IEDA DOMINGUES FERREIRA

**BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO TROPICAL CONTAMINADO
COM RESÍDUOS DA PRODUÇÃO DE PLASTIFICANTES**

Tese apresentada à Escola Politécnica
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em
Engenharia

São Paulo

2009

IEDA DOMINGUES FERREIRA

**BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO TROPICAL CONTAMINADO
COM RESÍDUOS DA PRODUÇÃO DE PLASTIFICANTES**

Tese apresentada à Escola Politécnica
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em
Engenharia.

Área de Concentração:
Engenharia Hidráulica e Ambiental

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Dione Mari Morita

São Paulo

2009

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, de março de 2009.

Assinatura do autor _____

Assinatura do orientador _____

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferreira, Ieda Domingues

Biorremediação de solo tropical contaminado com resíduos da produção de plastificantes / I.D. Ferreira. -- ed.rev. -- São Paulo, 2009.

388 p.

Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária.

1. Biorremediação 2. Biodegradação ambiental 3. Solo tropical I. Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária II. t.

Ao meu inestimável esposo,
Carneiro; à minha querida mãe, Isabel; ao meu saudoso pai,
Florivaldo e à minha adorável filhinha, Iara. Às minhas queridas
irmãs e afilhadas e aos meus queridos cunhados e sobrinhos.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Dione Mari Morita, pela oportunidade de realização deste trabalho, pela confiança e profissionalismo.

Ao Dr. Eduardo Cordeiro, diretor da indústria Petroquímica que permitiu a realização dos trabalhos em suas dependências, bem como suportou técnica e economicamente as análises de cromatografia deste estudo, a prospecção e coleta do solo e a montagem eletro-mecânica dos equipamentos da biorremediação *ex-situ*. Agradeço ainda aos Srs. Fábio Dallora, Sérgio Yoshida, José Benedito de Moura Santos, Ariovaldo Fernandes Júnior, Antenor Nunes de Siqueira e Rubens José Machado pela indispensável atenção, durante todo o período deste trabalho.

À Dr^ª. Valéria de Oliveria Maia e a Claudia Beatriz Menezes, pela receptividade; orientação e apoio a este estudo.

À Prof^ª. Dr^ª. Sidneide Manfredini, pela receptividade e pela permissão do uso do Laboratório de Pedologia do Instituto de Geografia da USP.

À Prof^ª. Dr^ª. Irma Nelly Gutierrez Rivera, pela permissão do uso do laboratório de Microbiologia Ambiental do Instituto de Biociências da USP e à Claudiana Paula de Souza, pela intensa ajuda e colaboração.

À Prof^ª. Dr^ª. Mônica Porto, pela oportunidade inicial.

À FAPESP, pelo auxílio à pesquisa, que possibilitou a realização deste trabalho.

À CAPES, pela bolsa de estudos, que permitiu minha dedicação exclusiva à esta pesquisa.

Aos funcionários do PHD, Ângela Regina Lagares de Miranda Mizuta, Wandréia Dantas Moreira, Odorico Francisco Borges e em especial, ao funcionário Ricardo Fonseca de Souza, pela contínua atenção.

Às funcionárias da biblioteca da Escola Politécnica, Manuela Gea Cabrera Reis, Maria Aparecida Gabriel, Maria Cristina Olaio Villela e Maria de Fátima da Silva, pela colaboração e atenção.

Agradeço a Deus pelo privilégio de realizar este trabalho.

RESUMO

Plastificantes podem ser definidos como aditivos de baixa volatilidade utilizados para aumentar a processabilidade, flexibilidade ou diminuir a dureza de materiais poliméricos. Os ftalatos e adipatos utilizados como plastificantes, por sua baixa solubilidade em água e pelo alto coeficiente de partição octanol/água, tendem a se acumular no solo e sedimentos. Os ftalatos de alto peso molecular são considerados potencialmente carcinogênicos, teratogênicos e ruptores endócrinos. A presente pesquisa compreendeu a biorremediação “ex-situ” do solo contaminado com resíduos de uma unidade industrial de plastificantes, utilizando reatores aeróbios, com microrganismos indígenas e exógenos adaptados através da adição de inóculo retirado da Estação de Tratamento de Efluentes por Lodos Ativados desta indústria. Foram avaliados os plastificantes: DIBP (Di-isobutilftalato), DBP (Dibutilftalato), DEHP (Bis-2-etilhexilftalato), DIDP (Di-isodecilftalato), DIAP (Di-isoamilftalato) e DOA (dioctiladipato). Foram realizados ensaios preliminares e confirmatórios em escala de laboratório. Estes ensaios demonstraram a viabilidade da biodegradação aeróbia dos plastificantes, mesmo com altos teores de co-substratos (álcoois), em valores de pH entre 5,5 a 7,81, temperatura de 17 a 30°C, umidade de 35 a 71%, adição de 5 a 11 gSSV/kg de solo, relações carbono: nitrogênio e carbono:fósforo de 60:1 e 300:1, respectivamente. Após a caracterização geotécnica do solo da área de plastificantes em 10 diferentes pontos, foram retiradas as quantidades para a biorremediação em 8 diferentes pontos (100kg solo/ponto) com os teores de plastificantes compreendidos entre 1 mg/kg solo e 2371 mg/kg solo. Análises mineralógicas, físicas e químicas foram realizadas conforme as recomendações da EMBRAPA, CETESB e Environmental Protection Agency. No ensaio piloto de biorremediação, os teores iniciais de plastificantes no solo variaram de 1 a 723mg/kg e após 120 dias de biodegradação em reatores aeróbios, as eficiências de remoção foram acima de 50%. Conforme as análises de *fingerprint* da comunidade bacteriana, ao final do processo, as bactérias presentes no solo eram originárias do lodo e do solo inicial e as análises de CGMS identificaram o metabólito Monoetilhexilftalato (MEHP), além de outros sub-produtos finais da biodegradação.

Palavras-chave: Biorremediação. Biodegradação ambiental. Solo Tropical.

ABSTRACT

Plasticizers are low volatility compounds that offer flexibility and processability to resins. The phthalates and adipates, used as plasticizers, have low water solubility e high partition octanol/water (K_{ow}) and accumulate in soil and sediments. These compounds are considered teratogenics, carcinogenics and as endocrine disruptors. This study evaluated the bioremediation of a tropical soil contaminated with process plasticizers wastes, under aerobic conditions, with and without introduction of acclimated bacteria. The compounds evaluated were: Di-butylphthalate, Di-n-butylphthalate, Bis(2-ethylhexyl)phthalate, Di-decylphthalate, Di-amylphthalate and Di-octyladipate. Previous studies were done and showed that aerobic degradation was possible: pH from 5,5 to 7,81, temperature from 17 to 30 °C, moisture from 35 to 71 %, sludge addition from 5 to 11 gSSV/kg soil, carbon-nitrogen rate 60:1 and carbon-phosphorus rate 300:1. After geological analysis of soil, considering ten different points on the factory area, it was selected the soil for biodegradation of eight points, representing 1 mg plasticizers/kg soil to 2371 mg plasticizers/kg soil. Mineralogical, physical and chemical analysis were done according to EMBRAPA, CETESB and Environmental Protection Agency recommendations. Plasticizers contents in soil varied from 1 to 723 mg/kg and after 120 days of biodegradation in eight aerobic reactors, the removal efficiencies were above 50%. The fingerprint analysis showed that the bacteria present in reactors, at the end of the tests, were originated from soil and sludge and the CG/MS analysis identified the metabolic Monoethylhexylphthalate, besides others sub-products and final products of biodegradation.

Keywords: Bioremediation. Environmental biodegradation. Tropical soil.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Definição, usos e propriedades dos plastificantes	5
3.2. Toxicologia dos plastificantes	8
3.2.1. Exposição da população aos plastificantes	8
3.2.2. Toxicidade	10
3.3. Biodegradação de ftalatos.....	13
3.3.1. Fatores que afetam a biodegradação dos ftalatos.....	23
3.3.2. Estudos de casos de biorremediação de solos contaminados com ftalatos	38
3.4. Aplicação da Microbiologia Molecular para caracterização de comunidades microbianas ambientais.....	49
4. ENSAIOS	53
Descrição Unidade Industrial	53
Processo produtivo.....	53
4.1. ENSAIOS PRELIMINARES	55
4.1.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
4.1.1.1. Amostragem do solo.....	55
4.1.1.2. Caracterização geotécnica do solo	58
4.1.1.3. Determinação da densidade de bactérias heterotróficas no solo.....	60
4.1.1.4. Caracterização química do solo	62
4.1.1.5. Amostragem e caracterização do inóculo.....	65
4.1.1.6. Ensaios de Biodegradação	65
4.1.1.7. Monitoramento do processo de biodegradação.....	68
4.1.1.8. Verificação de outros mecanismos de remoção - Fotólise	69
4.1.2. RESULTADOS E DISCUSSÕES	69
4.1.2.1. Caracterização geotécnica do solo	69
4.1.2.2. Caracterização microbiológica do solo	74
4.1.2.3. Caracterização química do solo	77

4.1.2.4. Amostragem e caracterização do inóculo.....	83
4.1.2.5. Monitoramento do Ensaio preliminar de biodegradação.....	87
4.1.2.6. Verificação teores de contaminantes após 01 ano de processo	101
4.2. ENSAIOS CONFIRMATÓRIOS	105
4.2.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	105
4.2.1.1. Amostragem do solo.....	105
4.2.1.2. Caracterização físico-química do solo para fins de levantamento.....	106
4.2.1.3. Caracterização geotécnica	106
4.2.1.4. Determinação da densidade de bactérias heterotróficas.....	109
4.2.1.5. Caracterização química do solo	110
4.2.1.6. Amostragem e caracterização do inóculo.....	110
4.2.1.7. Ensaios Confirmatórios de Biodegradação	110
4.2.1.8. Monitoramento do processo de biodegradação.....	113
4.2.2. RESULTADOS E DISCUSSÕES	114
4.2.2.1. Caracterização geotécnica e físico-química do solo	114
4.2.2.2. Caracterização microbiológica do solo	120
4.2.2.3. Caracterização química do solo	121
4.2.2.4. Amostragem e caracterização do inóculo.....	122
4.2.2.5. Monitoramento do Ensaio Confirmatório de biodegradação.....	126
4.3. CARACTERIZAÇÃO DO SOLO DA ÁREA DE PLASTIFICANTES	168
4.3.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	168
4.3.2. RESULTADOS E DISCUSSÕES	171
4.4. ENSAIO DE BIORREMEDIAÇÃO “EX-SITU”	182
4.4.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	182
4.4.1.1. Coleta e caracterização do solo para o ensaio de biorremediação	182
4.4.1.2. Coleta e caracterização do inóculo utilizado no teste de biorremediação	185
4.4.1.3. Caracterização molecular da microbiota do solo e inóculo	186
4.4.1.4. Tratamento “ex-situ”	189
4.4.1.5. Monitoramento do processo de biorremediação	191
4.4.2. RESULTADOS E DISCUSSÕES	191
4.4.2.1. Caracterização do solo para o teste piloto de biorremediação.....	192
4.4.2.2. Caracterização química do solo	201
4.4.2.3. Caracterização físico-química do Lodo.....	202
4.4.2.4. Caracterização molecular da microbiota do solo e Lodo	207

4.4.2.5. Características da Água Industrial adicionada ao processo	207
4.4.2.6. Monitoramento do Teste Piloto de Biorremediação “ <i>ex-situ</i> ”	213
5. CONCLUSÕES	360
6. ANEXOS	364
6.1. Caracterização do solo da área de plastificantes - Análises semi-voláteis.....	364
6.2. Biorremediação <i>ex-situ</i> - Cromatogramas água adicionada às betoneiras	366
6.3. Ensaios Preliminares - Cromatogramas	367
6.4. Ensaios Confirmatórios - Cromatogramas	368
6.5. Ensaios Biorremediação <i>ex-situ</i> - Cromatogramas	369
6.6. Horizontes do solo considerados para retirada de amostras na Biorremediação <i>ex-situ</i> e para retirada de amostras indeformadas na caracterização do solo da área de plastificantes.....	370
6.6. Ensaios Biorremediação <i>ex-situ</i> – Esquema Elétrico do painel de força e do painel de comando e controle de tempo de funcionamento das betoneiras.....	370
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	381

LISTA DE ABREVIATURAS

BBP	- Butilbenzilftalato
BOP	- Butiloctilftalato
BIDP	- Butilisodecilftalato
CFU	- Unidades formadoras de colônias
CG/MS	- “Gas chromatography/Mass spectrometry”
COT	- Carbono orgânico total
CTC	- Capacidade de troca catiônica
DBP	- Dibutilftalato
DEHP	- Bis-2-etilhexilftalato
DEP	- Dietilftalato
DHP	- Dihexilftalato
DIAP	- Di-isoamilftalato
DIBP	- Dibutilftalato
DIDA	- Di-isodeciladipato
DIDP	- Di-isodecilftalato
DINP	- Di-isononilftalato
DIOP	- Di-iso-octilftalato
DMP	- Dimetilftalato
DnBP	- Di-n-butilftalato
DOA	- Di-n-octiladipato
DPP	- Difenilftalato
DPrP	- Dipropilftalato
DnOP	- Di-n-octilftalato
DUP	- Di-undecilftalato
EDCs	- “Endocrine disrupting chemical”
EPA	- “Environmental Protection Agency”
HPLC	- “High-Pressure Liquid Chromatography”
IA	- Isoamílico

LISTA DE ABREVIATURAS

IBA	- Isobutanol
IDA	- Isodecanol
MMP	- Monometilftalato
MSH	- Materiais solúveis em Hexano
NB	- N-butanol
NOAEL	- “No-Observed-Adverse-Effect Level”
PA	- Ácido Ftálico
PAE's	- Ésteres de Ácido Ftálicos
PVC	- Policloreto de vinila
VOC	- Compostos Orgânicos Voláteis
2EH	- 2-etilhexanol

1. INTRODUÇÃO

Plastificantes podem ser definidos como aditivos de baixa volatilidade utilizados para aumentar a processabilidade, flexibilidade ou diminuir a dureza de materiais poliméricos (Brown et al., 1996). Assim, propriedades como alta estabilidade, fluidez e baixa volatilidade fazem dos ésteres de ácidos ftálicos de alto peso molecular, compostos extremamente aplicáveis enquanto plastificantes.

Os ésteres de ácidos ftálicos ou ftalatos são caracterizados por sua baixa solubilidade em água e pelo alto coeficiente de partição octanol/água, sendo estas propriedades dependentes do comprimento da cadeia alquílica. Devido à sua hidrofobicidade, os ftalatos tendem a se acumular no solo e sedimentos.

As perdas de ftalatos para o meio ambiente podem ocorrer durante a manufatura, distribuição, uso e disposição final dos plastificantes e de produtos plastificados. Devido à utilização global dos plásticos, os ftalatos têm sido detectados em diversos meios, sendo as maiores concentrações encontradas em áreas adjacentes às indústrias produtoras de ftalatos ou indústrias de processamento de plásticos.

A avaliação toxicológica destes compostos indica que os ftalatos de baixo peso molecular podem causar irritação nos olhos, nariz e garganta (New Jersey, 2003). Os ftalatos de alto peso molecular são considerados potencialmente carcinogênicos e teratogênicos, causando danos ao fígado, rins e órgãos reprodutivos, bem como disfunções endócrinas (Jobling et al., 1995; Harris et al., 1997; Paganetto et al., 2000; Petrovic et al., 2000). No entanto, apesar de efeitos adversos, como a proliferação de peroxissomas, terem sido observados em ratos e camundongos expostos ao DEHP (bis-2-etilhexilftalato), por exemplo, os mesmos efeitos não foram observados em culturas de hepatócitos humanos ou no fígado de primatas, levando a alteração da classificação destes compostos pela “International Agency for Research on Cancer”, passando do grupo 2B “possivelmente carcinogênico aos humanos”, para o grupo 3 “não classificável como causador de carcinogenicidade aos humanos” (IARC, 2000).

