com significância estatística ($P < 0,001$) para o período anterior (180 dias de tratamento), enquanto os outros tratamentos não se alteram. Quando os processos de biorremediação são comparados ao controle, é possível observar que o tratamento com lodo é o mais efetivo na agregação de partículas de solo, e o solo com lodo + gasolina não apresenta significância estatística quando comparado ao lodo + gasolina + NPK ($P > 0,05$), assim como quando comparado ao lodo puro aos 240 dias. O solo + gasolina não apresenta significância estatística ($P > 0,05$) para o solo + gasolina + NPK ou para o controle ($P > 0,05$), mas possui para o tratamento com lodo ($P < 0,001$). É possível se observar o efeito cumulativo do solo +

gasolina e solo + lodo no MWD, mostrando uma melhor resposta dos tratamentos contendo gasolina + lodo na agregação do solo.

Há necessidade de ensaios de laboratório que reproduzam as condições de campo no projeto de estruturas como camadas impermeáveis. A temperatura, o tipo de solo e o controle de nutrientes nas atividades biológicas têm importantes consequências na agregação de solos e suas propriedades mecânicas.

4.1.10 Ensaios de Percolação e de Pluviometria

Conforme discutido anteriormente no item 3.7.10, buscou-se avaliar as condições de contaminação durante um processo de biorremediação, onde houvesse interferências da pluviometria. O esquema proposto com suas condições de contorno foi mostrado na Figura 3.15b. Nas figuras que seguem, identificou-se como a, b, c, d o controle com 0mm (a) e as pluviometrias de 25, 50 e 100mm (b, c, d, respectivamente), observando-se os tempos. E, nas figuras e, f, g, os grupos foram ilustrados por tempo, ou seja, 3, 9 e 27 dias, observando-se a pluviometria. É importante salientar que os gráficos, devido à dispersão dos resultados nos diferentes tempos, não estão na mesma escala, e as linhas tracejadas são apenas uma forma de melhor visualização dos processos ocorridos.

A Figura 4.33 apresenta tendências de alterações das concentrações do benzeno em diferentes regimes pluviométricos (a, b, c e d) e em diferentes profundidades (e, f e g) em relação ao tempo. Na Figura 4.33a é possível identificar que quando não há regime pluviométrico estabelecido (0mm), as concentrações de benzeno caem praticamente ao limite de detecção em 9 dias na profundidade de 25 cm, enquanto que não há qualquer traço do contaminante na camada superficial já aos 3 dias. Na ausência de chuvas, portanto, a biorremediação ocorre de maneira intensa na superfície, favorecida pela volatilização, evoluindo para um solo sem contaminação por benzeno a maiores profundidades (25 cm) num período de 9 dias. Em momento algum a contaminação atingiu os 50 cm.

A Figura 4.33b ilustra um regime pluviométrico de 25mm e mostra que a biorremediação do benzeno se torna mais dificultada na presença de maiores umidades do solo (inicialmente colocado a 80% da capacidade de campo, ou 11% w/w). As concentrações superficiais

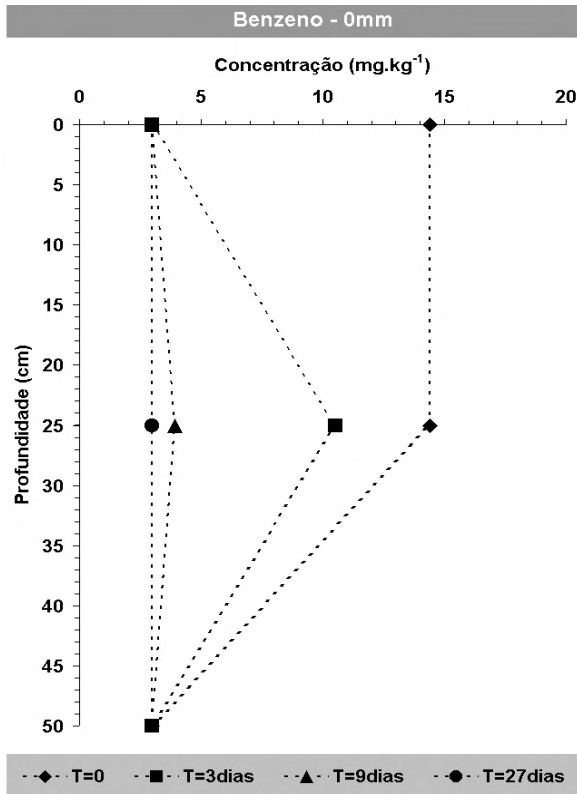
diminuem mais lentamente, e ainda há contaminantes na superfície aos 9 dias. Da mesma maneira vista para o regime de 0mm, não há contaminação na profundidade de 50 cm em qualquer tempo. Entretanto, pequena parte do benzeno parece migrar além dos 25 cm, à medida que a água vai permeando o solo, mostrando um aumento de concentração nesta profundidade em 9 dias, mas com biorremediação completa aos 27 dias. A volatilização se torna mais difícil pela diminuição da aeração.

As Figuras 4.33c, d mostram que quando há um regime pluviométrico mais intenso (50 e 100mm), há uma grande migração de benzeno da superfície para a profundidade, mantendo maiores concentrações superficiais e em profundidade (25 cm), que são retidas no solo por maior tempo, em condição pior com 100mm. O processo de biorremediação é dificultado com maiores umidades (Frankenberger, 1992; Alexander, 1994; Courseuil et al., 1998), mas ainda assim não atinge a profundidade de 50 cm. Com regimes de 100mm ainda encontramos benzeno no solo a 25 cm, com razoáveis níveis de contaminação, aos 27 dias (2,5 vezes a concentração inicialmente encontrada no tempo zero). A frente de contaminação desce muito lentamente, lixiviando os contaminantes e dificultando volatilização.

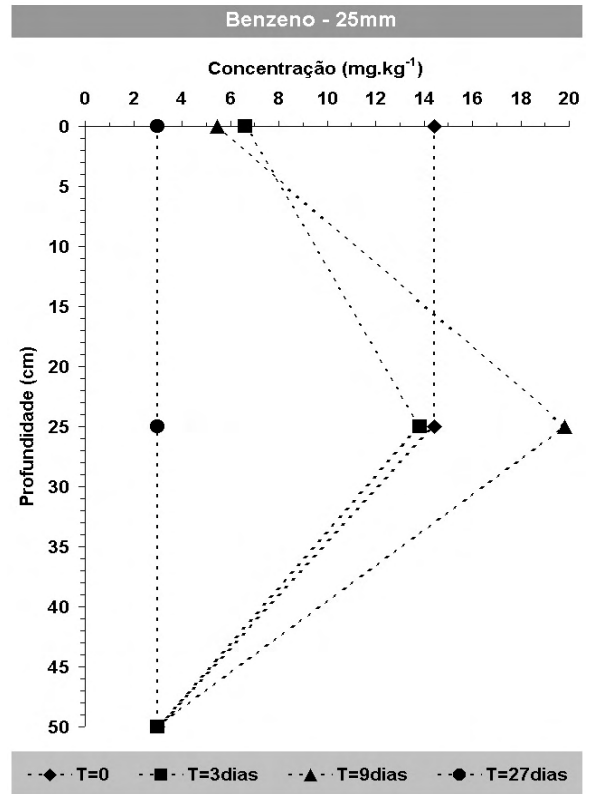
As Figuras 4.33e, f, g mostram, de certa forma, um resumo das observações anteriormente feitas, agora ilustradas em função do tempo. Os regimes pluviométricos de 50 e 100mm, como já analisados, mantém o benzeno na profundidade de 25 cm por mais tempo pela maior dificuldade de volatilização/biorremediação. Para chuvas de 100mm ainda encontramos o contaminante no solo aos 27 dias de tratamento em 25 cm em grandes concentrações.

A Figura 4.34 apresenta tendências de alterações das concentrações do tolueno em diferentes regimes pluviométricos (a, b, c e d) e em diferentes profundidades (e, f e g) em relação ao tempo. Na Figura 4.34a é possível identificar que quando não há regime pluviométrico estabelecido (0mm), as concentrações de tolueno caem praticamente ao limite de detecção somente em 27 dias na profundidade de 25 cm, enquanto que não há qualquer traço do contaminante na camada superficial já aos 3 dias. Ao contrário do benzeno visto anteriormente, o tolueno permanece no solo por um maior período de tempo. Inclusive, parece haver uma pequena migração para a profundidade, que retorna aos 25 cm em 3 dias. Na ausência de chuvas, portanto, a biorremediação ocorre de maneira intensa na superfície, favorecida pela volatilização, evoluindo para um solo sem contaminação por tolueno a

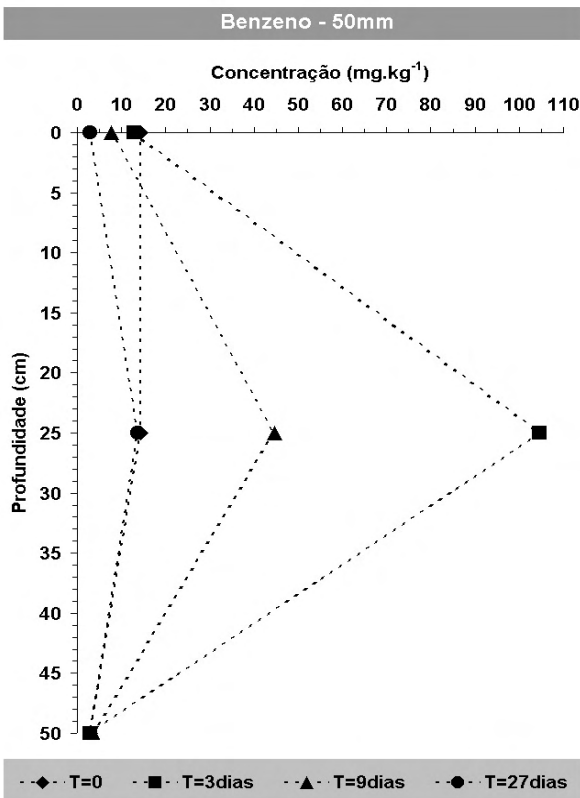
maiores profundidades (25 cm) num período de 27 dias. Em momento algum, para este parâmetro, a contaminação atingiu os 50 cm.



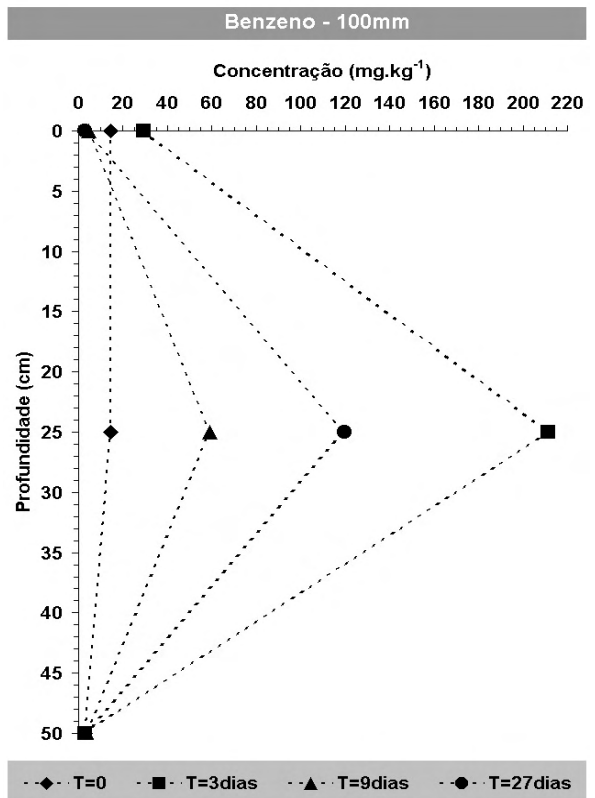
(a)



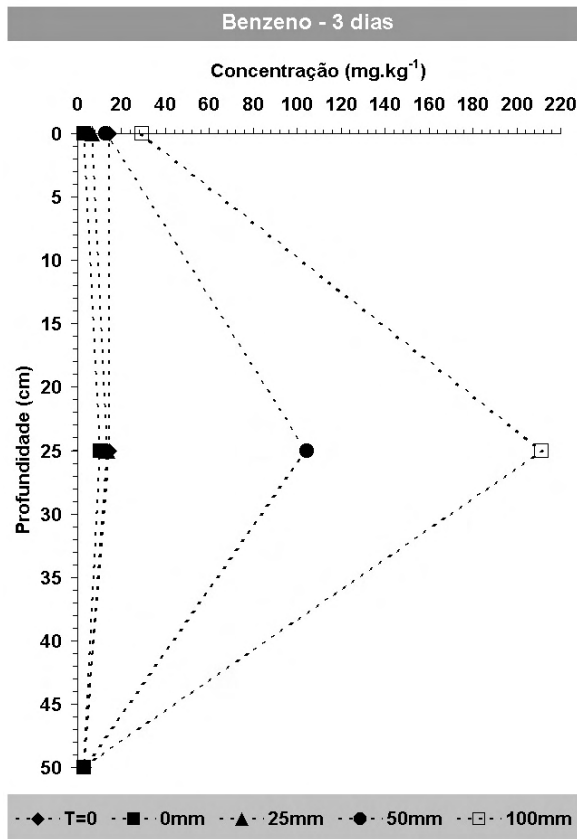
(b)



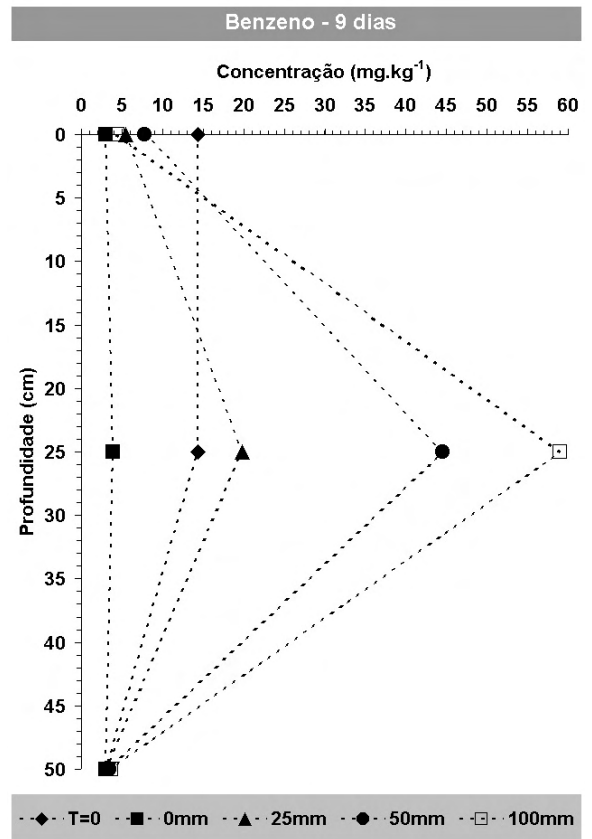
(c)



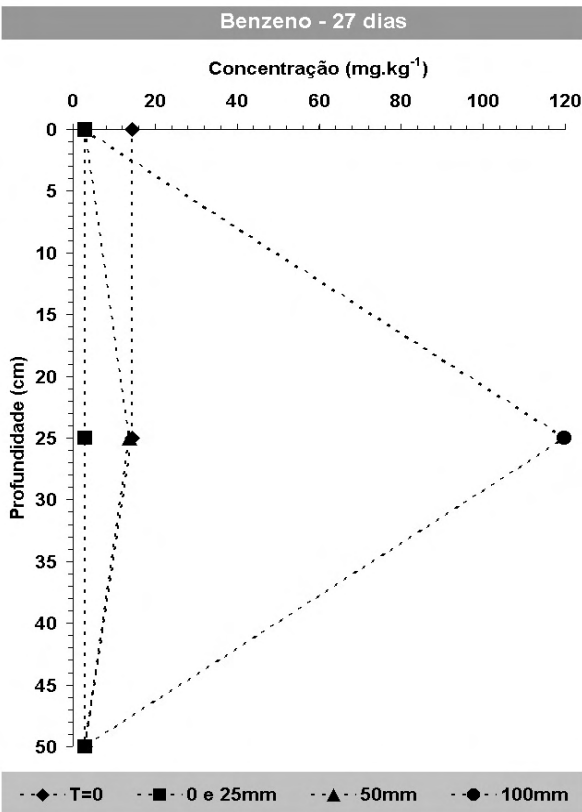
(d)



(e)



(f)



(g)

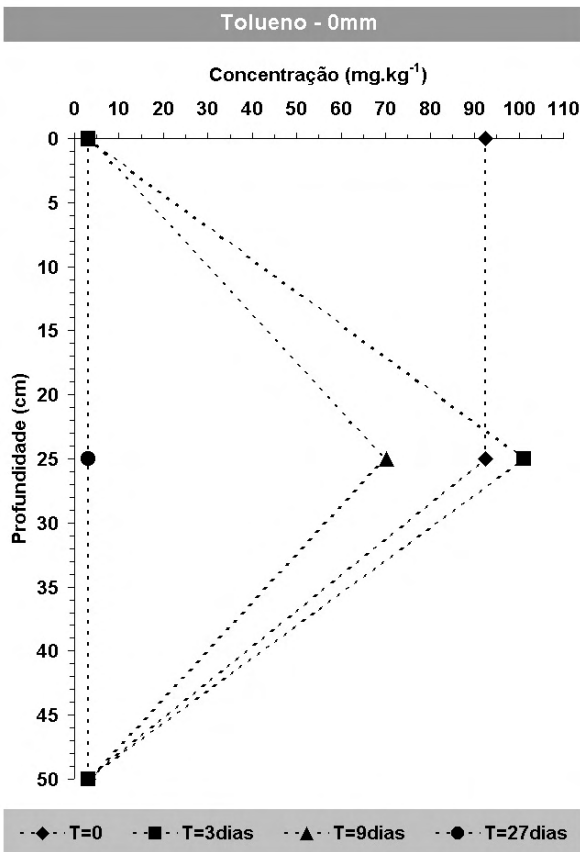
Figura 4.33: Alteração das concentrações de Benzeno nas diferentes profundidades em relação ao tempo e ao regime pluviométrico aplicado

A Figura 4.34b ilustra um regime pluviométrico de 25mm e mostra que a biorremediação do tolueno também se torna mais dificultada na presença de maiores umidades do solo. As concentrações superficiais diminuem mais lentamente, e ainda há contaminantes na superfície aos 9 dias. Da mesma maneira vista para o regime de 0mm, não há contaminação na profundidade de 50 cm em qualquer tempo. Pequena parte do benzeno parece migrar além dos 25 cm, à medida que a água vai permeando o solo, mostrando um aumento de concentração nesta profundidade em 9 dias, mas com biorremediação completa aos 27 dias.

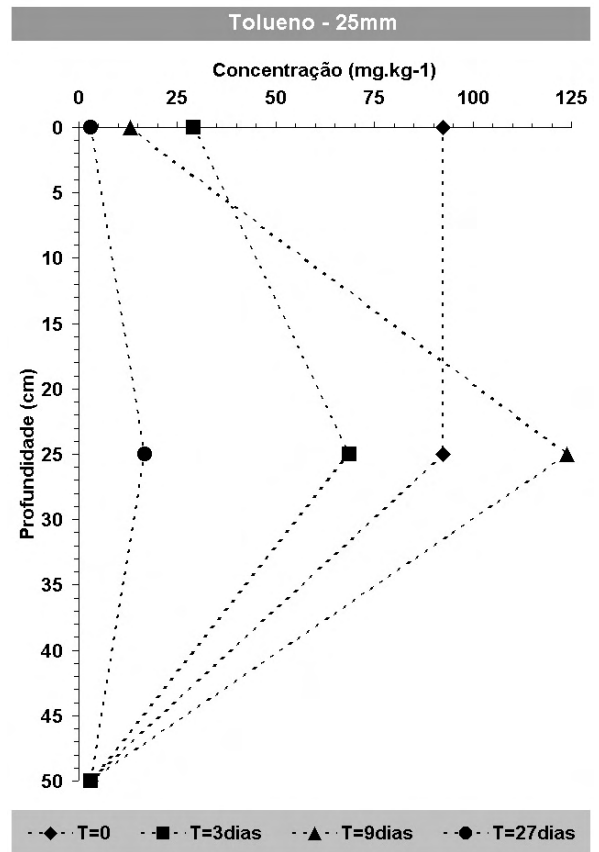
As Figuras 4.34c, d mostram que quando há um regime pluviométrico mais intenso (50 e 100mm), há uma grande migração de tolueno da superfície para a profundidade, mantendo maiores concentrações do contaminante na superfície e em profundidade (25 cm), retidas no solo por maior tempo, em condição pior com 100mm. No caso de um regime pluviométrico de 100mm, observamos que o contaminante atinge a profundidade de 50 cm aos 9 dias, aumentando um pouco até 27 dias. O excesso de água no solo, causando uma diminuição do O₂, piorou de forma considerável a biorremediação do tolueno. Se observarmos de forma mais detalhada a Figura 4.35d, veremos que o tolueno migrou à profundidades maiores que 25 cm no tempo 9 dias, e por não ter por onde volatilizar, retornou aos 25 cm em 27 dias, com contaminação de 5 vezes o valor inicialmente encontrado no tempo zero.

As Figuras 4.34e, f, g mostram o resumo das observações anteriormente feitas, agora ilustradas em função do tempo. Os regimes pluviométricos de 50 e 100mm, como já analisados, mantém o tolueno na profundidade de 25 cm por mais tempo, além de ter uma migração maior e atingir a profundidade de 50 cm no tempo 9 dias para 100mm. Para chuvas de 100mm encontramos o contaminante no solo aos 27 dias de tratamento em 25 e 50 cm.

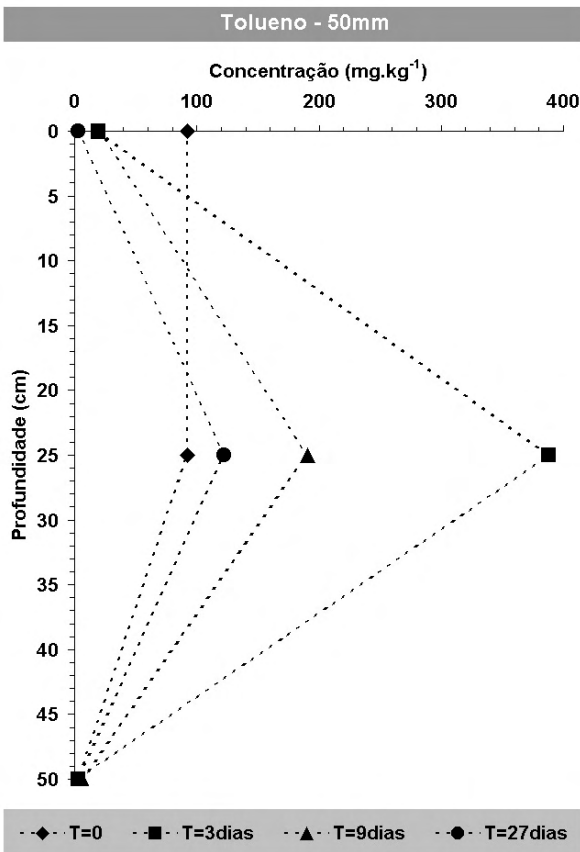
A Figura 4.35 apresenta tendências de alterações das concentrações do MTBE em diferentes regimes pluviométricos (a, b, c e d) e em diferentes profundidades (e, f e g) em relação ao tempo. Na Figura 4.35a é possível identificar que quando não há regime pluviométrico estabelecido (0mm), ou quando é de 25mm, as concentrações de MTBE caem praticamente ao limite de detecção já aos 3 dias tanto na profundidade de 25 cm quanto na camada superficial. Portanto, na ausência de chuvas e regimes pequenos (25mm), a biorremediação ocorre de maneira intensa, favorecida pela volatilização, evoluindo para um solo sem contaminação por MTBE já aos 3 dias.



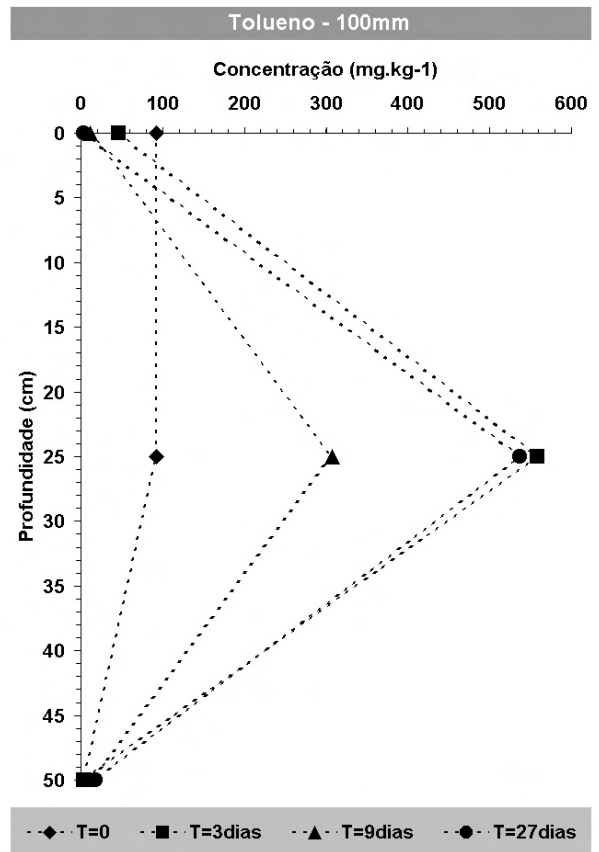
(a)



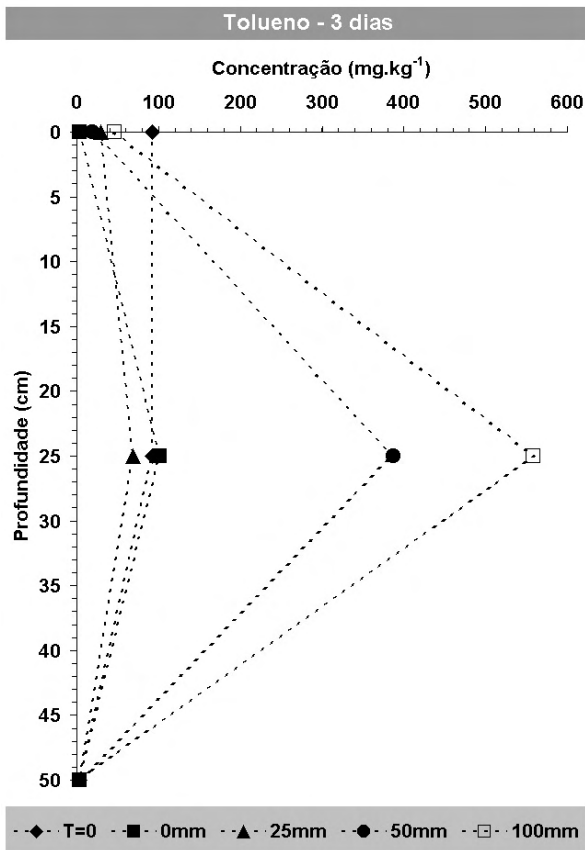
(b)



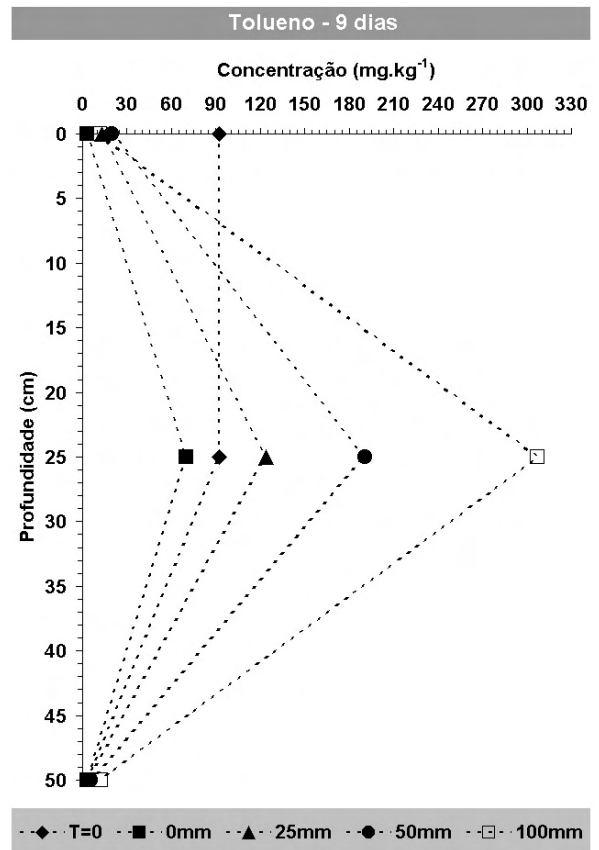
(c)



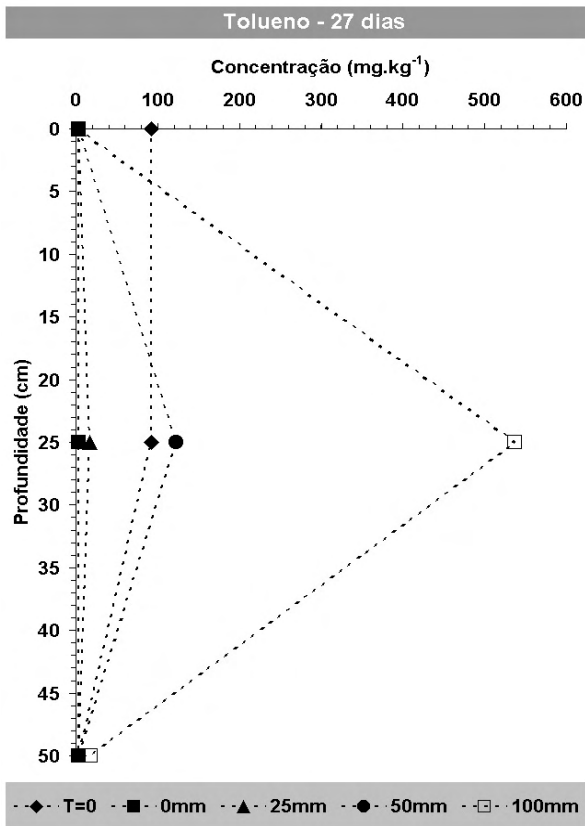
(d)



(e)



(f)



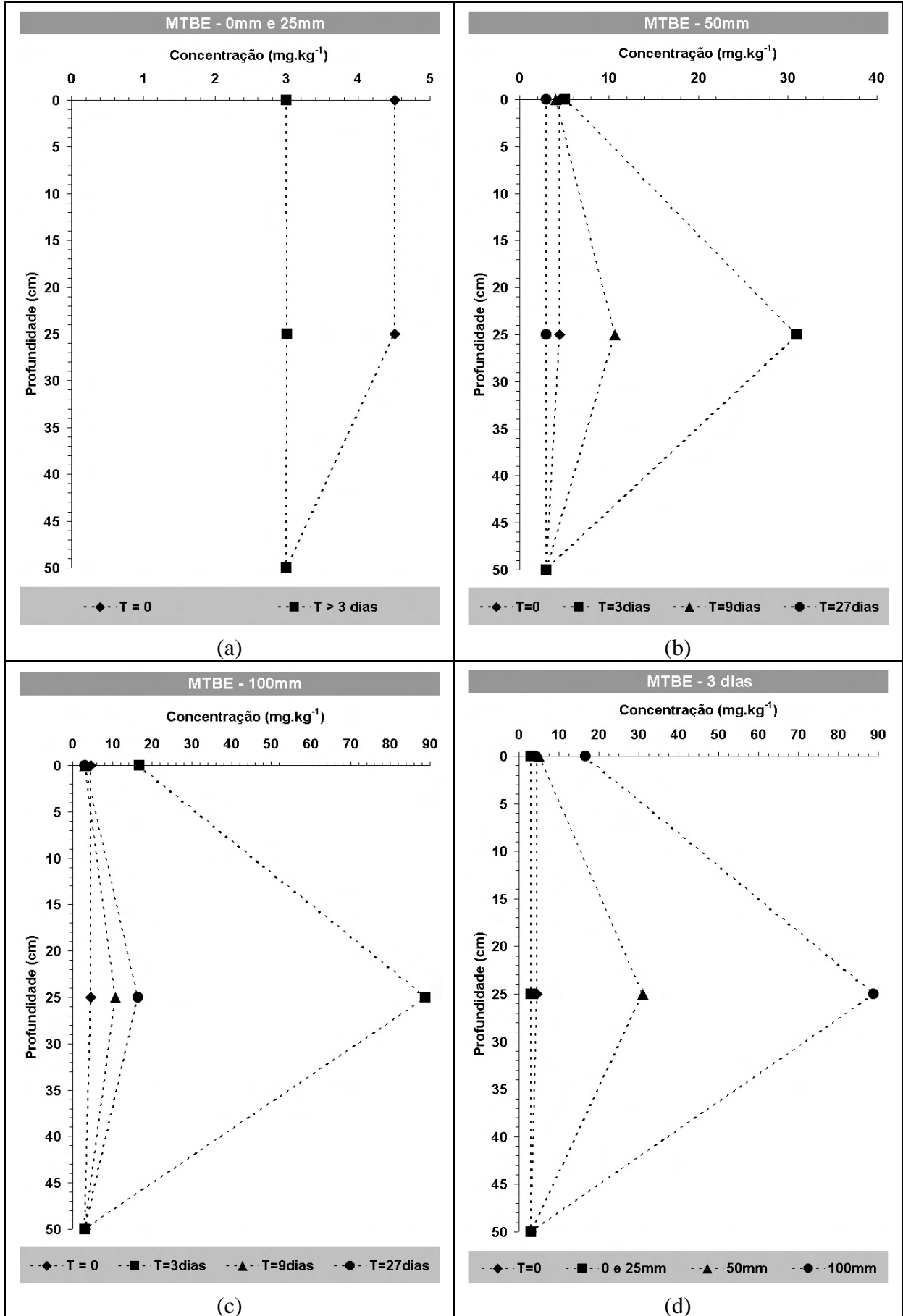
(g)

Figura 4.34: Alteração das concentrações de Tolueno nas diferentes profundidades em relação ao tempo e ao regime pluviométrico aplicado

A Figura 4.35b ilustra um regime pluviométrico de 50mm e mostra que a biorremediação do MTBE se torna mais dificultada na presença de maiores umidades do solo. As concentrações superficiais diminuem mais lentamente, e ainda há contaminantes na superfície aos 9 dias. Da mesma maneira vista para o regime de 0 e 25mm, não há contaminação na profundidade de 50 cm em qualquer tempo. Pequena parte do benzeno parece migrar além dos 25 cm, à medida que a água vai permeando o solo, mostrando um aumento de concentração nesta profundidade em 3 dias, mas com biorremediação completa aos 27 dias. No caso de 100mm (Figura 4.35c) ocorre a mesma coisa, porém com maior migração de contaminantes, mostrando grandes concentrações aos 3 dias em profundidade (25mm). Então, aos 9 dias, grande parte do contaminante já biorremediou, sendo que ainda encontramos concentrações semelhantes aos 9 dias em 27 dias, provavelmente por dificuldades de melhores taxas de biorremediação em função de umidade, ou retorno do MTBE de maiores profundidades à superfície.