Os ésteres dimetilftalato, dietilftalato, di-n-butilftalato, butilbenzilftalato, bis-2-etilhexilftalato e di-n-octilftalato foram considerados poluentes prioritários pela Agência de Proteção Ambiental Americana – Environmental Protection Agency (U.S.EPA). O Centro de Monitoramento Ambiental Nacional da China, também, incluiu o dimetilftalato, di-n-butilftalato e di-n-octilftalato em sua lista de poluentes prioritários. No Brasil, não existe legislação para o lançamento destes compostos no meio ambiente. A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental aprovou os Valores Orientadores para Solos e Águas subterrâneas no Estado de São Paulo, estabelecendo como valor de intervenção 10 mg DEHP/kg solo seco industrial (CETESB, 2005).

A identificação de áreas contaminadas e seus impactos à saúde pública têm sido objeto de atenção em diversos países, com a conseqüente implantação de programas de remediação.

O passivo ambiental norte-americano é incalculável, pois não se conhece, nacionalmente, o número total de áreas contaminadas, embora o governo tenha reabilitado, de 1980 a 2007, 1030 das 1569 áreas consideradas prioritárias pela agência ambiental norte-americana (EPA, 2007).

O Ministério da Ecologia e Desenvolvimento Sustentável da França identificou 4033 áreas contaminadas ou suspeitas de contaminação até agosto de 2007, sendo que 2120 já tinham realizado o diagnóstico confirmatório, mas ainda não estavam reabilitadas; 150 só fizeram a avaliação preliminar; 1076 necessitavam de investigação complementar, 290 estavam com o processo de remediação em andamento e 397 não necessitavam de remediação e nem de monitoramento (RÉPUBLIQUE FRANÇAISE, 2007).

Na Bélgica, a Agência Pública de Resíduos de Flandres registrou 7000 áreas contaminadas até 1997, sendo que, deste total, 70 possuíam projeto de remediação (PUBLIC WASTE AGENCY OF FLANDERS, 2008).

Na Holanda, foram identificadas 400.000 áreas suspeitas de contaminação, sendo confirmada a necessidade de descontaminação em 55.000 pelo Ministério da Habitação, Planejamento e Meio Ambiente Holandês. De 2000 a 2004, foram remediadas 5.188 áreas (WESSELINK; NOTENBOOM; TIKTAK, 2006).

Na Áustria, existem 156 áreas contaminadas, sendo que 88 já foram remediadas e 78 estão em processo de remediação (UMWELTBUNDESAMT GMBH, 2007).

Um diagnóstico preliminar do Ministério da Saúde do Brasil, realizado entre 2001 e 2003, indicou a existência de 15.237 áreas potencialmente contaminadas no país, no entanto, um diagnóstico confirmatório, em 2004, identificou a existência de 689 áreas potenciais e efetivas com populações expostas ou sob risco de exposição a solos contaminados. No último inventário, realizado em 2005, este número foi de 703 áreas (BRASIL, 2005).

Regionalmente, um panorama da situação foi apresentado em maio de 2002, quando a CETESB tornou pública a primeira relação de áreas contaminadas do Estado de São Paulo, na qual figuravam 255 sítios contaminados. A última atualização desta relação, divulgada em novembro de 2008, apontou a existência de 2514 áreas contaminadas, das quais 934 tinham alguma proposta ou processo de remediação em andamento, 95 estavam em monitoramento para avaliação da remediação implementada e apenas 87 já haviam concluído a descontaminação (CETESB, 2007).

As pesquisas envolvendo a biorremediação ainda são escassas no Brasil, assim como a sua implantação em escala real. Os fatores que influem no sucesso desta técnica ainda não são bem conhecidos, sendo a proposta desta pesquisa contribuir para a determinação destes fatores em solos tropicais contaminados com resíduos gerados na produção de plastificantes.

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivos:

a) Nos Ensaio Preliminares:

Verificar a biodegradação dos álcoois e plastificantes, presentes no solo contaminado de uma indústria de plastificantes, por meio de bactérias indígenas e exógenas adaptadas e definir as técnicas analíticas a serem utilizadas nos ensaios de biorremediação *ex-situ*.

b) Nos Ensaio Confirmatórios:

Ratificar os resultados obtidos nos Ensaio Preliminares e definir as condições ótimas de biodegradação para o tratamento *ex-situ*.

c) Na Caracterização do solo da Unidade Industrial de plastificantes:

Conhecer a distribuição dos álcoois e plastificantes nos diferentes horizontes do solo da unidade industrial para a seleção das amostras a serem utilizadas na biorremediação *ex-situ*.

d) Nos Ensaio de Biorremediação *ex-situ*:

Avaliar a biorremediação nas amostras de solo contaminadas e selecionadas na etapa de Caracterização do solo da Unidade Industrial de plastificantes.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Definição, usos e propriedades dos plastificantes

Os plastificantes, de maneira geral, são definidos como aditivos utilizados para melhorar a flexibilidade de materiais poliméricos.

Os ésteres de ácidos ftálicos (dialquil ou alquil aril éster do ácido 1,2 benzeno dicarboxílico), comumente chamados de ésteres ftálicos ou simplesmente ftalatos, são amplamente utilizados como plastificantes em indústrias químicas, servindo como um importante aditivo às resinas de policloreto de vinila (PVC) e a outras, como acetato de polivinila, poliuretano e resinas celulósicas. São empregados ainda, na produção de repelentes de insetos, fibras sintéticas e cosméticos (ATSDR, 2002).

Os diésteres ftálicos são produzidos industrialmente a partir das reações de esterificação, utilizando álcoois com cadeias contendo 1 a 13 átomos de carbono, embora ésteres com cadeias contendo 1 a 3 átomos de carbono sejam considerados muito voláteis para uso como plastificantes.

Staples et al. (1997) realizaram uma ampla revisão bibliográfica das propriedades físico-químicas de dezoito ésteres ftálicos comercialmente importantes (Tabela 1), chegando às seguintes conclusões:

- Os ésteres ftálicos são líquidos a temperatura ambiente e possuem temperatura de fusão abaixo de $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, com exceção do Dimetilftalato (DMP) e Diundecilftalato (DUP);
- A solubilidade dos ésteres ftálicos de baixo peso molecular em água tende a diminuir com o aumento do número de carbonos do respectivo álcool. Para os ésteres ftálicos de alto peso molecular, a tendência de declínio da solubilidade em água, esperada em função do aumento do comprimento da cadeia alquila, não é aparente;

- As constantes de partição octanol/água dos ésteres ftálicos aumentam com o aumento do comprimento da cadeia alquílica, indicando alta hidrofobicidade;
- Os valores da pressão de vapor de ésteres ftálicos apresentam, de maneira geral tendência de declínio, acima de quatro ordens de magnitude, em função do aumento do comprimento da cadeia alquílica.

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas dos ésteres ftálicos

Plastificante/Abreviação		Número Carbonos Álcool	Ponto de Fusão (°C)	Solubilidade em água (mg/L)	Log Kow (média geométrica)	Pressão Vapor (mmHg a 25°C)
Dimetilftalato	DMP	1	5,5	4200	1,61	1,0*E-3
Dietilftalato	DEP	2	-40	1100	2,38	1,6*E-4
Dialilftalato	DAP	3	–	182	3,36	1,16*E-3
Dipropilftalato	DPrP	3	–	108	3,63	1,04*E-3
Di-n-butilftalato	DnBP	4	-35	2,7	4,45	2,7*E-5
Di-isobutilftalato	DIBP	4	-58	20	4,11	5,8*E-4
Butilbenzilftalato	BBP	4-6	-35	2,7	4,59	5,0*E-6
Dihexilftalato	DHP	6	-27,4	0,05	6,3	5,06*E-6
Di-n-octilftalato	DnOP	8	-25	0,0005	8,06	1,0*E-7
Butil 2-Etilhexilftalato	BOP	6,8	–	<1,0	6,5	1,1*E-7
Di(n-Hexil,n-Octil,n-Decil)ftalato	610P	6,8,10	–	0,9	8,54	3,4*E-7
Bis-2-Etilexilftalato	DEHP	8	-47	0,003	7,5	1,0*E-7
Di-iso-octilftalato	DIOP	8	-46	0,001	8,00	1,06*E-6
Di-isononilftalato	DINP	9	-48	<0,001	>8,00	<5,0*E-7
Di-isodecilftalato	DIDP	10	-46	<0,001	>8,00	<5,0*E-7
D711 e L911ftalato	D711 e L911P	7,9-11	<-50	<0,001	>8,00	<5,0*E-7
Di-undecilftalato	DUP	11	-9	<0,001	>8,00	<5,0*E-7
Di-isotridecilftalato	DTDP	13	-37	<0,001	>8,00	<5,0*E-7

Fonte – Adaptado de Staples et al. (1997)

3.2. Toxicologia dos plastificantes

3.2.1. Exposição da população aos plastificantes

A população em geral é exposta aos ftalatos através de alimentos, água e ar, sendo as principais vias de contaminação, a ingestão e a inalação. Nos alimentos industrializados, os ftalatos podem estar presentes devido a contaminações durante o processo produtivo, em função dos tipos de equipamentos utilizados ou às próprias embalagens, sendo acentuadas em alimentos industriais gordurosos. Meek&Chan (1994) estimaram a exposição da população do Canadá aos ftalatos, em função da faixa etária, por acreditarem que as crianças estivessem mais susceptíveis à exposição alimentar (Tabela 2).

Tabela 2 – Exposição diária da população canadense ao DEHP ($\mu\text{g/kg}$ massa corpórea/dia)

Meio	Idade (anos)				
	0,0-0,5	0,5-4	5-11	12-19	20-70
Atmosfera: região dos grandes lagos	0,00003-0,0003	0,00003-0,0003	0,00004-0,0004	0,00003-0,0003	0,00003-0,0003
Ar (ambiente interno em edificações)	0,86	0,99	1,2	0,95	0,85
Água potável	0,13-0,38	0,06-0,18	0,3-0,10	0,02-0,07	0,02-0,06
Alimento	7,9	18	13	7,2	4,9
Solo	0,000064	0,000042	0,00014	0,000004	0,00003
Total	8,9-9,1	19	14	8,2	5,8

Fonte – Adaptado de Meek&Chan (1994)

O Centro de Prevenção e Controle de Doenças dos Estados Unidos (U.S.CDC) avaliou o nível de exposição humana aos ftalatos através de técnicas não-invasivas, medindo as concentrações dos metabólitos dos ftalatos BBP, DBP, DEHP, DnOP e DINP na urina de 2541 indivíduos, considerados como representativos da população americana, durante os anos de 1999 e 2000. Metabólitos do BBP, DBP, DEHP foram identificados em adultos e crianças, estando os teores nestas últimas acima daqueles encontrados nos adultos, quando expressos relativamente à massa corpórea. Os metabólitos do DnOP e

DINP estavam abaixo dos níveis de detecção em todos os grupos. A USCDC concluiu ainda, que a exposição ao DBP em mulheres era maior do que em homens, possivelmente devido ao uso de produtos de beleza e higiene pessoal. Os valores máximos encontrados em mulheres correspondiam a 5,2 µgDBP/kg massa corpórea/dia, estando, no entanto, abaixo da dose de referência estabelecida pela U.S.EPA, correspondente a 100 µg/kg massa corpórea/dia (Tabela 3). Os autores não especificaram os metabólitos encontrados em função do tipo de ftalato inicial.

Tabela 3 – Exposição diária da população americana ao ftalatos (µg/kg massa corpórea/dia)

Ftalatos	Todos os Indivíduos	Mulheres	Crianças de 6 a 11 anos
BBP	0,43	0,56	0,80
DBP	0,86	1,12	0,91
DEHP	0,61	0,67	0,57
DnOP	<LD	<LD	<LD
DINP	<LD	<LD	<LD

LD – Limite de detecção (LD DnOP = 0,9 mg/L e LD DINP = 0,8 ng/L)

Fonte – Adaptado de USCDC (2003)

A exposição ocupacional ocorre, principalmente, durante a manufatura dos ftalatos e o processamento de plásticos, sendo a principal via de exposição a inalação e, em menor escala, a dérmica. O Conselho Americano de Química considera, por exemplo, que a exposição ocupacional ao DEHP nos Estados Unidos esteja abaixo de 1 mg/m³, durante a produção dos ftalatos (143 µg/kg massa corpórea/dia) e abaixo de 2 mg/m³ durante a produção de resinas de PVC (286 µg/kg massa corpórea/dia). A exposição ocupacional não deve ultrapassar 700 µg /kg massa corpórea/dia para atender as concentrações no ambiente de trabalho, estabelecidos pelos padrões de higiene ocupacional americano (Chemical Manufactures Association, 1999).

Um grupo especialmente exposto aos ftalatos compreende a população submetida a procedimentos médicos específicos: hemodiálise, transfusão de sangue, oxigenação extracorporeal, “by-pass” cardiopulmonar, administração intravenosa, alimentação

parenteral e enteral, onde os acessórios e equipamentos utilizados, manufaturados a partir de resinas de PVC, contém em média 20 a 40% de DEHP em massa. A taxa de transferência de DEHP em transfusão de sangue em recém nascidos é de 1800 µg/kg massa corpórea/dia. Em adultos, submetidos à 156 sessões de hemodiálise/ano e massa corporal média de 70 kg, esta taxa corresponde a 640 µg/kg massa corpórea/dia (NTP CENTER, 2002).

3.2.2. Toxicidade

Hazelton (1992b) expôs um grupo de 10 camundongos fêmeas e 10 machos ao DEHP, durante 4 semanas, em dietas, a doses de 0, 1000, 5000, 10000, 25000 ppm, equivalentes a 0, 245, 1209, 2579, 6992 mg/kg massa corpórea/dia, para os machos e a 0, 270, 1427, 2897 e 7899 mg/kg massa corpórea/dia, para as fêmeas. O autor observou:

- Aumento na mortalidade em doses de 25000 ppm DEHP: 4 machos e 3 fêmeas;
- Reduções no peso, equivalentes a 5% e 28%, respectivamente, nas doses de 5000 e 25000 ppm em machos e, equivalentes a 29% na dose de 25000 ppm nas fêmeas;
- Alterações hematológicas: reduções nos níveis de eritrócitos em 25000 ppm em machos e reduções nos níveis de hemoglobina e hematócritos em 5000 ppm nos machos e 10000 ppm nas fêmeas;
- Alterações no tamanho de órgãos: aumento no fígado em doses acima de 5000 ppm nos machos e fêmeas; diminuição dos rins em doses acima de 5000 ppm nos machos; aumento dos rins em doses de 25000 ppm nas fêmeas e diminuição nos testículos em doses de 10000 ppm e 25000 ppm nos machos;
- Alterações histológicas: aumento na incidência de hipertrofia hepatocelular e necrose no fígado de machos e fêmeas em dose acima de 5000 ppm; inflamação nos rins dos machos em dose acima de 5000 ppm e das fêmeas acima de 10000 ppm; atrofia na glândula do sistema linfático (“thymus”) dos machos e fêmeas em dose de 25000 ppm; atrofia testicular nos machos e ausência da “corpora lútea” no ovário das fêmeas em dose de 25000 ppm.

O autor afirmou que os resultados deste estudo evidenciaram uma dose de 5000 ppm correspondente ao mais baixo efeito adverso observado (LOAEL), equivalente a 1209-1427 mg/kg massa corpórea/dia e uma dose de 1000 ppm, correspondente ao valor de

efeito adverso não-observado (NOAEL), equivalente a 245-270 mg/kg massa corpórea/dia.

Diferenças no metabolismo e na conseqüente absorção dos ftalatos foram observadas entre as diversas espécies. Albro et al. (1982) descreveram que os roedores absorvem, no mínimo, 50% DEHP por via oral, em diversas doses, contrariamente aos primatas, que apresentam absorção limitada para os ftalatos de alto peso molecular. Rhodes et al. (1986) administraram doses de 2500 mgDEHP/kg massa corpórea em macacos e estimaram que as máximas doses internas atingidas seriam equivalentes às doses administradas em roedores de 100-200 mgDEHP/kg massa corpórea. Kurata et al. (2003) afirmaram que os primatas excretam os ftalatos presentes na bile em uma extensão muito maior do que os roedores, sendo que a parcela absorvida não é necessariamente distribuída aos órgãos alvos identificados nos estudos com roedores.

A Agência para Substâncias Tóxicas e Registros de Doenças dos Estados Unidos afirmou que os aumentos dos peroxissomas hepático e enzimático são as marcas da exposição ao DEHP, por exemplo, em roedores, porém, os animais não são igualmente susceptíveis aos efeitos hepáticos do DEHP: estes efeitos foram evidentes em ratos e camundongos, parcialmente evidentes em porcos e não evidentes em macacos (ATSDR, 2002).

Nos últimos anos, especial atenção tem sido dada aos efeitos de compostos perigosos ao sistema endócrino. Estes compostos, chamados disruptores endócrinos, podem afetar a síntese, secreção, transporte, ação ou eliminação dos hormônios naturais no corpo, responsáveis por manter a homeostase, a reprodução, o desenvolvimento e o comportamento (USEPA, 1997). Autores como Daston et al. (1997), Safe et al. (1997) e Crisp et al. (1998) incluíram diversos compostos químicos, entre eles o DEHP, nesta classificação.

Alguns estudos verificaram a possibilidade dos ftalatos simularem ou antagonizarem as ações dos receptores estrógenos e andrógenos. Zicarewsky et al. (1998) administraram doses equivalentes a 2000 mgDEHP/kg massa corpórea/dia, durante 4 dias, em roedores e verificaram que o DEHP não atuou como receptor estrógeno ou competiu com o hormônio uterino 17 β -estradiol. Paganetto et al. (2000) realizaram ensaios “in vitro” e

verificaram que o DEHP e o seu metabólito, o mono etilhexilftalato (MEHP), não apresentaram afinidade ao receptor andrógeno humano em concentrações até 10 Molar. Parks et al. (2000) realizaram estudos em roedores fêmeas, durante a fase gestacional, administrando doses equivalentes a 750 mgDEHP/kg massa corpórea/dia e concluíram que o DEHP não atuava como um receptor andrógeno antagônico, mas sim como um antiandrógeno, durante um estágio crítico de formação do aparelho reprodutivo em roedores, reduzindo os níveis de testosterona dos fetos e pós-natal dos machos aos níveis hormonais das fêmeas.

O NTP Center (2004) publicou uma revisão do “Relatório de avaliação dos riscos dos ftalatos à reprodução humana”, por considerar que a exposição humana aos ftalatos foi melhor caracterizada nos últimos anos, após a implantação da metodologia de determinação dos metabólitos dos ftalatos na urina e por considerar estudos complementares relativos aos efeitos toxicológicos dos ftalatos, permitindo, de acordo com os autores, uma melhor definição dos valores NOAEL em roedores (Tabela 4).

Tabela 4 – Comparação entre NOAEL (mg/kg massa corpórea/dia) em roedores, obtido em diferentes datas

Ftalatos	Efeitos	NOAEL (2002)	NOAEL (2004)
BBP	Reprodução	Indefinido	50
	Desenvolvimento	182	182
DBP	Reprodução	M:52 – F:80	M:60 – F:600
	Desenvolvimento	50	50
DEHP	Reprodução	3,7 – 14	100
	Desenvolvimento	40	40
DINP	Reprodução	>600	>600
	Desenvolvimento	100-200	100-200
DIDP	Reprodução	427 – 929	427 – 929
	Desenvolvimento	>38	50

M: Macho e F: Fêmea

Fonte – Adaptado de NTP Center (2004)

O NTP Center (2004) descreveu em seu relatório que os estudos recentes sugerem que os seres humanos são menos susceptíveis aos efeitos dos ftalatos do que aqueles identificados em roedores, no entanto, afirmou que estudos detalhados como os de PBPK (*Physiologically based pharmacokinetic model*), específicos aos seres humanos, ainda são necessários. Estes modelos têm sido amplamente utilizados para avaliar riscos e utilizam modelos matemáticos da função dose-resposta para quantificar a relação entre a dose nos tecidos alvos e os efeitos tóxicos finais ou ainda, para estimar a concentração potencialmente tóxica de um determinado composto, que será transportada a qualquer tecido alvo, seguindo diversas combinações de rotas metabólicas, doses e espécies.

3.3. Biodegradação de ftalatos

Wolf et al. (1980) e Giam et al. (1984) afirmaram que a quebra metabólica dos ésteres de ácidos ftálicos (PAE) por microrganismos é considerada uma das principais rotas de degradação ambiental para estes poluentes, devido às baixas taxas de degradação nas reações de hidrólise, sem mediação biológica e nas reações de fotólise. Autores como Staples et al. (1997), por sua vez, descreveram que a biodegradação é um processo crítico, que afeta o destino dos ésteres ftálicos no meio ambiente. Cartwright et al. (2000) descreveram que a completa mineralização dos ftalatos no meio ambiente é restrita aos processos mediados por microrganismos.

Staples et al. (1997) descreveram em sua revisão bibliográfica que a rota metabólica de biodegradação dos ftalatos, em condições aeróbias e anaeróbias, inicia pela hidrólise do éster, formando o monoéster e o correspondente álcool e posteriormente, o ácido ftálico, sendo também definida como biodegradação primária (Figura 1). A próxima etapa, também definida como biodegradação última, resulta na completa mineralização do ácido ftálico e é função do meio. Sob condições aeróbias, a degradação enzimática do monoéster procede via ácido ftálico, tanto pelo caminho 3,4 ou 4,5 di-hidroxiftalato até o protocatecato. A clivagem do anel aromático do protocatecato pode ocorrer na posição orto, resultando na formação do piruvato e oxalacetato ou na posição meta, resultando em β -cetoadipato, sendo posteriormente degradado a acetil CoA e succinato. Sob condições anaeróbias, o monoéster é degradado a ácido ftálico e segue posteriormente a rota de degradação do benzoato, que é prontamente biodegradado nestas condições.

Figura 1 – Rota metabólica da biodegradação dos ésteres ftálicos em meio aeróbico e anaeróbico

Fonte – Adaptado de Staples et al. (1997)

Cartwright et al. (2000) verificaram rotas alternativas de degradação de DEP, por microrganismos indígenas, em um solo também contaminado com metanol. Foram utilizadas amostras de um solo argilo-arenoso com pH 6,3 e teor de carbono orgânico de 3,8%. Com o objetivo de garantir a completa distribuição do ftalato em 2 g deste solo peneirado (<1,7mm), os autores dissolveram o DEP em 100 µL de metanol, obtendo um

teor de 100 µg DEP/g solo seco. Em seguida, os frascos foram deixados abertos durante uma hora para volatilização do metanol. Posteriormente, foi ajustada a umidade para 50% da capacidade de campo. Depois de 20 dias de incubação a 20 °C, os autores analisaram amostras de extratos do solo, utilizando cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG/MS) e identificaram picos relativos ao dietilftalato (DEP), monoetilftalato (MEP) e ácido ftálico (PA), indicando a rota de hidrólise do DEP, bem como picos relativos ao etilmetilftalato (EMP), dimetilftalato (DMP) e monometilftalato (MMP), nesta ordem, indicando a existência de uma segunda rota de degradação (Figura 2).

Figura 2 – Rota metabólica da biodegradação do DEP por microrganismos indígenas em um solo contaminado, na presença do metanol.

Fonte – Adaptado de Cartwright et al. (2000)

A formação dos metabólitos EMP e DMP pode ocorrer através das reações de dimetilação ou reações de transesterificação e em ambos os casos, a formação sequencial de MMP e PA ocorrerá por hidrólise:

- 1- Reação de dimetilação: Clivagem da ligação C-C (ligação relativamente forte) no grupo etila, resultando em uma sequencial dimetilação, para formar EMP e posteriormente DMP;

- 2- Reação de Transesterificação: Reposição do grupo etila por um grupo metila, seguindo a clivagem da ligação C-O, para produzir EMP e posteriormente DMP. A reação de transesterificação é definida como a substituição nucleófila de um álcool por outro éster, e requer condições específicas como altas temperaturas e/ou pressões, podendo, no entanto, ocorrer nas condições ambientais, na presença de um catalisador biológico.

Os autores investigaram o papel do metanol no solo e as possibilidades das reações de transesterificação terem sido as responsáveis pela formação dos metabólitos EMP e DMP, chegando às seguintes conclusões:

1. Utilizando metanol com 10% de carbono marcado (traçador C₁₄), observaram que $2,9 \pm 0,4\%$ deste permanecia no solo até 21 dias após a injeção do DEP, não sendo, portanto, utilizado como agente nucleófilo, embora não tenham sido identificados os três metabólitos citados quando o solvente não era um álcool.
2. Devido a sua alta polaridade, a água é um agente nucleófilo mais forte do que o metanol, assim a hidrólise do DEP é uma reação preferencial em relação a transesterificação, em um solo contendo água e metanol, embora fossem verificadas as presenças de EMP e DMP no solo, mesmo com excesso de água em relação ao metanol (relação 7:1).
3. Após o período correspondente a um dia de reação, os autores já identificaram a presença de MMP, confirmando a maior reatividade da água em relação ao metanol, sem observar o acúmulo de DMP, mesmo com excesso de metanol.

Embasados nestas observações, os autores concluíram que a formação dos metabólitos EMP e DMP ocorreram pelas reações de dimetilação em um solo não estéril, na presença de metanol. Os mesmos, no entanto, não identificaram os microrganismos indígenas presentes no solo, responsáveis pela rota metabólica alternativa proposta.

Os autores afirmaram ainda que em áreas contaminadas em unidades de produção de ftalatos, onde o solo pode estar também contaminado com álcoois, a ocorrência de rotas alternativas de degradação, formando os metabólitos EMP e DMP, pode trazer efeitos mais tóxicos ao ecossistema do que a rota metabólica formando MEP e PA, uma vez que aqueles metabólitos podem causar a ruptura da membrana celular.

Zeng et al. (2002) verificaram uma nova rota de degradação de DEHP pelas bactérias *Pseudomonas Fluorescentes FS1*, isoladas a partir de sistemas de lodos ativados de indústrias petroquímicas. Tais bactérias foram identificadas como degradadoras de ftalatos, utilizando estes compostos como única fonte de carbono e energia. A alteração da rota metabólica, via hidrólise do diéster, ocorreu a partir do monoéster, onde a degradação enzimática produziu ácido ftálico, ácido benzóico, fenol e finalmente dióxido de carbono (CO₂) e água, sob condições aeróbias.

Chatterjee & Dutta (2003) investigaram as características da biodegradação do BBP pelas bactérias *Gordonia sp.*, isoladas a partir de um solo contaminado. Os testes foram conduzidos em meio aquoso, utilizando frascos do tipo “erlenmeyer”, volume de 100mL, em agitador rotativo, temperatura de 28°C, suspensão contendo BBP (1g/L) em 25 mL de um meio enriquecido (3,34 g/L K₂HPO₄ - 0,87 g/L NaH₂PO₄ - 2,0 g/L NH₄Cl - 1,0 mg/L CoCl₂.6H₂O - 200 mg/L MgSO₄.7 H₂O - 12 mg/L FeSO₄.7 H₂O - 3,0 mg/L MnSO₄.7 H₂O - 3,0 mg/L ZnSO₄.7 H₂O e 123 mg/L ácido nitrilotriacético). Os autores verificaram a completa degradação do BBP e utilizando cromatografia líquida de alta performance (HPLC) detectaram três metabólitos M₁, M₂ e M₃, com tempos de retenção de 9,8; 34,08 e 39,51 minutos, os quais foram identificados respectivamente como ácido ftálico (PA), Monobutilftalato (MBuP) e Monobenzilftalato (MBzP). Os pesquisadores propuseram a rota de degradação mostrada na Figura 3.

Figura 3 – Rota metabólica da biodegradação do BBP pelas bactérias *Gordonia sp.*

Fonte – Adaptado de Chatterjee & Dutta (2003)

Monitorando as quantidades de metabólitos em função do tempo, os autores constataram um acúmulo do MBuP e MBzP na proporção 1:2, durante os 7 dias de incubação, bem como um acúmulo da pequena quantidade de PA formado. As taxas de hidrólise do diéster e monoéster a PA foram pequenas: embora o BBP, apresentando concentração inicial correspondente a 80µmol, tenha sido totalmente hidrolisado em 4 dias, a concentração do PA formado foi igual a 3,1 µmol neste período e a 5,6 µmol após 7 dias (Tabela 5). Os autores concluíram que as bactérias *Gordonia sp.* eram capazes de utilizar o BBP como única fonte de carbono, bem como os álcoois obtidos a partir da hidrólise do diéster: benzílico e n-butanol, sendo estes últimos utilizados preferencialmente aos monoésteres. Tais bactérias, no entanto, não eram capazes de degradar o PA, sendo o mesmo considerado o produto final do processo de degradação.

Tabela 5 – Biodegradação do BBP pelas bactérias *Gordonia sp.*

Ftalato e Metabólitos	Quantidade acumulada (μmol) com o tempo (horas)							
	24	36	48	72	84	96	120	168
Butilbenzilftalato	62,4	60,5	53,6	45,5	27,7	ND	ND	ND
Mono-n-butil ftalato	2,2	2,7	5,4	8,2	14,3	25	24,5	23,9
Monobenxilftalato	3,9	4,5	9,7	15,1	29,1	50,2	49,9	49,3
Ácido Ftálico	0,2	0,4	0,6	0,8	1,6	3,1	4,1	4,5

ND – não detectado

Fonte – Adaptado de Chatterjee & Dutta (2003)

Vega & Bastide (2003) isolaram microrganismos do solo capazes de degradar o DMP e propuseram uma nova rota de degradação. Os autores utilizaram amostras advindas de dois solos distintos: “Bolquere” e “Saint Jacques”, do sul da França, coletadas em profundidades compreendidas entre 0 a 20cm da superfície, peneiradas em malha de abertura de 2mm, que apresentaram as características descritas na Tabela 6.

Tabela 6 – Características dos solos Bolquere e Saint Jacques

Parâmetro	Solo Bolquere	Solo Saint Jacques
pH	6,2	6,3
Areia	41,3%	56,7%
Silte	39,7%	38,5%
Argila	19%	4,8%
Carbono orgânico	2,95%	0,9%

Algumas amostras destes solos foram contaminadas com solução aquosa de DMP (500 mg/L) e outras, com solução aquosa de MMP (500 mg/L), obtendo teores de 50 mg ftalato/kg solo seco, sendo a umidade posteriormente ajustada para 25% (massa/massa solo seco) e levadas à incubadora (temperatura de $30 \pm 1^\circ \text{C}$).

Os autores observaram que a taxa de degradação do DMP, que seguia uma cinética de primeira ordem no solo “Bolquere”, era maior do que a do solo “Saint Jacques”. O tempo correspondente à degradação de 50% do teor inicial do composto (DT50) foi de três horas e trinta minutos para a primeira amostra de solo e trinta horas para a segunda.

O solo de “Bolquere” também demonstrou a capacidade de degradar rapidamente o MMP (DT50 = 5 horas), apresentando um transiente de acumulação de PA. Os autores atribuíram estas diferenças à atividade da carboxiesterase no solo, controlando e quantificando a produção de fenol a partir da hidrólise do acetato de p-nitrofenila misturado a cada solo, encontrando valores correspondentes a 84,2 $\mu\text{mol/min/g}$ solo para o solo Bolquere e 11,5 $\mu\text{mol/min/g}$ solo, para o solo Saint Jacques.

Isolando bactérias do solo de “Bolquere”, com alta capacidade de degradar o DMP, a partir de culturas mistas enriquecidas, os autores identificaram microrganismos aeróbios, sem mobilidade, gram-positivos pertencentes à espécie *Arthrobacter sp.* Isolando bactérias do solo de “Bolquere”, com alta capacidade de degradar o MMP, a partir de culturas mistas enriquecidas, os autores identificaram microrganismos aeróbios, gram-negativos pertencentes à espécie *Sphingomonas paucimobilis*.