As Figuras 4.35d, e, f mostram o resumo das observações anteriormente feitas, agora ilustradas em função do tempo. Os regimes pluviométricos de 50 e 100mm, como já analisados, mantém o MTBE na profundidade de 25 cm por mais tempo, além de ter uma migração maior. Para chuvas de 100mm, ainda encontramos o contaminante no solo aos 27 dias de tratamento na profundidade de 25cm.

A Figura 4.36 apresenta tendências de alterações das concentrações do C₈ aromático em diferentes regimes pluviométricos (a, b, c e d) e em diferentes profundidades (e, f e g) em relação ao tempo. Na Figura 4.36a é possível identificar que quando não há regime pluviométrico estabelecido (0mm), as concentrações de C₈ aromático continuam altas até os 27 dias na profundidade de 25 cm, enquanto que não há qualquer traço do contaminante na camada superficial já aos 3 dias. Da mesma maneira como ocorre com o tolueno, o C₈ aromático permanece no solo por um maior período de tempo em 25 cm. O C₈ aromático também não atinge os 50 cm com 0mm.



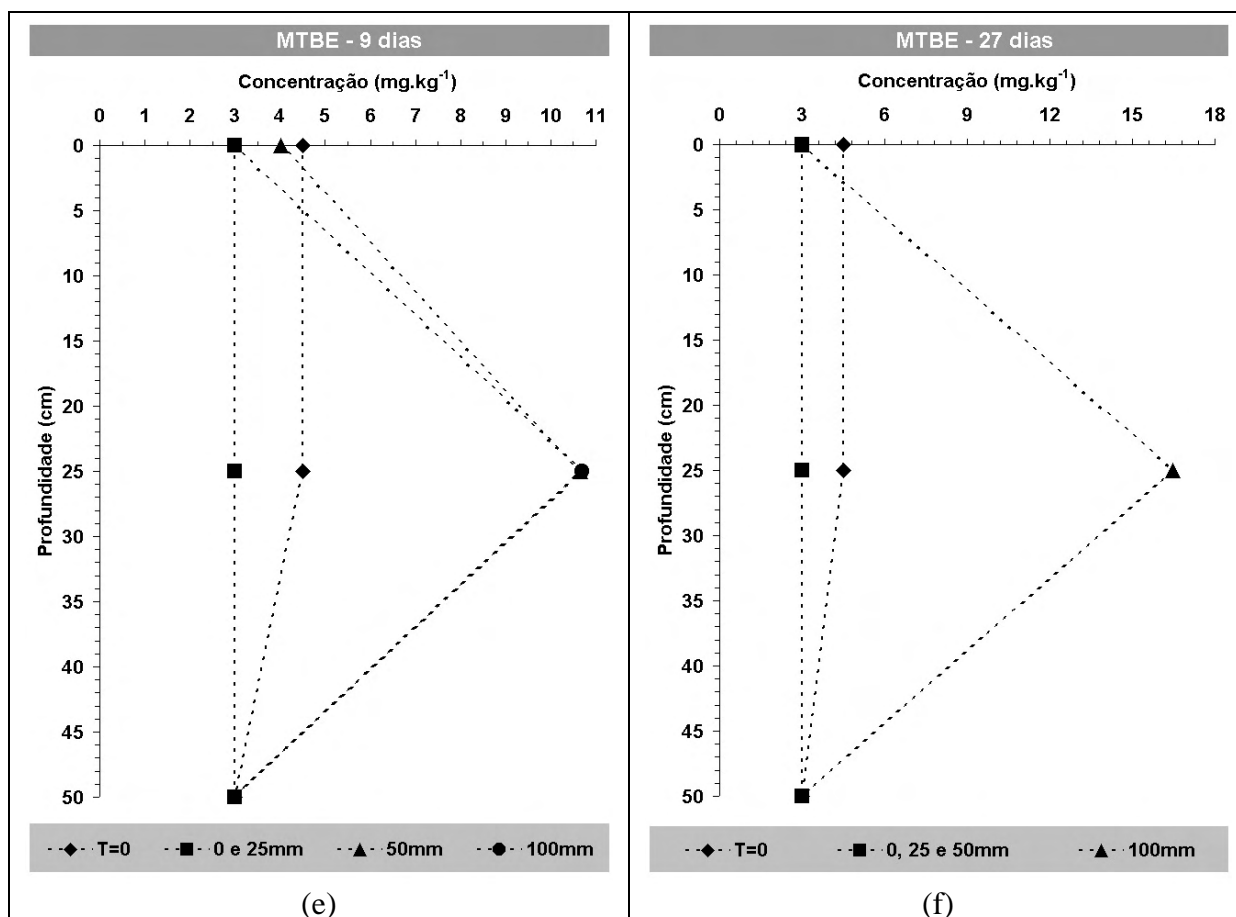


Figura 4.35: Alteração das concentrações de MTBE nas diferentes profundidades em relação ao tempo e ao regime pluviométrico aplicado

A Figura 4.36b ilustra um regime pluviométrico de 25mm e mostra que a biorremediação do C₈ aromático, como com os demais contaminantes, torna-se mais dificultada na presença de maiores umidades do solo. As concentrações superficiais diminuem lentamente, e ainda há contaminantes na superfície aos 9 dias. Da mesma maneira vista para o regime de 0mm, não há contaminação na profundidade de 50 cm em qualquer tempo. O contaminante sofre um processo de biorremediação mais lento com 25mm, porém contínuo, e apresenta níveis de contaminação significativos ainda aos 27 dias em 25 cm.

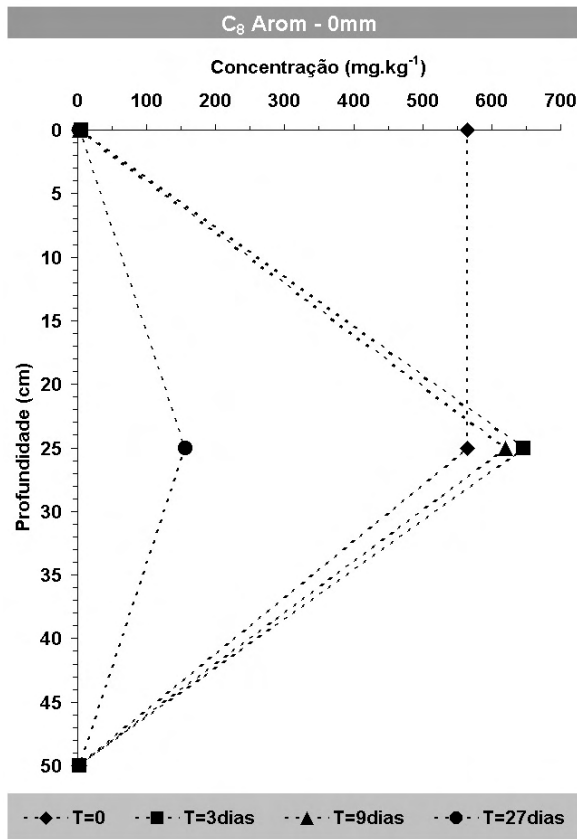
As Figuras 4.36c e d mostram que quando há um regime pluviométrico mais intenso (50 e 100mm), há uma migração de C₈ aromático da superfície para a profundidade, mantendo maiores concentrações do contaminante na superfície e em profundidade (25 cm), retidas no solo por maior tempo, em condição pior com 100mm. Com 50 mm observamos que o contaminante vai migrando naturalmente, aumentando sua concentração em 3 dias, e continua migrando aos 9 dias, quando notamos uma concentração menor em 25 cm. Então, em um

dado momento, o contaminante volta a migrar para a superfície, aumentando novamente sua concentração em 27 dias em 25 cm. No caso de um regime pluviométrico de 100mm, observamos que o contaminante atinge a profundidade de 50 cm aos 9 dias, apesar de ser em pequena quantidade, aumentando um pouco até 27 dias. Da mesma forma vista para 50mm, observamos que o C₈ aromático migrou à profundidade, aumentando sua concentração em 3 dias, continuando sua migração aos 9 dias, quando notamos uma concentração menor em 25 cm. Então, o contaminante volta a migrar para a superfície, aumentando novamente sua concentração em 27 dias em 25 cm. Neste momento, a contaminação por C₈ aromático é 2,5 vezes o valor inicialmente encontrado no tempo zero.

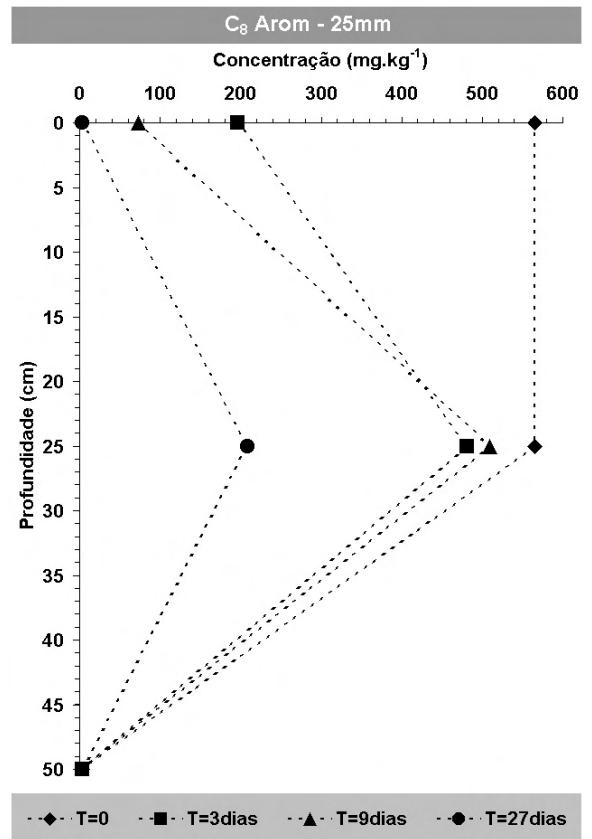
As Figuras 4.36e, f, g mostram o resumo das observações anteriormente feitas, agora ilustradas em função do tempo. Os regimes pluviométricos de 50 e 100mm, como já analisados, mantém o C₈ aromático em profundidade por mais tempo, além de ter uma migração maior e atingir a profundidade de 50 cm no tempo 9 dias. Para qualquer regime pluviométrico encontramos o contaminante no solo aos 27 dias de tratamento em 25 cm e em baixas concentrações em 50 cm para 100mm.

A Figura 4.37 apresenta tendências de alterações das concentrações do C₉₊ aromático em diferentes regimes pluviométricos (a, b, c e d) e em diferentes profundidades (e, f e g) em relação ao tempo. Na Figura 4.37a é possível identificar que quando não há regime pluviométrico estabelecido (0mm), mesmo assim as concentrações de C₉₊ aromático continuam altas até os 27 dias na profundidade de 25 cm, enquanto ainda há contaminante na camada superficial aos 3 dias. Da mesma maneira como ocorreu com o tolueno e C₈ aromático, o C₉₊ aromático permanece no solo por um maior período de tempo em 25 cm. O C₉₊ aromático também não atinge os 50 cm com 0mm.

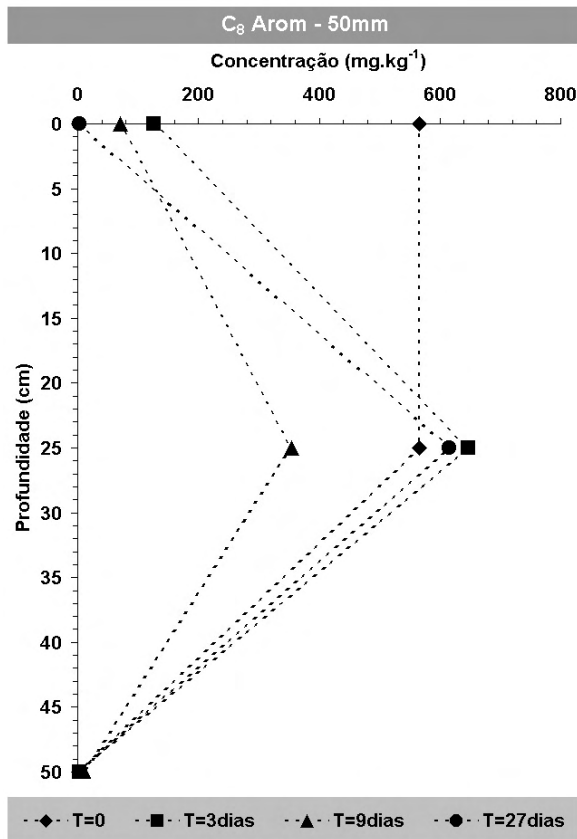
A Figura 4.37b ilustra um regime pluviométrico de 25mm. As concentrações superficiais diminuem lentamente, e ainda há contaminantes na superfície aos 9 dias. Da mesma maneira vista para o regime de 0mm, não há contaminação na profundidade de 50 cm em qualquer tempo. O contaminante sofre um processo de biorremediação lento e contínuo com 25mm e apresenta níveis de contaminação significativos ainda aos 27 dias em 25 cm.



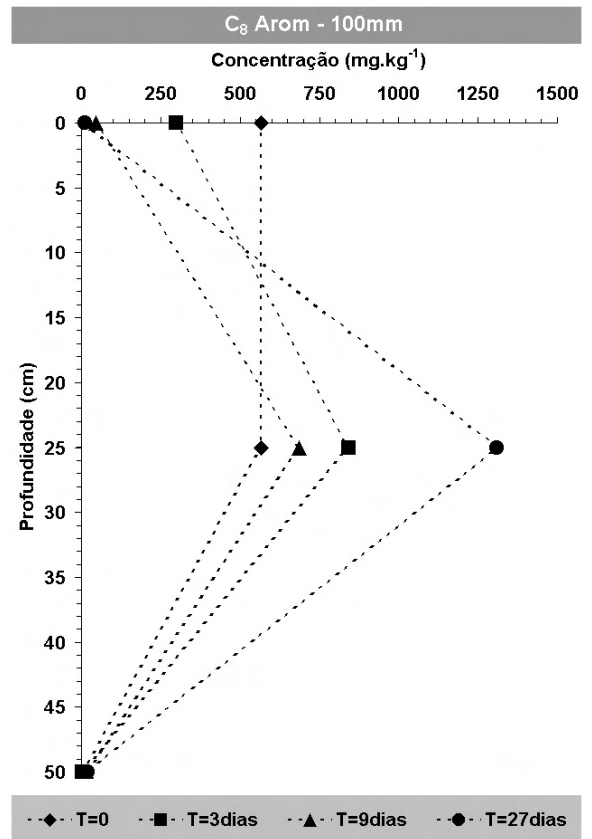
(a)



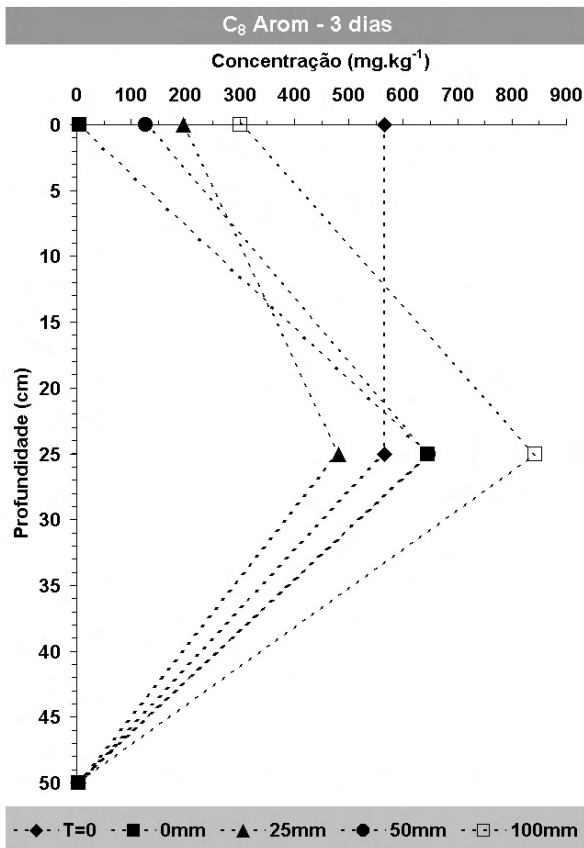
(b)



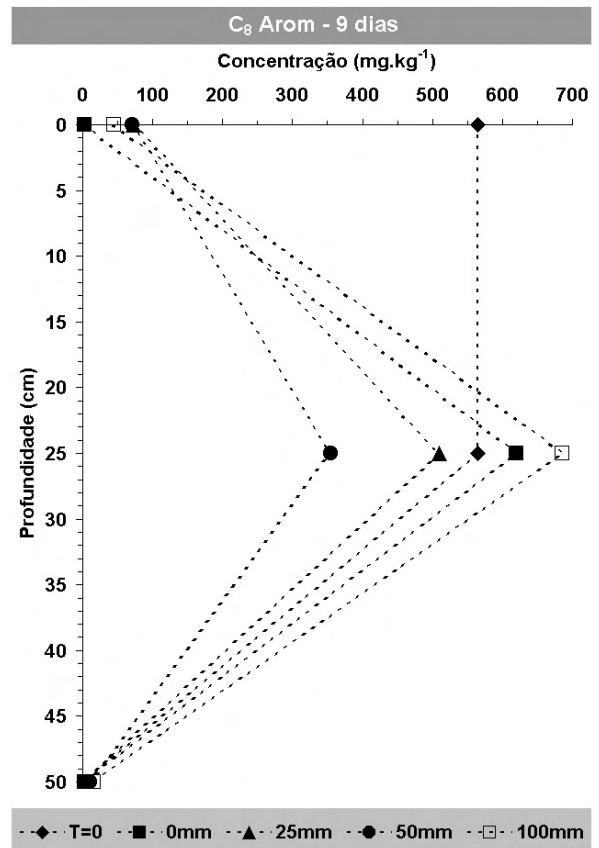
(c)



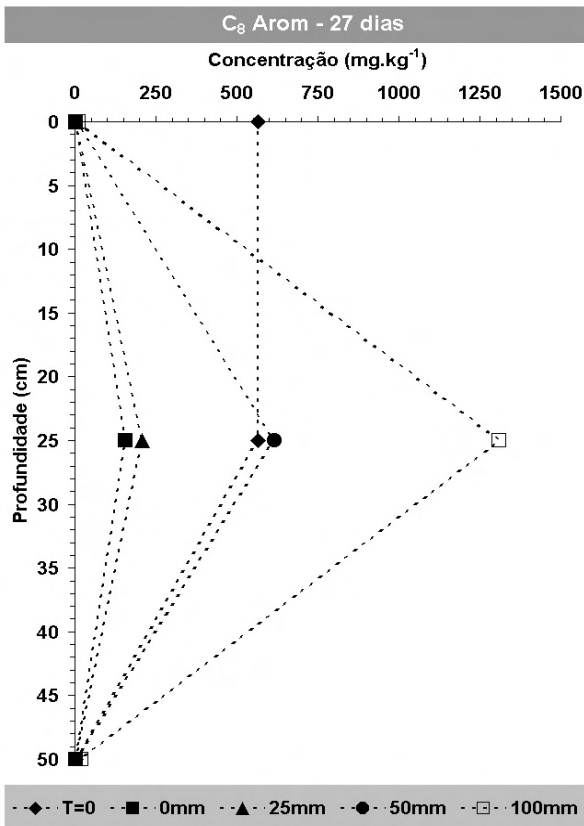
(d)



(e)



(f)



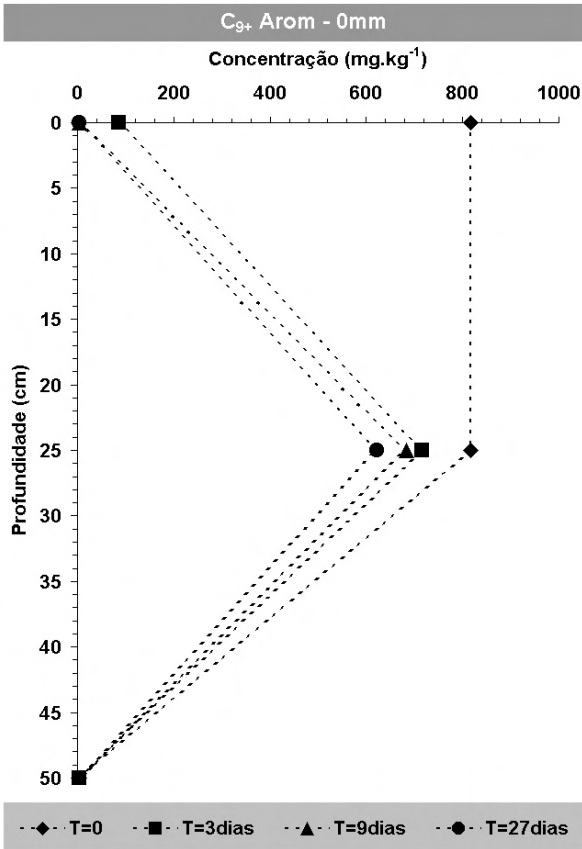
(g)

Figura 4.36: Alteração das concentrações de C₈ aromático nas diferentes profundidades em relação ao tempo e ao regime pluviométrico aplicado

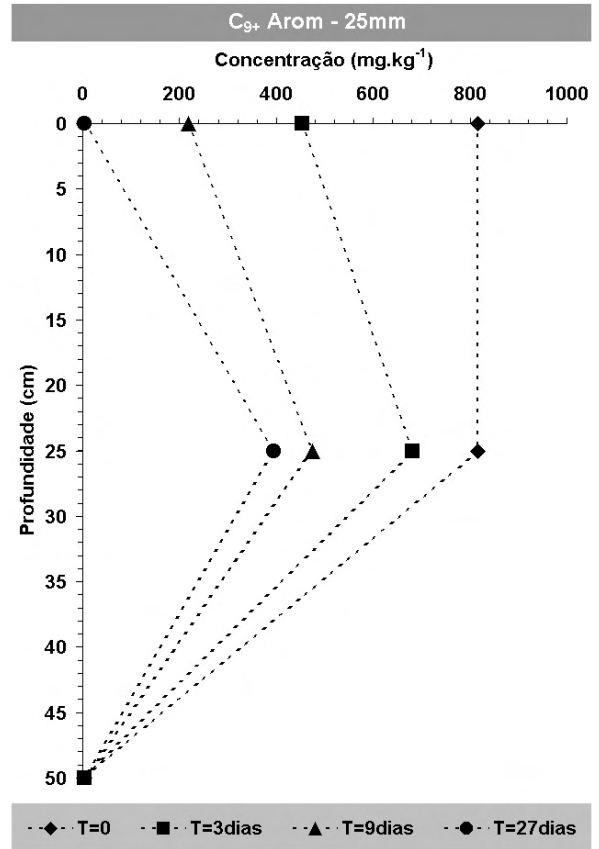
As Figuras 4.37c e d mostram que quando há um regime pluviométrico mais intenso (50 e 100mm), há uma migração de C_{9+} aromático da superfície para a profundidade, mantendo maiores concentrações do contaminante na superfície e em profundidade (25 cm), retidas no solo por maior tempo, em condição pior com 100mm. Com 50 mm observamos que o contaminante vai migrando naturalmente, e vai reduzindo sua concentração em 9 dias em 25 cm, e então o contaminante volta a migrar para a superfície, aumentando novamente sua concentração em 27 dias em 25 cm, neste caso todas concentrações inferiores ao tempo zero. No caso de um regime pluviométrico de 100mm, observamos que o contaminante atinge a profundidade de 50 cm somente aos 27 dias. Da mesma forma vista para 50mm, observamos que o C_{9+} aromático vai migrando naturalmente, e vai reduzindo sua concentração até os 9 dias em 25 cm, quando então volta a migrar para a superfície, aumentando novamente sua concentração em 27 dias em 25 cm, neste caso superior ao tempo zero. Neste momento, a contaminação por C_{9+} aromático é um pouco maior que o valor inicialmente encontrado no tempo zero para 25 cm.

As Figuras 4.37e, f, g mostram o resumo das observações anteriormente feitas, agora ilustradas em função do tempo. Os regimes pluviométricos de 50 e 100mm, como já analisados, mantém o C_{9+} aromático em profundidade por mais tempo, além de ter uma migração maior e atingir a profundidade de 50 cm no tempo 27 dias. Para qualquer regime pluviométrico encontramos o contaminante no solo aos 27 dias de tratamento em 25 cm e em baixas concentrações em 50 cm para 100mm no tempo 27 dias. Não houve eliminação do contaminante na superfície para qualquer tempo.

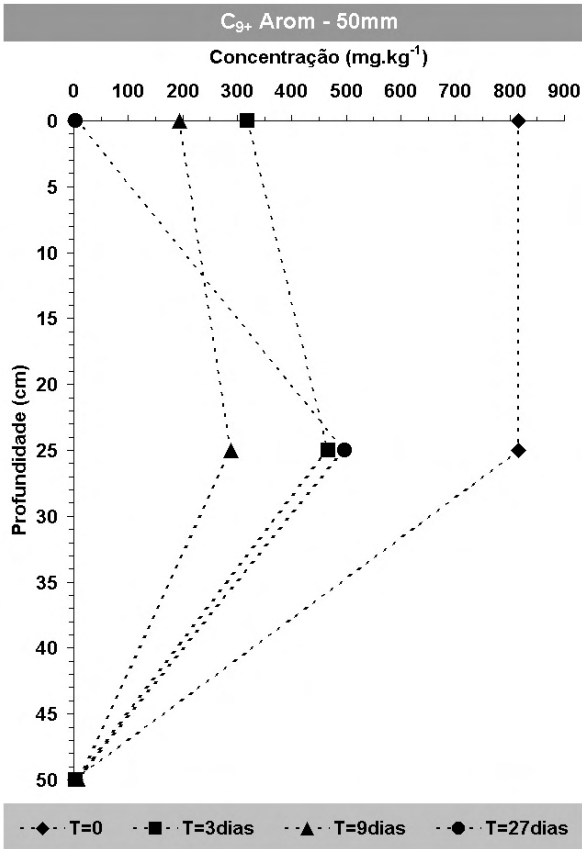
De forma geral, estes ensaios nos mostram a dinâmica dos contaminantes no solo em função do grau de umidade. Existe uma tendência natural de volatilização dos contaminantes, que se torna dificultada pelo incremento da pluviometria em uma relação diretamente proporcional. Em condições de campo, este é um parâmetro que inviavelmente deverá ser contabilizado, principalmente ao considerarmos climas tropicais e subtropicais.



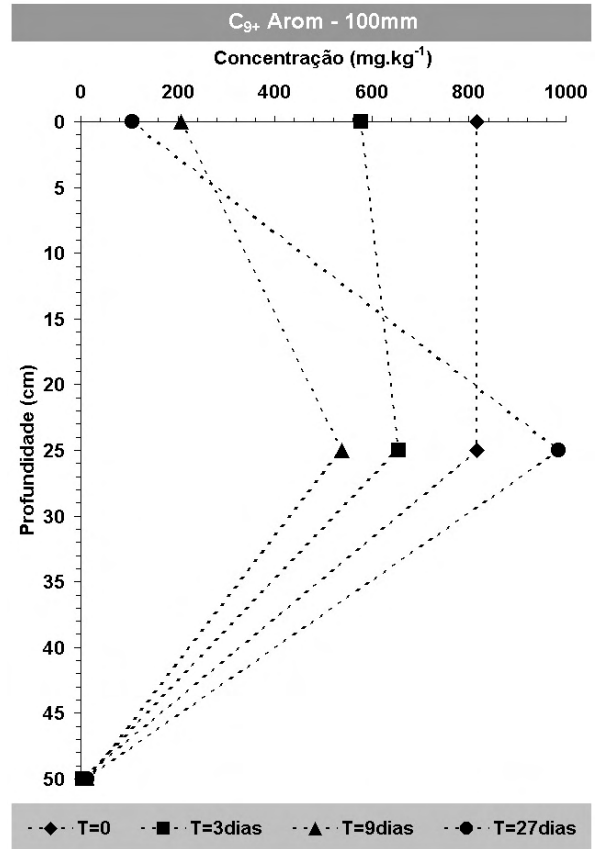
(a)



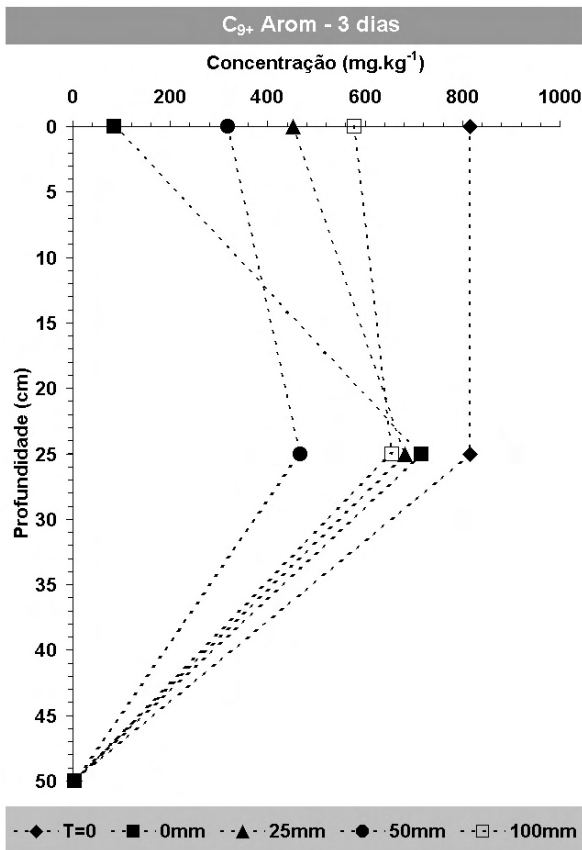
(b)



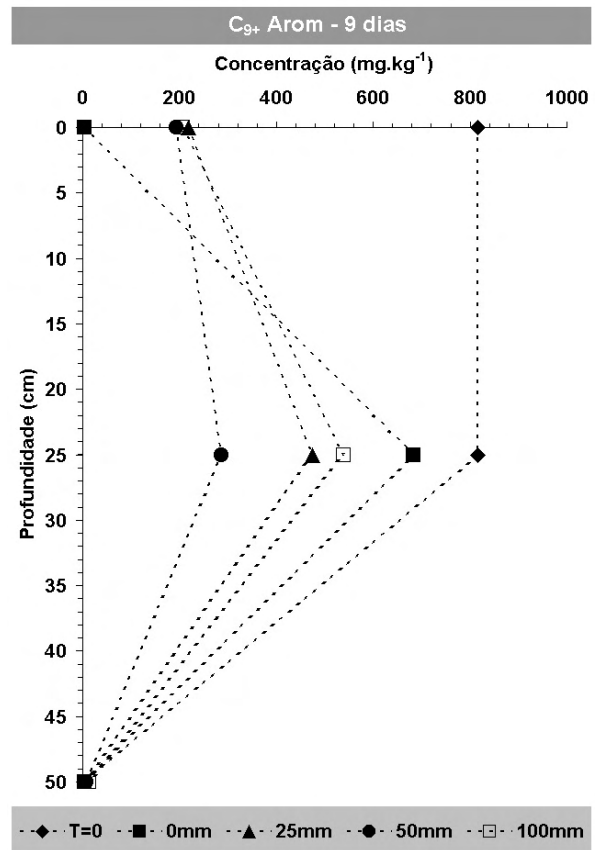
(c)



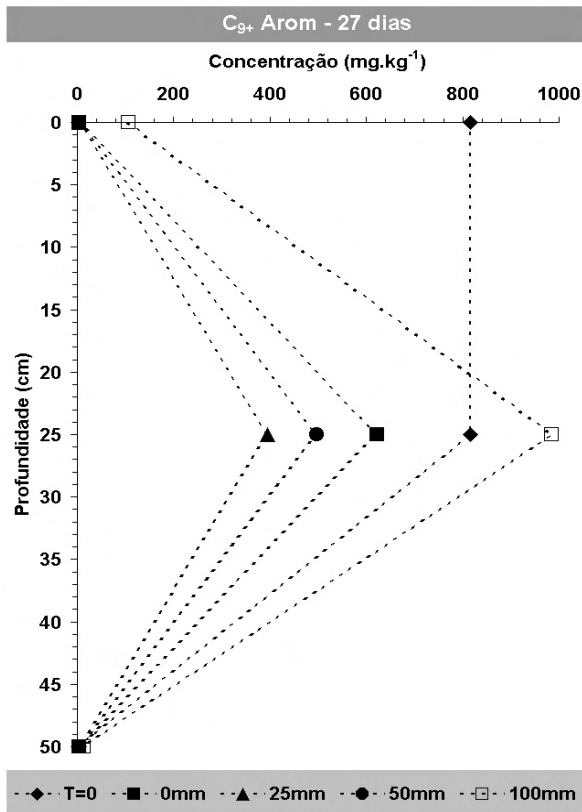
(d)



(e)



(f)



(g)

Figura 4.37: Alteração das concentrações de C₉₊ aromáticos nas diferentes profundidades em relação ao tempo e ao regime pluviométrico aplicado

4.1.11 Presença de Metais Pesados no Solo

A análise de metais pesados no solo foi um outro fator considerado no presente estudo, uma vez que estes componentes inibem/ alteram o funcionamento celular. Foram avaliados os metais cádmio, níquel, chumbo, cromo e mercúrio nos tratamentos realizados. O cádmio apresentou em todos os tratamentos concentrações inferiores a 1 mg/kg, assim como o níquel inferior a 5 mg/kg e o chumbo inferior a 10 mg/kg. Os valores citados são o limite inferior de detecção do equipamento de análise. O cromo oscilou em $5,7 \pm 0,6$ a $6,7 \pm 1,2$ mg/kg nos diversos tratamentos, e foi encontrado inicialmente tanto no solo “in natura” como no lodo originado da agroindústria. E o mercúrio oscilou em $0,01 \pm 0,01$ mg/kg nos diversos tratamentos, sendo 0,01 mg/kg o valor mínimo de detecção. Considerando os valores mínimos destes metais nos solos, recomendados pelo EPA, observamos que todos estes valores encontram-se dentro da faixa de normalidade.