Utilizando uma cultura pura de *Arthrobacter sp.*, em meio mineral, pH 6,8 e temperatura de 30°C, tendo o DMP como única fonte de carbono e energia, apresentando uma concentração inicial de 270 $\mu\text{mol/L}$, os autores observaram que o mesmo foi degradado em 20 horas. Já o MMP, formado e acumulado como intermediário nas 6 primeiras horas, manteve sua concentração praticamente constante durante as próximas 44 horas. Uma pequena quantidade de PA formada durante as primeiras 6 horas foi completamente degradada nas 44 horas subseqüentes (Figura 4).

Figura 4 – Degradação do DMP por cultura pura de *Arthrobacter sp.*, em meio mineral, pH 6,8 a 30 °C

Fonte – Adaptado de Vega & Bastide (2003)

Utilizando uma cultura pura de *Sphingomonas paucimobilis*, em meio mineral, pH 6,8 e temperatura de 30 °C, tendo o MMP como única fonte de carbono e energia, a partir de uma concentração inicial de 230 µmol/L, os autores observaram que o mesmo foi degradado em 5 horas. O PA produzido concomitante foi posteriormente degradado (Figura 5). Utilizando uma cultura mista das duas espécies de bactérias, os autores observaram a completa degradação de DMP, MMP e PA em 24 horas, a partir de uma concentração inicial de 270 µmol/L DMP.

Figura 5 – Degradação do MMP por cultura pura de *Sphingomonas paucimobilis*, em meio mineral, pH 6,8 a 30 °C

Fonte – Adaptado de Vega & Bastide (2003)

Os pesquisadores concluíram que as bactérias *Arthrobacter sp.* foram capazes de degradar o DMP diretamente a PA, mas não apresentavam a capacidade de degradar o MMP formado, propondo assim duas rotas de degradação paralelas: a hidrólise do DMP a MMP e a hidrólise do DMP diretamente a PA pelas bactérias *Arthrobacter sp.*, sendo posteriormente o MMP degradado pelas bactérias *Sphingomonas paucimobilis* e o PA pelas bactérias *Arthrobacter sp.* ou *Sphingomonas paucimobilis* (Figura 6).

Figura 6 – Esquema da rota metabólica de degradação do DMP pelas bactérias *Arthrobacter sp.* e *Sphingomonas paucimobilis*

Fonte – Adaptado de Vega & Bastide (2003)

Os microrganismos degradadores de ftalatos, identificados nos estudos descritos nesta revisão bibliográfica, estão apresentados, de forma resumida, na Tabela 7.

Tabela 7 – Tabela resumo dos microrganismos degradadores de ésteres de ácidos ftálicos identificados nos estudos descritos nesta revisão bibliográfica.

Ftalatos	Microrganismo	Pesquisadores
DEHP	<i>Brevibacterium Iodinum</i> <i>Rhodococcus luteus</i> <i>Bacillus brevi</i>	Juneson et al. (2001)
DEHP	<i>Pseudomonas Fluorescentes FS1</i>	Zeng et al. (2002)
DMP	<i>Arthrobacter sp</i> <i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Vega & Bastide (2003)
BBP	<i>Gordonia sp</i>	Chatterjee & Dutta (2003)
DEP, DPrP DBP, DHP BBP, DEHP DCP, DPP	<i>Corynebacterium sp</i> <i>Sphigomonas sp</i>	Chang et al. (2004)
DMP, DEP DnBP, DIBP DnOP	<i>Pseudomonas Fluorescentes FS1</i>	Zeng et al. (2004)

3.3.1. Fatores que afetam a biodegradação dos ftalatos

Jianlong et al. (1995) identificaram e isolaram microrganismos capazes de degradar o DBP e avaliaram os efeitos da concentração inicial deste ftalato na biodegradação. Utilizando como inóculo o lodo da estação de tratamento de águas residuárias de uma indústria petroquímica, os autores procederam a adaptação, utilizando o DBP como única fonte de carbono, em temperatura de 25 °C, em um meio de cultura, cuja composição está descrita na Tabela 8.

Tabela 8 – Composição do meio utilizado para adaptação do lodo ao dibutil ftalato

Componente	Concentração (g/L)
KH ₂ PO ₄	1,0
KNO ₃	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1
7CaCl ₂	0,1
FeCl ₃	0,01
NaCl	1,0
DBP	50 – 500 mg/L

Fonte: Jianlong et al. (1995)

Os autores isolaram cinco espécies de bactérias capazes de degradar o DBP, denominadas A, B, C, D e E e avaliaram, separadamente, suas capacidades de degradação, inoculando-as em frascos de 250 mL, contendo 50 mL do meio de cultura. Utilizando 100 mg/L de DBP, os autores observaram que o mesmo foi completamente degradado por todas as bactérias porém, em diferentes taxas de degradação (Figura 7).

Figura 7 – Degradação do DBP por diferentes espécies de bactérias (A, B, C, D e E)

Fonte – Adaptado de Jianlong et al. (1995)

Utilizando as bactérias denominadas A, que apresentaram a maior velocidade de degradação, os autores avaliaram os efeitos da concentração inicial do DBP no crescimento celular e no tempo de degradação. Os resultados obtidos indicaram um aumento na fase “lag”, relativa ao crescimento celular microbiano, com o aumento da concentração inicial de DBP, sendo também maiores os tempos necessários para a sua completa degradação. Em concentrações de 100 mg/L, por exemplo, o tempo de degradação foi de aproximadamente 40 horas; em concentrações de 400 mg/L, aproximadamente 100 horas e a fase “lag” em torno de 40 horas, no entanto, uma vez iniciada a degradação, não foram observados efeitos de inibição. Os pesquisadores observaram que os microrganismos continuaram a crescer durante um certo tempo após o consumo do substrato, provavelmente devido ao consumo dos intermediários formados durante a degradação primária do DBP (Figura 8).

Figura 8 – Biodegradação de DBP em diferentes concentrações iniciais: 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L e 400 mg/L

Figura 8 – Biodegradação de DBP em diferentes concentrações iniciais: 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L e 400 mg/L (continuação)

Fonte – Adaptado de Jianlong et al. (1995)

Chang et al. (2004) investigaram as variáveis que alteravam a eficiência na biodegradação de oito ftalatos por duas culturas de bactérias aeróbias. Os pesquisadores isolaram a bactéria gram-positiva *Corynebacterium sp.*, a partir de amostras de sedimentos dos rios de Taiwan, bem como a bactéria gram-negativa *Sphigomonas sp.*, a partir de lodo de Estações de Tratamento de Águas Residuárias de Indústrias Petroquímicas. Os testes foram conduzidos em meio aquoso, contendo em um litro de água destilada: K_2HPO_4 - 21,75 mg/L, KH_2PO_4 - 8,5 mg/L, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ - 44,6 mg/L, NH_4Cl - 1,7 mg/L, $CaCl_2$ - 27,5 mg/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 22,5 mg/L e $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - 0,25 mg/L .

1 - Efeitos da variação da temperatura e pH na biodegradação.

Os testes foram conduzidos apenas para as bactérias *Corynebacterium sp.*, utilizando-se conjuntamente os ftalatos DEP, DPrP, DBP, DPP, BBP, DHP, DCP e DEHP, em concentrações de 5mg/L cada, ajustando-se o pH para os valores 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e a temperatura em 20, 30 e 40 °C. Foram determinadas as porcentagens remanescentes de cada PAE após 7 dias de incubação. Os resultados apresentados pelos autores demonstraram que o DEHP não foi totalmente degradado em nenhuma das condições apresentadas, sendo as menores remoções observadas em pH igual a 5,0 para todos os ftalatos. Os autores identificaram como condições ótimas: pH igual a 7,0 e temperatura de 30 °C (Tabela 9).

Tabela 9 – Efeitos da variação da temperatura e do pH na degradação de ftalatos pelas bactérias *Corynebacterium sp.*

Temperatura °C	pH	Porcentagem Remanescente							
		DEP	DPrP	DBP	DHP	BBP	DEHP	DCP	DPP
30	7	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	10,8	ND ^a	ND ^a
20	7	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b	22,8	ND ^b	ND ^b
40	7	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c	29,2	ND ^c	ND ^c
30	5	2,1	3,7	1,2	12,4	3,4	45,8	21,2	1,2
30	6	ND ^d	ND ^d	ND ^d	5,3	ND ^d	33,8	12,4	ND ^d
30	8	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c	ND ^c	15,8	ND ^c	ND ^c
30	9	ND ^f	ND ^f	ND ^f	6,3	ND ^f	35,8	15,3	ND ^f

ND – Não detectado

a) DEP, DPrP, DBP, DHP, BBP, DCP e DPP foram completamente degradados com 2, 2, 2, 4, 2, 4 e 2 dias.

b) DEP, DPrP, DBP, DHP, BBP, DCP e DPP foram completamente degradados com 3, 3, 3, 5, 3, 5 e 3 dias.

c) DEP, DPrP, DBP, DHP, BBP, DCP e DPP foram completamente degradados com 4, 3, 4, 5, 5, 6 e 4 dias.

d) DEP, DPrP, DBP, BBP e DPP foram completamente degradados com 7, 7, 7, 6 e 7 dias.

e) DEP, DPrP, DBP, DHP, BBP, DCP e DPP foram completamente degradados com 2, 3, 2, 4, 3, 5 e 2 dias.

f) DEP, DPrP, DBP, BBP, e DPP foram completamente degradados com 6, 7, 6, 6 e 7 dias.

Fonte – Adaptado de Chang et al. (2004)

2 - Efeitos da variação da concentração inicial dos ftalatos na biodegradação.

Os testes foram conduzidos utilizando-se os ftalatos DEP, DPrP, DBP, DPP, BBP, DHP, DCP e DEHP, em concentrações de 5, 30 e 100 mg/L cada, pH igual a 7,0 e temperatura de 30 °C. Os autores identificaram aumento das porcentagens remanescentes de cada PAE após 7 dias de incubação, em função do aumento das concentrações iniciais destes compostos, tanto para as bactérias *Corynebacterium sp.*

como para as bactérias *Sphigomonas sp* (Tabela 10). Verificando ainda a contagem das bactérias *Corynebacterium sp*, observaram um aumento de $8,9.10^6$ CFU/mL para $1,4.10^8$ CFU/mL em 5mg/L; uma diminuição de $5,6.10^5$ CFU/mL para $9,8.10^4$ CFU/mL em 30 mg/L e de $8,9.10^4$ CFU/mL para $1,9.10^3$ CFU/mL em 100 mg/L, demonstrando, possivelmente, o aumento da toxicidade à medida que a concentração dos ftalatos aumentava.

Tabela 10 – Efeitos da variação da concentração inicial dos ftalatos na degradação pelas bactérias *Corynebacterium sp* e *Sphigomonas sp*.

Paes	Porcentagem Remanescente		
	5 mg/l	30 mg/l	100 mg/l
Corynebacterium sp			
DEP	ND ^b	21,8 ± 2,4	56,2 ± 2,3
DPrP	ND ^b	23,6 ± 2,8	68,5 ± 2,3
DBP	ND ^b	21,6 ± 2,4	65,7 ± 2,2
DHP	ND ^b	43,5 ± 3,2	83,5 ± 3,5
BBP	ND ^b	29,2 ± 1,2	69,1 ± 3,5
DEHP	10,8 ± 1,4	63,1 ± 3,2	88,5 ± 3,2
DCP	ND ^b	38,8 ± 3,2	76,0 ± 2,3
DPP	ND ^b	21,1 ± 1,1	71,4 ± 2,9
Sphigomonas sp			
DEP	ND ^c	ND ^d	ND ^c
DPrP	ND ^c	ND ^d	12,3 ± 0,3
DBP	ND ^c	ND ^d	25,3 ± 1,4
DHP	ND ^c	21,4 ± 1,2	52,7 ± 2,4
BBP	ND ^c	ND ^d	40,1 ± 5,3
DEHP	43,1 ± 13,2	72,2 ± 2,4	88,8 ± 1,3
DCP	31,1 ± 2,1	51,1 ± 2,8	68,0 ± 3,2
DPP	ND ^c	11,1 ± 1,2	48,8 ± 2,6

ND – Não detectado

a) Valores são média ±desvio padrão.

b) DEP, DPrP, DBP, DHP, BBP, DCP e DPP foram completamente degradados com 2, 2, 2, 4, 2, 4 e 2 dias.

c) DEP, DPrP, DBP, DHP, BBP e DPP foram completamente degradados com 2, 2, 4, 7, 3 e 4 dias.

d) DEP, DPrP, DBP e DPP foram completamente degradados com 2, 2, 3 e 4 dias.

e) DEP foram completamente degradados com 5 dias.

Fonte – Adaptado de Chang et al. (2004)

3 - Efeitos da presença dos diversos PAE's, simultaneamente ou individualmente, na biodegradação.

Os testes foram conduzidos apenas com as bactérias *Corynebacterium sp*, utilizando-se conjuntamente ou individualmente os ftalatos DEP, DPrP, DBP, DPP, BBP, DHP, DCP e DEHP, em concentrações de 5 mg/L cada, pH igual a 7,0 e temperatura de 30 °C. Os autores verificaram que a degradação seguia cinética de primeira ordem e observaram elevação nas taxas de degradação quando todos os 08 PAE's estavam presentes simultaneamente no meio. Atribuíram esta elevação à maior disponibilidade de carbono e energia para os microrganismos (Tabela 11).

Tabela 11 – Efeitos da presença dos diversos PAE's, simultaneamente ou individualmente, na degradação destes poluentes pelas bactérias *Corynebacterium sp*.

PAEs	Mistura			Individual		
	k	t ½	r ²	k	t ½	r ²
DEP	5,78	0,12	0,98	0,92	0,75	0,94
DPrP	5,78	0,12	0,98	0,60	1,16	0,95
DBP	5,78	0,12	0,98	0,36	1,93	0,96
DHP	0,70	0,99	0,95	0,17	4,08	0,97
BBP	5,78	0,12	0,97	0,67	1,03	0,96
DEHP	0,23	3,01	0,98	0,07	9,90	0,98
DCP	0,69	1,00	0,99	0,11	6,30	0,95

Taxa degradação (k, l/dia) e meia-vida (t ½, dia)

Fonte – Adaptado de Chang et al. (2004)

4 - Efeitos da presença de culturas mistas ou puras na biodegradação.

Os testes foram conduzidos utilizando-se conjuntamente os ftalatos DEP, DPrP, DBP, DHP, BBP, DEHP, DCP e DPP, em concentrações de 5 mg/L cada, pH igual a 7,0 e temperatura de 30 °C. Chang et al. (2004) concluíram que as bactérias *Corynebacterium sp*. apresentavam taxas de degradação mais elevadas do que as bactérias *Sphigomonas sp*. No entanto, quando as duas culturas estavam presentes simultaneamente no meio, as taxas de degradação eram ainda maiores, atribuindo esta elevação à uma possível relação de sinergismo entre as mesmas, com a conseqüente produção de enzimas específicas, não presentes no meio quando utilizadas culturas puras (Tabela 12).

Tabela 12 – Efeitos da presença das culturas mistas ou puras na biodegradação de PAE's

PAEs	<i>Sphigomonas sp</i>			Culturas Mistas			<i>Corynebacterium sp</i>		
	k	t ½	r ²	k	t ½	r ²	k	t ½	r ²
DEP	5,08	0,14	0,97	6,93	0,10	0,95	5,78	0,12	0,98
DPrP	4,33	0,16	0,96	5,78	0,12	0,97	5,78	0,12	0,98
DBP	3,01	0,23	0,95	3,85	0,18	0,98	5,78	0,12	0,98
DHP	0,47	1,47	0,98	1,16	0,60	0,97	0,70	0,99	0,95
BBP	4,62	0,15	0,96	4,95	0,14	0,96	5,78	0,12	0,98
DEHP	0,05	13,9	0,94	0,30	2,31	0,97	0,23	3,01	0,98
DCP	0,09	7,7	0,98	0,85	0,82	0,96	0,69	1,00	0,99
DPP	2,89	0,24	0,99	3,47	0,20	0,98	4,33	0,16	0,96

Taxa degradação (k, 1/dia) e meia vida (t ½, dia)

Fonte – Adaptado de Chang et al. (2004)

5 - Efeitos da adsorção na biodegradação.

Os testes foram conduzidos com culturas de bactérias *Corynebacterium sp.*, na presença de sedimentos, utilizando-se conjuntamente os ftalatos DEP, DPrP, DBP, DPP, BBP, DHP, DCP e DEHP, em concentrações de 5 mg/L cada, pH igual a 7,0 e temperatura de 30 °C e comparados com os resultados obtidos em culturas de bactérias *Corynebacterium sp.*, sem a presença de sedimentos. Os ftalatos DEP, DPrP, DBP foram completamente removidos, enquanto que os ftalatos DHP, BBP, DEHP, DCP e DPP apresentaram porcentagens de remoção de 90,7%, 99,2%, 67,4%, 89,3% e 97,2%, respectivamente. Os autores atribuíram as diferenças significativas na degradação dos ftalatos à adsorção destes compostos aos sedimentos, diminuindo assim a sua biodisponibilidade e retardando o processo de biodegradação. Os pesquisadores não mediram os teores de ftalatos nos sedimentos.

Zeng et al. (2004) investigaram os efeitos da concentração inicial de seis ftalatos na cinética de degradação, em condições aeróbias, pelas bactérias *Pseudomonas Fluorescentes FS1*. Tais bactérias foram isoladas a partir de sistemas de tratamento de águas residuárias por lodos ativados de indústrias petroquímicas e identificadas como

degradadoras de ésteres ftálicos. Os autores procederam a adaptação do inóculo durante sete dias, utilizando agitador rotativo (120rpm) e temperatura de 30 °C, em um meio de cultura contendo nutrientes e os respectivos ftalatos, de acordo com o descrito na Tabela 13 .

Tabela 13 – Composição do meio utilizado para adaptação do lodo aos ftalatos

Componente	Concentração (g/L)
DMP	0,2
DEP	0,2
DnBP	0,2
DIBP	0,2
DnOP	0,2
DEHP	0,2
K ₂ HPO ₄	1,0
NH ₄ KNO ₃	0,5
MgSO ₄	0,5
CaCl ₂	0,1
FeCl ₃	0,01
NaCl	1,0

Fonte – Adaptado de Zeng et al. (2004)

Os testes foram conduzidos utilizando-se conjuntamente os ftalatos DMP, DEP e DnBP em concentrações de 25, 50, 100, 200, 300 e 400 mg/L cada; o ftalato DIBP em concentrações de 25, 50, 100, 150, 200 e 300 mg/L e os ftalatos DnOP e DEHP em concentrações de 12,5 , 25, 50, 100, 150 e 200 mg/L cada. O teor inicial de inóculo foi de 4 a 8% em volume. Foi utilizado agitador rotativo (120rpm), mantido o pH de 6,5 a 8,0 e temperatura de incubação de 30° C. Os pesquisadores relataram que as taxas de biodegradação dos ftalatos DMP, DEP, DnBP, DIBP, DnOP e DEHP pelas bactérias *Pseudomonas Fluorescences FSI* foram significativamente retardadas em temperaturas abaixo de 10 °C e acima de 30 °C, conforme resultados apresentados em testes anteriores, no entanto, não especificaram o pH e as concentrações iniciais dos ftalatos em que foram realizados estes testes.

Os resultados apresentados pelos autores demonstraram que o DMP, DEP, DnBP, em concentrações iniciais até 100 mg/L, foram degradados rapidamente, apresentando remoções de 99%, em 3 dias. Os autores consideraram os mesmos resultados para o DIBP, no entanto observando os gráficos apresentados, verifica-se que em concentrações iniciais até 100 mg/L, as remoções de 99% para o DIBP ocorreram a partir de 48 horas. Já os ftalatos DnOP e DEHP, nesta mesma concentração, apresentaram remoções abaixo de 30% e 20% respectivamente, em 3 dias (Figura 9).

Figura 9 – Biodegradação de PAE's em diferentes concentrações iniciais pelas bactérias *Pseudomonas Fluorescentes FS1*

Fonte – Adaptado de Zeng et al. (2004)

Figura 9 – Biodegradação de PAE's em diferentes concentrações iniciais pelas bactérias *Pseudomonas Fluorescentes FS1* (continuação)

Fonte – Adaptado de Zeng et al. (2004)

Os autores concluíram que a biodegradação dos seis ftalatos pelas bactérias *Pseudomonas Fluorescentes FSI* seguia uma cinética de primeira-ordem. Correlacionando a concentração inicial dos ftalatos com as respectivas constantes de degradação, os pesquisadores observaram que para o DMP, DEP, DnBP, em concentrações iniciais até 200 mg/L; para o DIBP, até 150 mg/L; para o DnOP, até 100 mg/L e para o DEHP, até 50 mg/L, a constante de degradação (k) era independente da concentração inicial do ftalato. Em concentrações iniciais acima destes valores, a constante de degradação(k) decrescia gradualmente com a concentração inicial do respectivo ftalato, sugerindo inibição na biodegradação dos ftalatos pelas bactérias *Pseudomonas Fluorescentes FSI*. A Tabela 14 apresenta a equação cinética de biodegradação dos PAE's, meia-vida e respectivos coeficientes de correlação de cada equação.

Tabela 14 – Biodegradação dos ftalatos pelas bactérias *Pseudomonas Fluorescentes FSI*

Ftalato	Concentração inicial (mg/L)	Equação cinética	Meia-vida (horas)	r²
DMP	25	$\ln c = 3,22 - 0,107t$	6,17	0,9516
	50	$\ln c = 3,91 - 0,109t$	6,33	0,9671
	100	$\ln c = 4,61 - 0,109t$	6,38	0,9457
	200	$\ln c = 5,30 - 0,102t$	6,79	0,9586
	300	$\ln c = 5,70 - 0,073t$	9,49	0,9155
	400	$\ln c = 5,99 - 0,0667t$	10,39	0,9746
DEP	25	$\ln c = 3,22 - 0,0894t$	7,75	0,9628
	50	$\ln c = 3,91 - 0,0850t$	8,15	0,9741
	100	$\ln c = 4,61 - 0,0823t$	8,42	0,9587
	200	$\ln c = 5,30 - 0,0803t$	8,63	0,9652
	300	$\ln c = 5,70 - 0,0633t$	10,95	0,9486
	400	$\ln c = 5,99 - 0,0555t$	12,49	0,9713

c - Concentração do ftalato; t - Tempo de degradação

Fonte – Adaptado de Zeng et al. (2004)

Tabela 14– Biodegradação dos ftalatos pelas bactérias *Pseudomonas Fluoresences FSI*(continuação)

Ftalato	Concentração inicial (mg/L)	Equação cinética	Meia-vida (dias)	r²
DnBP	25	$\ln c = 3,22 - 0,067t$	10,34	0,9462
	50	$\ln c = 3,91 - 0,0650t$	10,66	0,9634
	100	$\ln c = 4,61 - 0,0639t$	10,83	0,9317
	200	$\ln c = 5,30 - 0,0631t$	10,98	0,9506
	300	$\ln c = 5,70 - 0,0528t$	13,12	0,9334
	400	$\ln c = 5,99 - 0,0450t$	15,40	0,9463
DIBP	25	$\ln c = 3,22 - 0,0462t$	15,00	0,9452
	50	$\ln c = 3,91 - 0,0460t$	15,06	0,9374
	100	$\ln c = 4,61 - 0,0459t$	15,10	0,9337
	150	$\ln c = 5,30 - 0,0436t$	15,89	0,9416
	200	$\ln c = 5,70 - 0,0368t$	18,83	0,9268
	300	$\ln c = 5,99 - 0,0298t$	23,25	0,9365
DnOP	12,5	$\ln c = 2,53 - 0,1012t$	6,85	0,9726
	25	$\ln c = 3,22 - 0,0920t$	7,53	0,9614
	50	$\ln c = 3,91 - 0,0920t$	7,53	0,9258
	100	$\ln c = 4,61 - 0,0915t$	7,57	0,9632
	150	$\ln c = 5,01 - 0,0693t$	10,00	0,9811
	200	$\ln c = 5,30 - 0,0523t$	13,00	0,9296
DEHP	12,5	$\ln c = 2,53 - 0,0723t$	9,59	0,9658
	25	$\ln c = 3,22 - 0,0716t$	9,68	0,9264
	50	$\ln c = 3,91 - 0,0698t$	10,00	0,9715
	100	$\ln c = 4,61 - 0,0615t$	11,26	0,9746
	150	$\ln c = 5,01 - 0,0501t$	13,83	0,9385
	200	$\ln c = 5,30 - 0,0408t$	16,99	0,9477

c - Concentração do ftalato; t - Tempo de degradação

Fonte – Adaptado de Zeng et al. (2004)

Os autores correlacionaram as taxas de degradação dos seis PAE's pelas bactérias *Pseudomonas Fluoresences FSI* com o comprimento e a ramificação das cadeias alquílicas dos respectivos ftalatos e observaram que as mesmas eram decrescentes na seguinte ordem: DMP > DEP > DnBP > DIBP > DnOP > DEHP.

3.3.2. Estudos de casos de biorremediação de solos contaminados com ftalatos

A introdução de microrganismos exógenos em um sistema de remediação envolve o uso de culturas especialmente adaptadas para a degradação de determinados contaminantes. Os microrganismos utilizados podem ser coletados do próprio solo contaminado, de sedimentos ou lodos de estações de tratamento de águas residuárias, sendo que as culturas identificadas e isoladas apresentam a capacidade de degradar os contaminantes presentes no solo (U.S.DOD, 1994; U.S.EPA, 1996).

Juneson et al. (2001) estudaram a biorremediação de um solo contendo DEHP, utilizando reatores em batelada com diferentes tempos de residência hidráulica. Os autores utilizaram amostras de solo superficial de uma unidade industrial de produção de polímeros desativada, predominantemente siltoso, e procederam às adaptações dos microrganismos indígenas, durante cinco dias, em um erlenmeyer de 250 mL, temperatura de 20-22 °C, pH igual a 7,0, adicionando 1g do solo contaminado e 50 mL de um meio enriquecido (Tabela 15). Inicialmente, foram utilizadas concentrações correspondentes à 500 mgDEHP/L, como única fonte de carbono e posteriormente, 1000 mgDEHP/L, na adaptação de culturas subseqüentes, sendo este procedimento repetido cinco vezes para garantir alta seletividade. Os autores isolaram e identificaram as espécies *Brevibacterium iodinum*, *Rhodococcus luteus* e *Bacillus brevi* como degradadoras do DEHP.

Tabela 15 – Composição do meio utilizado no experimento de Juneson et al. (2001)

Componente	Quantidade (g/L)
K ₂ HPO ₄	2
KH ₂ PO ₄	2
NaNO ₃	2
NH ₄ Cl	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
CaCl ₂	0.05
MnSO ₄	0,02
Solução contendo traços de metais	1mL

Fonte – Adaptado de Juneson et al. (2001)

Os autores utilizaram diferentes amostras do solo e tempos de residência hidráulica. Os reatores, operados com tempos de residência de 3; 6 e 10 dias, foram preenchidos com amostras do solo contaminado, peneirado em malha de abertura de 2 mm, apresentando teor de umidade 2,7% e teores de DEHP de 11 a 14 g/kg solo. Os reatores operados com tempos de residência de 20, 25 e 30 dias foram preenchidos com amostras do solo contaminado, peneirado em malha de abertura de 4 mm, apresentando teor de umidade 4,8% e teores de DEHP de 8 a 12 g/kg solo. Durante a partida dos reatores, foram utilizados solo contaminado e meio enriquecido (nutrientes), em relações quantitativas 1:1 (em massa), bem como inóculo em quantidades relativas a 1% em volume, sendo diariamente alimentados conforme descrito na Tabela 16.

Tabela 16 – Alimentação diária dos reatores

Tempo de residência (dias)	Massa de solo (g)	Massa de nutrientes(g)
3	395	395
6	198	198
10	119	119
15	171	164
20	129	122
25	103	98
30	77	73

Fonte – Adaptado de Juneson et al. (2001)

As remoções de DEHP corresponderam a 70%, 75% e 78% para os tempos de residência hidráulica de 3, 6 e 10 dias, respectivamente, após 25 dias de operação e a 88% e 86% para 20 e 25 dias, respectivamente, após 32 dias de operação. Os pesquisadores obtiveram, ainda, 92% de remoção de DEHP, para o tempo de residência hidráulica de 30 dias, após 38 dias de operação. Os autores concluíram que os teores de DEHP no solo tratado eram inversamente proporcionais aos tempos de residência hidráulica nos reatores, tendo estes comportamento semelhante a reatores de fluxo contínuo.

A eficiência dos reatores em batelada, com diferentes tempos de residência hidráulica, foi medida pelas taxas de remoção volumétrica, estando entre 0,23 e 2,31g/L.dia, sendo consideradas pelos autores mais eficientes do que reatores em bateladas simples, estando os valores para estes últimos entre 7 e 80 mg/L.dia. Os autores atribuíram as eficiências dos sistemas à alta atividade da biomassa mantida nos reatores. O crescimento e o desenvolvimento da biomassa foram monitorados pela contagem microbiana, determinação de sólidos em suspensão voláteis (VSS) e taxa de utilização de oxigênio (SOUR). A densidade microbiana nos reatores estabilizou após 10-12 dias de operação e aumentou de uma a três ordens de magnitude em função do tempo de residência hidráulico. Os sólidos em suspensão voláteis aumentaram proporcionalmente até o tempo de residência hidráulico correspondente a 20 dias, diminuindo para 25 e 30 dias, não podendo ser correlacionados com a contagem de bactérias (Tabela 17).

Tabela 17 – Resultados obtidos no monitoramento dos reatores em batelada tratando DEHP

Tempo de residência (dias)	DEHP inicial (mg/kg)	Contagem de bactérias (média) UFC/g	VSS (média) mg/L	SOUR mgO ₂ /g células/minuto	DEHP final (mg/kg)	Taxa de remoção volumétrica (g/L/dia)
3	7050	$5,3 \times 10^7$	4780	0,24	2125	2,31
6	6400	$8,1 \times 10^7$	5745	0,33	1570	1,27
10	6650	$1,3 \times 10^8$	6692	0,32	1430	0,78
20	3300	$3,7 \times 10^9$	6045	0,35	411	0,35
25	2400	$1,9 \times 10^9$	4152	0,35	330	0,28
30	2760	$3,2 \times 10^9$	3572	0,35	215	0,23

Fonte – Adaptado de Juneson et al. (2001)

O percentual de oxigênio dissolvido no meio foi monitorado para o reator com tempo de residência hidráulico correspondente a 6 dias, durante a partida e após 17 dias de operação, decaindo rapidamente neste último, indicando alta atividade microbiana (Figura 10).

Figura 10 – Oxigênio dissolvido no reator em batelada no instante inicial e após 17 dias de operação

Fonte – Adaptado de Juneson et al. (2001)

Os autores identificaram ainda um decaimento nos valores de pH, durante o período de crescimento da biomassa. Os valores iniciais correspondentes a 7,0 alteraram para 5,0.

Os pesquisadores atribuíram este decaimento à natureza ácida dos sub-produtos da degradação dos ftalatos.

Carrara (2003) verificou a biorremediação do DEHP no solo por microrganismos exógenos. A pesquisadora utilizou uma betoneira como nova proposta de técnica de biorremediação aeróbia e realizou dois ensaios utilizando o solo saprolítico da Universidade de São Paulo, o qual apresentou as características descritas na Tabela 18.