4.2 ENSAIOS EM MODELO ANIMAL

4.2.1 Cromatografia Gasosa do Solo Utilizado nos Ensaios com Modelo Animal

Como já considerado no Capítulo 3, o solo utilizado nos experimentos com modelo animal foi analisado ao longo dos ensaios, sendo medidas as concentrações de hidrocarbonetos. A Figura 4.39 mostra as concentrações dos diferentes hidrocarbonetos medidos durante uma exposição de 24h, num período total de 72h. Observamos que as concentrações de benzeno, tolueno e MTBE decaem para valores mínimos (< 3 mg/kg solo) já nas primeiras 24h do início dos ensaios, fato similar ocorrendo com o C_8 aromático. Os C_{9+} aromáticos, por possuírem cadeias maiores, perduram por mais tempo no solo, apresentando teores menores que 50% da concentração inicial com 72h. Uma vez que diversos trabalhos mostram os BTEX, em especial o benzeno e tolueno como os hidrocarbonetos mais tóxicos da gasolina, poderíamos esperar poucos efeitos biológicos, ou até mesmo nenhum, a partir de 24 – 48h de ensaios. As Figuras 4.38 e 4.39 serão alvos de comparação para todos os ensaios realizados em modelo animal.

Em um segundo momento, buscou-se avaliar os efeitos cumulativos da exposição de animais a uma pior condição, sendo considerado o dobro do tempo previsto inicialmente, ou seja, 48h (Figura 4.39). Na ocasião, foi obtida uma nova amostra de gasolina da REFAP, que apresentou concentrações iniciais dos hidrocarbonetos medidos superiores a 3,5x a amostra utilizada anteriormente. Desta forma, não se pode inferir aumentos ou diminuições de algum fator analisado ao tempo de exposição exclusivamente, uma vez que, se houvesse alguma variação, poderia ser considerada também pela maior concentração. Entretanto, o fato de não haver alterações significativas poderia sugerir que o fator em estudo não se alteraria por aumentos de concentração ou tempo de exposição.

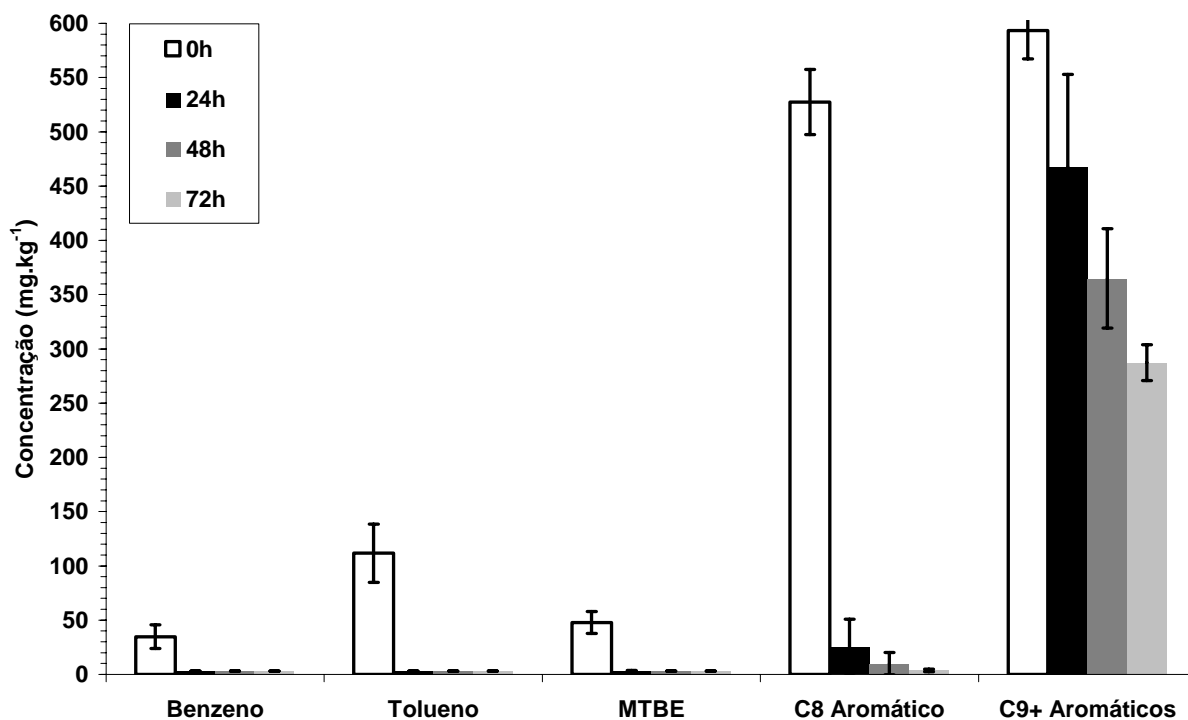


Figura 4.38: Concentração dos diferentes contaminantes no solo contaminado nos diversos tempos de estudo

4.2.2 Hemograma e Plaquetas

A Figura 4.40 apresenta as variações encontradas na contagem de células brancas (White Blood Cells), sendo possível se observar um amplo desvio padrão (valores \pm 1SD). O grupo de animais exposto às primeiras 24h ao solo contaminado sofreu um aumento de WBC significativo em relação ao controle ($P=0,011$), fato que não ocorreu com os demais grupos

de animais expostos aos contaminantes ($P > 0,05$). Entretanto, como discutido no item anterior, o grupo exposto a 48h cumulativas pode ter tido suas WBCs aumentadas nas primeiras 24h e ter retornado aos valores basais a seguir. Neste sentido, a exposição aos hidrocarbonetos poderia acarretar alterações reversíveis no que se refere a este parâmetro. O aumento nas células brancas, ou leucocitose, na maioria das vezes está relacionado a um processo inflamatório, sendo o principal diagnóstico diferencial da leucocitose a leucemia (Friedman, 1996). Leucócitos maduros usualmente indicam processo reativo ou leucemia crônica. A presença de blastos, ao contrário, é sugestiva de leucemia aguda. A presença de blastos no hemograma não foi contemplada no presente estudo. Entretanto, a histologia da medula óssea, que permite o diagnóstico de leucemia aguda, é vista no item 4.2.5 – Histologia da medula óssea, rins e pulmões. A leucocitose, de forma geral, pode ser associada a infecções agudas, intoxicações, hemorragia aguda, processo hemolítico agudo, doenças mieloproliferativas, necrose tissular e estados fisiológicos (exercícios físicos, estresse emocional, menstruação e parto)(Friedman, 1996; Guyton e Hall, 2002; Faillace, 2003; Wallach, 2000).

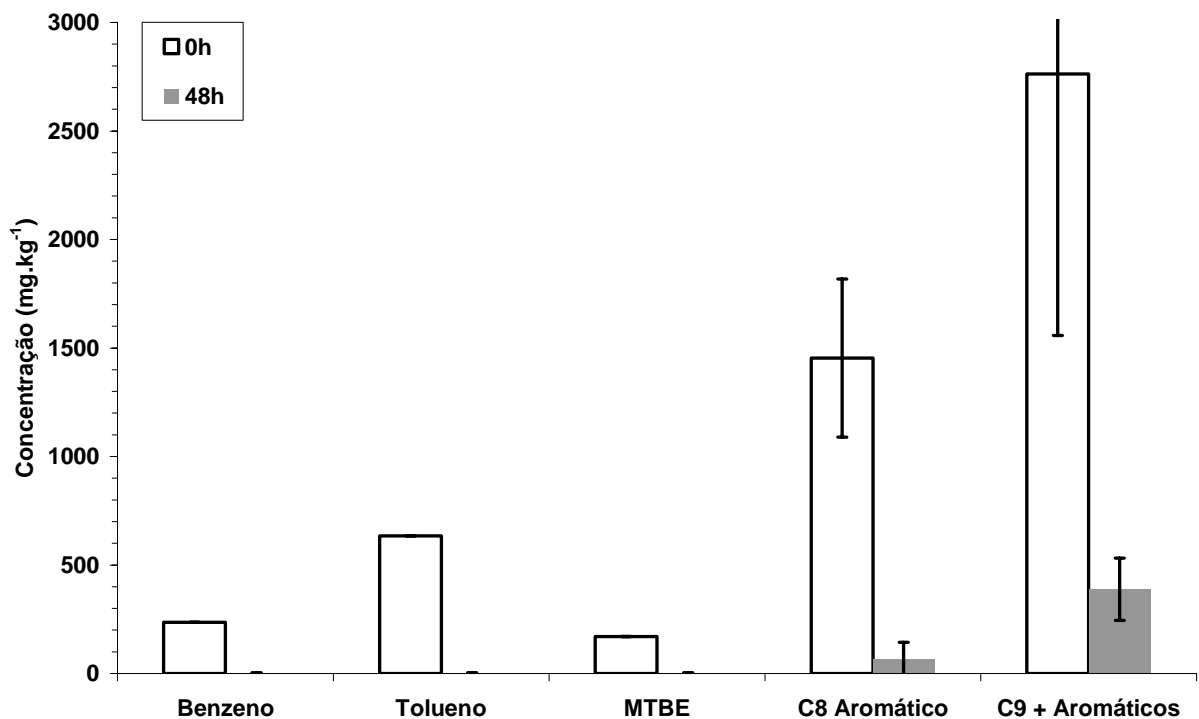


Figura 4.39: Concentração dos diferentes contaminantes no solo contaminado nos tempos inicial e com 48h

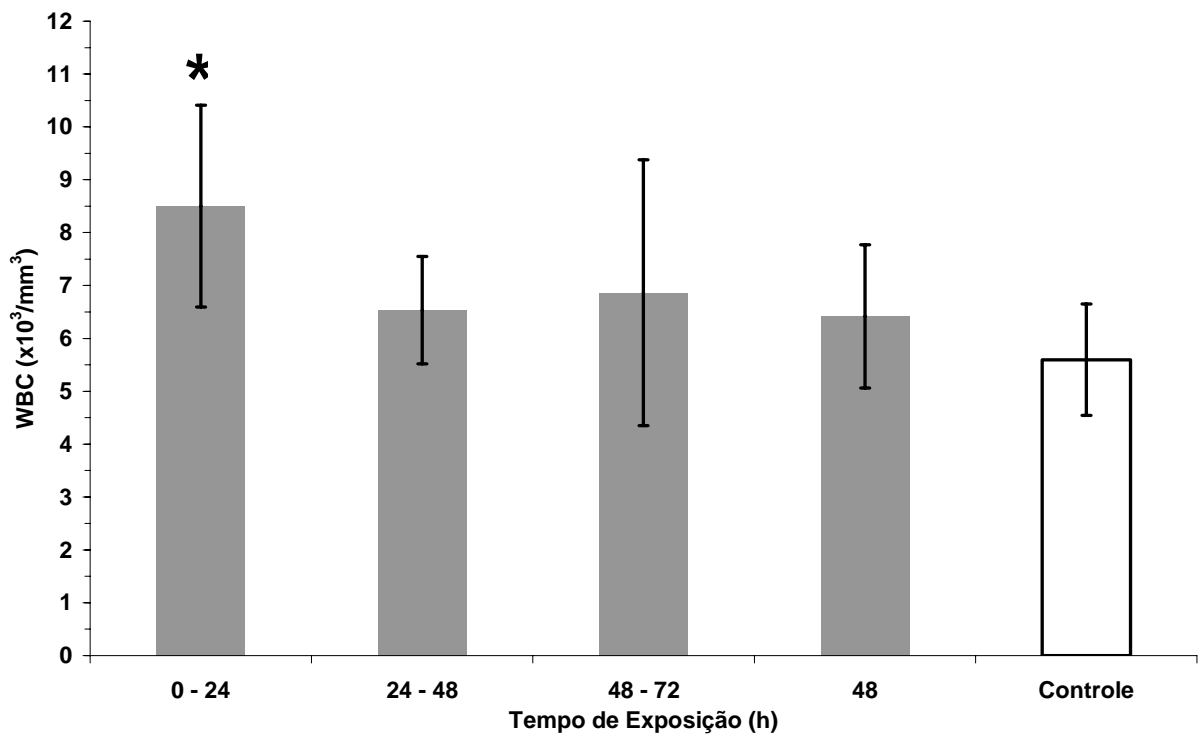


Figura 4.40: Alterações no WBC dos animais durante o período de ensaios ($P=0,011$ para o controle)

A análise das células vermelhas (Red Blood Cells, Figura 4.41), da hemoglobina (Hb, Figura 4.42), do volume corpuscular médio (VCM, Figura 4.44), da hemoglobina corpuscular média (HCM, Figura 4.45) e da concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM, Figura 4.46) não mostrou qualquer alteração significativa ($P>0,05$) para qualquer que seja o grupo em estudo. Da mesma forma, não há qualquer efeito cumulativo em relação a estes parâmetros. Aparentemente, nem mesmo um maior período de exposição a um processo de biorremediação ou maiores concentrações causaria alguma alteração e, caso tenha causado, voltou aos valores basais no tempo de coleta (incluindo o grupo exposto por 48h), tempo este em que não há mais benzeno, tolueno e C_8 aromáticos.

O hematócrito (Hct, Figura 4.43) sofreu uma redução significativa ($P<0,02$) nas primeiras 48h nos grupos expostos à gasolina em processo de biorremediação em relação ao grupo exposto no período 48-72h. De fato foi observada uma diminuição no volume de urina dos animais neste período (analisado posteriormente), podendo justificar o ocorrido por hemodiluição. As alterações, entretanto, apesar de significativas estatisticamente, não o são fisiologicamente, pois não acarretam modificações hemodinâmicas (Goldman e Bennett, 2001; Guyton e Hall, 2002; Faillace, 2003). Inclusive, estas alterações não apresentam

diferenças estatisticamente significativas para o controle ($P>0,05$). Conforme Friedman (1996), os valores de hemoglobina e hematócrito encontram-se normais ou próximos da normalidade na leucocitose reativa e nas leucemias crônicas.

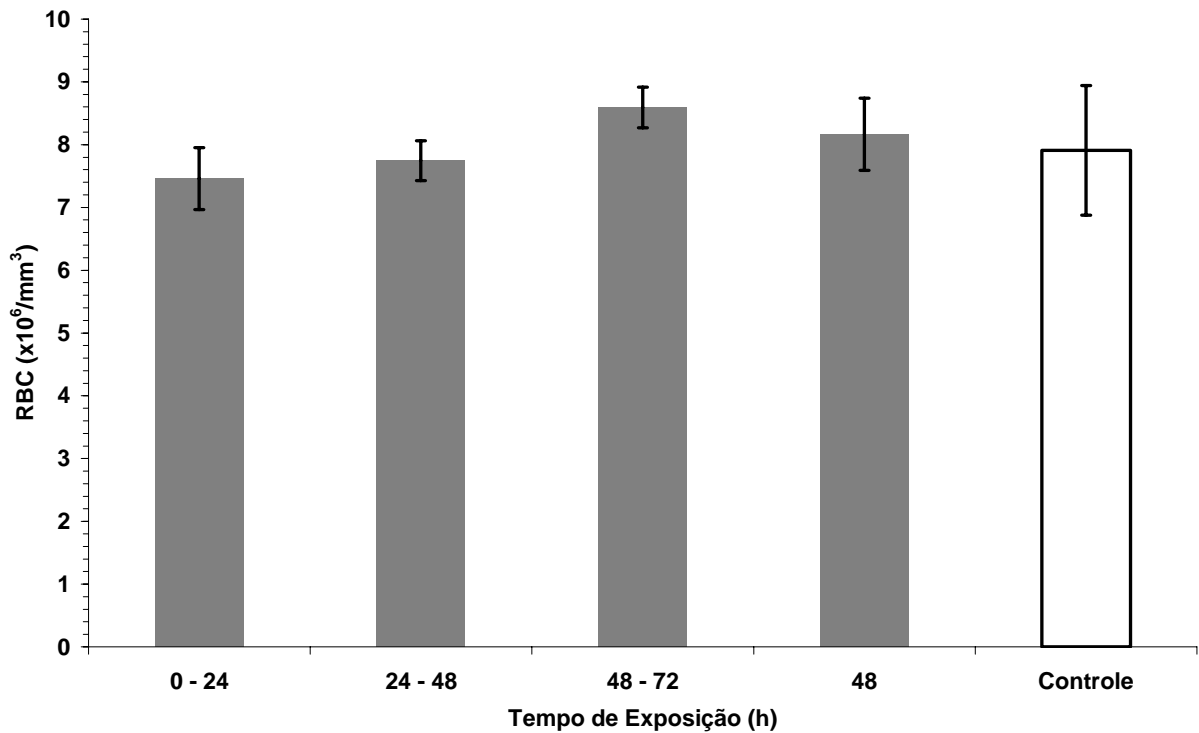


Figura 4.41: Alterações no RBC dos animais durante o período de ensaios

A Figura 4.47 mostra as alterações que ocorrem com as plaquetas no grupo de animais expostos nas primeiras 24h ao experimento ($P=0,01$). A redução de plaquetas foi acompanhada por alterações medulares, vistas na histologia adiante. No grupo exposto por 48h cumulativas, parece que o organismo dos animais conseguiu reverter o quadro ao final do período de exposição, visto que se pode observar uma leve redução nas plaquetas sem diferenças significativas para o grupo controle ($P>0,05$), mostrando que mesmo uma maior concentração pode ser eliminada do organismo sem efeitos permanentes em uma exposição aguda.

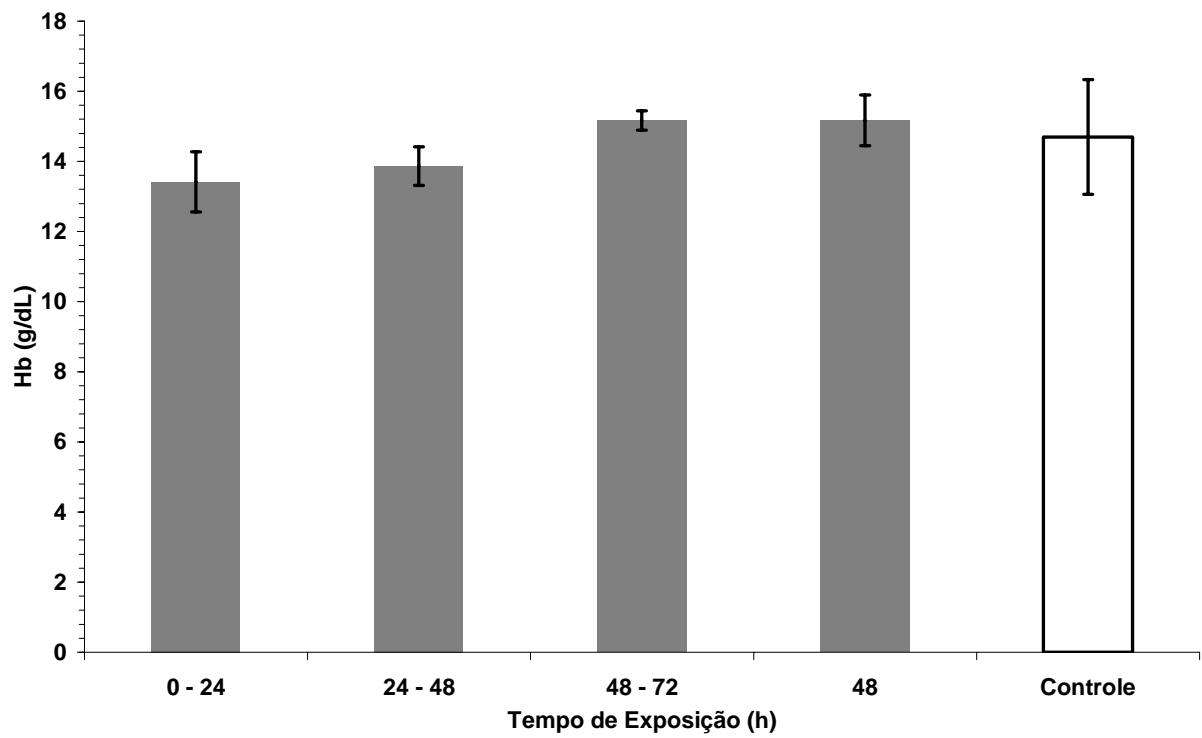


Figura 4.42: Alterações na hemoglobina dos animais durante o período de ensaios

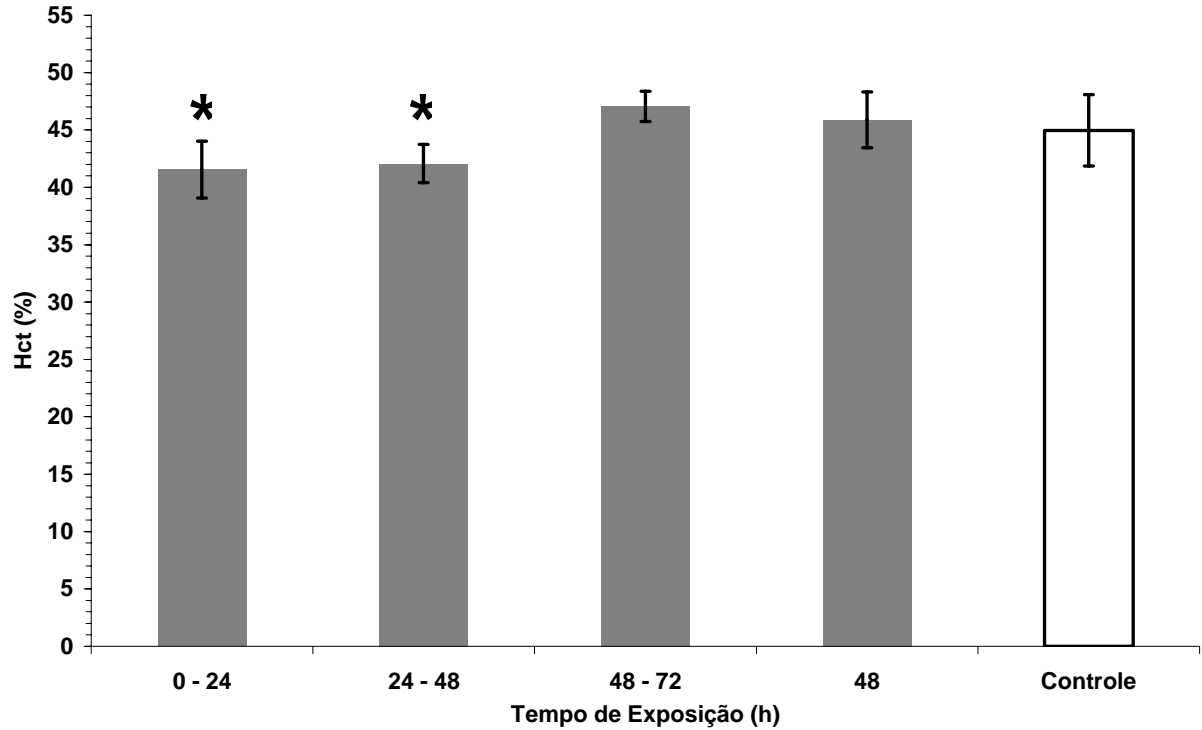


Figura 4.43: Alterações no hematócrito dos animais durante o período de ensaios ($P < 0,02$ para o grupo 48-72h)

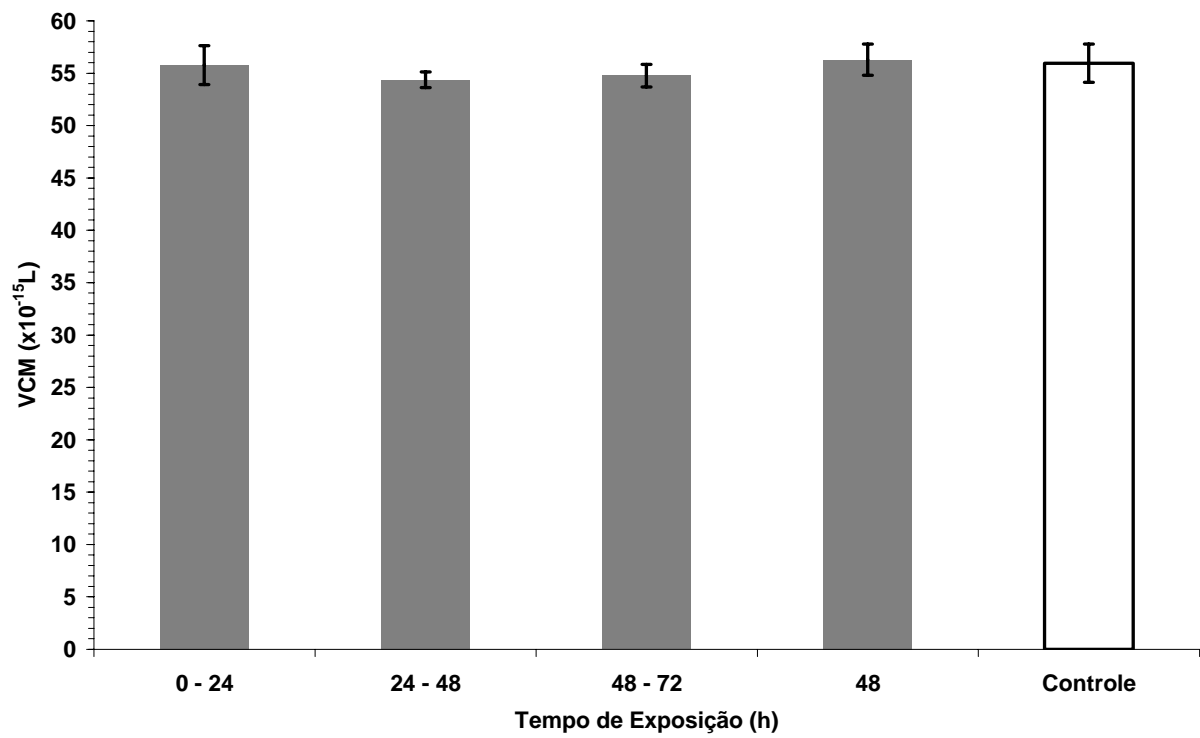


Figura 4.44: Alterações no VCM dos animais durante o período de ensaios

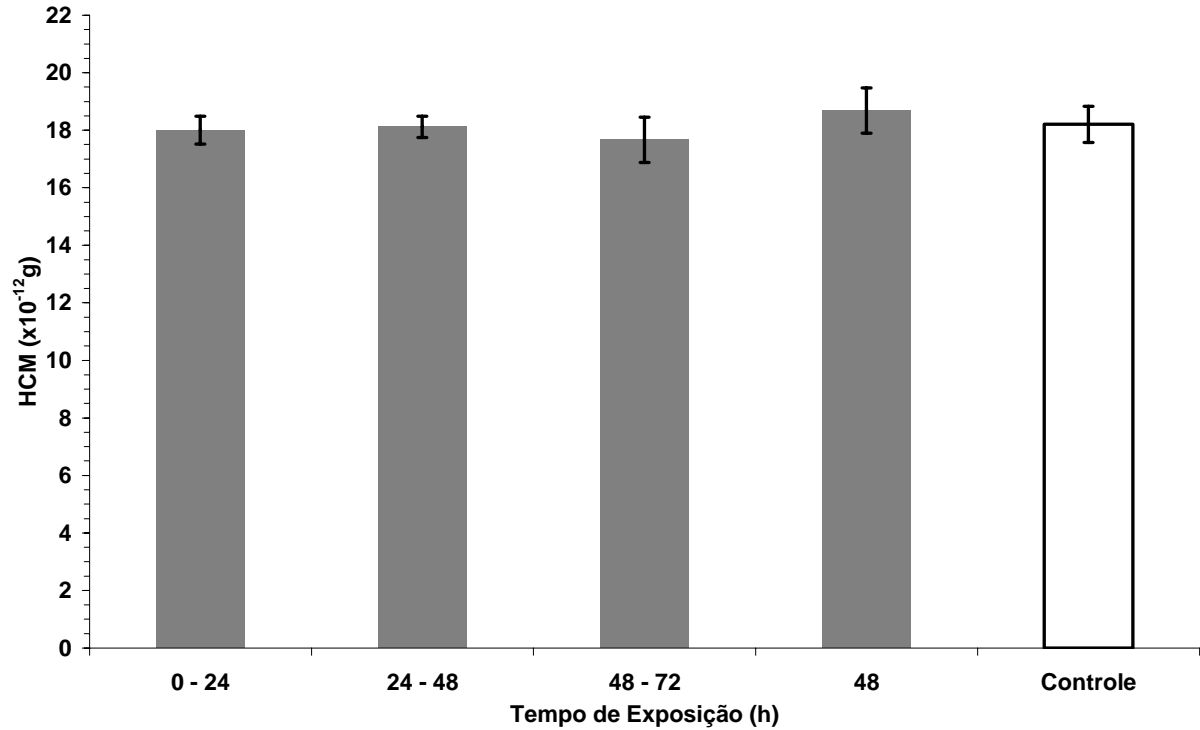


Figura 4.45: Alterações no HCM dos animais durante o período de ensaios

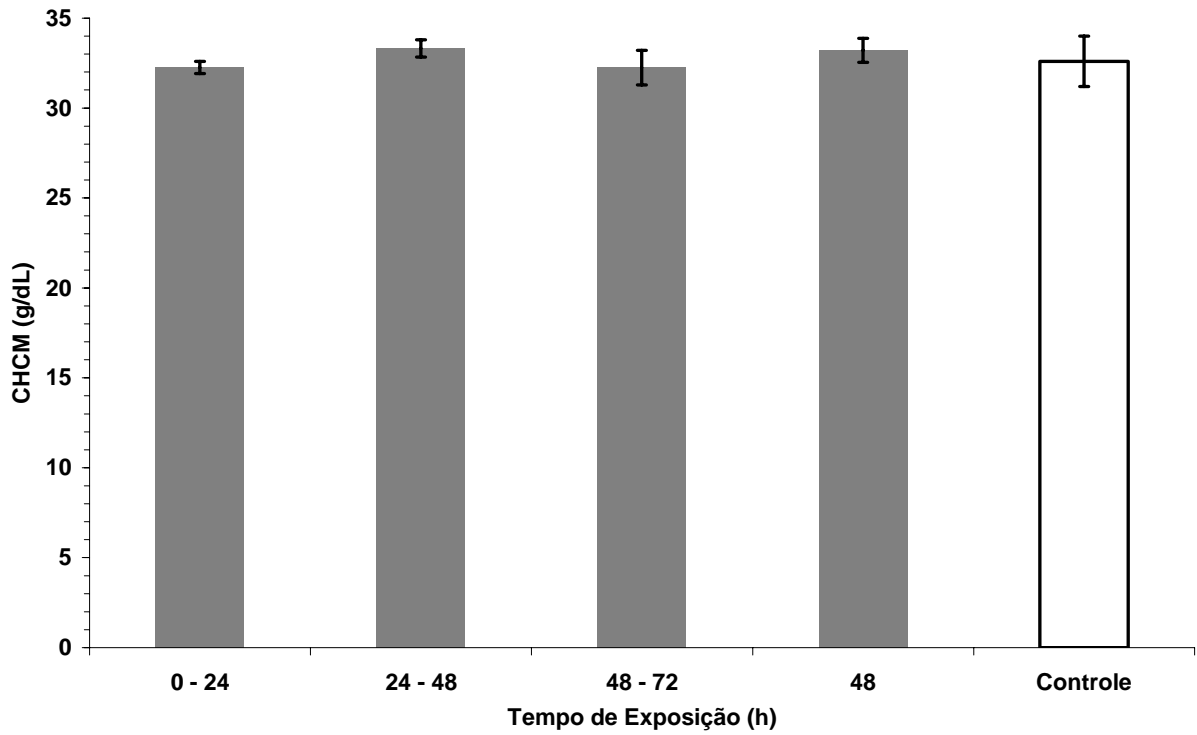


Figura 4.46: Alterações no CHCM dos animais durante o período de ensaios

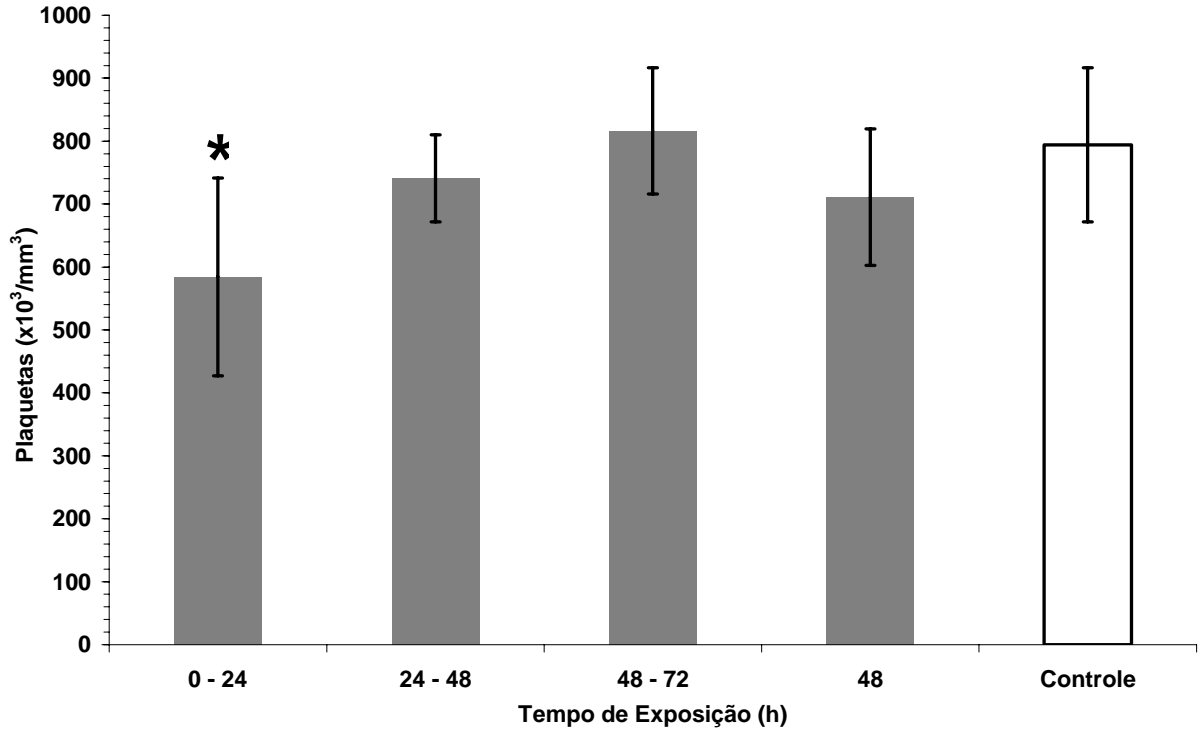


Figura 4.47: Alterações nas plaquetas dos animais durante o período de ensaios ($P=0,010$ para grupo 48-72h e controle)

A redução de plaquetas em um organismo, ou plaquetopenia, pode ser causada por toxicidade direta à produção de plaquetas (Friedman, 1996). Sangramento pode ocorrer com contagens muito baixas ou muito altas de plaquetas. Essas aderem ao endotélio vascular avariado através do contato com o colágeno subendotelial. A adenosina difosfato (ADP) formada a partir dos grânulos citoplasmáticos das plaquetas participa na indução da agregação e coesão. Ao mesmo tempo, os fosfolipídeos (fator 3 plaquetário) e outros constituintes celulares secretados ativam o fator XII de Hageman, que por sua vez, ativa a via intrínseca da cascata de coagulação (Friedman, 1996; Goldman e Bennett, 2001; Guyton e Hall, 2002; Nelson e Cox, 2002). A plaquetopenia pode também estar relacionada a efeitos de agregação plaquetária, causadas pela gasolina, talvez causando uma síndrome do tipo resposta inflamatória sistêmica. Futuros trabalhos poderiam contemplar esta consideração.