Tabela 18 – Caracterização química solo saprolítico avaliado por Carrara (2003)

Parâmetro	Unidade	Valor	Parâmetro	Unidade	Valor
pH		4,1	B	g/dm ³	0,1
CTC	mmolc/dm ³	20,7	Cu	g/dm ³	0,1
Matéria Orgânica	g/dm ³	3	Fe	g/dm ³	2
P	g/dm ³	1	Mn	g/dm ³	0,5
K	mmolc/dm ³	0,3	Zn	g/dm ³	1,7
Ca	mmolc/dm ³	3	Cd ³	g/dm ³	<0,01
Mg	mmolc/dm ³	1	Cr	g/dm ³	<0,01
Al	mmolc/dm ³	9	Ni	g/dm ³	<0,01
S	g/dm ³	15	Pb	g/dm ³	1,17

Fonte – Adaptado de Carrara (2003)

O solo foi contaminado com 100 mgDEHP /kg solo seco e o teor de umidade ajustado para 70% da capacidade de campo, parâmetro que foi mantido durante toda a investigação experimental. Para a introdução de microrganismos exógenos ao sistema, a autora utilizou como inóculo, o lodo da estação de tratamento de águas residuárias de uma indústria de plastificantes, localizada no Estado de São Paulo. O lodo foi lavado três vezes para remoção de outros compostos orgânicos (Tabela 19).

Tabela 19 – Caracterização do lodo utilizado por Carrara (2003)

Parâmetros	Unidades	Valores Lodo 1	Valores Lodo 2
pH		6,8	6,4
Temperatura	°C	36	34
Nitrogênio Total Kjeldahl	mg/L	326	135
Fósforo Total	mg/L	96,4	41,8
Sólidos Totais	mg/L	9720	4640
Sólidos Totais Fixos	mg/L	710	410
Sólidos Totais Voláteis	mg/L	9010	4230
Densidade de Bactérias Heterotróficas	UFC/mL	$3,4 \times 10^7$	$4,3 \times 10^7$
Carbono Total	mg/L	-	26550
Carbono Orgânico	mg/L	-	920
DEHP	mg/L	0,89	0,61

Fonte – Adaptado de Carrara (2003)

A pesquisadora procedeu os ensaios, introduzindo 150 kg de solo, 50 L de água e 15 L de inóculo na betoneira, garantindo a aeração do novo sistema proposto, através de rotação automática temporizada, a cada 12 minutos e monitorou os ensaios durante 50 dias. Os resultados apresentados demonstraram remoções correspondentes a 99,5% no ensaio 1 e 98,83% no ensaio 2, em 49 dias. Os resultados da contagem de bactérias no ensaio 1 demonstraram uma diminuição inicial na densidade microbiana, durante a fase “lag” e um aumento correspondente a 2 logs após 49 dias de tratamento. No ensaio 2, não houve elevação da densidade microbiana, comparando os valores iniciais e finais; entretanto, ocorreu diminuição na densidade microbiana após 28 dias de tratamento, voltando posteriormente aos níveis iniciais (Tabela 20). A autora atribuiu esta redução a fatores abióticos, como a temperatura, a qual correspondeu a 24 °C no 28° dia, diminuindo possivelmente o grau de reprodução dos microrganismos. Observando os

resultados de temperatura apresentados pela pesquisadora nos ensaios 1 e 2, nota-se que as do ensaio 1 foram em média 2 °C maiores do que as do ensaio 2.

Tabela 20 – Teor de DEHP no solo e contagem de bactérias heterotróficas – Ensaios 1 e 2

Ensaio 1		
Tempo (dias)	Teor de DEHP (mg/kg)	Contagem de bactérias (UFC/g)
0	57,7	4,90E+06
7	52,3	9,20E+05
35	1,0	1,8E+07
49	0,3	3,3E+08
Ensaio 2		
Tempo (dias)	Teor de DEHP (mg/kg)	Contagem de Bactérias (UFC/g)
0	68,2	3,6E+06
7	68,2	7,2E+05
14	67,8	1,2E+05
21	38,6	1,2E+06
28	23,1	7,9E+05
35	13,5	3,7E+06
42	3,5	2,0E+06
49	0,8	2,1E+06

Fonte – Adaptado de Carrara (2003)

Verificando as remoções de DEHP no ensaio 2, a pesquisadora concluiu que a fase de adaptação das bactérias, fase “lag”, encontrou-se entre o 18° e 21° dias (Figura 11).

Figura 11 – Teor de DEHP no solo – Ensaio 2

Fonte – Adaptado de Carrara (2003)

A pesquisadora notou que o teor de umidade variou entre 61,03 e 81,26%, no ensaio 1 e entre 55,85 e 83,16%, no ensaio 2. Carrara (2003) concluiu que esta variação não influenciou a biodegradação e atribuiu a mesma a imprecisão na medição de água introduzida ao sistema e à evaporação. Monitorando ainda o pH em solução de cloreto de cálcio e em água destilada, a pesquisadora conclui que não houve mudanças significativas durante os períodos de ensaio.

Jianlong et al. (2004) investigaram a degradação de quatro ftalatos (DMP, DEP, DBP e DOP) no solo, adicionando lodo adaptado e correlacionaram a taxa de degradação e as correspondentes meias-vidas, de acordo com a estrutura dos respectivos ésteres ftálicos. Utilizando microrganismos de um sistema de lodos ativados de uma estação de tratamento de águas residuárias industrial, procederam à adaptação dos mesmos durante dois dias em um reator de volume de 2,0 litros, a uma temperatura de 25° C, em um meio de cultura contendo nutrientes e os respectivos ésteres ftálicos, de acordo com a Tabela 21.

Tabela 21 – Composição do meio utilizado para adaptação do lodo

Componente	Concentração (g/L)
DMP	0,01-0,1
DEP	0,01-0,1
DBP	0,01-0,1
DOP	0,01-0,1
KH ₂ PO ₄	1,0
KNO ₃	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1
CaCl ₂	0,1
FeCl ₃	0,01
NaCl	1,0

Fonte – Jianlong et al. (2004)

Os autores utilizaram amostras de solo superficial (20-30 cm) dos jardins da Universidade Tsinghua (Beijing, China), seco a 40% e peneirado (mesh 2mm), tendo como características: pH igual a 7,2, Carbono orgânico - 1,14%, Carbono inorgânico - 0,42%, Nitrogênio Total - 0,058%, (sendo 5,82 mg/kg N-NH₄⁺ e 22,15 mg/kg N-NO₃⁻), Fósforo Total - 9,0 mg/kg, Potássio - 30,2 mg/kg e Magnésio - 52,3 mg/kg.

Os testes de degradação foram conduzidos utilizando 10 g de solo seco e peneirado, os quais foram introduzidos em *erlenmeyers* de 100 mL, sendo os ftalatos adicionados em 0,1 mL de metanol, atingindo teor de 100 µgftalato/gsolo. Os frascos foram deixados abertos, durante uma noite, para evaporação do solvente à temperatura ambiente. Foi introduzido 1 mL de lodo ativado adaptado aos ftalatos e misturado vigorosamente. A umidade foi ajustada para 60% da capacidade de campo com água destilada e os frascos mantidos a temperatura de 25°C. Posteriormente, para determinar as concentrações dos ftalatos, a biomassa e a fase líquida foram separadas por centrifugação e o sobrenadante extraído duas vezes com 5 mL de diclorometano, sendo então analisado por cromatografia gasosa.

Os autores verificaram que o DMP e o DEP foram degradados rapidamente (remoção de 90%, em 10 e 15 dias, respectivamente). A degradação do DBP foi lenta, restando 10% após 30 dias. Cinquenta por cento do DOP foi degradado durante o período de estudo. A taxa de biodegradação dos quatro ftalatos diminuiu com o aumento do comprimento da cadeia do respectivo álcool. A Figura 12 apresenta a biodegradação dos ftalatos no solo, onde as concentrações dos mesmos devem ser consideradas em mg/kg, embora os autores tenham descrito as concentrações dos ftalatos no solo em mg/L, no gráfico representativo deste processo.

Figura 12 – Degradação de Ftalatos no solo

Fonte – Adaptado Jianlong et al. (2004)

Aplicando regressão linear aos dados experimentais, os autores concluíram que a reação de degradação dos quatro ftalatos no solo seguia cinética de primeira ordem, sendo os coeficientes de correlação encontrados mostrados na Tabela 22.

Tabela 22 – Equação cinética de degradação de ftalatos no solo

PAE	Equação cinética	Taxa de degradação 1/dia	Meia-vida dias	r ²
DMP	$\ln c = 4,76 - 0,3028t$	0,3028	2,29	0,9868
DEP	$\ln c = 4,88 - 0,1871t$	0,1871	3,70	0,9850
DBP	$\ln c = 4,61 - 0,0812t$	0,0812	8,53	0,9942
DOP	$\ln c = 4,60 - 0,0244t$	0,0244	28,4	0,9975

c - Concentração do ftalato; t - tempo de degradação

Fonte – Jianlong et al. (2004)

Os autores correlacionaram a constante de degradação (k_1) e o número de carbonos do correspondente álcool para cada PAE e verificaram que o $\ln k_1$ decrescia linearmente com o aumento da cadeia alquílica (Figura 13). Da mesma forma, correlacionaram a meia-vida de cada ftalato e verificaram que a mesma crescia significativamente com o aumento do número de carbonos do respectivo álcool (Figura 14).

n - número de carbonos no álcool; k_1 - constante de degradação

Figura 13 – Correlação entre a taxa de degradação e a estrutura do PAE

Fonte – Adaptado Jianlong et al. (2004)

n - número de carbonos no álcool; $t_{1/2}$ - meia-vida dos ftalatos

Figura 14 – Correlação entre a meia-vida e a estrutura do PAE

Fonte – Adaptado Jianlong et al. (2004)

Correlacionando ainda as constantes de degradação e os coeficientes de partição octanol-água, os autores verificaram uma tendência de declínio das taxas de degradação em função do aumento destes coeficientes.

3.4 Aplicação da Microbiologia Molecular para caracterização de comunidades microbianas ambientais

A quantificação e o monitoramento de bactérias capazes de degradar compostos xenobióticos em solos contaminados através de metodologias de cultivo, frequentemente subestimam os resultados, devido à incapacidade de reproduzir as condições *in situ* e por cultivar a maioria dos microrganismos (Lloyd-Jones et al, 1999). Pesquisadores concluíram que bactérias cultiváveis representam apenas de 0,1 a 10% da população bacteriana total no ambiente (Amann et al., 1995; Hugenholtz et al., 1998). Neste contexto, a avaliação da biodiversidade utilizando técnicas convencionais, como o cultivo de bactérias em meio sólido, pode introduzir sérios erros de interpretação em estudos de ecologia microbiana (Wagner et al., 1994).

Técnicas moleculares têm sido empregadas para caracterizar os ácidos nucléicos dos microrganismos presentes na comunidade microbiológica de amostras ambientais, tendo como vantagem ser uma técnica direta a qual reflete a composição da comunidade microbiana nas condições *in situ*, pois as amostras são congeladas imediatamente após a coleta. Estas técnicas são capazes de representar de maneira mais precisa a diversidade microbiana presente no ambiente, incluindo os microrganismos que não são prontamente cultiváveis, mas que podem ser responsáveis pelas atividades de biodegradação dos poluentes de interesse (Brockman, 1995).

Técnicas baseadas em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), como a amplificação de fragmentos do gene RNAr 16S e a posterior desnaturação destes fragmentos utilizando a eletroforese DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), têm sido aplicadas para avaliar a diversidade de amostras ambientais e monitorar as alterações nas comunidades microbianas (Muyzer, G e Smalla, K (1998).

A técnica de PCR, ou reação de polimerização em cadeia, consiste na amplificação de uma cadeia específica de DNA, utilizando a enzima *Taq DNA polimerase* como catalisador da reação e oligonucleotídeos sintéticos (*primers*), como iniciadores. Ocorrem nas seguintes etapas (correspondendo a um ciclo):

1. Desnaturação: separação da dupla fita de DNA;
2. Anelamento: pareamento dos *primers* com as fitas de DNA separadas;

3. Extensão: adição de nucleotídeos produzindo a amplificação da sequência inicial

A enzima *Taq DNA polimerase* processa cerca de 1000 bases/minuto à temperatura de 72°C; já os *primers* apresentam 20 a 30 bases de extensão e a seleção dos mesmos, juntamente com o DNA alvo, definirá as condições da reação (tempos, temperaturas e número de ciclos).

A técnica de *fingerprint* DGGE consiste na extração dos ácidos nucléicos, DNA, das células dos microrganismos presentes na amostra, seguida de amplificação por PCR de uma região específica do DNA e posterior separação dos fragmentos amplificados em géis de poliacrilamida. Esta separação de fragmentos de DNA de mesmo tamanho ocorre em função da composição diferente de bases nitrogenadas das sequências de DNA, o que confere comportamentos de desnaturação diferentes em um gel contendo um gradiente progressivo de agentes desnaturantes. Desta forma, estes fragmentos de DNA com composição diferente, que correspondem potencialmente a espécies distintas de microrganismos, param de migrar em posições diferentes no gel e resultam em um perfil de bandas que reflete a complexidade da comunidade presente na amostra.

No gel de DGGE, o número, a posição exata e a intensidade das bandas dão uma estimativa indireta da riqueza e abundância relativa dos ribotipos (perfis de bandas de fragmentos de DNAr 16S) dominantes em uma amostra, possibilitando comparar diferentes comunidades. No entanto, as comunidades presentes no solo, lodo e sedimentos normalmente são muito complexas, e muitas vezes, espécies menos abundantes, porém importantes, podem não ser detectadas por esta técnica molecular (Heuer et al., 1997).

Eichner et al. (1999) afirmaram que as bandas de DGGE não necessariamente representam o número e a abundância das espécies presentes em uma comunidade microbiana, pois um organismo pode produzir mais de uma banda devido à multiplicidade e heterogenia de genes de RNAr. Adicionalmente, sequências parciais de DNAr 16S nem sempre permitem discriminação entre espécies, assim uma banda de DGGE pode representar várias espécies com sequências de DNAr idênticas (Muyzer et al., 1998).

Estas deficiências da técnica sugerem que os resultados do DGGE devem ser interpretados apenas como indicadores do grau de diversidade em uma comunidade bacteriana.

Ainda assim, a técnica oferece grande sensibilidade, rapidez, eficiência e capacidade de representar razoavelmente as variações em uma comunidade microbiana em um determinado sistema (Kaewpipat & Grady, 2002), o que a torna uma excelente ferramenta para monitoramento da dinâmica de populações microbianas.

Engelen et al. (1998) monitoraram o impacto de dois herbicidas (*Herbogil* e *Goltix*) e um óleo mineral no ecossistema do solo, através de técnicas tradicionais (respiração substrato-induzida-SIR, atividade dehidrogenase, consumo do carbono e nitrogênio) e verificaram alterações na estrutura da comunidade bacteriana, através das técnicas de DGGE. Foram retiradas amostras de um solo utilizado anteriormente para fins agrícolas, porém não contaminado, nos primeiros 10 cm de profundidade. O solo apresentava textura arenosa (12,9% argila, 37,7% silte e 49,4% areia), COT de 1,16%, pH (KCl 0,1 N) de 5,6-6,8 e capacidade de campo de 23,7 g/100g solo seco. As amostras foram secas e peneiradas (malha 2mm). Os testes foram conduzidos adicionando 5mL contaminante/1000 g solo seco, utilizando três contaminantes em diferentes ensaios e o controle (5 mL água/1000g solo seco). Os reatores foram mantidos a 20 °C, no escuro, com 60% de umidade. Foram retiradas amostras após 1, 2, 5 e 8 semanas.

Verificando os efeitos dos herbicidas e óleo mineral através das técnicas denominadas tradicionais, os pesquisadores concluíram que o herbicida *Herbogil* causou os maiores efeitos na biomassa do solo: redução de 22% na respiração induzida e de 44% na atividade dehidrogenase quando comparados aos resultados obtidos no controle, sendo os efeitos na respirometria observados somente após 2 semanas. Os autores não observaram diferenças significativas na mineralização do nitrogênio em relação ao controle.

Analisando os resultados dos *fingerprints* de DGGE das amostras após 8 semanas (Figura 15), os pesquisadores verificaram alterações na estrutura bacteriana em relação àquelas do controle, causadas principalmente pelo herbicida *Herbogil* e o óleo mineral, já as bandas obtidas no *fingerprint* das amostras do solo contaminado com *Goltix* apresentaram similaridade com àquelas do controle.