De forma inversa, a Figura 4.48 mostra o aumento no número de linfócitos que ocorre no grupo de animais expostos nas primeiras 24h ao experimento ($P=0,031$). No grupo exposto por 48h cumulativas, parece que o organismo dos animais conseguiu manter o número de linfócitos ao final do período de exposição, sem diferenças significativas para o grupo controle ($P>0,05$), mostrando que, de forma similar ao que ocorre com as plaquetas, mesmo uma maior concentração de hidrocarbonetos pode ser eliminada do organismo sem efeitos permanentes em uma exposição aguda.

O aumento de linfócitos em um organismo, ou linfocitose, é mais comum em crianças e é usualmente um achado não-específico associado a infecções virais. Nos adultos, a linfocitose tem uma especificidade maior e conseqüentemente um maior valor diagnóstico. Os mecanismos da linfocitose não são bem conhecidos (Friedman, 1996; Goldman e Bennett, 2001; Wallach, 2000). Pode ter como causas infecções virais (varicela, rubéola, herpes simples, influenza, mononucleose infecciosa, hepatite infecciosa, citomegalovírus), bacterianas (tuberculose, pertussis), síndromes pós-transfusão, toxoplasmose, indução por drogas (ácido para-amino salicílico, difenil-hidantoína, mefentoína) ou ainda outras, como leucemia linfocítica crônica (Friedman, 1996; Wallach, 2000).

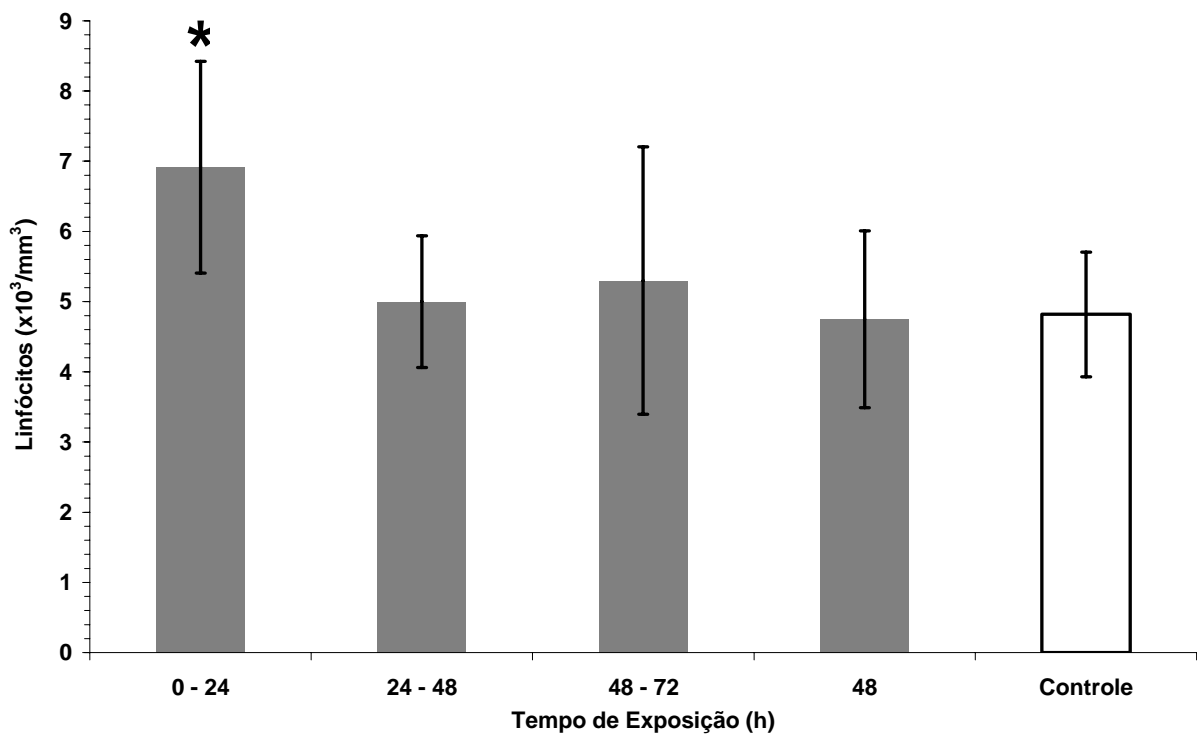


Figura 4.48: Alterações nos linfócitos dos animais durante o período de ensaios ($P=0,031$ para o grupo controle)

4.2.3 Creatinina e Uréia Sérica e Urinária, AST, ALT, γ GT, Fosfatase Alcalina, Proteínas Totais e Proteinúria, Sódio, Potássio, Glicose, LDH, CPK, CPK-MB, Troponina “I” e Cálcio Total

Antes de iniciar as análises dos parâmetros acima mencionados, é interessante observar que os animais ensaiados, os ratos Wistar, não apresentaram qualquer nível de gama-glutamil transferase (γ GT) detectável, até mesmo em grupos expostos aos contaminantes, ficando este parâmetro, portanto, fora das análises.

A Figura 4.49 apresenta o estudo da creatinina sérica dos animais nos tempos de ensaios. Como se pode observar, não houve qualquer variação significativa ($P>0,05$) entre os grupos, mostrando que a creatinina sérica não se modifica em exposição aguda aos hidrocarbonetos estudados. Não há, portanto, alteração da função renal significativa. O estudo complementar por histologia mostrará que existem pequenas alterações celulares nos grupos expostos ao pior tempo de contaminação, ou seja, nas primeiras 24h.

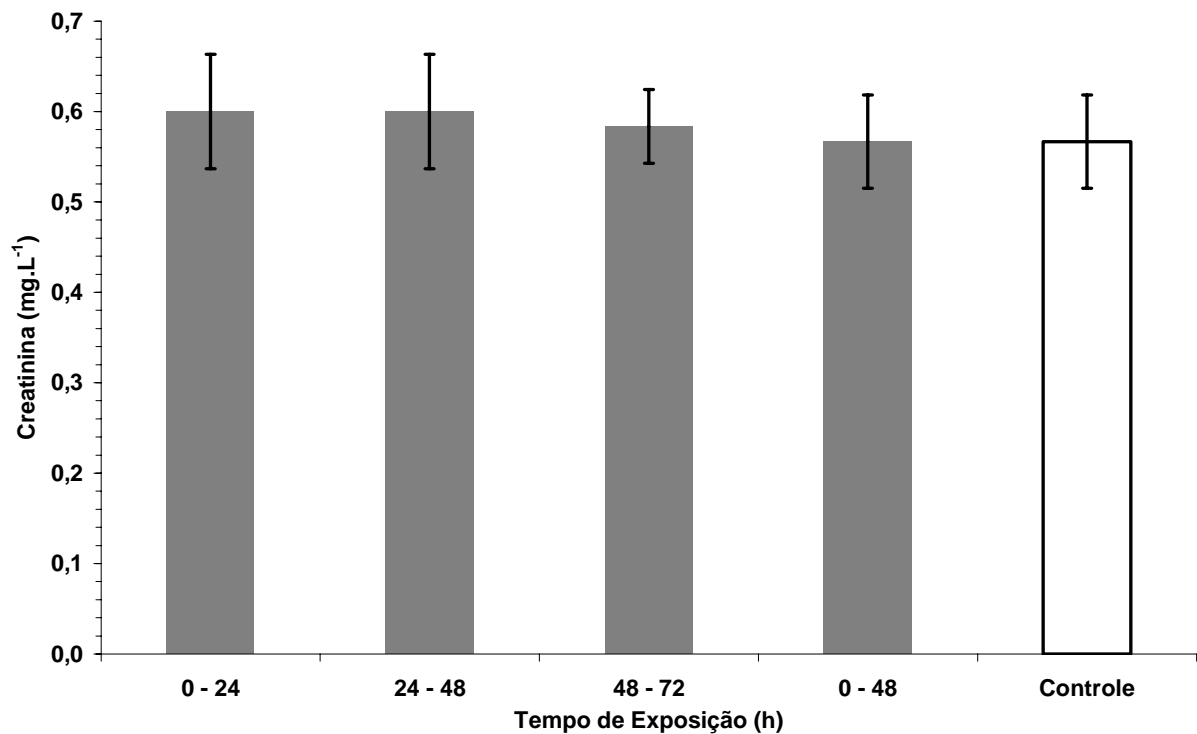


Figura 4.49: Alterações na creatinina sérica dos animais durante o período de ensaios

A Figura 4.50 mostra as alterações que ocorrem na creatinina urinária ao longo do período de ensaios. A análise estatística não foi considerada neste grupo porque houve problemas na coleta de urina nos primeiros grupos. No tempo 24h tivemos duas coletas e no tempo 24-48h apenas uma coleta foi possível. Considerando a imensa variação deste parâmetro, vista pelo tempo 48-72h, infelizmente esta variável não pode ser considerada para estudo. A Figura fica, entretanto, para uso em novas pesquisas, que adicionem novos valores a estes. A média normal destes ratos é 45 mg/L.

A Figura 4.51 mostra as alterações da uréia excretada pela urina. Da mesma forma que a creatinina urinária, este parâmetro também não pode ser avaliado, uma vez que houve dificuldades de coleta de urina, principalmente nos primeiros grupos, com média no grupo controle de 2700 mg/dL.

A Figura 4.52 mostra uma diminuição da uréia sérica no grupo exposto a 48h cumulativas ao processo de biorremediação. Novamente, pode ser considerado que a variável pode ter reduzido não apenas pelo tempo de exposição, mas pela maior concentração da gasolina.

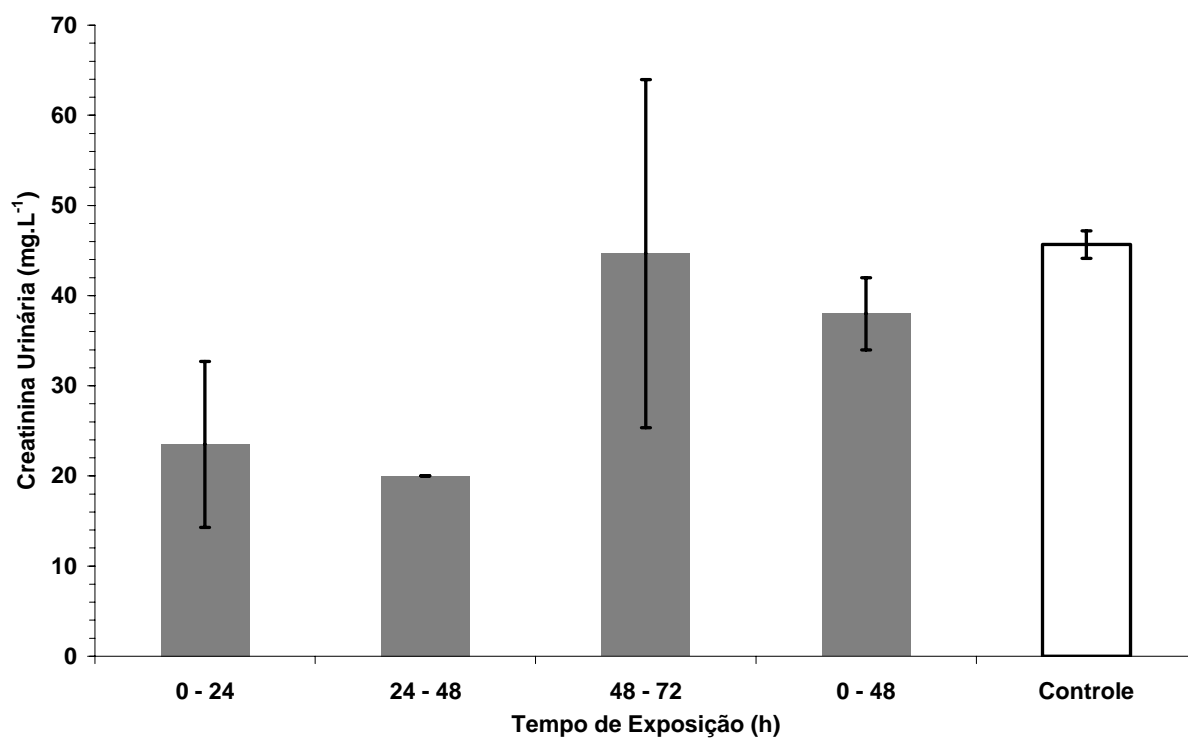


Figura 4.50: Alterações na creatinina urinária dos animais durante o período de ensaios

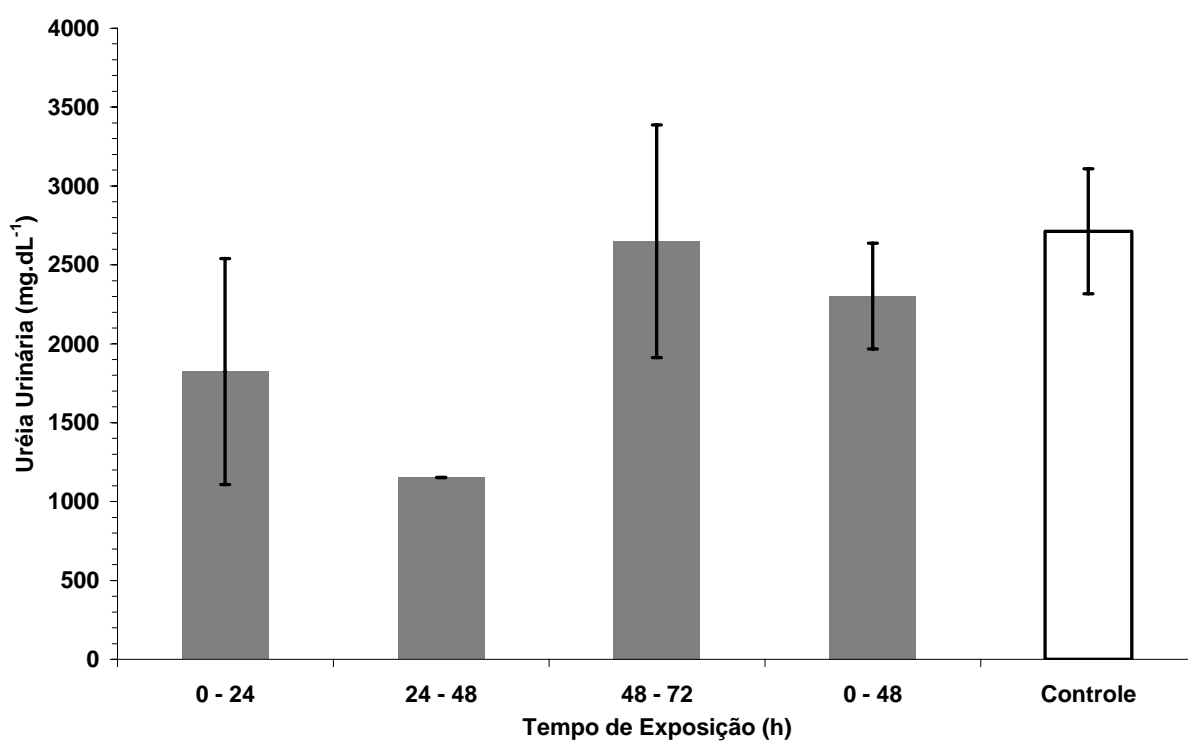


Figura 4.51: Alterações na uréia excretada pela urina dos animais durante o período de ensaios

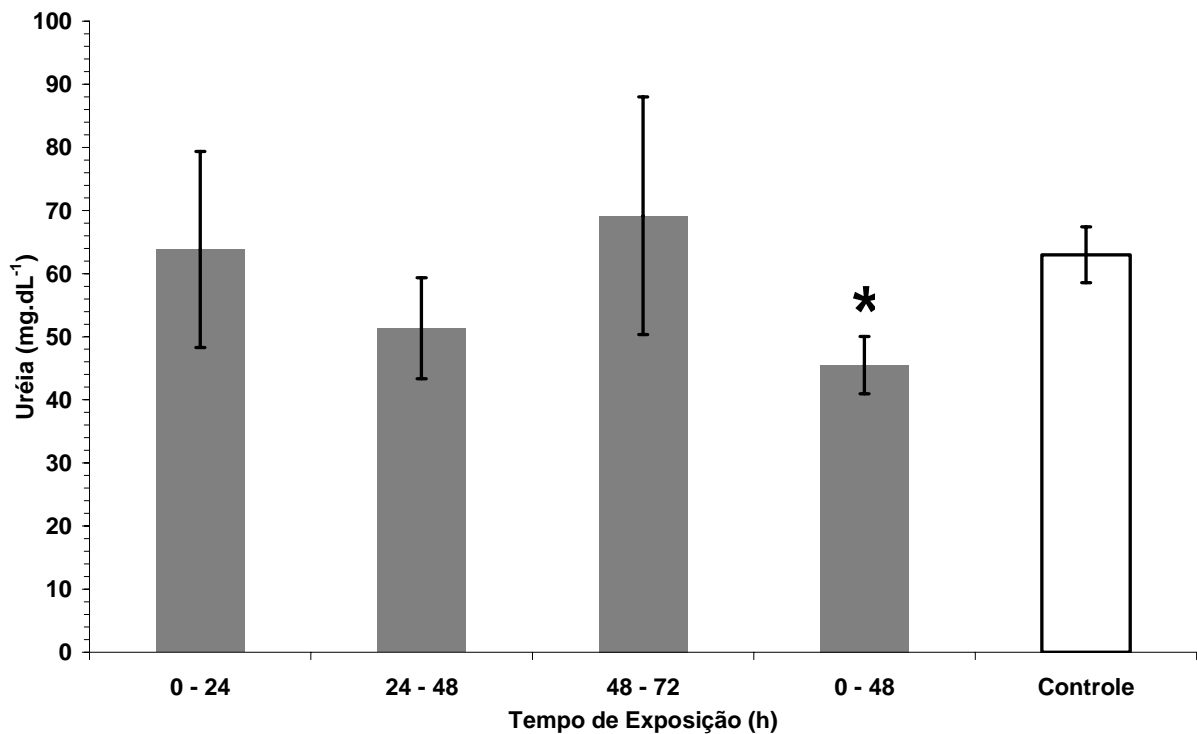


Figura 4.52: Alterações na uréia sérica dos animais durante o período de ensaios ($P < 0,02$ para grupo controle)

A produção catabólica de amônia tem uma séria repercussão bioquímica, porque é muito tóxica. As bases moleculares dessa toxicidade não são inteiramente compreendidas. Nos seres humanos, a uremia pode causar manifestações gastrointestinais (anorexia, náuseas, vômitos, diarreias), manifestações do sistema nervoso central (desde alterações do sensorio até coma), alterações cardiovasculares e pulmonares (Friedman, 1996; Nelson e Cox, 2002). No presente estudo parece haver uma excreção maior de uréia pelo organismo, uma vez que já existem outros tóxicos séricos provindos da gasolina. Entretanto, considerando a variação dos outros grupos e a pequena variação fisiológica (50 – 65 mg/dL), a alteração encontrada no grupo exposto por 48h não parece ter um significado importante do ponto de vista fisiológico.

As Figuras 4.53 e 4.54 mostram as variações da AST e da ALT nos animais durante os ensaios. A AST possui uma menor dispersão de valores, e é possível se observar que o grupo exposto por 48h cumulativas apresentou um aumento da variável ($P < 0,05$) em relação aos grupos 0-24h e 48-72h, mas não em relação ao grupo controle ($P > 0,05$). Muitos hidrocarbonetos são degradados no fígado e excretados pela urina. No caso de uma maior concentração ou maior tempo de exposição poderia-se esperar uma sobrecarga dos contaminantes para o fígado metabolizar, acarretando lesões nos hepatócitos. Entretanto, a

Figura 4.54 mostra que a ALT possui uma grande dispersão da normalidade, não ocorrendo qualquer alteração significativa entre os grupos ($P>0,05$).

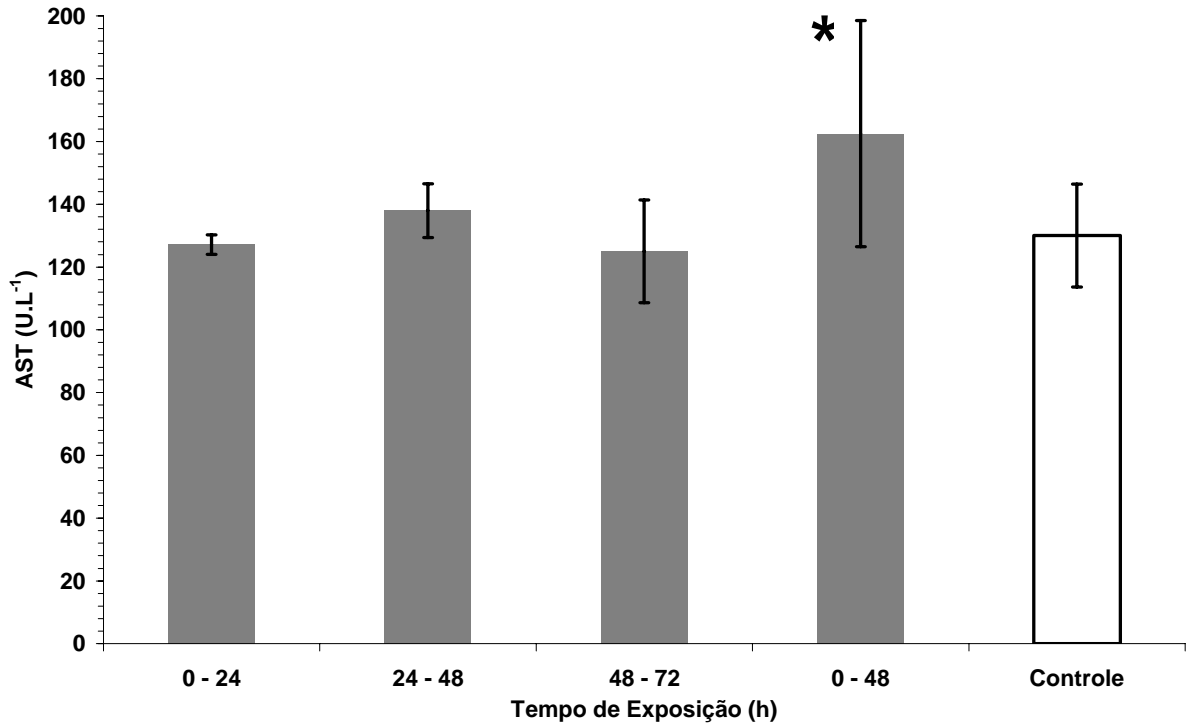


Figura 4.53: Alterações na AST dos animais durante o período de ensaios ($P<0,05$ para grupos 0-24h e 48-72h)

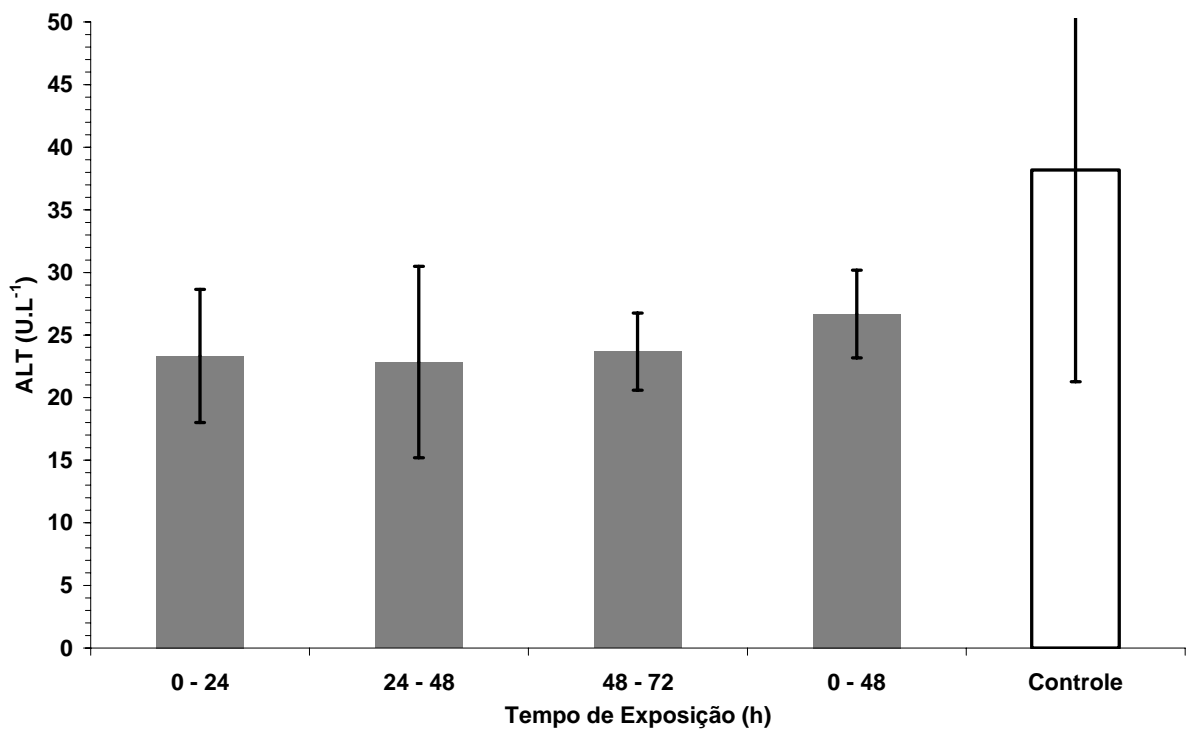


Figura 4.54: Alterações na ALT dos animais durante o período de ensaios

A AST é encontrada nos seguintes órgãos em ordem de concentrações decrescentes: coração, fígado, músculo esquelético, rim e pâncreas. A ALT, apesar de distribuída por todo o organismo, é predominantemente confinada ao fígado, sendo mais específica para doenças deste órgão. Ambos os testes são indicadores sensíveis da necrose hepatocelular. De forma geral, valores 10 vezes maiores que o limite superior do normal indicam lesão hepatocelular, como nos casos de hepatite viral, hepatite induzida por drogas ou outros tóxicos, doenças isquêmicas do fígado ou colangite (Friedman, 1996; Wallach, 2000). Elevações inferiores são menos específicas, podendo, no caso deste estudo, ser até mesmo fisiológico, ou ainda indicar o início de lesão do coração, músculo esquelético, rim ou pâncreas pelo aumento da AST.

As Figuras 4.55, 4.56, 4.57, 4.58 e 4.59 apresentam os estudos de fosfatase alcalina, proteínas totais no soro, proteínas urinárias, sódio e potássio, respectivamente. Em nenhuma destas análises ocorreram diferenças significativas entre os grupos de estudo ($P > 0,05$). Em relação a figura que apresenta proteínas urinárias, devemos fazer as mesmas considerações já feitas para creatinina e uréia urinária, por problemas de amostragem, não podendo-se excluir futuras análises desta variável. Pequenas variações ocorreram dentro de cada grupo, todas de caráter fisiológico, dentro da normalidade.

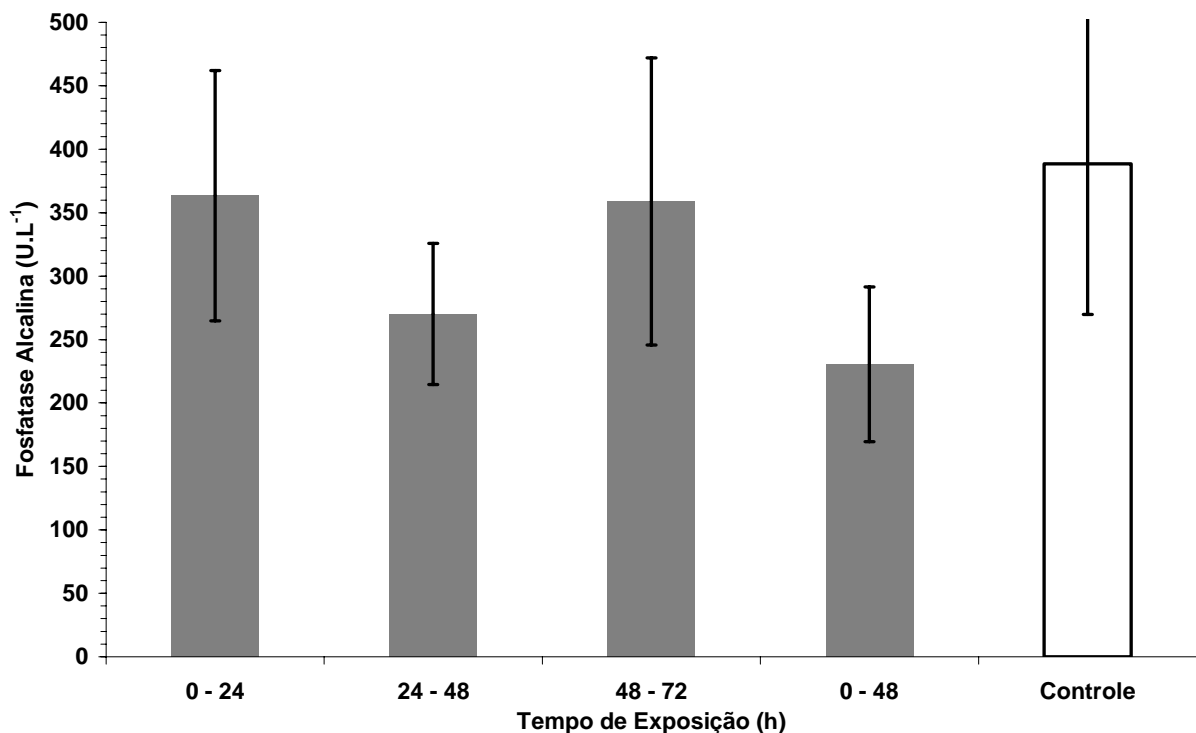


Figura 4.55: Alterações na fosfatase alcalina dos animais durante o período de ensaios

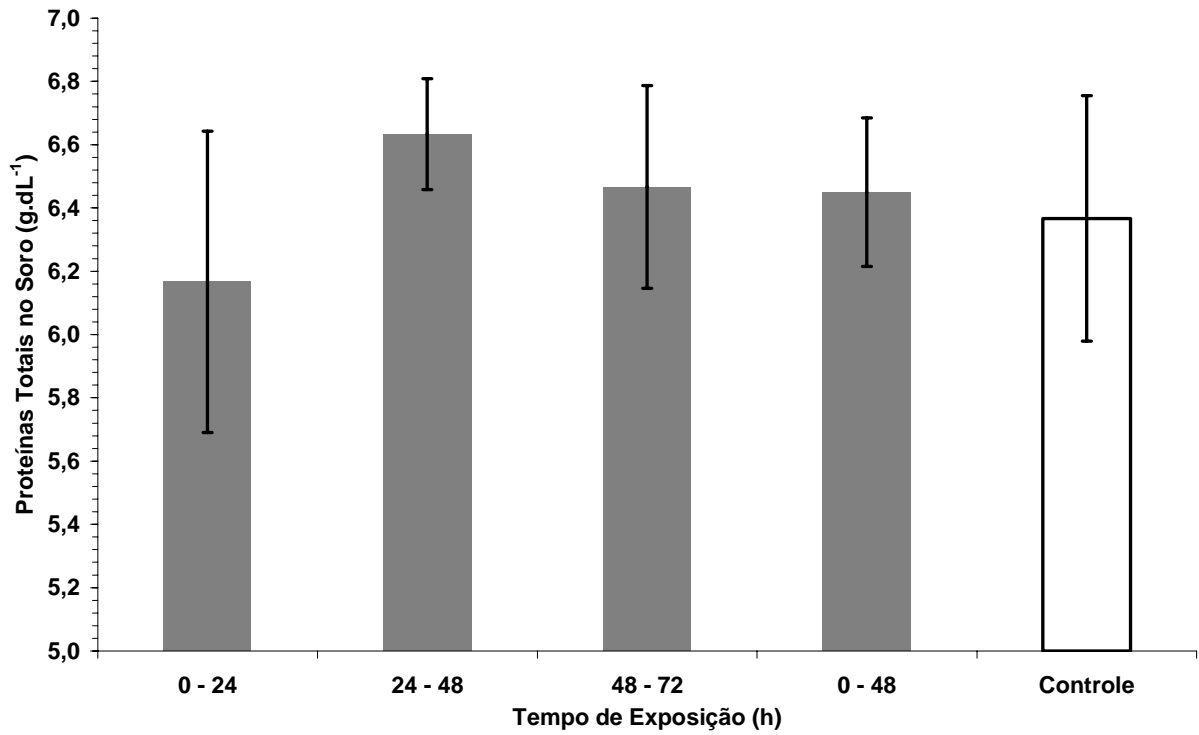


Figura 4.56: Alterações nas proteínas totais no soro dos animais durante o período de ensaios