Figura 15 – Comparação dos *fingerprints* de amostras de solo controle e contaminadas com diferentes herbicidas e óleo

Fonte Adaptado de Engelen et al.(1998)

Os autores concluíram que as técnicas moleculares são complementos valiosos àquelas tradicionais: enquanto esta última avalia os parâmetros relacionados à biomassa total, a primeira avalia exclusivamente os impactos na comunidade bacteriana exposta à variações ambientais.

4. ENSAIOS

A presente pesquisa compreende a biorremediação *ex-situ* do solo contaminado com resíduos de uma unidade industrial de plastificantes, utilizando reatores aeróbios, com microrganismos indígenas e exógenos adaptados, constando de:

1. Ensaios Preliminares
2. Ensaios Confirmatórios
3. Caracterização do solo da área de plastificantes
4. Biorremediação *ex-situ*

Descrição Unidade Industrial

A unidade de plastificantes a ser remediada é parte integrante de uma indústria petroquímica, instalada no Estado de São Paulo desde 1950, que iniciou suas operações com a produção de anidrido ftálico. A indústria ocupa uma área total de 800.000 m², sendo a área da unidade de plastificantes de aproximadamente 4.000 m². Os plastificantes atualmente produzidos por esta unidade industrial (65.000 toneladas/ano) compreendem os ftalatos: DIBP (Di-isobutilftalato), DBP (Dibutilftalato), DEHP (Bis-2-etilhexilftalato), DINP (Di-isononilftalato), DIDP (Di-isodecilftalato), DTDP (Di-isotridecilftalato), DIAP (Di-isoamilftalato) e em menor escala os adipatos: DOA (dioctiladipato), DINA (di-isononiladipato) e DIDA (Di-isodeciladipato).

Processo produtivo

A unidade industrial de plastificantes utiliza o processo de esterificação em batelada, obtendo os ftalatos a partir da reação entre o anidrido ftálico e o respectivo álcool e os adipatos, a partir da reação entre o ácido adípico e o respectivo álcool. As etapas do processo produtivo compreendem a esterificação, neutralização, desalcolização e filtração:

1 - Esterificação: Inicialmente, o álcool é introduzido no reator de esterificação estequiometricamente em excesso em relação ao anidrido ftálico, por bombeamento, a partir dos tanques de estocagem e em seguida, são adicionados, o catalisador ácido p-

tolueno sulfônico e o carvão, utilizado como agente clarificante. O reator é então fechado, efetuando-se, posteriormente, o carregamento do anidrido ftálico líquido por bombeamento a partir dos tanques de estocagem. A reação ocorre sob aquecimento, iniciando a 120°C, sob vácuo, sendo o término controlado através de coletas de amostras. Os vapores de álcool e água, formados durante a reação de esterificação, saem do reator e passam por um condensador, onde são liquefeitos e, após separação, o álcool é reutilizado, permanecendo em refluxo durante toda a operação. A água é enviada para o sistema de tratamento de águas residuárias.

2 - Neutralização: Após a reação de esterificação, quando todo o anidrido ftálico reagiu, o ácido residual é neutralizado, adicionando-se carbonato de sódio ou soda cáustica ou bicarbonato de sódio, com a conseqüente formação de sal e água.

3 - Desalcolização: A etapa da desalcolização é efetuada para remover todo o álcool remanescente da reação de esterificação e recuperá-lo. O processo ocorre sob ação de vácuo e com a injeção de vapor sob pressão, que provoca o arraste do álcool existente na carga, sendo controlado para que o teor de álcool na carga seja equivalente a 0,1%. O álcool deixa o reator pelo topo, juntamente com o vapor d'água, e são conduzidos para um condensador, onde são liquefeitos. Em seguida, a mistura água/álcool é transferida para um tanque de quebra de vácuo e enviada a um decantador. A água é transferida para o sistema de tratamento de águas residuárias e o álcool é armazenado para ser reutilizado na batelada seguinte, em proporções correspondentes a 10 e 20% do total necessário. A reutilização do álcool é controlada pelo parâmetro cor do plastificante final.

4 - Filtração: Após a desalcolização, a carga é enviada para um filtro prensa, para a remoção do carvão e impurezas, sendo então o produto filtrado enviado aos tanques de estocagem de plastificantes.

4.1. ENSAIOS PRELIMINARES

4.1.1. MATERIAIS E MÉTODOS

Para verificação da possibilidade de biorremediação do solo da Unidade Industrial, foram realizados testes preliminares de biodegradação em *erlenmeyers*, com microrganismos indígenas e exógenos adaptados, utilizando-se amostras coletadas em um local previamente selecionado na área de plastificantes. Os ensaios preliminares foram realizados também para escolha das metodologias analíticas.

4.1.1.1. Amostragem do solo

O local da coleta na área de plastificantes foi selecionado em função dos dados coletados dos poços de bombeamento existentes, sendo considerado um ponto com elevados teores de contaminantes pelas quantidades de fase livre removidas; em função da proximidade dos reatores e tanques de estocagem de produtos, bem como livre acesso para remoção do piso industrial (Figura 16). Foi coletada uma amostra de solo indeformada para realização de ensaios geotécnicos (Figura 17) e avaliação da possibilidade da biorremediação *in-situ*. Foram ainda coletadas amostras deformadas para a realização do teste preliminar de biodegradação e determinações físico-químicas.

Figura 16 – Planta Geral da Unidade de Plastificantes Estudada

Fonte – Adaptado de AmbiTerra (2004)

Figura 17 – Amostra Indeformada dos Ensaios Preliminares

Foi aberta uma cava de dimensões 71x75x63cm (largura x comprimento x profundidade), sendo identificados água e óleo no local (Figura 18).

Figura 18 – Local da amostragem dos Ensaio Preliminares

A amostra indeformada foi coletada conforme procedimentos do Laboratório de Solos da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Foi retirado um cubo de 30 cm de lado, envolto em papel de alumínio, colocado em caixa de madeira com espaçamento lateral de 2,5 cm, o qual foi preenchido com parafina, para manter a integridade da amostra durante o transporte. O fechamento da caixa foi efetuado com parafusos. Esta amostra foi enviada ao Laboratório de Saneamento Professor Lucas Garcez do Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária da Escola Politécnica da USP, de onde foram retiradas amostras, em triplicatas, com batedor de volume conhecido, para determinação da densidade e porosidade total.

Foram coletados 20 kg de amostras deformadas, que foram introduzidos em sacos plásticos de 3 kg (denominadas Branco 2) e enviadas ao Laboratório de Saneamento Professor Lucas Nogueira Garcez, onde foram realizadas as determinações mencionadas no item 4.2.2, bem como o teste de biodegradação. Três kilogramas de amostra deformada, preservadas a 4 °C, conforme as recomendações do manual de gerenciamento de áreas contaminadas da CETESB (CETESB; GTZ, 2001), foram encaminhadas ao Laboratório da Unidade Industrial, onde foram realizadas as determinações dos teores de álcoois e plastificantes. Esta amostra foi denominada solo inicial.

4.1.1.2. Caracterização geotécnica do solo

As determinações relativas a densidade aparente, umidade residual e capacidade de campo foram realizadas de acordo com a Norma CETESB L6.350 (CETESB, 1990), sendo os ensaios efetuados em triplicatas. As determinações relativas a porosidade total foram realizadas de acordo com o procedimento do Manual de Métodos de Análises do Solo (EMBRAPA, 1999).

Preparação da amostra

Aproximadamente 3 kg de solo foram distribuídos em uma bandeja de aço inox (AISI 304), isenta de contaminações, para secagem à temperatura ambiente, durante uma semana. Tal secagem foi efetuada em capela de laboratório e eventuais torrões formados foram desagregados. Posteriormente, 1 kg deste solo foi peneirado em malha com diâmetro de 2,0 mm (Figura 19) e esta amostra foi denominada Branco 1.

Figura 19 – Preparação amostras para realização dos Ensaio Preliminares

Densidade aparente, umidade residual e capacidade de campo

Foram utilizados três anéis volumétricos previamente aferidos: V49, V50 e V141, sendo fixado um papel de filtro (Whatman 40), com o auxílio de um *o-ring*, no fundo de cada anel. Posteriormente, os anéis foram colocados em uma caixa preenchida com água destilada em altura suficiente para umedecer e saturar o papel-filtro. Cada anel foi retirado e pesado após a drenagem do excesso de água (m_1). Em seguida, os anéis foram secos a 105 °C até peso constante (m_2).

Os anéis foram preenchidos com a amostra de solo Branco 1, compactada com aproximadamente 10 batidas, a uma distância de cerca de 3 cm, repetindo-se este procedimento até completar cada anel. O excesso de solo foi retirado com o auxílio da espátula e os anéis, contendo as amostras, pesados (m3). Estas amostras foram secas a 105 °C por 24 horas, esfriadas em dessecador e pesadas (m4).

Posteriormente, os anéis contendo as amostras secas foram imersos em uma caixa com água destilada até cerca da metade da altura para saturação do solo (Figura 20). As amostras saturadas, apresentando umidade visível, foram colocadas em dessecador até drenagem completa da água. Os anéis foram pesados em condições de saturação (m5).

Figura 20 - Saturação anéis contendo amostras solo nos Ensaio Preliminares

A densidade aparente, umidade residual e capacidade de campo foram determinadas através das seguintes expressões:

$$\rho_A = \frac{m_4 - m_2}{V} \dots \dots \dots \text{Equação 1}$$

$$UR = \frac{m_3 - m_4}{m_4 - m_2} \times 100 \dots \dots \dots \text{Equação 2}$$

$$CC = \frac{(m_5 - m_4) - (m_1 - m_2)}{(m_4 - m_2)} \dots \dots \dots \text{Equação 3}$$

onde:

ρ_A = densidade aparente, em g/cm³

m_i = massa, em g

V = volume do anel, em cm³

U_R = umidade residual em g H₂O/100 g de solo seco

CC = capacidade de campo em g H₂O/100 g de solo seco

Determinação do pH do solo

As determinações de pH foram realizadas de acordo com a Norma CETESB L6.350 (CETESB, 1990), sendo os ensaios efetuados em triplicatas. Foram pesados 10 + 0,1 g da amostra de solo Branco 1 em um béquer de 50 mL e adicionados 25 mL de água destilada com uma proveta. A amostra foi agitada, com bastão de vidro, por 15 minutos e posteriormente deixada em repouso por 60 minutos. A medição do pH foi efetuada após este período, mantendo o eletrodo combinado no líquido sobrenadante, sem agitação da amostra.

4.1.1.3. Determinação da densidade de bactérias heterotróficas no solo

A determinação da densidade de bactérias heterotróficas no solo foi efetuada de acordo com a Norma CETESB L5.201 (CETESB, 1996).

Inicialmente, foram realizados ensaios para definir a metodologia analítica aplicável à matriz analisada. Foram realizados ensaios para verificação do método de inoculação em placas: *pour plate* e *spread plate* e posteriormente, foram avaliados os meios de cultura *Plate Count Agar*, aplicável para determinação da densidade de bactérias heterotróficas em alimentos e o *Agar R2A*, aplicável para determinação da densidade de bactérias heterotróficas em água potável.

Verificação dos métodos *pour plate* e *spread plate*

Foram avaliadas as técnicas *pour plate* e *spread plate*, utilizando meio de cultura alternativo *Agar R2A* e amostras de solo Branco 1 e Branco 2.

O meio de cultura *Agar R2A* foi preparado utilizando-se 18,2 g do produto em 1000 mL de água destilada, levado a aquecimento sob agitação, sem atingir fervura, até dissolução e posteriormente esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

A água utilizada para a diluição das amostras de solo foi preparada com 1,25mL da solução estoque A e 5,0 mL da solução estoque B, completando o volume a 1000 mL com água destilada. A água de diluição foi esterilizada em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. As soluções estoque foram preparadas de acordo com o seguinte procedimento:

- Solução estoque A: Dissolução de 34,0 g de fosfato monopotássico pa (KH_2PO_4) em 500 mL de água destilada; ajuste do pH para 7,2+0,1, utilizando solução de hidróxido de sódio 1M; volume complementado com 500 mL de água destilada; esterilização em autoclave a 121 °C durante 15 minutos e armazenamento em geladeira.
- Solução estoque B: Dissolução de 81,1 g de cloreto de magnésio pa ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) em 500 mL de água destilada; esterilização em autoclave a 121 °C durante 15 minutos e armazenamento em geladeira.

As amostras de solo foram inoculadas em placas de Petri (triplicatas), a partir de soluções decimais (1 g amostra de solo em 9mL de água de diluição: 10^{-1}), utilizando 1mL da amostra na técnica “pour-plate” e 0,1mL da amostra na técnica “spread plate”. As placas foram incubadas a $35 \pm 0,5$ °C durante 48 horas.

Verificação dos meios de cultura

Os meios de cultura *Plate Count Agar* e o *Ágar R2A* são considerados complexos e apresentam as seguintes composições:

- *Ágar R2A*: extrato de levedura, peptona, dextrose e casamino ácidos (500 mg/L cada), amido solúvel, piruvato de sódio e fosfato de potássio dibásico (300 mg/L cada), sulfato de magnésio (50 mg/L) e agar (15 g/L);
- *Plate Count Agar*: triptona(5 g/L), extrato de levedura(2,5 g/L), glicose(1 g/L) e bacto ágar (15 g/L).

Os meios de cultura foram avaliados utilizando amostras de solo seco peneirado em malha com diâmetro de 2,0 mm tendo a umidade ajustada para 70% da capacidade de campo (denominadas Frasco 1) e amostras de solo Branco 2.

O meio de cultura *Plate Count Agar* foi preparado utilizando-se 23,5 g do produto em 1000 mL de água destilada, levados a aquecimento sob agitação sem atingir fervura até dissolução e posteriormente, esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

As amostras de solo foram inoculadas em placas de *Petri* (triplicatas), retirando-se 1 mL de amostras a partir de soluções: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} decimais (1 g amostra inicial de solo em 9 mL de água de diluição, sendo as demais diluições correspondentes a 1 mL da solução anterior em 9 mL de água de diluição), utilizando a técnica *pour-plate*. As placas foram incubadas a $35\pm0,5$ °C durante 48 horas.

4.1.1.4. Caracterização química do solo

Inicialmente, foram realizados ensaios para definir a metodologia analítica aplicável à matriz analisada. Foram realizados ensaios para verificação de três métodos de extração: EPA 3540 (EPA,1996) denominada extração cartucho, a extração direta com Soxhlet e a extração à temperatura ambiente.

Ensaios para verificação da eficiência na extração

Extração Cartucho

Ensaios para verificação da eficiência na extração foram realizados, sendo introduzidos 10 gramas da amostra de um solo virgem, isento de contaminações, com 10 g de sulfato de sódio p.a.(anidro) em um cartucho de extração. Esta amostra foi contaminada com os seguintes compostos de interesse, em diferentes quantidades (0,1; 1,0 e 20 mg): álcoois isobutanol, n-butanol, isoamílico, 2-etilhexanol, isodecanol e os plastificantes DIBP, DBP, DIAP, DEHP, DOA, DIDP. O cartucho foi inserido em um extrator Soxhlet, que estava conectado a um condensador e a um balão de 500mL contendo 150 mL de diclorometano. A extração procedeu sob aquecimento, com 6 ciclos/hora, durante 24 horas. A amostra foi resfriada a temperatura ambiente. Os padrões internos utilizados

foram o n-hexanol e o di-butilmaleato, adicionados após o resfriamento do extrato. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

Extração Direta

Simultaneamente, outros ensaios para verificação da eficiência na extração foram realizados, sendo introduzidos, 10 gramas da amostra de um solo virgem, isento de contaminações, e 10 g sulfato de sódio p.a.(anidro) em um balão de 500 mL contendo 150 mL de diclorometano. A extração foi realizada a quente, durante 8 horas, a 6 ciclos/hora. Esta amostra foi contaminada com todos os compostos de interesse em diferentes quantidades (0,1; 1,0 e 20 mg): álcoois isobutanol, n-butanol, isoamílico, 2-etilhexanol, isodecanol e os plastificantes DIBP, DBP, DIAP, DEHP, DOA, DIDP. Após as 8 horas, foi resfriada e preservada em geladeira até o momento da análise. Foram adicionados 1 mL dos padrões internos n-hexanol e di-butilmaleato, após o resfriamento do extrato. Os ensaios foram realizados em triplicatas e este procedimento foi denominado Extração Direta.