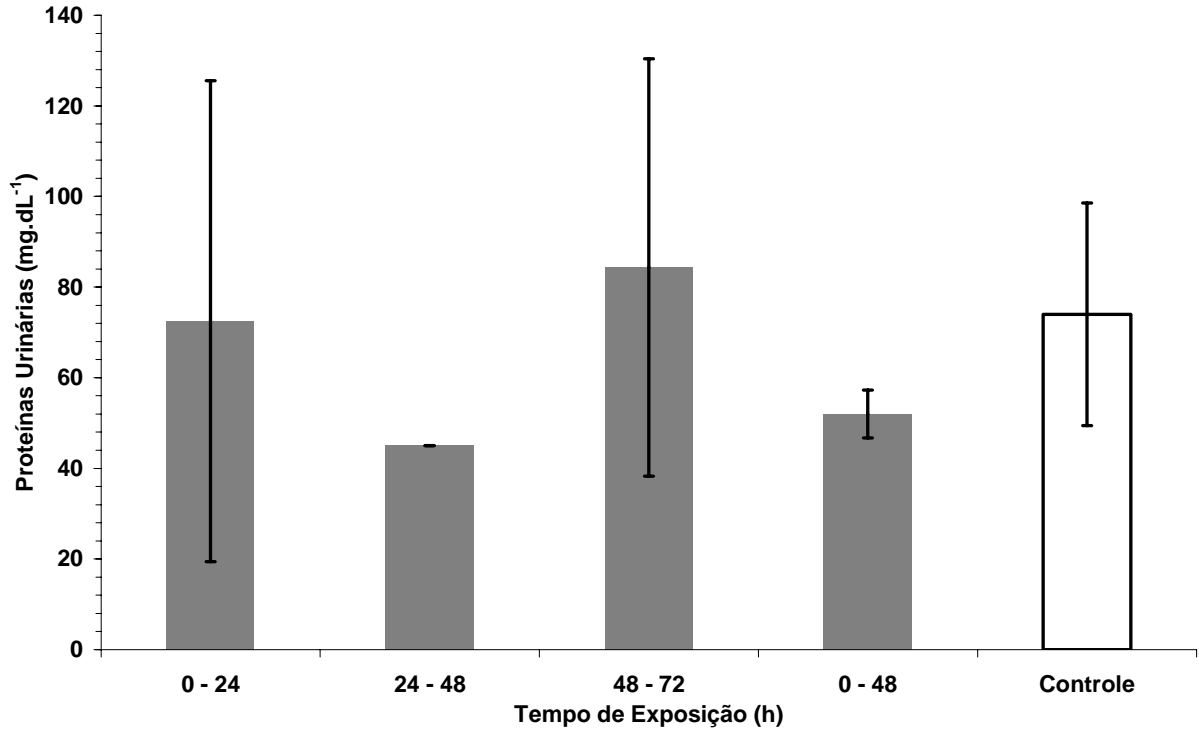


Figura 4.57: Alterações nas proteínas urinárias dos animais durante o período de ensaios

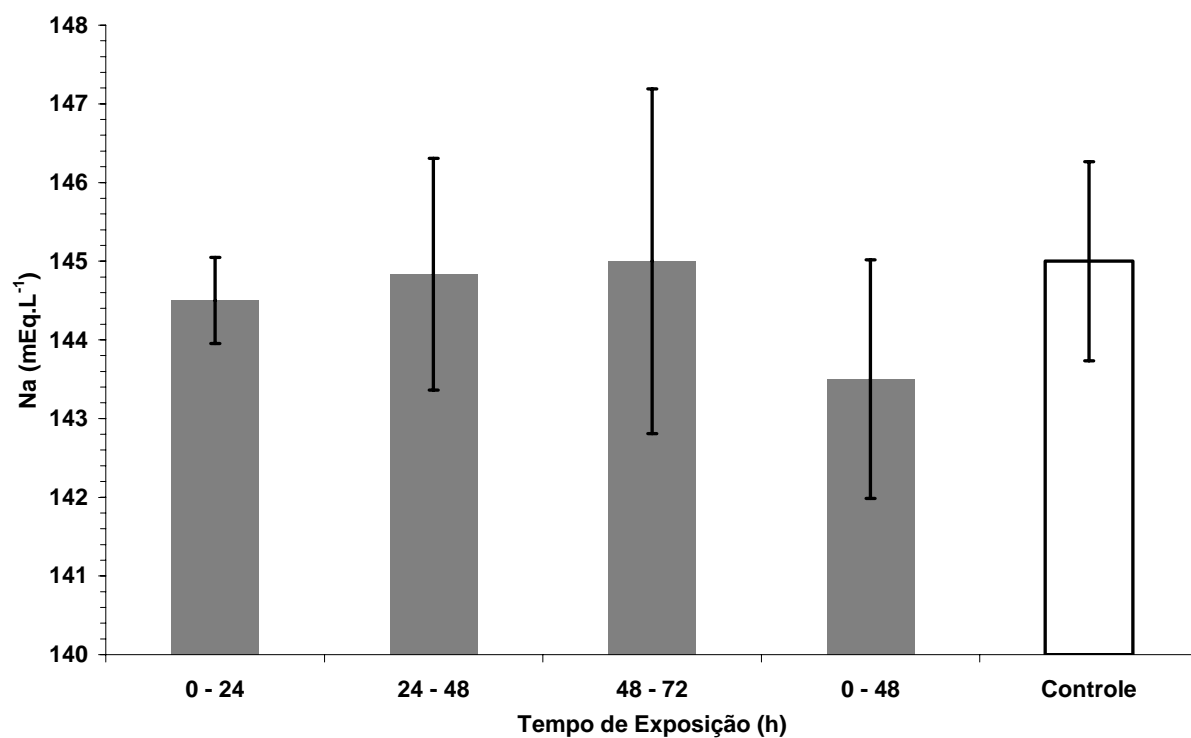


Figura 4.58: Alterações do sódio dos animais durante o período de ensaios

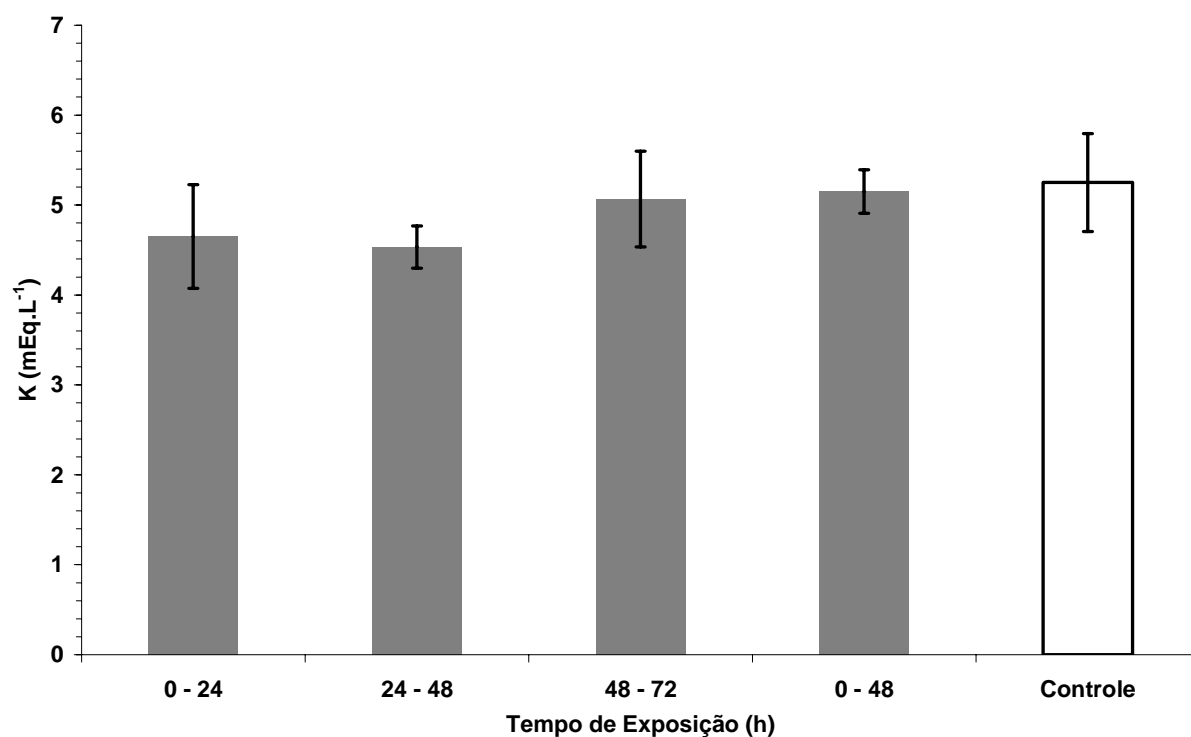


Figura 4.59: Alterações do potássio dos animais durante o período de ensaios

A Figura 4.60 ilustra as variações ocorridas para a glicose nos diferentes grupos. Aparentemente, os animais expostos à aspiração de hidrocarbonetos de gasolina utilizam mais

glicose no seu metabolismo, principalmente quando observamos que os animais submetidos por 48h cumulativas diminuem significativamente ($P < 0,05$) a sua glicemia. De forma geral, apesar do grupo exposto às primeiras 24h não diminuir sua glicose com significância estatística, é possível se observar uma diminuição em relação aos grupos controle e 48-72h. Foi pensada a possibilidade de se medir concomitantemente o lactato e o bicarbonato, de forma a se verificar acidose/alcalose metabólicas associadas à falta de glicose disponível durante a metabolização dos hidrocarbonetos, fato que não foi possível porque não havia disponibilidade de equipamentos de gasometria. Fica a idéia para futuros trabalhos.

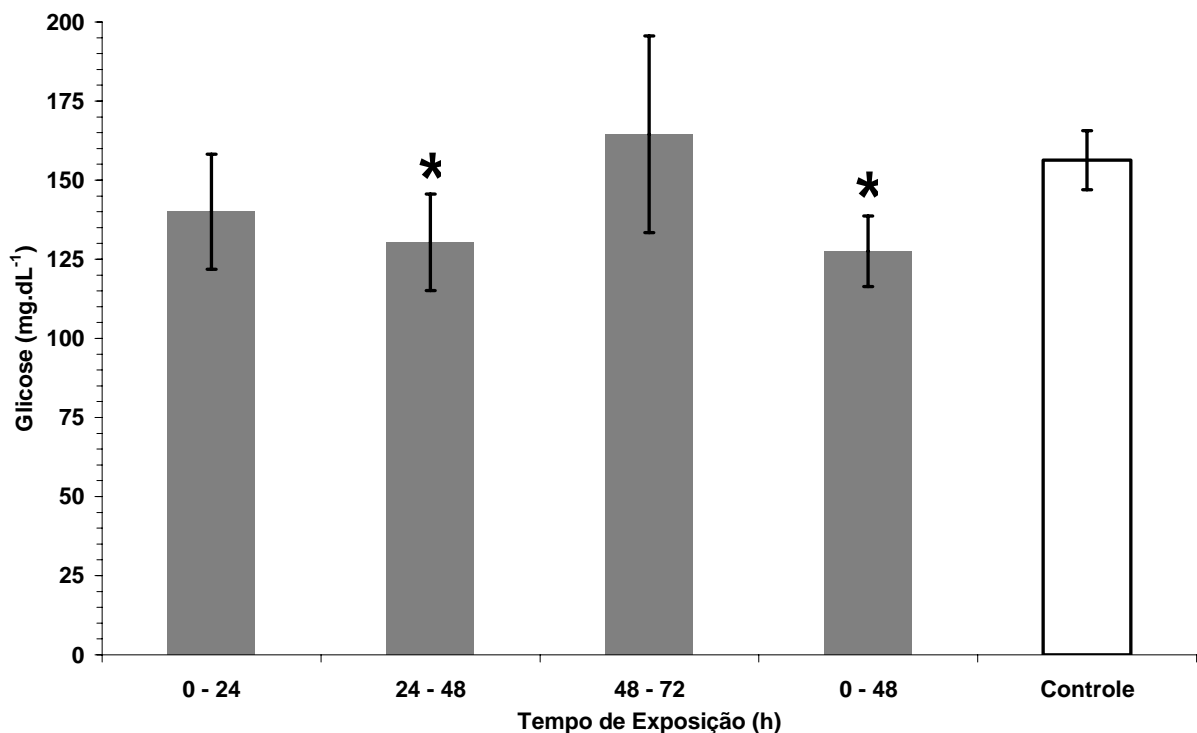


Figura 4.60: Alterações da glicose dos animais durante o período de ensaios ($P < 0,05$ para grupo controle)

A Figura 4.61 apresenta a variação de lactato desidrogenase (LDH) nos diversos grupos e períodos de tratamento. O único grupo que apresentou diferença significativa para os demais ($P < 0,02$) foi o grupo de animais expostos por 48h cumulativas. A mesma consideração anteriormente relatada continua valendo, ou seja, a maior concentração ou o maior tempo de exposição causam, neste caso, lesão celular. A LDH é responsável pela conversão de lactato a piruvato no citosol, auxiliada pela NAD^+ que se converte em $NADH + H$ (Nelson e Cox, 2002), como já visto no Capítulo 2, sendo um bom indicativo de lesão celular. Como o miocárdio possui transaminases, LDH, creatinaquinase e frações (CPK e CPK-MB) e

proteínas específicas (troponina “T”), poderíamos considerar o aumento da LDH, da AST e leucocitose um indicativo de que possa ter ocorrido lesão do miocárdio nos animais, sugerindo-se a investigação de CK, CK-MB e troponina “T”. Os três parâmetros foram analisados e não foram encontradas quaisquer diferenças significativas entre os grupos ($P>0,05$), mostrando que aparentemente não há lesão cardíaca (Figuras 5.62, 5.63 e 5.64). Além do infarto do miocárdio, a LDH em humanos encontra-se aumentada em anemia perniciosa, crise de células falciformes, hepatite em fase precoce, linfoma maligno, lúpus eritematoso sistêmico, dermatomiosites, câncer de próstata e embolia e infarto pulmonar (Friedman, 1996; Goldman e Bennett, 2001; Guyton e Hall, 2002; Wallach, 2000).

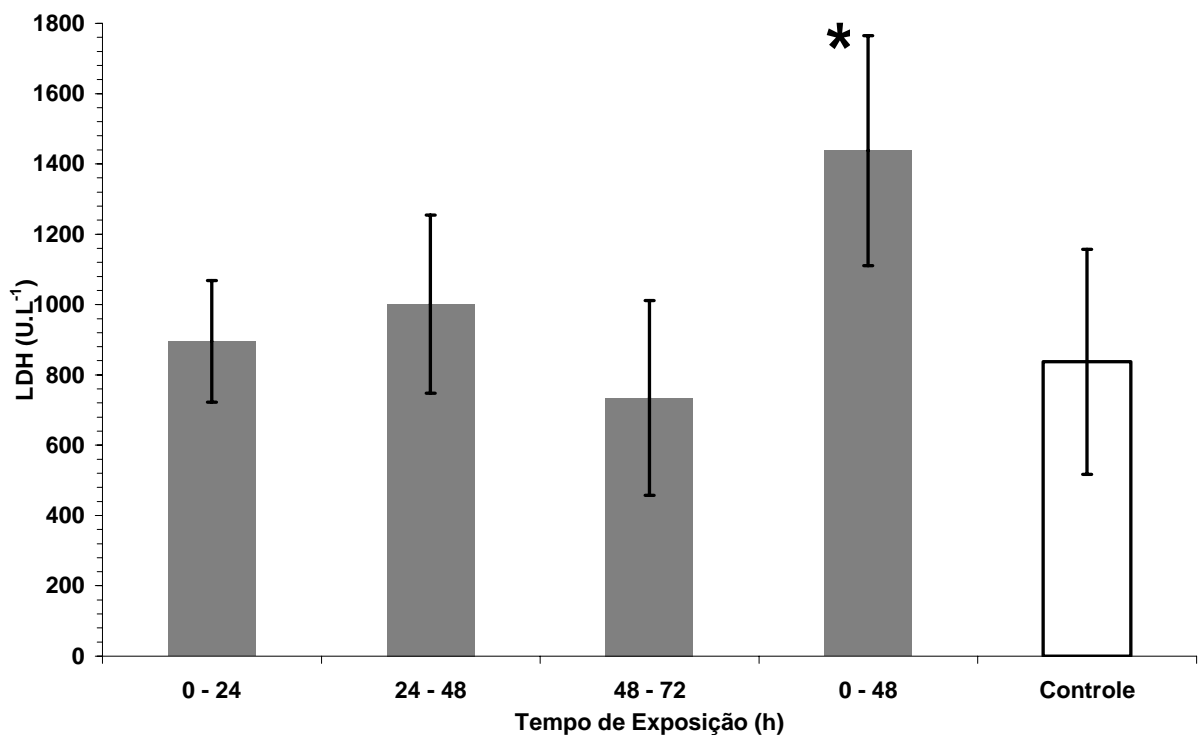


Figura 4.61: Alterações da LDH dos animais durante o período de ensaios ($P<0,02$ para grupo controle)

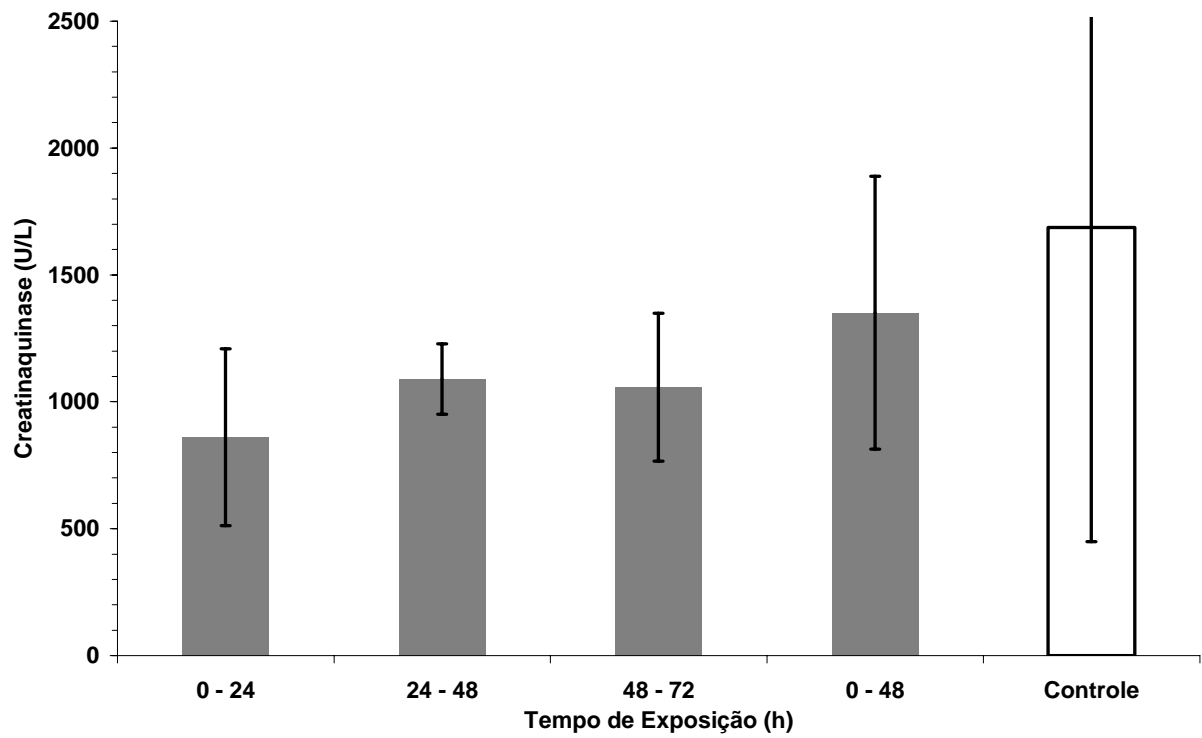


Figura 4.62: Alterações da Creatinaquinase dos animais durante o período de ensaios

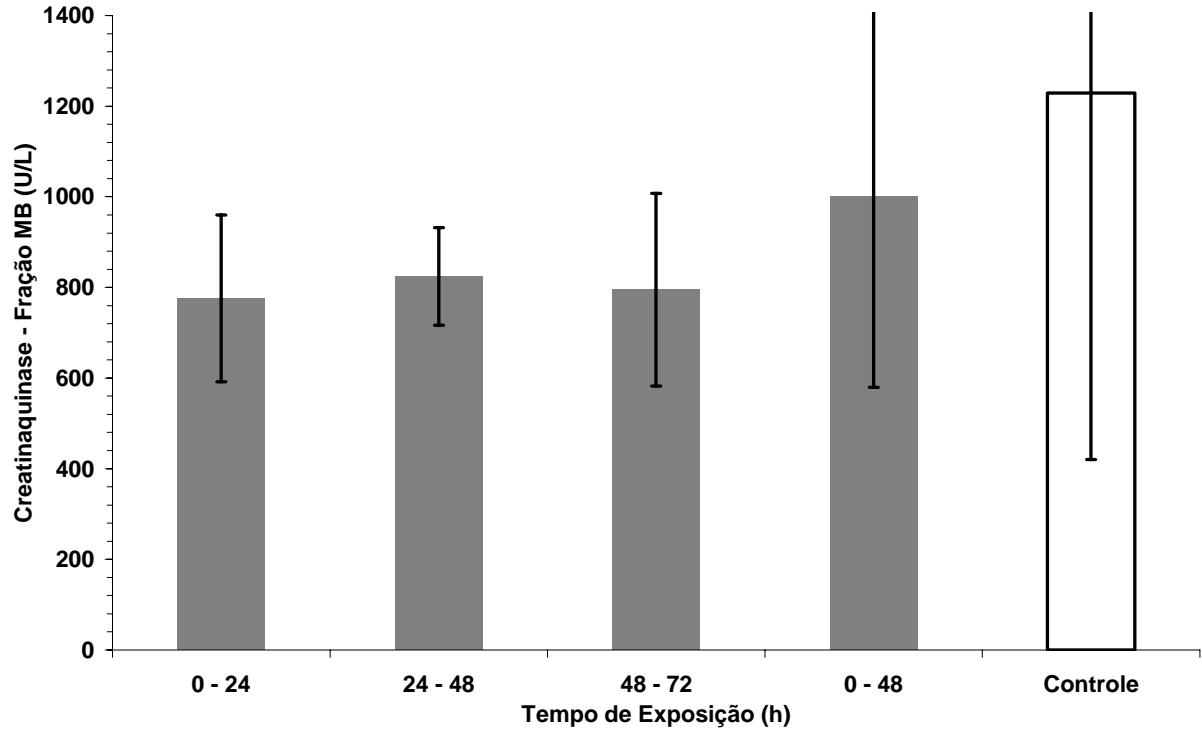


Figura 4.63: Alterações das Frações MB dos animais durante o período de ensaios

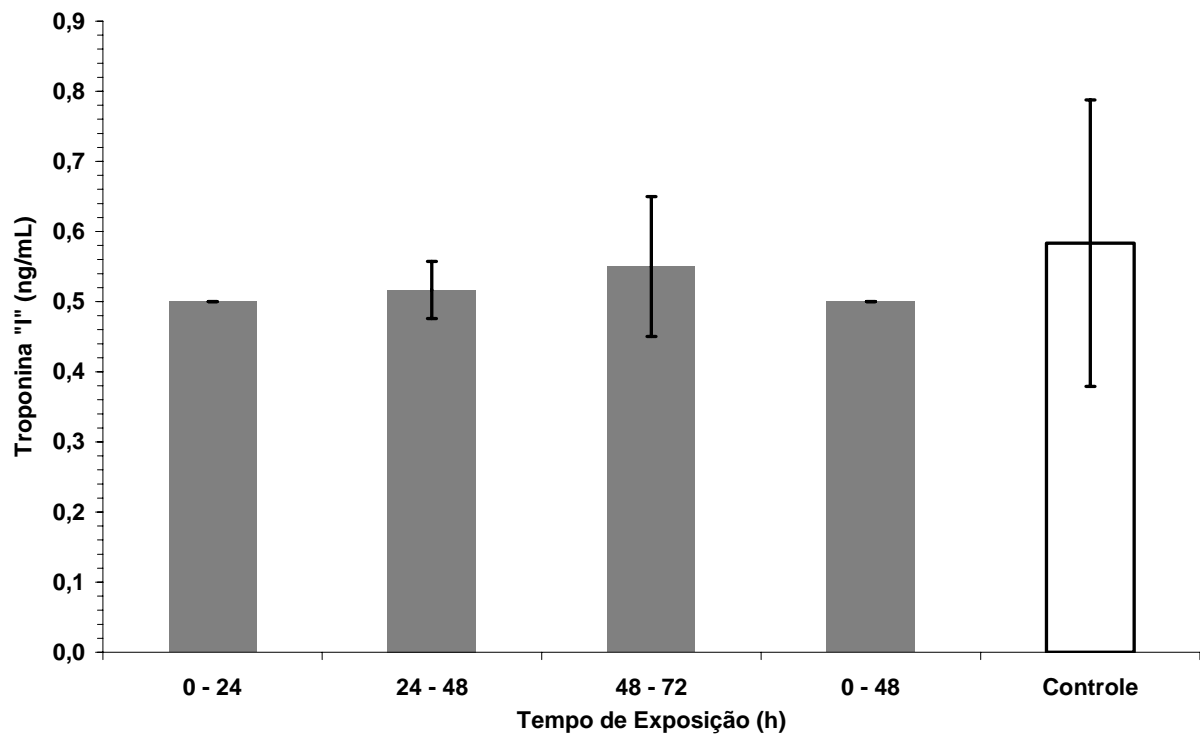


Figura 4.64: Alterações da Troponina "I" dos animais durante o período de ensaios

A Figura 4.65 apresenta as alterações do cálcio sérico total para os diferentes grupos nos períodos de ensaios. Observa-se que há uma tendência de aumento do cálcio nas primeiras 24h de exposição à gasolina, diminuindo sua concentração nas horas consecutivas até atingir o valor controle no terceiro dia de exposição. O primeiro grupo apresenta uma alteração significativa para o grupo controle ($P < 0,02$) e o grupo exposto por 48h cumulativas ($P < 0,02$). No caso do grupo exposto por 48h cumulativas, parece que o animal se reestabelece após as primeiras 24h do início dos experimentos, sem que haja qualquer alteração residual. Como já observado anteriormente, por ser este um grupo exposto a uma concentração inicial maior, observa-se que não há correlação entre concentração inicial de hidrocarbonetos e cálcio total ao final de 48h. Conforme Wallach (2000), o cálcio está aumentado em hiperparatireoidismo devido a hiperplasia ou adenoma das paratireóides, excesso de ingestão de vitamina D, tumor ósseo, osteoporose aguda, hipofosfatemia infantil, hipertireoidismo, hiperproteinemia. Para a correta interpretação do cálcio no soro, devemos conhecer a proteinemia total, que no presente trabalho não mostrou qualquer alteração entre os grupos. Friedman (1996) relata haver ainda hipercalemia em leucocitose, hemólise e trombocitose, além de acidose metabólica.

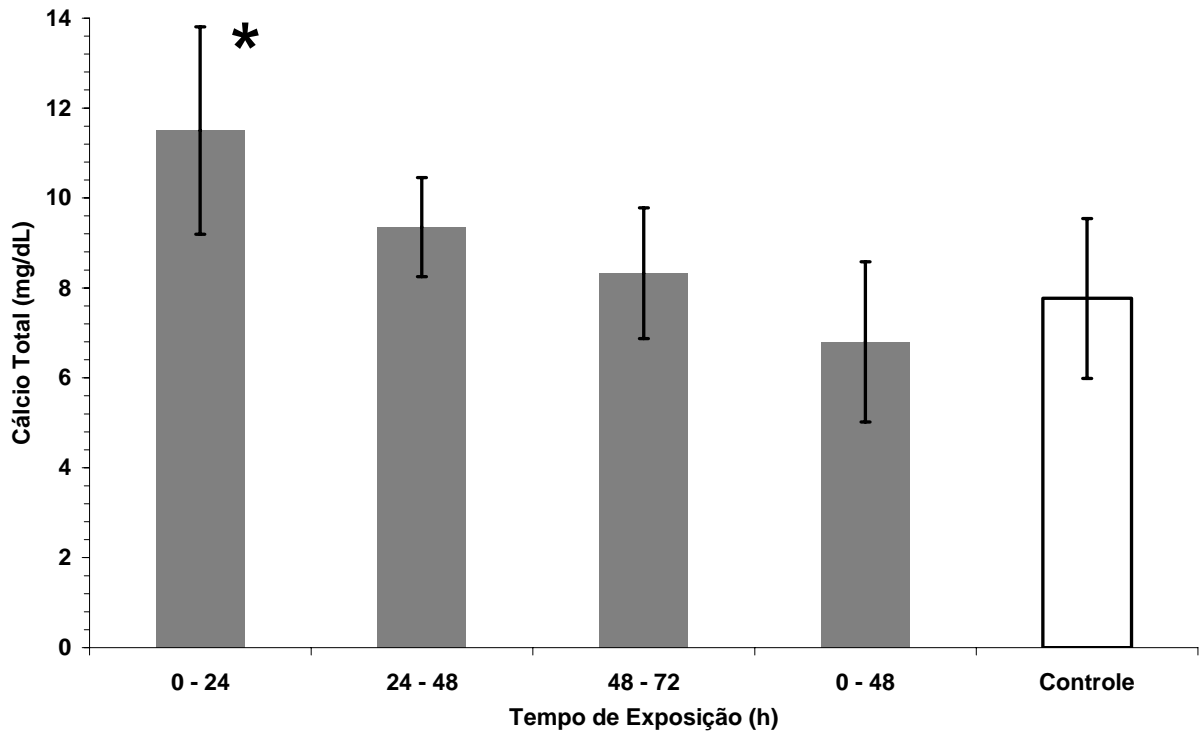


Figura 4.65: Alterações do Cálcio Total dos animais durante o período de ensaios ($P < 0,02$ para grupo 0-48h e controle)

4.2.4 Condutividade Elétrica e pH Celular

4.2.4.1 Condutividade Elétrica e pH Renal e Pulmonar

A Figura 4.66 ilustra as alterações no pH do macerado renal nos diferentes grupos e dias de tratamento. Observa-se que os grupos expostos no primeiro momento de contaminação, incluindo o grupo com efeito cumulativo, apresentam acidificação do macerado renal em relação ao controle e ao grupo exposto mais tardiamente, com significância estatística ($P < 0,04$). Infelizmente não foi possível a verificação dos parâmetros responsáveis pelo ocorrido, visto que a creatinina, proteínas e uréia urinária não puderam ser analisadas, enquanto não houve alterações nas condições séricas.

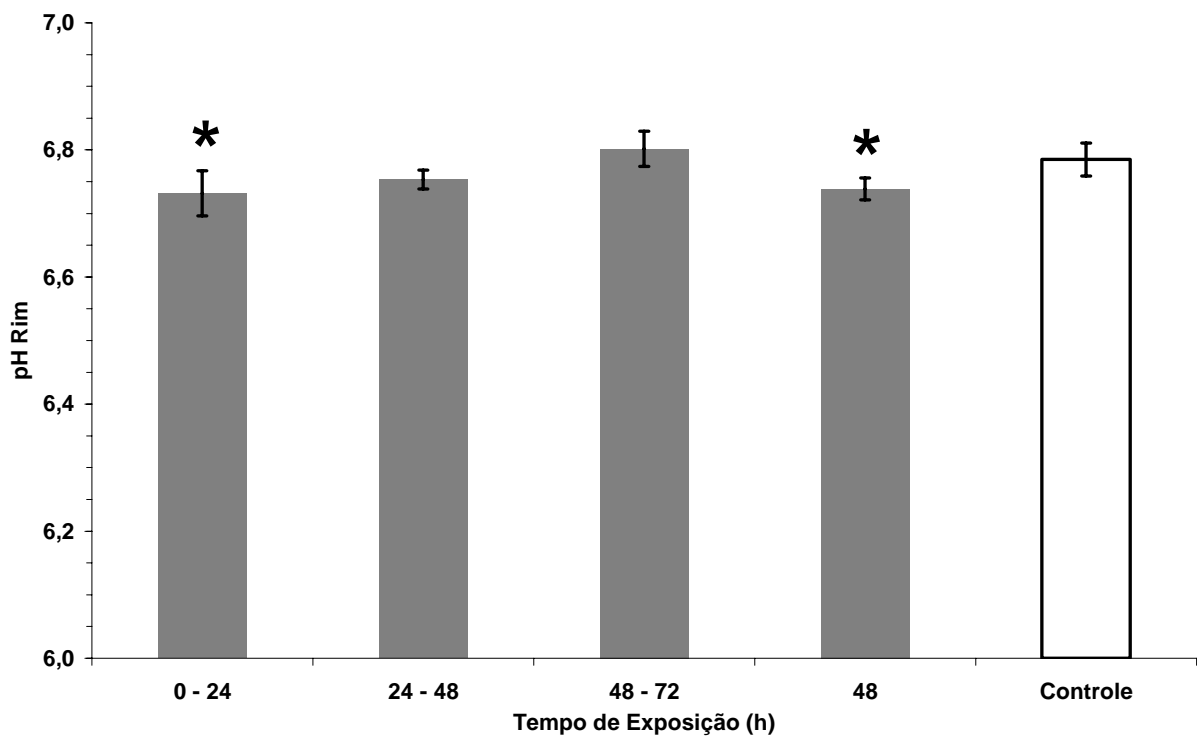


Figura 4.66: Alterações do pH do macerado de rim dos animais durante o período de ensaios ($P < 0,04$ para grupo controle)

A Figura 4.67 apresenta um estudo da condutividade elétrica normalizada por peso de rim. Os testes normalizados não mostraram significância estatística ($P > 0,05$) entre os grupos. Entretanto, a Figura 4.68 mostra a condutividade elétrica normalizada pela relação peso de rim sobre peso de proteínas renais para todos os grupos, onde é possível se observar que esta relação normalizada diminuiu significativamente ($P < 0,04$) nos grupos sujeitos à aspiração de hidrocarbonetos de gasolina. Foi feita uma tentativa em se analisar quais foram os fatores/variáveis contribuintes para este fenômeno. A creatinina e uréia séricas não mostraram significância estatística ($P > 0,05$) em todos os grupos quando comparadas ao controle (visto anteriormente), assim como o sódio e potássio ($P > 0,05$). Apesar do potássio não ter apresentado significância estatística, os valores séricos deste íon diminuíram nas primeiras 24-48h, assim como o sódio no período cumulativo de 48h, talvez contribuindo para as alterações na excreção de íons e consequentemente diminuindo a relação da condutividade elétrica normalizada do rim. Guyton e Hall (2002) e Nelson e Cox (2002) discutiram a importância fisiológica dos organismos em manterem o pH sérico, parâmetro que foi eficientemente mantido pelos animais nos experimentos. A resposta inflamatória do organismo por meio de citocinas, α -TNF, óxido nítrico, etc pode influenciar as modificações na atividade elétrica das células e pode ser contemplada em trabalhos futuros.

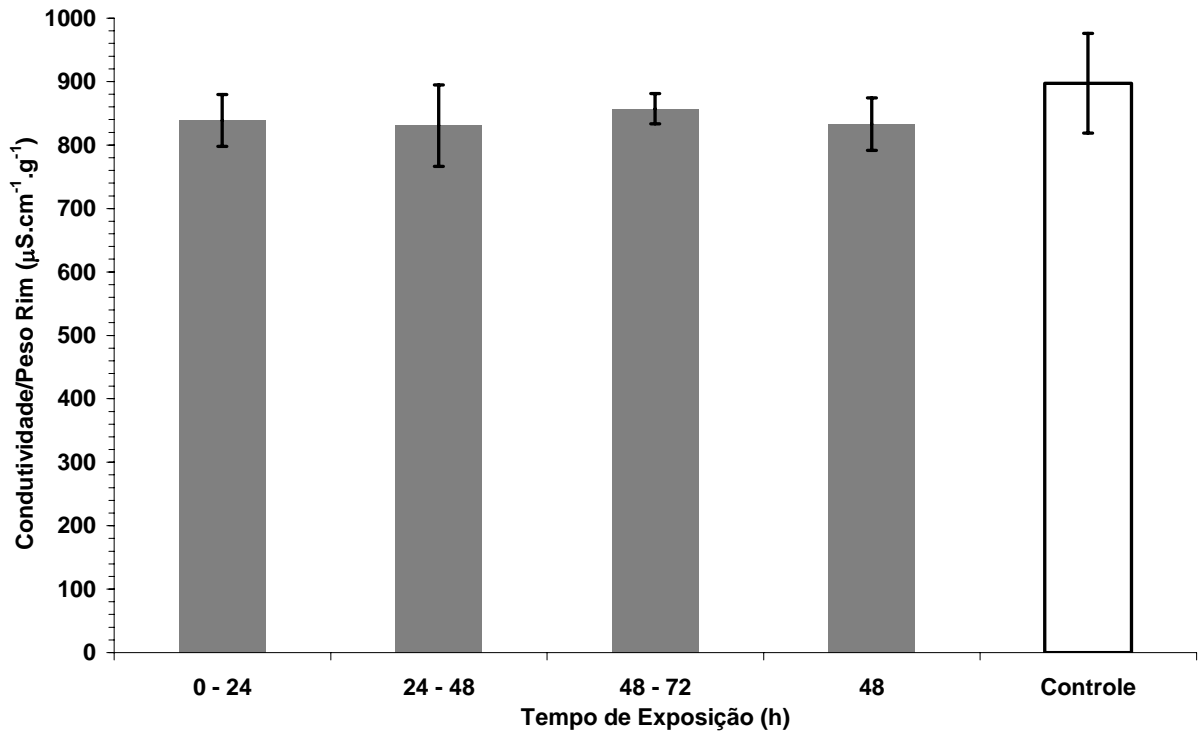


Figura 4.67: Alterações da condutividade elétrica dos macerados de rins dos animais normalizada por peso de rim durante o período de ensaios

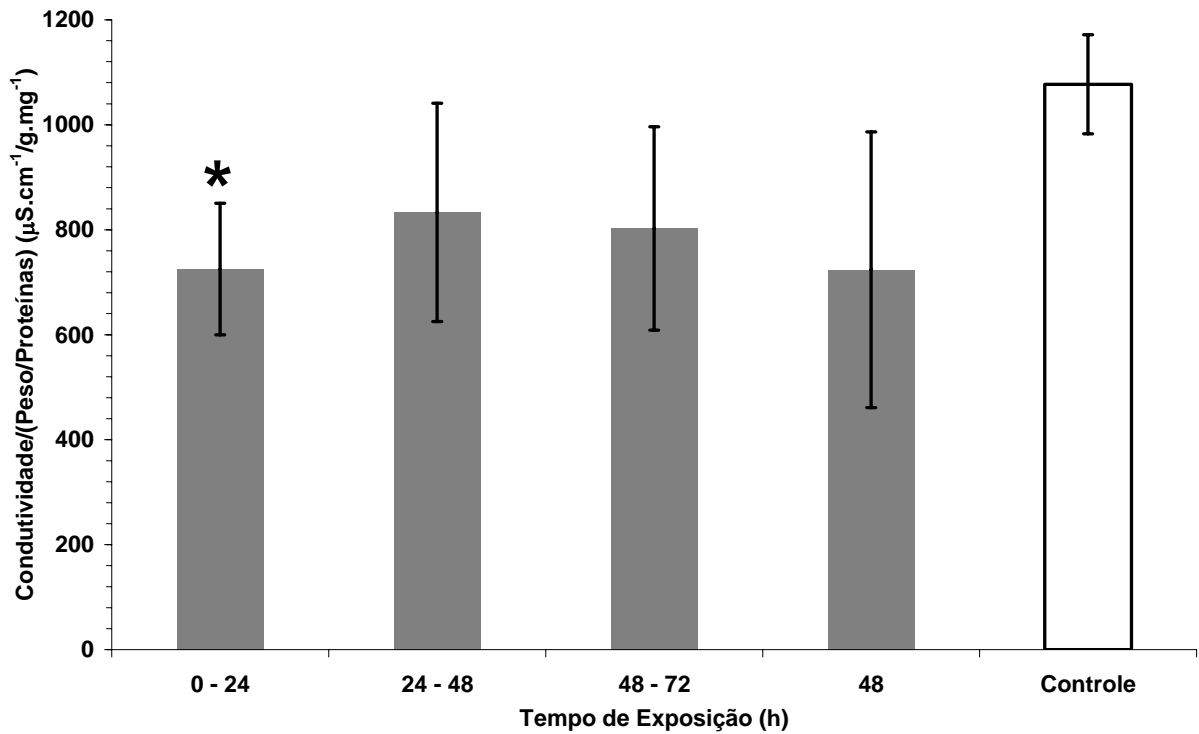


Figura 4.68: Alterações da condutividade elétrica dos macerados de rins dos animais normalizada por peso de rim e por proteínas dos diversos períodos de ensaios ($P < 0,04$ para o grupo controle)

A Figura 4.69 ilustra as alterações no pH do macerado pulmonar nos diferentes grupos e dias de tratamento. Para todos os tratamentos realizados, observa-se que não há significância estatística ($P>0,05$) entre os grupos, mostrando que se houve alguma alteração, não foi relacionada a íons de hidrogênio.

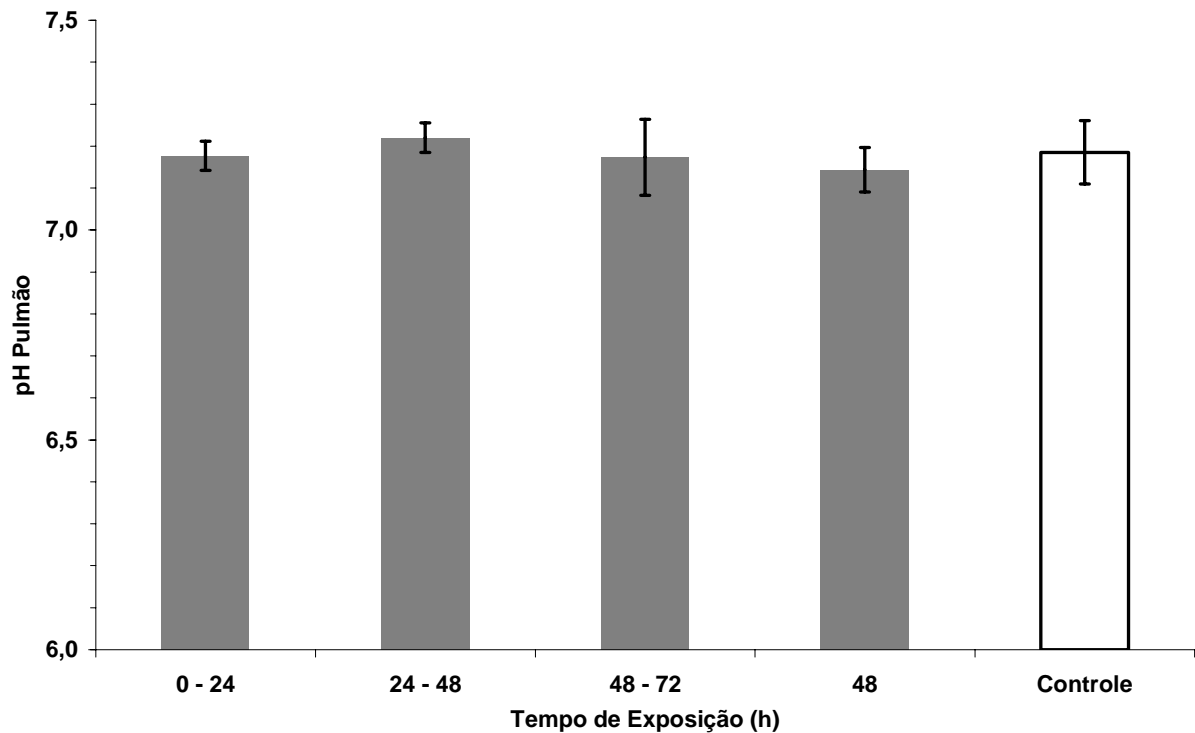


Figura 4.69: Alterações do pH dos macerados de pulmão dos animais durante o período de ensaios

A Figura 4.70 apresenta um estudo da condutividade elétrica normalizada por peso de pulmão. Os testes normalizados mostraram que há significância estatística ($P=0,032$) do grupo exposto nas primeiras 24h em relação aos expostos por 48-72h. O grupo controle não apresentou diferença significativa para o grupo de 24h ($P>0,05$), apesar deste último mostrar uma tendência de diminuição do parâmetro normalizado. Sugere-se novos estudos com grupos contendo maior quantidade de indivíduos a fim de se estabelecer um padrão.

A Figura 4.71 mostra a condutividade elétrica normalizada pela relação peso de pulmão e peso de proteínas renais para todos os grupos, onde é possível se observar que esta relação normalizada diminuiu significativamente ($P<0,004$) no grupo sujeito à aspiração de hidrocarbonetos de gasolina nas primeiras 24h. Novamente, apesar de haver uma tendência de diminuição do parâmetro normalizado nas primeiras 24h, devemos considerar a realização de novos estudos para quantificar melhor as variáveis.

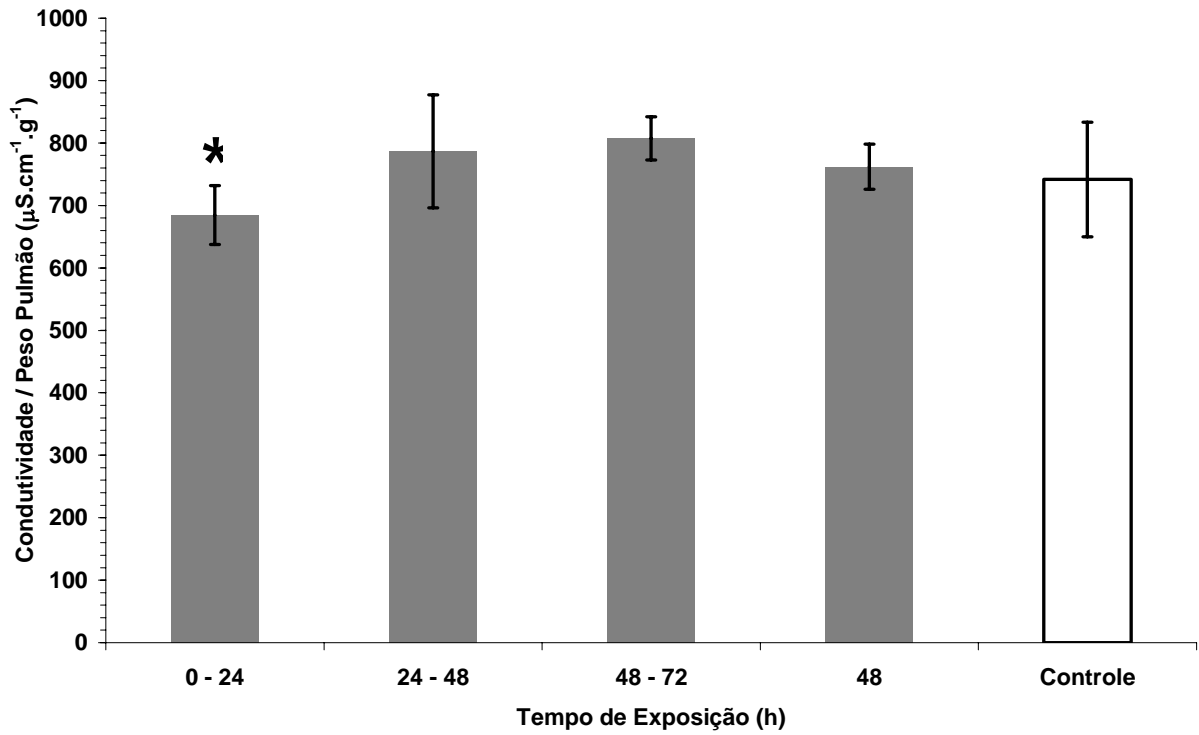


Figura 4.70: Alterações da condutividade elétrica dos macerados de pulmão dos animais normalizada por peso de pulmão durante o período de ensaios ($P=0,032$ para grupo 48-72h)

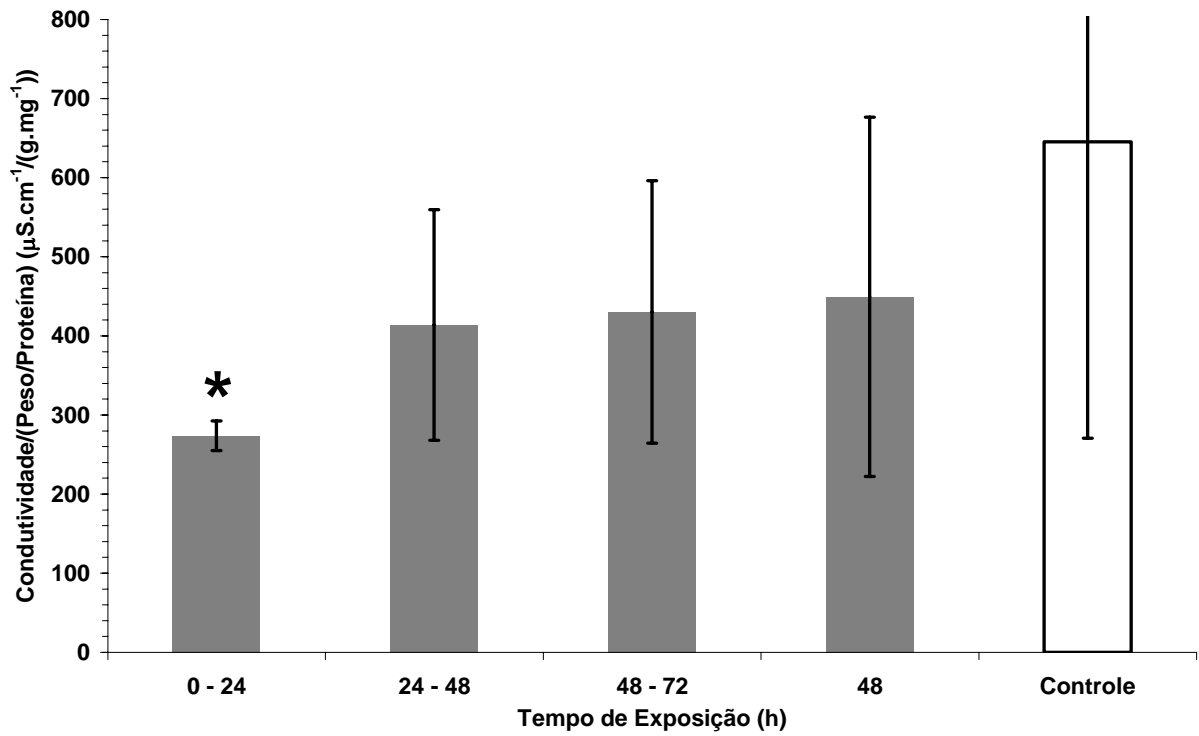


Figura 4.71: Alterações da condutividade elétrica dos macerados de pulmão dos animais normalizada por peso de pulmão e por proteínas durante o período de ensaios ($P<0,004$ para grupo controle)

Poderia se supor que a estabilidade do pH está baseada nas alterações iônicas. A importância dos íons pode ser explicada da seguinte maneira: quando há lesão de membrana, íons e moléculas passam em ambas as direções. As alterações da microvasculatura também são um fator importante que deve ser considerado, causando uma resposta inflamatória do organismo. A molécula de oxigênio produz reações nas células, formando radicais livres e induzindo a peroxidação de lipídeos de membrana, alterando sua integridade e aumentando sua fluidez e permeabilidade (Kumar et al., 2005).

4.2.4.2 Condutividade Elétrica e pH do Sangue e da Urina

As Figuras 4.72 e 4.73 ilustram o pH e a condutividade elétrica do plasma normalizada por peso de proteínas. Observa-se que o organismo dos animais consegue manter ambos os parâmetros em qualquer condição de exposição sem diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$), apesar de haver uma acidificação do pH na condição de 48h cumulativas. Como já discutido anteriormente, foi feita uma tentativa em se analisar quais foram os fatores/variáveis contribuintes para este fenômeno. Guyton e Hall (2002) e Nelson e Cox (2002) discutiram a importância fisiológica dos organismos em manterem o pH sérico, parâmetro que foi eficientemente mantido pelos animais nos experimentos.

Nas Figuras 4.74 e 4.75 tentou-se avaliar as alterações de pH e condutividade elétrica urinária normalizada por proteínas urinárias, parâmetros que não puderam ser analisados com maior acuidade por problemas de coleta de urina nos ensaios com contaminantes.

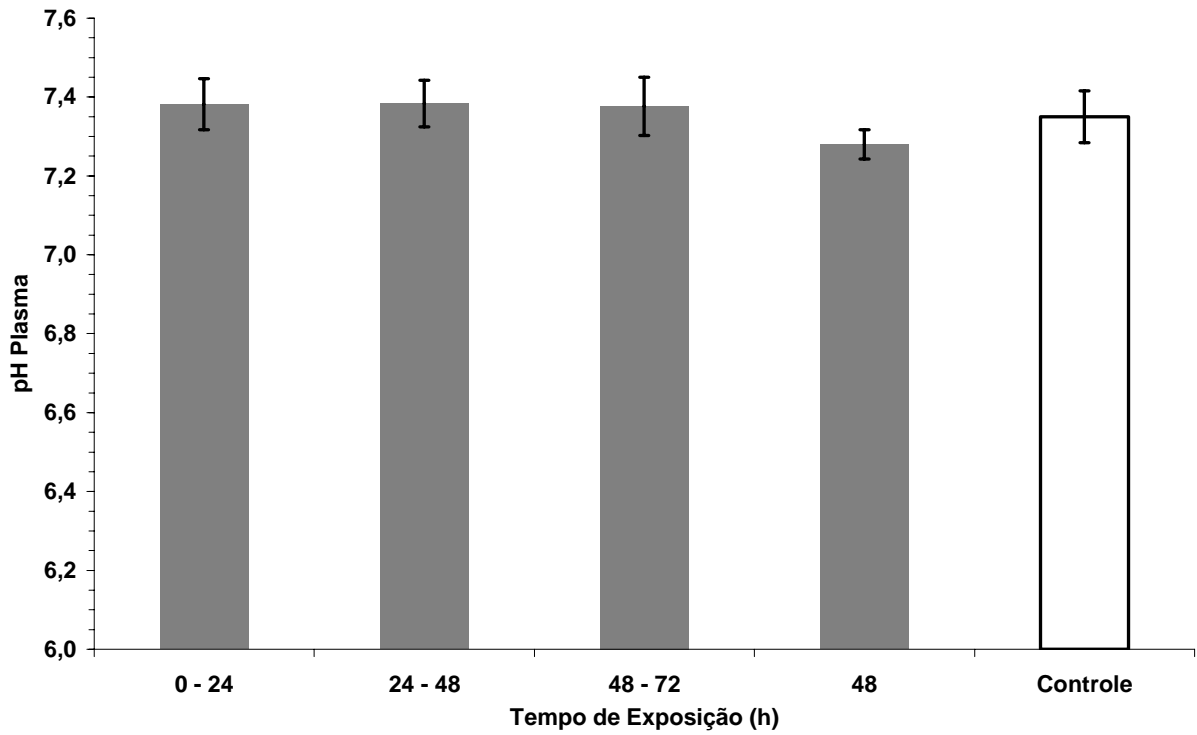


Figura 4.72: Alterações do pH do plasma dos animais durante o período de ensaios

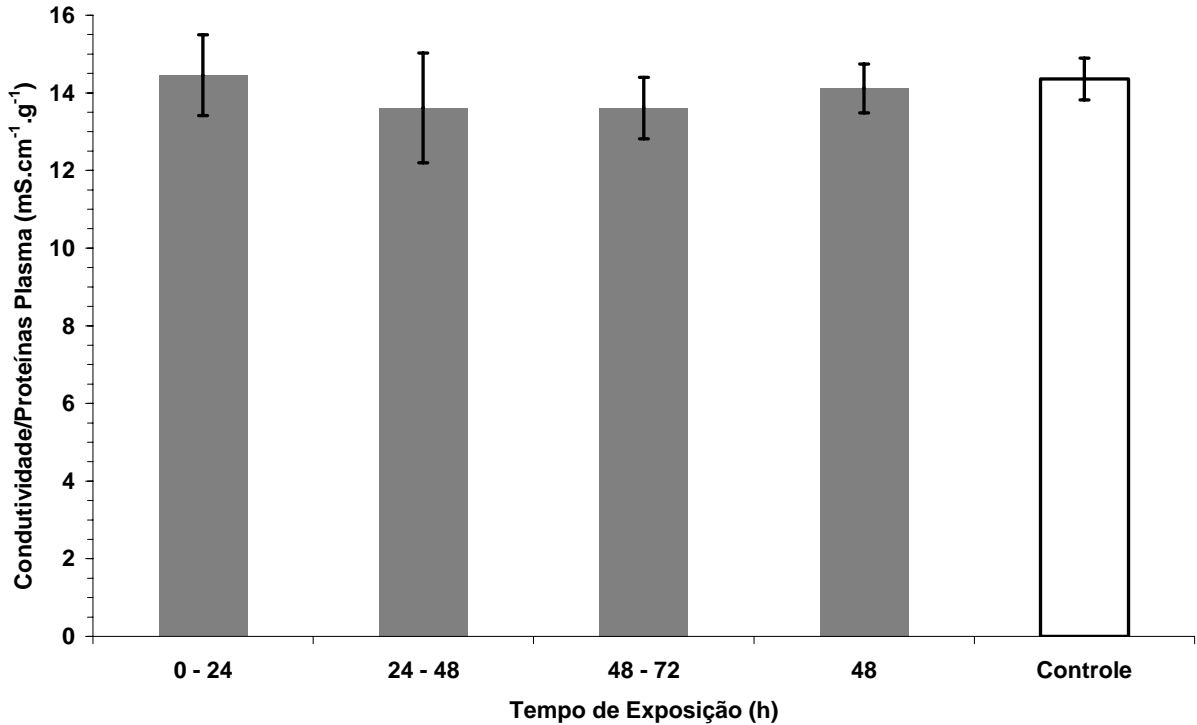


Figura 4.73: Alterações da condutividade elétrica do plasma dos animais normalizada por proteínas durante o período de ensaios

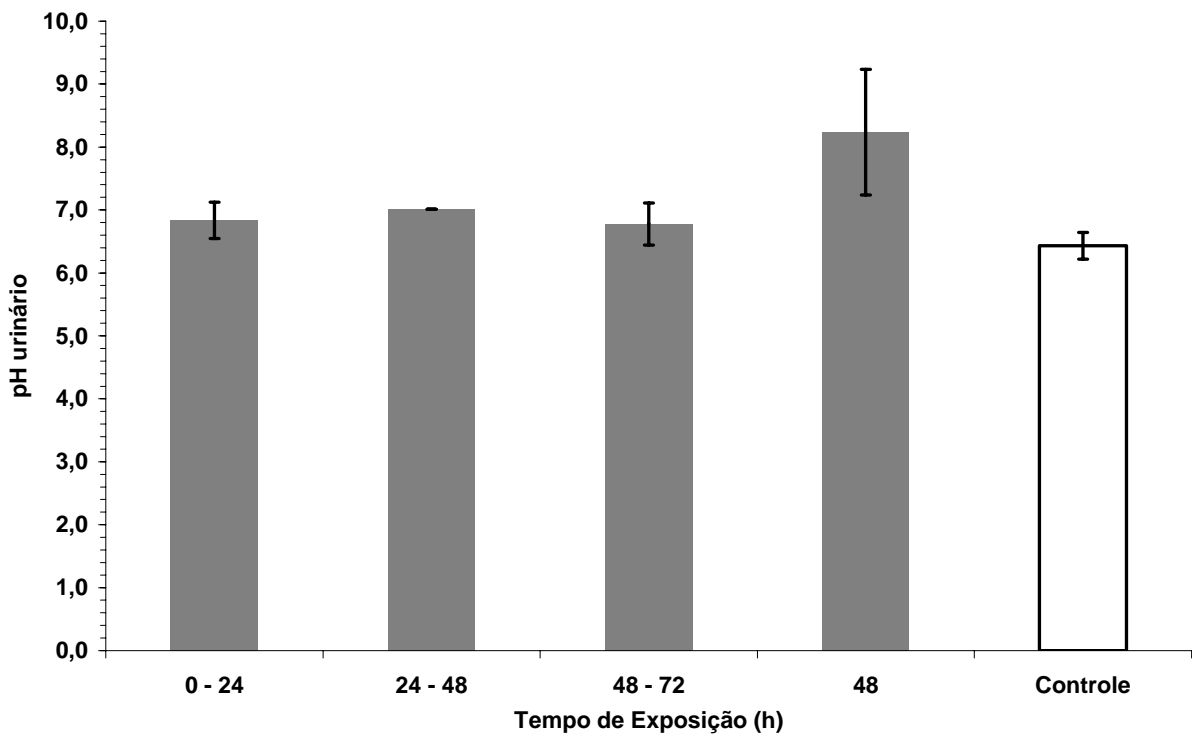


Figura 4.74: Alterações do pH urinário dos animais durante o período de ensaios

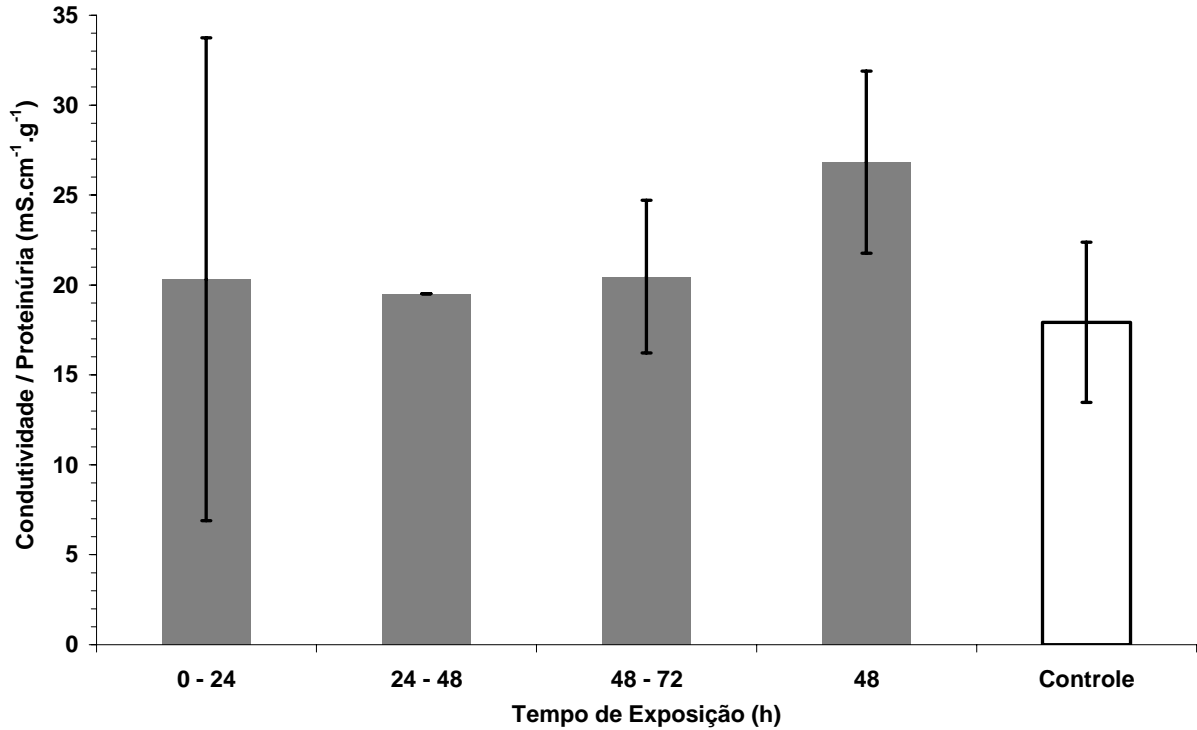


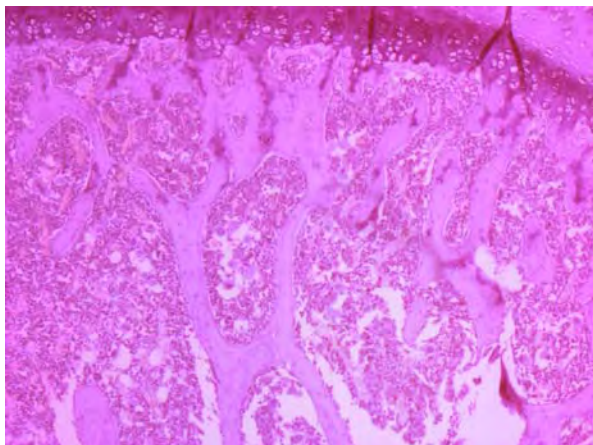
Figura 4.75: Alterações da condutividade elétrica da urina dos animais normalizada por proteínas urinárias durante o período de ensaios

4.2.5 Histologia da Medula Óssea, Rins e Pulmões

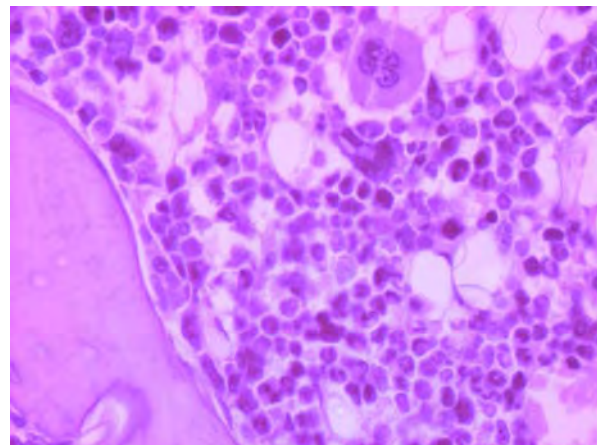
As Figuras 4.76a e b mostram uma medula óssea normal, dos ratos controle, com distribuição normal dos elementos medulares, com 50x e 400x de aumento. Na Figura 4.76c e d observa-se necrose e apoptose difusa, mostrando lesão irreversível dos elementos medulares para o grupo exposto nas primeiras 24h para 50x e 400x. Há uma medula hiperpopulada com reação leucemóide. Da mesma forma, encontramos exatamente a mesma lesão e reações para os grupos expostos até 72h (Figura 4.76e, f, g e h). O fato mostra que independentemente dos voláteis e de sua concentração, além da presença dos demais hidrocarbonetos, há uma reação da medula devido à intoxicação, causando lesão. Surpreendentemente, no grupo exposto por 48h cumulativas (Figura 4.76i e j), a histologia mostra uma medula de aspecto morfológico normal, com apenas leve diminuição da série branca. A partir desta observação é possível se pressupor a existência de um mecanismo de agressão e recuperação da medula óssea que independe do grau de contaminação e do tempo de exposição. Aparentemente, há uma intensa lesão medular nas primeiras 24h de exposição ao contaminante e, com o passar do tempo, apesar de continuar exposto, o animal consegue reverter o quadro. O fato pode explicar porque frentistas e outros trabalhadores de refinarias, etc conseguem manter suas atividades diárias sem que haja maiores conseqüências, uma vez que a medula óssea sofre um processo de adaptação nas horas seguintes à exposição. Isso não se aplica a longo prazo.

A histologia dos pulmões nos diferentes grupos pode ser vista na Figura 4.77. A Figura 4.77a e b mostram o grupo controle, com espaços alveolares aerados, com ausência de edema ou reação inflamatória. As Figuras 4.77c e d apresentam o grupo exposto às primeiras 24h, mostrando infiltrado com polimorfonucleares e mononucleares (linfócitos) em espaço perialveolar com espessamento alveolar importante, congestão venular e células apoptóticas. Observa-se ainda pneumonite descamativa e secreção brônquica, além de intenso enfisema. Nas Figuras 4.77e e f observa-se o mesmo padrão para o grupo submetido no período de 24 – 48h, com o aparecimento de restos celulares e hemorragia. No grupo exposto durante o período de 48 – 72h (Figura 4.77g e h) observa-se um pouco de melhora do quadro do dia anterior, com lesões próximas principalmente aos brônquios mais calibrosos. O grupo de 48h cumulativas apresenta o mesmo padrão do anteriormente descrito (Figura 4.77i e j). Observa-se que da mesma forma que a medula, não importa o grau ou o período exposto à contaminação, a lesão sempre ocorre. Entretanto, o pulmão não consegue se regenerar como a

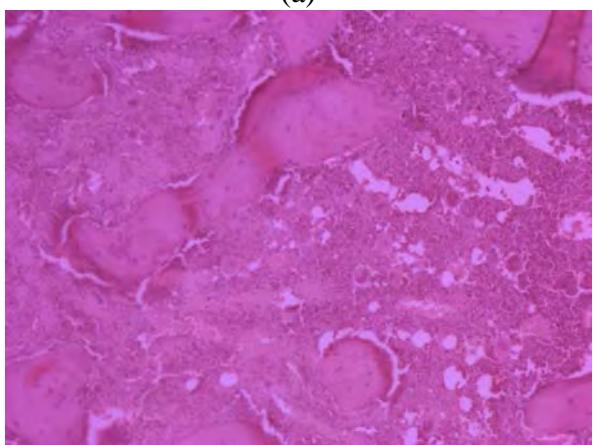
medula óssea no tempo de 48h cumulativas, possivelmente necessitando de um período bem maior. Ao contrário do que se poderia esperar, os BTEX não são os principais causadores de lesão aguda tanto na medula como nos pulmões, pois observa-se sempre o mesmo padrão, inclusive em um período onde estes contaminantes não estão mais presentes no solo.



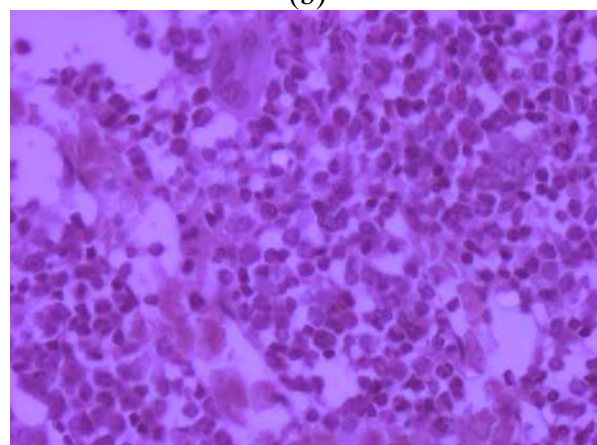
(a)



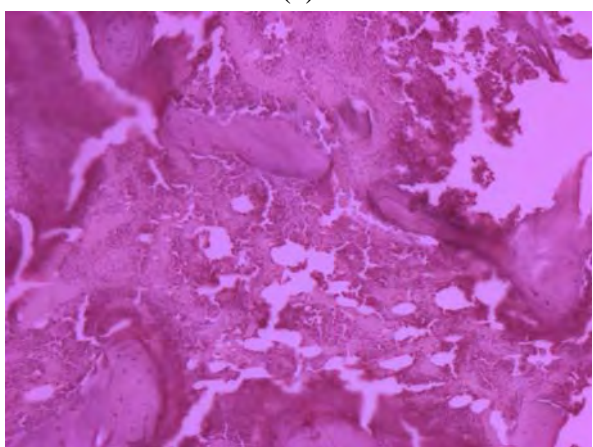
(b)



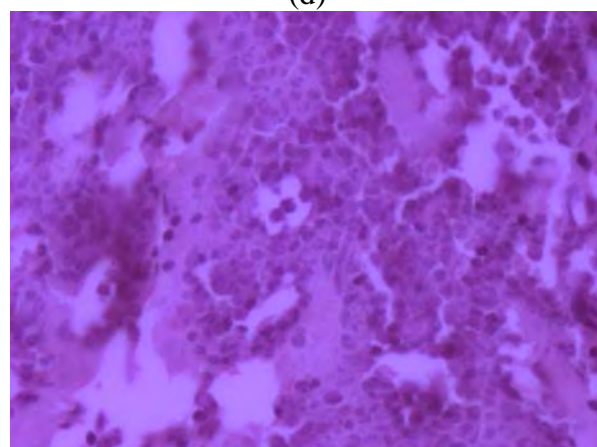
(c)



(d)



(e)



(f)

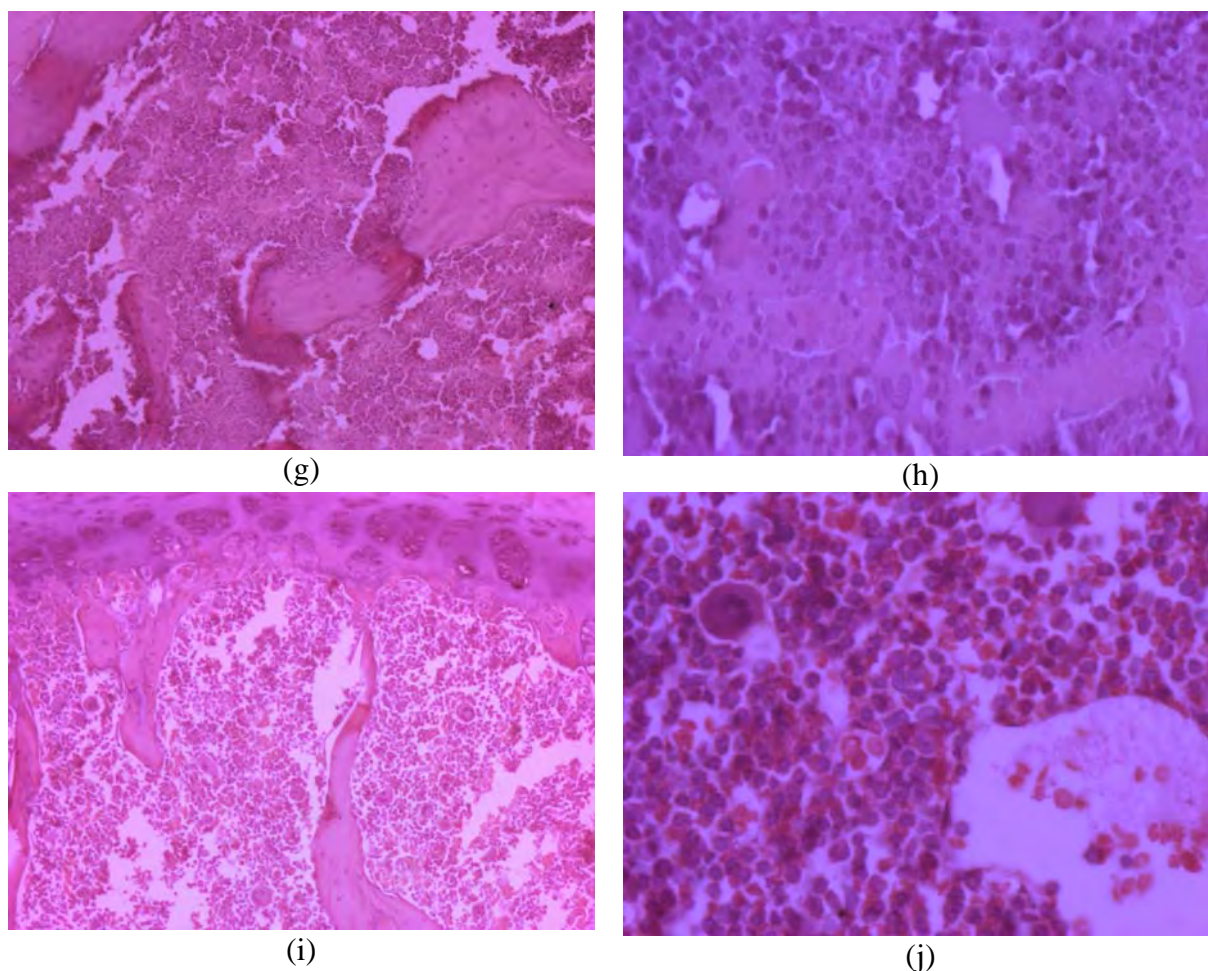
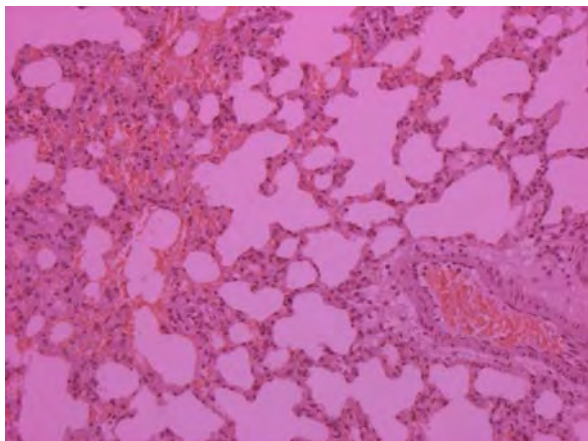


Figura 4.76: Alterações histológicas da medula óssea em aumentos de 50x (coluna da esquerda) e 400x (coluna da direita), para o grupo controle (a, b), 0 – 24h de exposição (c, d), 24 – 48h (e, f), 48 – 72h (g, h) e 48h cumulativas (i, j)

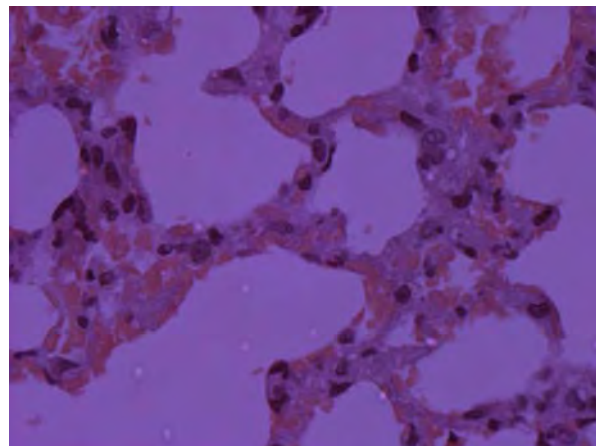
Por fim, a Figura 4.78 mostra a histologia dos rins nos diferentes grupos. A Figura 4.78a e b mostram o grupo controle, com glomérulos normais e alça de Henle normais, sem edema ou reação inflamatória. Há diminuta vacuolização do epitélio tubular, com predomínio de células da cortical. Na Figura 4.78c e d observa-se que há um aumento da vacuolização do epitélio dos túbulos renais, mantendo o predomínio de células da cortical, sem demais alterações. Observa-se que o padrão encontrado na Figura 4.78c e d se mantém em e, f, g e h, voltando à condição basal, ou seja, idem ao controle, em i e j.

Alterações tubulares vacuolares ou hidrópicas ocorrem nas células tubulares em uma ampla variedade de condições. Tais alterações são freqüentemente referidas como nefrose osmótica, pois representam um distúrbio das relações osmóticas normais dentro da célula. Em alguns casos, estas alterações histológicas estão relacionadas à administração intravenosa de substâncias como a sucrose, dextrano ou manitol. Também são observadas em cadáveres

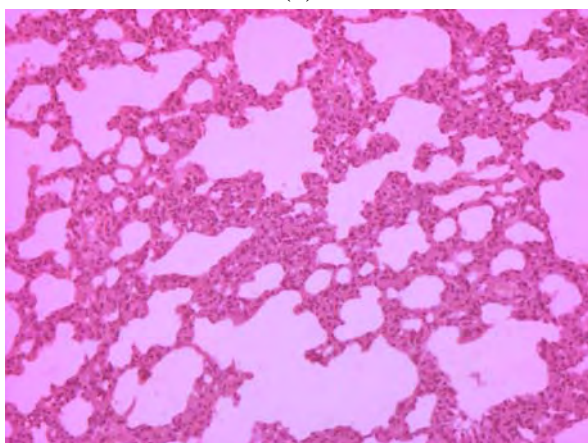
doadores de rim, e algumas vezes na hipocalcemia (Meadows, 1973; Junqueira e Carneiro, 2004). A vacuolização, por ser uma reação inespecífica, explica o fato de não ter havido qualquer alteração de creatinina sérica.



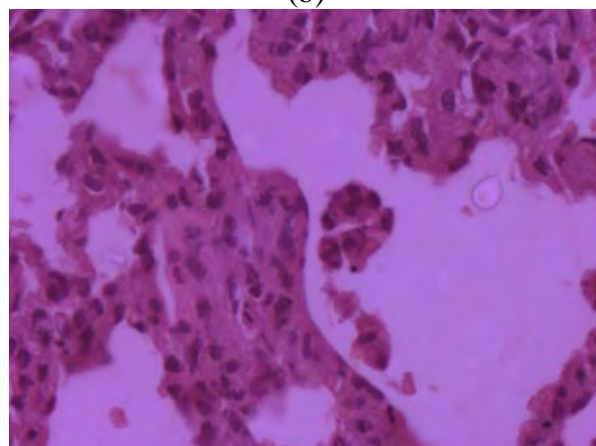
(a)



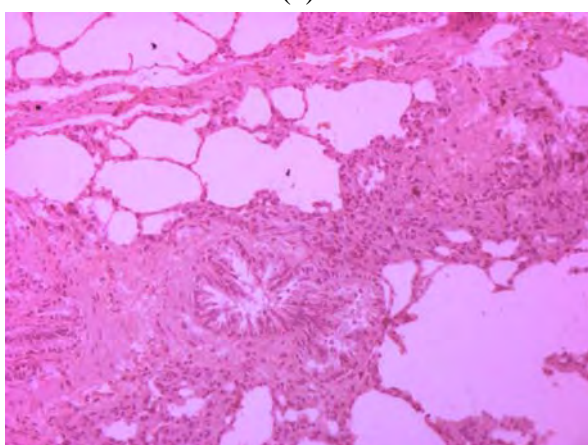
(b)



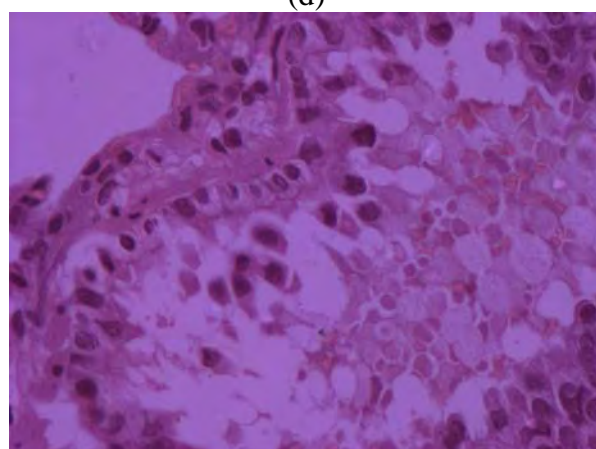
(c)



(d)



(e)



(f)

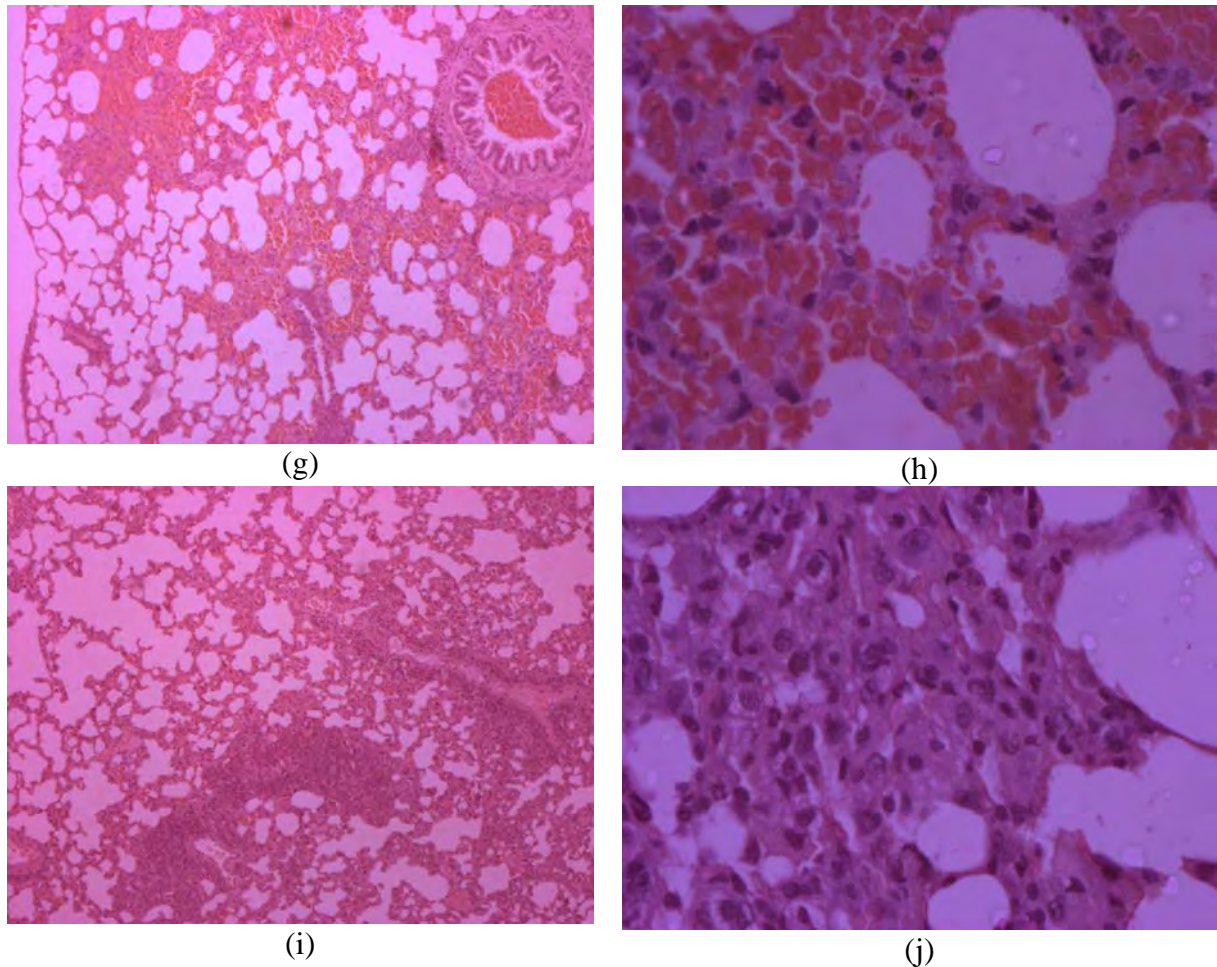
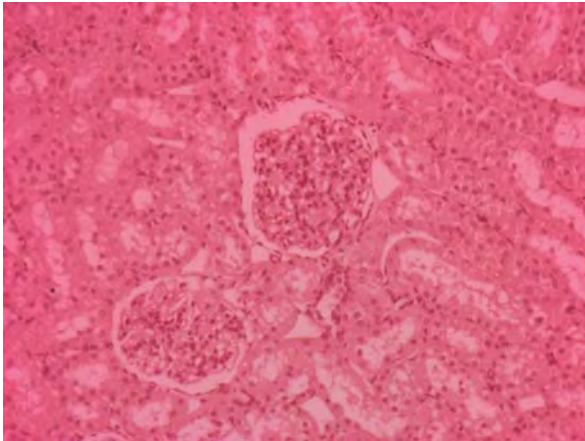


Figura 4.77: Alterações histológicas do pulmão em aumentos de 50x (coluna da esquerda) e 400x (coluna da direita), para o grupo controle (a, b), 0 – 24h de exposição (c, d), 24 – 48h (e, f), 48 – 72h (g, h) e 48h cumulativas (i, j)

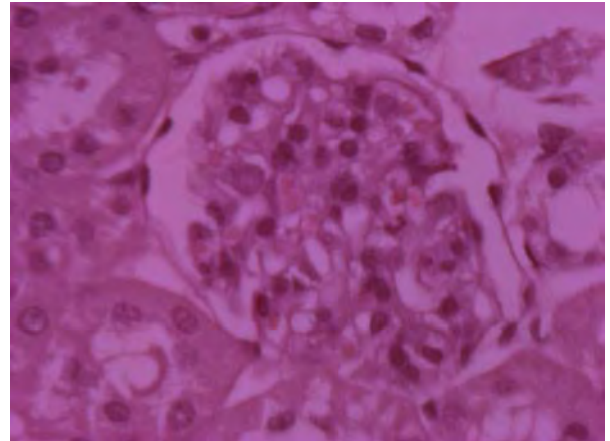
4.2.6 Considerações Finais sobre Toxicidade e Lesão Celular

Conforme o EPA (2005), o biomonitoramento de compostos orgânicos voláteis é difícil de ser obtido, pois estes gases não persistem por muito tempo no organismo. Por esta razão, dados de biomonitoramento são indicativos de exposição recente. O ATSDR (2005) sugere como estudos de rotina de laboratório a verificação do hemograma com plaquetas, glicose e eletrólitos em populações expostas agudamente. No caso de inalações mais severas, sugere a realização de eletrocardiograma (ECG), testes de função renal, raio-X de tórax e monitorização do paciente por oximetria de pulso. O órgão dos EUA relata ainda que a identificação, ou medidas diretas dos hidrocarbonetos no sangue não tem aplicação clínica, apesar destes testes serem utilizados para documentar a exposição. No Brasil, o Ministério da

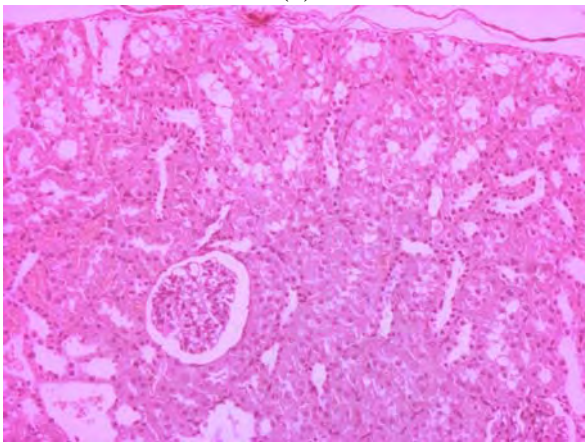
Saúde, através da Norma 7 (NR7), preconiza a investigação de fenol, carboxi-hemoglobina, ácido hipúrico, ácido metil-hipúrico e ácido trans-trans-mucônico em populações expostas a hidrocarbonetos. A presente pesquisa mostra a importância da realização de hemograma com plaquetas, uréia, AST, eletrólitos (potássio e cálcio iônico, ou cálcio total com proteínas), glicose, LDH e exame comum de urina para a monitorização de populações expostas a hidrocarbonetos, compatível com as sugestões do ATSDR (2005).



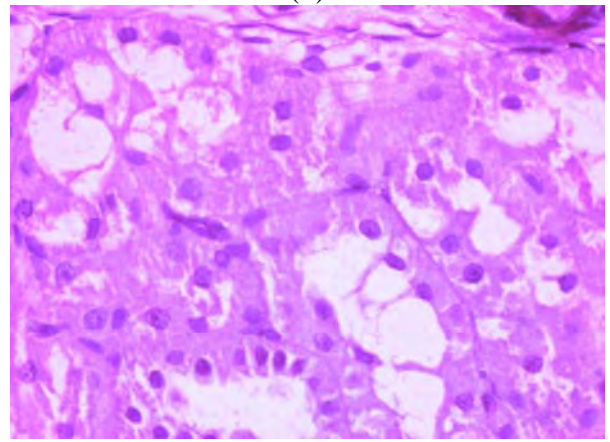
(a)



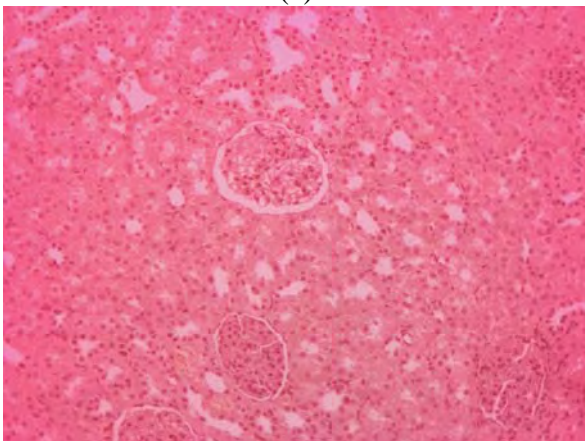
(b)



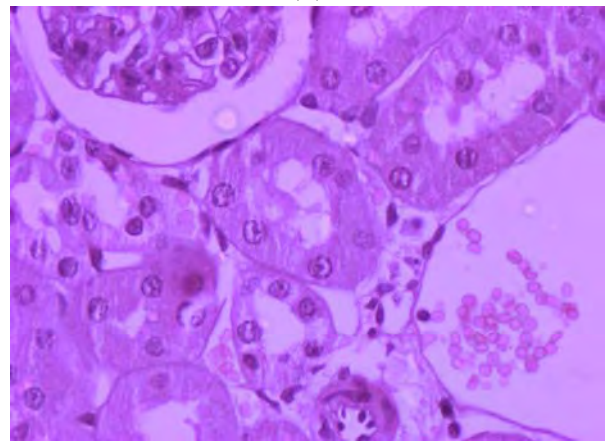
(c)



(d)



(e)



(f)

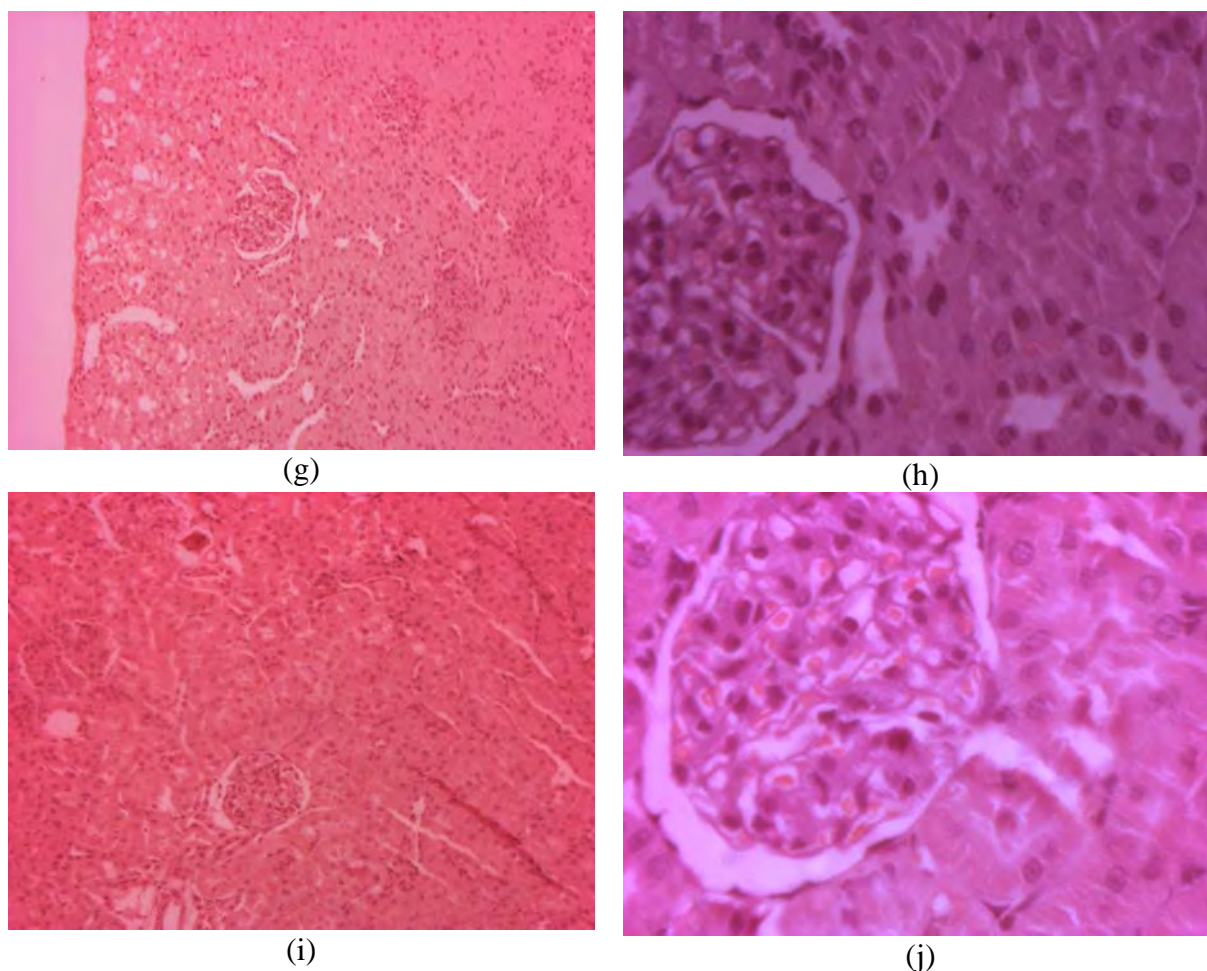


Figura 4.78: Alterações histológicas do rim em aumentos de 50x (coluna da esquerda) e 400x (coluna da direita), para o grupo controle (a, b), 0 – 24h de exposição (c, d), 24 – 48h (e, f), 48 – 72h (g, h) e 48h cumulativas (i, j)

4.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho abrange um estudo integrado que busca as relações existentes entre processos de biorremediação e alterações das condições fisiológicas dos organismos que habitam os locais contaminados. Observou-se que materiais orgânicos melhoram as características gerais dos solos ao final dos tratamentos ao mesmo tempo retém o contaminante por um maior período de tempo. Existe uma clara influência dos microrganismos nos processos de biorremediação da gasolina e diesel analisados. A umidade retém e auxilia na mobilização de contaminantes nos solos, identificados por cromatografia gasosa. Quanto aos testes em modelo animal, observou-se alterações importantes no seu metabolismo/fisiologia/histologia e, em especial, identificou-se um novo exame que pode

auxiliar na análise fisiopatológica de órgãos. Uma perfeita integração entre as áreas de engenharia geotécnica, agronomia, medicina, biologia e farmácia e bioquímica foi obtida, provando a necessidade de projetos multidisciplinares no futuro da pesquisa.

*“Não se pode conhecer o todo sem as partes e nem as partes sem o todo”
(Blaise Pascal, 1623-1662)*

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

A seguir são apresentadas as conclusões desta pesquisa, divididas em biorremediação do solo, toxicidade e lesão celular em modelo animal e sugestões para futuros trabalhos.

5.1 BIORREMEDIAÇÃO DO SOLO

A incorporação de gasolina e diesel ao solo com e sem adições produziu alterações na evolução cumulativa de CO₂ quando comparada ao solo controle. O processo de remediação com lodo inicia com um grande incremento de CO₂, enquanto a adição da gasolina com e sem NPK ao lodo parece iniciar o processo somente alguns dias após a mistura. O solo com gasolina com e sem NPK tem uma evolução de CO₂ mais lenta, sendo que apenas aos 10 dias o NPK parece fazer algum efeito no tratamento. A adição de NPK às amostras contendo lodo não trouxe qualquer benefício ao processo de biorremediação já que o lodo por si só contém todos os elementos necessários ao crescimento microbiano.

A atividade microbiana medida através da liberação de CO₂ não apresentou diferenças significativas ao final do período de tratamento para as gasolinas utilizadas (posto de combustível e REFAP). A resposta da bioestimulação, através da adição de nutrientes é significativa quando comparamos as gasolinas com e sem o NPK, e mais ainda quando comparados aos níveis de CO₂ liberado destes tratamentos com o controle.

A análise pelo método da lâmina enterrada mostrou que, nas amostras contaminadas com gasolina e diesel sem adições, não houve a ocorrência de fungos, sendo encontrados apenas alguns actinomicetos (nenhum na gasolina) e uma pequena quantidade de bactérias. A adição de lodo produz um aumento significativo da atividade microbiana, a qual é mantida até mesmo após a adição dos contaminantes.

A análise microbiana por contagem direta mostrou que há uma queda inicial do número de fungos em todos os tratamentos realizados contendo gasolina, em função da estabilização do microcosmo ao novo ambiente. No solo natural (controle) e no tratamento com lodo há um aumento do número de fungos. No caso dos tratamento com solo e gasolina (“atenuação

natural”) e nos casos com bioestimulação com NPK também há a mesma queda no número de fungos no início do processo de remediação, porém necessitando de um maior tempo para a aclimatação da população fúngica. Ao considerar a contagem bacteriana, observa-se um rápido crescimento no caso do solo controle e do lodo já ao início dos tratamentos, passando por períodos de oscilação e atingindo um patamar. Nos solos com gasolina há uma queda no número de bactérias em relação à contagem inicial. E o tratamento com gasolina e NPK apresenta uma estabilização desde o início do tratamento.

A *Pseudomonas sp.* foi encontrada em todos os tratamentos. O *Aspergillus sp.* não foi encontrado de maneira significativa em qualquer um dos tratamentos após sua contaminação ou mesmo estimulação. Na análise do lodo, foi possível a observação de um rico consórcio de microrganismos, contendo *Penicillium sp.* e diversos tipos de bacilos gram-positivos.

Na primeira etapa da pesquisa, observou-se que a adição dos contaminantes ao solo não produziu variação significativa de pH ao longo do tempo. Entretanto, a análise do pH na segunda etapa dos ensaios mostra que há uma tendência de queda ao final do período – acidificação – para praticamente todos os tratamentos. A variação total é pequena e ocorre numa faixa menor que 1,0.

A contaminação por gasolina pura no solo tende a manter estável a condutividade elétrica do solo ao longo do período de biorremediação, e diminui com a adição de NPK. No solo controle, ao contrário, observa-se uma tendência natural de aumento da condutividade, em uma relação inversamente proporcional ao pH. No caso dos tratamentos com lodo, observa-se também uma tendência de aumento de condutividade elétrica com o tempo. Ao considerar-se o solo com lodo, gasolina e NPK verifica-se uma relação inversa, ou seja, o NPK parece causar uma redução da condutividade elétrica ao longo do tempo.

Nos ensaios com gasolina e diesel oriundos do posto de combustível, as maiores taxas na forma de amônia ocorreram principalmente nos tratamentos com a adição de nutrientes (lodo e NPK) com diferenças significativas quando comparados às amostras controle. E nos ensaios com a gasolina da REFAP, observa-se basicamente o mesmo.

Foi feita uma análise por cromatografia gasosa em microcosmos estéreis e não-estéreis para fins de verificação dos efeitos da microbiota nos compostos voláteis. Os testes foram realizados apenas com a contaminação de gasolina sem NPK e com NPK. De forma geral, os

dados obtidos mostram um significativo efeito da microbiota na biorremediação dos hidrocarbonetos analisados.

Apesar da volatilização do benzeno e tolueno ser intensa, observa-se uma importante contribuição da microbiota, quando vemos que nos solos contendo os microrganismos já não há mais estes hidrocarbonetos no tempo de aproximadamente 24h do início dos experimentos. Idem ao estudo feito anteriormente para o benzeno e o tolueno, a microbiota ajuda a remover rapidamente o C_8 já nas primeiras 24h. Ao contrário dos outros componentes da gasolina, as frações C_{9+} são mais difíceis de serem degradadas levando maior período de tempo para serem removidas dos solos. Diferentemente das demais análises, os C_{9+} aromáticos ainda perduram no solo após 26 dias.

O lodo industrial retém os hidrocarbonetos em sua matriz por um período maior de tempo. A redução aos mesmos níveis encontrados para os demais tratamentos leva em torno de 6 dias a mais para ocorrer, ficando ainda uma parcela residual até o 35º dia. Apesar de trazer uma condição ambiental melhor ao final dos tratamentos, este pode ser um fator crucial para a saúde pública de populações que vivam ao redor de vazamentos de combustíveis.

A variação do pH do solo com a concentração de gasolina mostrou que o pH aumenta com o incremento do contaminante, atingindo um patamar aos 6mL/20mL água em 4,9. Entretanto, para fins práticos, as diferenças de valores são muito pequenas. No caso do diesel não houve qualquer variação quando se aumenta ou diminui a quantidade do contaminante.

Na avaliação da variação da condutividade elétrica na gasolina, observou-se que há, inicialmente, um aumento da condutividade, que decai com o incremento do contaminante. No caso do diesel, temos uma exponencial decrescente até 8mL/10g solo, a partir de onde a condutividade elétrica se torna constante em 8 μ S. Contaminações de até 3mL/10g solo poderiam ser confundidas com o solo controle.

Há um aumento significativo da formação de agregados de solo durante os processos de biorremediação. Todos os tratamentos mostraram agregação de solo, com correspondente diminuição das partículas mais finas. Nos tratamentos com “bioaugmentação”, este aumento chega a ser maior que 100%.

Há uma influência significativa dos regimes pluviométricos na percolação de contaminantes no solo. Quando não há regime pluviométrico estabelecido, as concentrações dos contaminantes avaliados caem ao limite de detecção em um período menor de tempo. Com regimes pluviométricos, a biorremediação se torna mais dificultada e as concentrações superficiais diminuem mais lentamente. A volatilização se torna mais difícil pela diminuição da aeração no solo. Em regimes pluviométricos mais intensos (50 e 100mm), há uma maior migração de contaminantes da superfície para a profundidade. A ordem de biorremediação ocorre primeiramente para o benzeno, seguido pelo tolueno, C₈ aromático, C₉₊ aromático

A análise de metais pesados no solo mostrou uma baixa concentração dos elementos avaliados. Considerando os valores mínimos destes metais nos solos, recomendados pelo EPA, observou-se que todos os valores encontravam-se dentro da faixa de normalidade.

5.2 TOXICIDADE E LESÃO CELULAR EM MODELO ANIMAL

Nos experimentos em modelo animal, observou-se que as concentrações de benzeno, tolueno e MTBE decaem para valores mínimos (< 3 mg/kg solo) já nas primeiras 24h do início dos ensaios. O C₈ aromático também diminuiu sua concentração durante o período de ensaios, mas somente chega ao limite de detecção em 72h. Os C₉₊ aromáticos, por possuírem cadeias maiores, perduram por mais tempo no solo, apresentando teores de até 50% da concentração inicial com 72h.

O grupo de animais exposto às primeiras 24h ao solo contaminado sofreu um aumento de células brancas (White Blood Cells) significativo em relação ao controle, fato que não ocorreu com os demais grupos de animais expostos aos contaminantes. A análise das células vermelhas (Red Blood Cells), da hemoglobina (Hb), do volume corpuscular médio (VCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM) e da concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) não mostrou qualquer alteração significativa para qualquer que seja o grupo em estudo. O hematócrito (Hct) sofreu uma redução significativa nas primeiras 48h nos grupos expostos à gasolina. As alterações, entretanto, apesar de significativas estatisticamente, não são fisiologicamente, pois não acarretam modificações hemodinâmicas. Houve plaquetopenia no grupo de animais expostos às primeiras 24h do experimento. A redução de plaquetas foi acompanhada por alterações medulares, vistas na histologia. E houve um aumento no número

de linfócitos no grupo de animais expostos nas primeiras 24h ao experimento. Nos grupos expostos por 48h cumulativas, parece que o organismo dos animais consegue reverter o quadro ao final do período de exposição.

Não houve alterações da creatinina sérica entre os grupos, mostrando que a creatinina sérica não se modifica em exposição aguda aos hidrocarbonetos. No caso da creatinina urinária, a análise estatística não foi considerada porque houve problemas na coleta de urina nos primeiros grupos. E houve uma diminuição da uréia sérica no grupo exposto por 48h cumulativas. Entretanto, considerando a variação dos outros grupos e a pequena variação fisiológica (50 – 65 mg/dL), a alteração encontrada no grupo exposto por 48h não parece ter um significado importante do ponto de vista fisiológico.

A AST possui pouca dispersão de valores, e é possível se observar que o grupo exposto por 48h cumulativas apresentou um aumento da variável. No caso de uma maior concentração ou maior tempo de exposição poderia-se esperar uma sobrecarga dos contaminantes para o fígado metabolizar, acarretando lesões nos hepatócitos. Entretanto, a ALT possui uma grande dispersão da normalidade, não ocorrendo qualquer alteração significativa entre os grupos ($P > 0,05$). Os ratos Wistar não apresentaram qualquer nível de gama-glutamil transferase (γ GT) detectável, até mesmo em grupos expostos aos contaminantes, ficando este parâmetro, portanto, fora das análises.

A fosfatase alcalina, as proteínas totais no soro e proteínas urinárias, o sódio e o potássio não apresentaram diferenças significativas entre os grupos de estudo. Da mesma forma, a creatinaquinase e frações (CPK e CPK-MB) e proteínas específicas (troponina “I”) foram analisadas, sem que fosse encontrada qualquer diferença significativa entre os grupos, mostrando que, aparentemente, não há lesão cardíaca.

Os animais expostos à aspiração de hidrocarbonetos de gasolina necessitam de mais glicose para suas atividades metabólicas. De forma geral, apesar do grupo exposto às primeiras 24h não diminuir sua glicose com significância estatística, é possível se observar uma diminuição em relação aos grupos controle e 48-72h.

A lactato desidrogenase (LDH) mostrou uma diferença significativa do grupo exposto por 48h cumulativas para os demais grupos. E com relação ao cálcio sérico total, observou-se que há

uma tendência de aumento nas primeiras 24h de exposição à gasolina, diminuindo sua concentração nas horas consecutivas até atingir o valor controle no terceiro dia de exposição.

Observou-se que os grupos expostos no primeiro momento de contaminação, incluindo o grupo com efeito cumulativo, apresentam acidificação do macerado renal em relação ao controle e ao grupo exposto mais tardiamente. O estudo da condutividade elétrica normalizada por peso de rim não mostrou significância estatística entre os grupos. Entretanto, a condutividade elétrica normalizada pela relação peso de rim sobre peso de proteínas renais mostra que esta relação normalizada diminui significativamente nos grupos sujeitos à aspiração de hidrocarbonetos de gasolina.

O pH do macerado pulmonar nos diferentes grupos e dias de tratamento não mostrou alterações. E o estudo da condutividade elétrica normalizada por peso de pulmão mostrou que há significância estatística do grupo exposto nas primeiras 24h em relação aos expostos por 48-72h e 48h cumulativas. O grupo controle não apresentou diferença significativa para o grupo de 24h, apesar do último mostrar tendência de diminuição do parâmetro normalizado. E a condutividade elétrica normalizada pela relação peso de pulmão e peso de proteínas renais mostrou que a relação normalizada diminui significativamente no grupo sujeito à aspiração de hidrocarbonetos de gasolina nas primeiras 24h.

O pH e a condutividade elétrica do plasma normalizada por peso de proteínas mostrou que não há diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$), apesar de haver uma acidificação do pH na condição de 48h cumulativas. Os parâmetros urinários não puderam ser avaliados.

Nos animais expostos aos hidrocarbonetos por 24h, a medula óssea apresentou necrose e apoptose difusas, mostrando lesão irreversível dos elementos medulares, uma medula hiperpopulada com reação leucemóide. No grupo exposto por 48h cumulativas, a histologia mostrou uma medula de aspecto morfológico normal, com apenas leve diminuição da série branca. A partir desta observação foi possível pressupor a existência de um mecanismo de agressão e recuperação da medula óssea que independe do grau de contaminação e do tempo de exposição.

A histologia dos pulmões nos diferentes grupos expostos à gasolina mostrou um infiltrado com polimorfonucleares e mononucleares (linfócitos) em espaço perialveolar com espessamento alveolar importante, congestão venular e células apoptóticas. Observou-se

ainda pneumonite descamativa e secreção brônquica, além de intenso enfisema, piorando nas horas seguintes com o aparecimento de restos celulares e hemorragia. Ao contrário do que se poderia esperar, os BTEX não são os principais causadores de lesão aguda tanto na medula como nos pulmões, pois observa-se sempre o mesmo padrão, inclusive em um período onde estes contaminantes não estão mais presentes no solo.

Nos rins dos animais expostos por 24h observou-se uma vacuolização do epitélio dos túbulos renais, mantendo o predomínio de células da cortical, sem demais alterações, voltando ao padrão normal em 48h cumulativas.

Por fim, sugere-se um protocolo para exames de rotina de populações expostas a hidrocarbonetos composto de hemograma com plaquetas, creatinina e uréia, exame comum de urina, aspartato aminotransferase, eletrólitos (potássio e cálcio iônico, ou cálcio total com proteínas séricas), glicose e lactato desidrogenase.

SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

- Estudar os processos de biorremediação em outros tipos de solos, em especial argilas, que são solos predominantes nos ambientes tropicais e subtropicais;
- Avaliar a biorremediação através de cromatografia em intervalos mais curtos de tempo, analisando de forma detalhada a volatilização;
- Estudar os processos de biorremediação com cepas específicas em solos esterilizados;
- Estudar percolação e biorremediação em diferentes profundidades, com novas condições de contorno e em corpos de prova com outros diâmetros, associando-se à uma técnica de elementos finitos e fractais;
- Avaliar formação de biofilmes por microscopia eletrônica;
- Estudar agregação em diferentes tempos e em outros solos contaminados, avaliando sua resistência ao cisalhamento e permeabilidade;
- Avaliar macerados de outros órgãos e aumentar o número de animais, obtendo-se curvas para futuras avaliações patológicas;
- Estudar diferentes respostas biológicas de animais expostos por diferentes tempos e efeitos cumulativos, isolando-se por compostos químicos específicos, buscando-se identificar os reais causadores de lesão;
- Avaliar a sobrevivência dos animais após serem retirados do ambiente contaminado;
- Avaliar fatores de agregação plaquetária, resposta inflamatória, relações de glicose com o lactato, o bicarbonato e o cortisol, além de uma melhor avaliação da urina com o exame comum de urina;

REFERÊNCIAS

- AHMED, F.E. Toxicology and human health effects following exposure to oxygenated or reformulated gasoline. **Toxicology Letters**, v.123, p.89-113, 2001.
- ALEF, K., NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1995.
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. San Diego: Academic Press, 1994.
- ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. New York: Wiley, 1977.
- ALLARD, A.-S., NEILSON, A.H. Bioremediation of organic wastes sites: a critical review of microbiological aspects. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.39, n.4, p.253-285, 1997.
- ANDREOLI, C., LEOPARDI, P., CREBELLI, R. Detection of DNA damage in human lymphocytes by alkaline single cell gel electrophoresis after exposure to benzene or benzene metabolites. **Mutation Research**, v.337, p.95-104, 1997.
- ANDREWS, L.S., SNYDER, R. Toxic effects of solvents and vapors. In: AMDUR, M.O., DOULL, J., KLAASSEN, C.D. **Casarett and Doull's Toxicology: the Basic Science of Poisons**. 4. ed. New York: Pergamon Press; 1991. p.681-722.
- ANSARI-LARI, M., SAADAT, M., HADI, N. Modulation of hematology changes by polymorphism of glutathione S-transferase M1 and T1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.312, p.299-302, 2003.
- ARONSTEIN, B.N., CALVILLO, Y.M., ALEXANDER, M. Effect of surfactants at low concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil. **Environmental Science & Technology**, v.25, n. 10, p.1728-1731, 1991.
- ATSDR – AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. In: www.atsdr.cdc.gov/MHMI/mmg72.html, 2005.
- BARDI, L., et al. Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with b-cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability. **Enzyme and Microbial Technology**, v.27, p.709-713, 2000.
- BENTO, F.M., GAYLARDE, C.C. Microbial contamination of stored diesel oil in Brazil. **Revista de Microbiologia**, v.27, p.192-196, 1996.
- BENTO, F.M., GAYLARDE, C.C. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.47, p.107-112, 2001.
- BENTO, F.M., et al. Bioremediation of diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.27, p.65-68, 2004.
- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces**, v.152, p.41-52, 1999.

BONINCONTRO, A., RISULEO, G. Dielectric spectroscopy as a probe for the investigation of conformational properties of proteins. **Spectrochimica Acta Part A**, v.59, p.12, p. 2677-2684, out. 2003.

BONINCONTRO, A., et al. Apoptosis dependent decrease of the intramembrane ion traffic in cultured mouse fibroblasts shown by conductivity dispersion. **Biosciences Reports**, v.17, n.6, p.547-556, 1997.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, v.74, p.63-67, 2000.

BRADDOCK, J.F., CATTERALL, P.H. A simple method for enumerating gasoline- and diesel-degrading microorganisms. **Bioremediation Journal**, v.3, n., p.81-84, 1999.

BROWN, E.J., BRADDOCK, J.F. Sheen Screen, a miniaturized most-probable-number method for enumeration of oil-degrading microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.12, p.3895-3896, dez. 1990.

BURLAND, J.B. Small is beautiful: the stiffness of soils at small strains. **Canadian Geotechnical Journal**, v.26, n.4, p.499-516, 1989

BURLAND, J.B. On the compressibility and shear strength of natural clays. **Géotechnique**, v.40, n.3, p.329-378, 1990.

CAIRNEY, S., et al. The neurobehavioural consequences of petrol (gasoline) sniffing. **Neuroscience and Biobehavioural Reviews**, v.26, p.81-89, 2002.

CALDWELL, C.A. Aromatic hydrocarbon pathology in fish following a large spill into the Nemadji river, Wisconsin, USA. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.58, p.574-581, 1997.

CANDURA, S.M., LAPAGLIA, G., MANZO, L. Metabolism and toxicity mechanisms of benzene. In: MINOIA, C., APOSTOLI, P., BARTOLUCCI, G.B. **Benzene: Toxicology, Life Environments and Workplace**. Italy: Morgan Edizioni Tecniche; 1995. p.3-15.

CAPELLI, S.M., BUSALMEN, J.P., SÁNCHEZ, S.R. Hydrocarbon bioremediation of a mineral-base contaminated waste from crude oil extraction by indigenous bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.47, p.233-238, 2001.

CBE – Center for Biofilm Engineering. www.erc.montana.edu, 2005.

CELIK, A., AKBAS, E. Evaluation of sister chromatid exchange and chromosomal aberration frequencies in peripheral blood lymphocytes of gasoline station attendants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.60, n.1, p.106-112, jan. 2005.

COLEMAN, D.C., CROSSLEY, J.R., Jr. **Fundamentals of soil ecology**. San Diego: Academic Press, 1996.

COMPEAU, G.C., MAHAFFEY, W.D., PATRAS, L. Full scale bioremediation of contaminated soil and water. In: SAYLER, G.S., FOX, R., BLACKBURN, J.W. **Environmental Biotechnology for Waste Treatment**. New York: Plenum; 1991. p.91-109.

CORDAZZO, J., MALISKA, C.R., CORSEUIL, H.X. Solução numérica do problema de derramamento de gasolina acrescida de álcool no solo. UFSC: Florianópolis, 2000.

CORSEUIL, H.X., ALVAREZ, P.J.J. Natural bioremediation of aquifer material contaminated with gasoline-ethanol mixtures. **Revista de Microbiologia**, v.27, n.1, p.19-26, 1996.

CORSEUIL, H.X., FERNANDES, M. Efeitos de co-solvência em aquíferos contaminados com gasolina aditivada com etanol. UFSC: Florianópolis, 1999.

CORSEUIL, H.X., et al. The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation. **Water Resources**, v.32, n.7, p.2065-2072, 1998.

CUCCOVILLO, T., COOP, M.R. On the mechanics of structures sands. **Géotechnique**, v.49, n.6, p.741-760, 1999.

CUNHA, C.D., LEITE, S.G.F. Optimization of some environmental conditions to enhance gasoline biodegradation in soil microcosms bioaugmented with *Pseudomonas putida*. **Revista de Microbiologia**, v.28, p.129-134, 1997.

CUNHA, C.D., LEITE, S.G.F. Gasoline biodegradation in different soil microcosms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.45-49, 2000.

DEKANT, W., et al. Toxicokinetics of ethers used as fuel oxygenates. **Toxicology Letters**, v.124, p.37-45, 2001.

DEEB, R.A., ALVAREZ-COHEN, L. Aerobic biotransformation of gasoline aromatics in multicomponent mixtures. **Bioremediation Journal**, v.4, n.1, p.1-9, 2000.

DIBBLE, J.T., BARTHA, R. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, n.4, p.729-739, abril 1979.

DOBSON, A.L., WILSON, H.A. Respiration studies on soil treated with some hydrocarbons. **Soil Sci. Soc. Proc.**, v.28, p.536-539, 1964.

DONALDSON, S.G., MILLER, G.C., MILLER, W.W. Remediation of gasoline-contaminated soil by passive volatilization. **Journal of Environmental Quality**, v.21, p.94-102, 1992.

EPA – ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. How to effectively recover free product at leaking underground storage tanks sites – A guide to state regulators – EUA – EPA 510-R-96-001, 1996.

EPA – ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. In: www.epa.gov/indicators/roe/pdf/tdHealth.pdf, 2005.

ERVIN, M.E. Petroleum distillates and turpentine. In: HADDAD, L.M., WINCHESTER, J.F. **Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose**. Philadelphia: Saunders; 1983. p.771-779.

FAILLACE, R. **Hemograma: manual de interpretação**. Porto Alegre: ARTMED Ed.; 2003.

FELDMAN, R.G., RATHER, M.H., PTAK, T. Chronic toxic encephalopathy in a painter exposed to mixed solvents. **Environmental Health Perspectives**, v.107, n.5, p.417-422, maio 1999.

FOGEL, S., FINDLAY, M., MOORE, A. Enhanced bioremediation techniques for in situ and onsite treatment of petroleum contaminated soils and groundwaters. In: KOSTECKI, P.T., CALABRESE, E.J. **Petroleum Contaminated Soils**, v.2. Chelsea: Lewis Publishers; 1989. p.201-209.

FOGHT, J.M., GUTNICK, D.L., WESTLAKE, D.W.S. Effect of emulsan on biodegradation of crude oil by pure and mixed bacterial cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n.1, p.36-42, jan. 1989.

FIGLIO, M.S.H. **Atlas de histologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

FORSYTHE, W. **Física de suelos: manual de laboratorio**. San José, Costa Rica: IICA; 1975.

FRANKENBERGER, Jr., W.T. The need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons. In: CALABRESE, E.J.; KOSTECKI, P.T. **Hydrocarbon contaminated soils and groundwater**, v.2. Chelsea: Lewis Publishers; 1992. p.237-293.

FRIEDMAN, H.H. **Problem-oriented medical diagnosis**. 6.ed. Boston: Little, Brown and Company, 1996.

FRUIN, S.A., et al. Reductions in human benzene exposure in the California south coast air basin. **Atmospheric Environment**, v.35, p.1069-1077, 2001.

GAGNON, M.M., HOLDWAY, D.A. Metabolic enzyme activities in fish gills as biomarkers of exposure to petroleum hydrocarbons. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.44, p.92-99, 1999.

GALLEGO, J.R., et al. Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. **Biodegradation**, v.12, p.325-335, 2001.

GINGERICH, W.H., DALICH, G.M. An evaluation of liver toxicity in rainbow trout following treatment with monochlorobenzene. **Pro. West. Pharmacol. Soc.**, v.21, p.475-480, 1978.

GOLDIN, J.R.; RAYMUNDO, M.M. **Pesquisa em saúde e direitos dos animais**. 2ª ed. Porto Alegre: HCPA, 1997.

GOLDMAN, L., BENNETT, J.C. **Cecil. Tratado de medicina interna**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

GOMES, N.C.M., MENDONÇA-HAGLER, L.C.S., SAVVAIDIS, I. Metal bioremediation by microorganisms. **Revista de Microbiologia**, v.29, p.85-92, 1998.

GOSSELIN, R.E., SMITH, R.P., HODGE, H.C. **Clinical toxicology of commercial products**. 5. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984.

- GREENE, E.A., et al. Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatics hydrocarbons. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.5282-5289, 2000.
- GUYTON, A.C., HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- HAKKOLA, M., SAARINEN, L. Exposure of tanker drivers to gasoline and some of its components. **Annals of Occupational Hygiene**, v.40, n.1, p.1-10, 1996.
- HILLEL, D. **Environmental soil physics**. San Diego: Academic Press, 1998.
- HILLEL, D. Movement and retention of organics in soil: a review and a critique of modeling. In: KOSTECKI, P.T., CALABRESE, E.J. **Petroleum Contaminated Soils**, v.1, 1989. Chelsea: Lewis Publishers, 1989. p.81-86.
- HONG, J.-Y., et al. Rat olfactory mucosa displays a high activity in metabolizing methyl tert-butyl ether and other gasoline ethers. **Fundamental and Applied Toxicology**, v.40, p.205-210, 1997.
- JENSEN, V. Effects of lead on biodegradation of hydrocarbons in soil. **Oikos**, v.28, p.220-224, 1977.
- JO, W-K., SONG, K-B. Exposure to volatile organic compounds for individuals with occupations associated with potential exposure to motor vehicle exhaust and/or gasoline vapor emissions. **The Science of the Total Environment**, v.269, p.25-37, 2001.
- JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- KALF, G.F., POST, G.B., SNYDER, R. Solvent toxicology: recent advances in the toxicology of benzene, the glycol ethers, and carbon tetrachloride. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.27, p.399-427, 1987.
- KEMPER, W.D., CHEPIL, W.S. Size distribution of aggregates. In: BLACK, C.A. **Methods of soil Analysis, physical and mineralogical properties, including statistics, measurement and sampling**. 1. ed. Madison: American Society Agronomy; 1965. p.499-510.
- KHAN, A.A., COPPOCK, R.W., SCHULER, M.M. Effects of multiple exposures of small doses of pembina cardium crude oil and diesel in rats. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.40, p.418-424, 2001.
- KLAASSEN, C.D. Tóxicos ambientais não-metálicos: poluentes do ar, solventes e vapores e pesticidas. In: HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E., GILMAN, A.G. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.
- KHONKE, H. **Soil physics**. New Delhi: Tata McGraw-Hill, 1968.
- KRUTCHKOFF, R.G. One-way fixed effects analysis of variance when the error variances may be unequal. **J. Statist. Computa. Simula.**, v.30, p.259-271, 1988.

KUMAR, V., COLLINS, T. **Robbins: patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2000.

LAMBE, T.W., WHITMAN, R.V. **Soil mechanics, SI version**. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1979.

LAITINEN, J., et al. Short time exposure to benzene and gasoline at garages. **Chemosphere**, v.28, n.1, p.197-205, 1994.

LEROUEIL, S., VAUGHAN, P.R. The general and congruent effects of structure in natural soils and weak rocks. **Géotechnique**, v.40, n.3, p.467-488, 1990.

LOEHR, R.C., SMITH, J.R., CORSI, R.L. VOC and SVOC emissions from slurry and solid phase bioremediation processes. **Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management**, v.5, n.4, out. 2001.

LONG, S.M., RYDER, K.J., HOLDWAY, D.A. The use of respiratory enzymes as biomarkers of petroleum hydrocarbon exposure in *Mytilus edulis planulatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.55, p.261-270, 2003.

LOYNACHAN, T.E. Low-temperature mineralization of crude oil in soil. **Journal of Environmental Quality**, v.7, p.494-500, 1978.

MAIER, R.M., PEPPER, I.L., GERBA, C.P. **Environmental microbiology**. San Diego: Academic Press, 2000.

MARGESIN, R., SCHINNER, F. Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpine soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.7, p.2660-2664, 1997.

MASSAD, E., et al. Acute toxicity of gasoline and ethanol automobile engine exhaust gases. **Toxicology Letters**, v.26, p.187-192, 1985.

MAZA, L.M., PEZZLO, M.T., BARON, E.J. **Atlas de diagnóstico em microbiologia**. Porto Alegre: ARTMED ED., 1999.

MCGILL, W.B., ROWELL, M.J., WESTLAKE, D.W.S. Biochemistry, ecology and microbiology of petroleum components in soil. In: PAUL, E.A.; LADD, J.N. **Soil Biochemistry**, v.5. New York; 1981. p.229-296.

MCKEE, R.H., et al. Assessment in rats of the reproductive toxicology of gasoline from a gasoline vapor recovery unit. **Reproductive Toxicology**, v.14, p.337-353, 2000.

MEADOWS, R. **Renal histopathology. A light microscopy study of renal disease**. London: Oxford University Press, 1973.

MEHLMAN, M.A. Benzene health effects: unanswered questions still not addressed. **Am. J. Ind. Med.**, v.20, p.707-711, 1991.

MEHLMAN, M. Dangerous and cancer-causing properties of products and chemicals in the oil refining and petrochemical industry. **Environmental Resources**, v.59, p.238-249, 1992.

MIELNICZUK, C. **A população microbiana e a degradação de resíduo petroquímico no solo**. 135f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1991.

MINAMI, P.S. *Micologia: métodos laboratoriais de diagnóstico das micoses*. Barueri: Manole, 2003.

MISHRA, S., et al. In situ bioremediation potential of an oily sludge-degrading bacterial consortium. **Current Microbiology**, v.43, p.328-335, 2001.

MORGAN, P., WATKINSON, R.J. Microbial methods for the cleanup of soil and ground water contaminated with halogenated organic compounds. **FEMS Microbiology Letters**, v.63, n.4, p.277-300, dec. 1989.

NELSON, D.L., COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NUÑEZ, W.P. **Estabilização físico-química de um solo residual de arenito botucatu, visando seu emprego na pavimentação**. 150f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1991.

OHLINGER, R., et al. **Methods in Soil Biology**. Berlin: Springer-Verlag, 1996.

OLSON, J.J., et al. Biodegradation rates of separated diesel components. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.18, n.11, p.2448-2453, 1999.

PACHECO, M., SANTOS, M.A. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.49, p.64-75, 2001.

PASSMAN, F.J., MCFARLAND, B.L., HILLYER, M.J. Oxygenated gasoline biodeterioration and its control in laboratory microcosms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.47, p.95-106, 2001.

PAUL, E.A., CLARK, F.E. **Soil microbiology and biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1996.

PERIAGO, J.F., PRADO, A.Z. Evaluation of environmental levels of aromatic hydrocarbons in gasoline service stations by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.778, p.263-268, 1997.

PERESSUTTI, S.R., ALVAREZ, H.M., PUCCI, O.H. Dynamics of hydrocarbon-degrading bacteriocenosis of an experimental oil pollution in Patagonian soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.52, p.21-30, 2003.

PETLEY, D., et al. Deformation and fabric changes in weak fine-grained rocks during high pressure consolidation and shear. **Proc. 1st Int Symp on Geotech Engng of Hard Soils-Soft Rocks**, Athens, v.1, p.737-743, 1993.

PITARQUE, M. et al. Evaluation of DNA damage by the comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. **Mutation Research**, v.441, p.115-127, 1999.

POWERS, S.E., et al. The transport and fate of ethanol and BTEX in groundwater contaminated by gasohol. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v.31, n.1, p.79-123, 2001.

POWLEY, M.W., CARLSON, G.P. Species comparison of hepatic and pulmonary metabolism of benzene. **Toxicology**, v.139, p.207-217, 1999.

PRENAFETA-BOLDÚ, F.X., et al. Bioremediation of BTEX hydrocarbons: effect of soil inoculation with the toluene-growing fungus *Cladophialophora sp.* strain T1. **Biodegradation**, v.15, p.59-65, 2004.

PRESCOTT, L.M., HARLEY, J.P., KLEIN, D.A. **Microbiology**. Boston: McGraw-Hill, 1999.

PRIETTO, P.D.M. **Estudo do comportamento mecânico de um solo artificialmente cimentado**. 150f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

RADWAN, S.S., et al. Enhanced remediation of hydrocarbon contaminated desert soil fertilized with organic carbons. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.46, p.129-132, 2000.

RAHMAN, K.S.M., et al. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. **Bioresource Technology**, v.81, p.25-32, 2002.

RAIKHLIN-EISENKRAFT, B., et al. Determination of urinary hippuric acid in toluene abuse. **Clinical Toxicology**, v.39, n.1, p.73-76, 2001.

RICHARD, J.Y., VOGEL, T.M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.44, p.93-100, 1999.

RINSKY, R.A., et al. Benzene and leukemia. An epidemiologic risk assessment. **New England Journal of Medicine**, v.316, p.1044-1050, 1987.

ROBERTS, L., et al. Developmental toxicity evaluation of unleaded gasoline vapor in the rat. **Reproductive Toxicology**, v.15, p.487-494, 2001.

ROWELL, M.J. Restoration of oil spills on agricultural soils. In: **Proceedings on the Environmental Effects of Oil and Salt Water Spills on Land**. Banff, Alberta; 1975. p.250-276.

RUBERTO, L., VAZQUEZ, S.C., CORMACK, W.P.M. Effectiveness of the natural flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.52, p.115-125, 2003.

RUSSELL, E.W. **Soil conditions and plant growth**. 10. ed. London: Longman, 1973.

RYAN, J.R., LOEHR, R.C., RUCKER, E. Bioremediation of organic contaminated soils. **Journal of Hazardous Materials**, v.28, n.1-2, p.159-169, set. 1991.

SABATÉ, J., VIÑAS, M., SOLANAS, A.M. Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.54, n.1, p.19-25, jul. 2004.

SCHNAID, F. **Ensaio de campo e suas aplicações à engenharia de fundações**. São Paulo: Oficina de Textos, 2000.

SCHNAID, F., PRIETTO, P.D.M., CONSOLI, N.C. Prediction of cemented sand behaviour in triaxial compression. **Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering**, v.127, n.10, p.857-868, 2001.

SELBACH, P.A., CAMARGO, F. **Microbiologia e bioquímica de solos**. Apostila do Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo/ Faculdade de Agronomia/ UFRGS: Porto Alegre, 2001.

SENZOLO, C., FRIGNANI, S., PAVONI, B. Environmental and biological monitoring of occupational exposure to organic micropollutants in gasoline. **Chemosphere**, v.44, p.67-82, 2001.

SILVA, I.F. **Formação, estabilidade e qualidade de agregados do solo afetados pelo uso agrícola**. 126f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993.

SNYDER, Jr., H.J., RICE, G.B., SKUJINS, J.J. Disposal of waste oil re-refining residues by land farming. **EPA/600/9-76-015**, 1976.

SNYDER, R., WITZ, G., GOLDSTEIN, B.D. The toxicology of benzene. **Environmental Health Perspectives**, v.100, p.293-306, 1993.

SOGHNGEN, N.L. Sur le role du methane dans la vie organique. **Rec. Trav. Chim.**, v.29, p.238-274, 1910.

SOLA, A., et al. Multiparametric monitoring of ischemia-reperfusion in rat kidney: effect of ischemic preconditioning. **Transplantation**, v.75, n.6, p.744-749, mar. 2003.

SOLANO-SERENA, F., et al. Intrinsic capacities of soil microflorae for gasoline degradation. **Biodegradation**, v.9, p.319-326, 1998.

SOLANO-SERENA, F., et al. Biodegradation of gasoline: kinetics, mass balance and fate of individual hydrocarbons. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p.1008-1016, 1999.

SOLANO-SERENA, F., et al. Selection of microbial populations degrading recalcitrant hydrocarbons of gasoline by monitoring of culture-headspace composition. **Letters in Applied Microbiology**, v.30, p.19-22, 2000.

SOUTHAM, G., WHITNEY, M., KNICKERBOCKER, C. Structural characterization of the hydrocarbon degrading bacteria-oil interface: implications for bioremediation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.47, p.197-201, 2001.

SPILBORGHS, Maria Cristina Frasca. **Biorremediação de aquífero contaminado por hidrocarboneto**. 147f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Geociências / USP, São Paulo, 1997.

SPINELLI, L.F. **Comportamento de fundações superficiais em solos cimentados**. 150f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

SPINELLI, L.F., et al. Enhancing bioremediation of diesel oil and gasoline in soil amended with an agroindustry sludge. **Journal of the Air & Waste Management Association**, v.55, p.421-429, 2005.

SPINELLI, L.F., et al. Biorremediação de gasolina em um solo de Arenito Botucatu. **IV Simpósio de Prática de Engenharia Geotécnica da Região Sul – GEOSUL 2004**, 2004, Curitiba, Paraná: ABMS. p.207-212.

STONE, R.W., WHITE, A.G.C., FENSKE, M.R. Microorganisms attacking petroleum and petroleum fractions. **Journal of Bacteriology**, v.39, p.91, 1940.

STOTZKY, G. Microbial respiration. In: BLACK, C.A. **Methods of soil analysis**, Agron. Monogr. 9 Part 2. Madison: American Society of Agronomy; 1965. p.1550-1572.

SYLVIA, D.M., et al. **Principles and applications of soil microbiology**. New Jersey: Prentice Hall, 1999.

TAKAMIYA, M., et al. A case of acute gasoline intoxication at the scene of washing a petrol tank. **Legal Medicine**, v.5, p.165-169, 2003.

TEDESCO, M.J., et al. **Análise de solos, plantas e outros materiais**. Faculdade de Agronomia/ UFRGS: Porto Alegre, 1995.

TEDESCO, M.J., et al. Resíduos orgânicos no solo e os impactos no ambiente. In: SANTOS, G.A., CAMARGO, F.A.O. **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Genesis; 1999. p.159-196.

THIELECKE, H., MACK, A., ROBITZKI, A. A multicellular spheroid-based sensor for anti-cancer therapeutics. **Biosensors & Bioelectronics**, v.16, p.261-269, 2001.

THOMAS, J.M., WARD, C.H. In situ bioremediation of organic contaminants in the subsurface. **Environmental Science Technology**, v.23, n.7, p.760-766, 1989.

TORNABENE, T.G., EDWARDS, H.W. Microbial uptake of lead. **Science**, v.176, p.1334-1335, 1972.

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: ARTMED ED., 2000.

TRINDADE, P.V.O., et al. Evaluation of the biostimulation and bioaugmentation techniques in the bioremediation process of petroleum hydrocarbons contaminated soil. In: www.ipec.utusa.edu/ipec/conf2002/trindade_soriano_21.pdf, 2002.

VEGUE, J.B. **Atlas de histologia**. Madrid: Ed. Médica Panamericana, 1999.

VERSTRAETE, W.R., et al. Modelling of the breakdown and the mobilization of hydrocarbons in unsaturated soil layers. **Proceedings of the International Biodegradation**

Symposium, 1975, Kingston, Rhode Island. London: Applied Science Publishers; 1976. p.99-112.

VIEIRA, S. **Estatística experimental**. 2. ed. São Paulo: Ed. Atlas, 1999.

VOLK, L.B.S. **Erosão hídrica relacionada à condições físicas da superfície e subsuperfície de solo induzidos por formas de cultivo e manejo dos resíduos culturais**. 81f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

WALKER, J.D., COLWELL, R.R. Measuring the potential activity of hydrocarbon-degrading bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v.31, p.189-197, 1976.

WALLACH, J. **Interpretação de exames laboratoriais**. São Paulo: Medsi; 2000.

WANG, C.C., IRONS, G.V. Acute gasoline intoxication. **Archives of Environmental Health**, v.2, p.714-716, 1961.

WHITE, R.F., PROCTOR, S.P. Solvents and neurotoxicity. **Lancet**, v.349, n.9060, p.1239-1243, abril 1997.

WONG, O., RAABE, G.K. Multiple myeloma and benzene exposure in multinational cohort of more than 250,000 petroleum workers. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.26, p.188-199, 1997.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1999.

ZHOU, E., CRAWFORD, R.L. Effects of oxygen, nitrogen, and temperature on gasoline biodegradation in soil. **Biodegradation**, v.6, p.127-140, 1995.

ZHU, F., CLARK, J.I., PAULIN, M.J. Factors affecting at-rest lateral stress in artificially cemented sands. **Canadian Geotechnical Journal**, v.32, n.1, p.195-203, 1995.