Extração na temperatura ambiente

Ensaio para verificação da eficiência na extração direta dos álcoois foram realizados, sendo introduzidos 10 gramas da amostra de um solo virgem, isento de contaminações, e 10g sulfato de sódio p.a.(anidro) em um balão de 500 mL contendo 150 mL de diclorometano. A extração foi realizada à temperatura ambiente, com agitação durante 15 minutos. Esta amostra foi contaminada com todos os compostos de interesse em diferentes quantidades (1,0 e 20,0 mg): álcoois isobutanol, n-butanol, isoamílico, 2-etilhexanol, isodecanol e os plastificantes DIBP, DBP, DIAP, DEHP, DOA, DIDP. As amostras foram preservadas em geladeira até o momento da análise. Foram adicionados 1mL dos padrões internos n-hexanol e di-butilmaleato no extrato. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

Este ensaio de extração foi aplicado também ao solo inicial, utilizando o mesmo procedimento descrito anteriormente.

Metodologias de extração e cromatografia utilizados na caracterização do solo inicial

Após a definição das metodologias de extração aplicáveis, as determinações dos teores de álcoois e plastificantes presentes nas amostras de solo inicial foram efetuadas por cromatografia gasosa de acordo com o método 8061A da EPA (EPA, 1996). A extração destes álcoois e plastificantes foi realizada de acordo com o método 3540 da EPA (EPA, 1996).

Cromatografia gasosa

As determinações dos teores de álcoois e plastificantes foram realizadas injetando-se 2 µL do extrato, obtido conforme procedimento descrito anteriormente, em um cromatógrafo gasoso CP-3380 da Varian, operando nas condições:

- Injetor: modo “splitless” (sem divisão da amostra), temperatura no injetor = 280 °C
- gás de arraste: Hélio, vazão = 48 mL/min
- Forno: temperatura inicial = 40 °C, durante 2 minutos, rampa de temperatura = 20 °C/minuto, temperatura final = 280 °C.
- Coluna: RTX - 35 Restec (cross-linked methylsilicone), com diâmetro interno de 0,53 mm, comprimento de 30 m e espessura do filme de 1,5 µm. Gás de arraste: Hélio, vazão = 7,0 mL/min, pressão = 30,30 psi (constante), velocidade média = 86 cm/s.
- Detector: Detector de ionização de chama (FID), temperatura = 300 °C, gases empregados (ar comprimido: 300 mL/min e hidrogênio: 15 mL/min), gás make-up = Nitrogênio: 30 mL/min

Curva de calibração:

Foi feita uma curva de calibração para cada um dos seguintes álcoois e plastificantes: isobutanol, n-butanol, isoamílico, 2-etilhexanol, isodecanol, DIBP, DBP, DIAP, DEHP, DOA, DIDP. Para obtenção das curvas, foram utilizados os seguintes teores de todos os compostos: 0,0020; 0,0040; 0,0060; 0,0080 e 0,0100g e 0,020; 0,040; 0,060; 0,080 e 0,100 g em 150 mL de diclorometano, injetando-se 2 µL de cada solução no cromatógrafo.

4.1.1.5. Amostragem e caracterização do inóculo

O inóculo utilizado para o teste de biodegradação dos poluentes do solo foi o lodo da estação de tratamento de águas residuárias da unidade industrial de plastificantes, que é um sistema de lodos ativados, modalidade aeração prolongada. As amostras de inóculo foram coletadas em recipientes de vidro (volume: 1 Litro) e posteriormente preservadas a temperatura de 4°C até seu uso.

Para caracterização do inóculo, foram determinados os seguintes parâmetros: pH, Temperatura, material solúvel em n-hexano (MSH), Série de Sólidos, nitrogênio e fósforo, conforme os procedimentos descritos no APHA, AWWA, WEF (1998). A contagem de bactérias heterotróficas foi realizada pelo método “spread-plate”, utilizando meio de cultura *Standard Agar*. As concentrações dos plastificantes e álcoois foram determinadas por cromatografia gasosa, seguindo o método da EPA 8061A (EPA, 1996) e a extração, realizada de acordo com o método 3540 da EPA (EPA, 1996), seguindo os mesmos procedimentos para matriz solo.

4.1.1.6. Ensaios de Biodegradação

Os ensaios de biodegradação do solo foram conduzidos em “erlenmeyers”, a temperatura ambiente (Figura 21). Inicialmente, os frascos foram colocados no equipamento *shaker*, rotação 200 rpm, no entanto, após 24 horas de acompanhamento, observou-se que a homogeneização não ocorria e optou-se pela mistura manual. Os Frascos Brancos 1 e 2 permaneceram fechados durante o período de ensaios e os demais, foram abertos uma vez por semana somente durante a homogeneização manual do solo, no primeiro mês, permanecendo o restante do período fechados, para evitar a perda de compostos voláteis. As tampas plásticas utilizadas foram envoltas em papel alumínio, evitando contaminações. Foram realizados ensaios utilizando amostras de solo Branco 1 (Ensaios I) e Branco 2 (Ensaios II), passadas em peneira ABNT N 10 (malha 2mm), com microrganismos indígenas (Tratamento I) ou indígenas e exógenos adaptados (Tratamento E). Os Ensaios II foram conduzidos para avaliar a influência da secagem da amostra (procedimento sugerido pela CETESB) na biodegradação dos compostos avaliados.

Figura 21 – Reatores utilizados nos Ensaio Preliminares de biodegradação

Ensaio I

Todos os frascos foram preenchidos inicialmente com 100g de solo seco (Tabela 23):

- Frasco B1 (Branco 1): solo seco.
- Frasco 1 (Processo I1): A umidade inicial do solo foi ajustada para 70% da capacidade de campo através da adição de água destilada.
- Frasco 2 (processo I2): A umidade inicial do solo foi ajustada para 70% da capacidade de campo, através da introdução de água destilada, e posteriormente foram adicionados 135mg/kg solo de nitrogênio ($\text{N-NH}_4\text{Cl}$) e 35mg/kg solo de fósforo ($\text{P-KH}_2\text{PO}_4$).
- Frasco 3 (processo E3): A umidade do solo foi ajustada para 70% da capacidade de campo, através da introdução de água destilada, e posteriormente foram adicionados 50% em volume de inóculo.
- Frasco 4 (processo E4): A umidade inicial do solo foi ajustada para 70% da capacidade de campo, através da introdução de água destilada, e posteriormente foram adicionados 50% em volume de inóculo e 135mg/kg solo de nitrogênio ($\text{N-NH}_4\text{Cl}$) e 35mg/kg solo de fósforo ($\text{P-KH}_2\text{PO}_4$).

Ensaio II

Todos os frascos foram preenchidos inicialmente com 50g de solo natural, passado em peneira de malha de 2mm. O processo foi conduzido de maneira similar aos ensaios anteriores (Tabela 23):

- Frasco B2 (Branco 2): preenchido com solo natural da unidade industrial.
- Frasco 5 (processo E5): Foram adicionados 50% em volume de inóculo.
- Frasco 6 (processo E6): Foram adicionados 50% em volume de inóculo e 155mg/kg solo de nitrogênio (N-NH₄Cl) e 40mg/kg de fósforo (P-KH₂PO₄).
- Frasco 7 (processo I7): Foram adicionados 155mg/kg solo de nitrogênio (N-NH₄Cl) e 40mg/kg de fósforo (P-KH₂PO₄).

Tabela 23 – Ensaios preliminares de biodegradação com o solo contaminado

Solo Branco 1		
Processo	Variável	Descrição do processo
I1	–	Controle - Ajuste da umidade 70%C.C.
I2	Nutrientes	Frasco preenchido nas condições de controle com adição de N e P
E3	Inóculo	Frasco preenchido nas condições de controle com adição de inóculo
E4	Inóculo + nutrientes	Frasco preenchido nas condições de controle com adição de inóculo e nutrientes
Solo Branco 2		
Processo	Variável	Descrição do processo
B2	–	Controle
E5	Inóculo	Frasco preenchido nas condições de controle com adição de inóculo
E6	Inóculo + nutrientes	Frasco preenchido nas condições de controle com adição de inóculo e nutrientes
I7	Nutrientes	Frasco preenchido nas condições de controle com adição de N e P

4.1.1.7. Monitoramento do processo de biodegradação

Após 90 e 180 dias de ensaios, foram retiradas amostras do solo dos *erlenmeyers* para determinação dos seguintes parâmetros:

- teores dos plastificantes e álcoois: as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa seguindo o método da EPA 8061A (EPA,1996). A extração foi realizada seguindo o procedimento do método 3540 da EPA.
- Contagem das bactérias heterotróficas: as amostras foram analisadas pelo método *pour plate*, de acordo com a Norma CETESB L5.201 (CETESB, 1996), utilizando meio *Agar R2A*.

- Temperatura, umidade e pH: as amostras foram analisadas de acordo com os procedimentos do Manual de Métodos de Análises do Solo (Embrapa,1997).

4.1.1.8. Verificação de outros mecanismos de remoção - Fotólise

Após a montagem dos Ensaios I e II, foram segregados 2 kg de solo seco (altura de 4 cm) numa bandeja de inox (45x35x5 cm) e uma amostra idêntica ao branco 1, que foram submetidos, durante um ano, à incidência e ausência de luz solar, a fim de verificar a influência da fotólise.

Tais amostras foram denominadas:

- Branco 1
- Branco 1- 01 ano sem luz
- Amostra bandeja – 01 ano sob luz
- Amostra bandeja – 01 ano sem luz

Nestas amostras, foram determinados os teores de contaminantes por cromatografia gasosa seguindo o método da EPA 8061A (EPA,1996). A extração foi realizada seguindo o procedimento do método 3540 da EPA.

4.1.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.2.1. Caracterização geotécnica do solo

A amostra do solo analisada apresentou aparente hidromorfia e cor variegada, com matriz cinza 10YR6/1, apresentando manchas cinza escuro 10YR7/1, manchas amarelas a bruno amareladas 10YR5/8 a 6/8, manchas vermelha-amareladas 2,5YR5/8 e manchas pretas 10YR2/1 a 2/2, de acordo com a carta de Munsell : *soil color chart* (Munsell, 1979). A avaliação ao tato demonstrou textura siltosa. Averiguando a mistura solo e água após uma hora de descanso, confirmou-se a presença de uma fina camada em suspensão e uma maior camada em sedimentação. A avaliação da amostra seca e peneirada aparentou mica.

Determinação da Densidade Total e Porosidade Total

Os resultados relativos às determinações de densidade total e porosidade total, efetuados utilizando a amostra indeformada, estão mostrados na Tabela 24.

Tabela 24 – Densidade e porosidade total da amostra indeformada

Corpo	Densidade	Porosidade (%)
P1	2,08	21,38
P2	2,07	21,80
P3	2,09	20,95
Média	2,08	21,38

P1, P2 e P3 - triplicatas

Os valores encontrados demonstram tratar-se de um solo de baixa porosidade já nos primeiros 60 cm de profundidade. Segundo Brady (1983), os solos arenosos de superfície apresentam porosidade entre 35 e 50%, diminuindo com a profundidade em solo compactados para 25 a 30%. A plastificação do solo pelos contaminantes, aliada a possível compactação por tratar-se de um local aterrado, pode ter contribuído para os resultados encontrados. Esta baixa porosidade poderia limitar a eficiência da biorremediação *in-situ*. (EPA, 1995).

Densidade aparente, umidade residual e capacidade de campo

A Tabela 25 apresenta a densidade aparente, umidade residual e capacidade de campo da amostra de solo Branco 1.

Tabela 25 - Densidade aparente, umidade residual e capacidade de campo da amostra de solo Branco 1

Determinação n ^o (triplicatas)	Densidade (g/cm ³)	Umidade (%)	Capacidade Campo (%)	pH a 25°C
1	1,24	2,52	28,32	6,21
2	1,25	4,35	28,23	6,22
3	1,29	1,67	27,39	6,24
Média	1,26	2,85	27,98	6,21 a 6,24 (faixa de variação)

A umidade da amostra de solo Branco 2 foi de 15,78% e densidade 1,14 g/cm³. Estes parâmetros foram obtidos em determinação única, devido a dificuldade de peneiramento da amostra em malha 2mm em função da plastificação do solo.

A umidade da amostra do solo inicial utilizada para caracterização química do solo foi determinada utilizando as metodologias Karl Fisher e secagem a estufa durante 24 horas a 103°C (Tabela 26). Os resultados apresentados pelos dois métodos estão próximos (diferença < 1%). A aplicabilidade da metodologia Karl Fisher para o solo foi verificada com o objetivo de disponibilizar uma determinação imediata para controle deste parâmetro de processo na biorremediação *ex-situ* e correções em tempo hábil se necessário, sendo verificada sua aplicabilidade para umidade até 50% no solo.

Tabela 26 - Umidade da amostra do solo natural utilizada no Ensaio II

Ensaio n ^o (Triplicatas)	K. Fischer	Estufa
I	14,63%	15,00%
II	15,15%	15,15%
III	14,94%	14,89%
Média	14,91%	15,01%

Foram determinados os valores de pH de todas as amostras retiradas do solo (1 a 6), cerca de 20 kg distribuídos em sacos de 3 kg. Tais amostras não foram secas e peneiradas e não foram homogeneizadas após a retirada em campo, para evitar perda de contaminantes voláteis. Para utilização no Ensaio II, foi selecionada a amostra 5, sendo esta passada em peneira 2 mm (Tabela 27).

Tabela 27 - Determinação do pH das amostras de solo natural

Amostra	pH			T°C		
	I	II	III	I	II	III
1	5,72	5,69	5,69	25,0	25,0	25,0
2	7,12	7,19	7,22	25,5	25,5	25,5
3	6,48	6,48	6,6	25,0	25,0	25,0
4	6,49	6,48	6,44	26,0	26,0	26,0
5(*)	6,74	6,72	6,80	26,0	26,0	26,0
6	6,42	6,39	6,38	25,5	25,5	25,5

(*)Amostra passada em peneira 2 mm

Nota: I, II e III - triplicatas

Conforme resultados apresentados, o pH do solo variou de 5,69 a 7,22, considerando as amostras representativas dos 20 kg retirados, demonstrando a heterogenia deste solo, confirmando-se pela cor variegada. Fassbender (1975) avaliou dados de 252 solos tropicais e verificou que 99% destes apresentavam o pH na faixa de 4,5 a 7,0.

As características de todas as amostras retiradas do solo estão apresentadas na Tabela 28.

Tabela 28 – Características das amostras retiradas do solo

Amostra	Características da amostra
1	Úmida, odor de contaminantes, cor acinzentada
2	Úmida, odor de contaminantes , cor acinzentada
3	Levemente úmida, odor de contaminantes, cor amarelada
4	Levemente úmida, forte odor de contaminantes, cor cinza, bem plastificada
5	Úmida, odor de contaminantes, cor acinzentada
6	Levemente úmida, odor de contaminantes, cor marrom

Após a determinação dos parâmetros físico-químicos, foram calculadas as quantidades de água, nutrientes e lodo a serem introduzidas em cada processo.

No Ensaio I, a umidade do solo foi corrigida para 70% de sua capacidade de campo, correspondendo a 19,59%, sendo adicionados 18 mL de água destilada para correção da umidade nos Frascos 1 a 4 I. O volume de lodo adicionado foi de 40mL no Ensaio I e de 20 mL no Ensaio II, correspondendo a 5 gSSV/kgsoloseco. Considerando COT 1% no solo (não sendo considerados os teores de nitrogênio e fósforo no mesmo) e as concentrações no lodo de COT (1,01% a 1,15%), Nitrogênio Total (1,01% a 1,13%) e Fósforo Total (114 a 120mg/L), foram preparadas soluções contendo 5000 mgNH₄Cl/L e 1500 mgKH₂PO₄/L, sendo adicionados 10 mL nos frascos 2 e 4, e 5 mL nos Frascos 6 e 7 (Tabela 29).

Tabela 29- Umidade Inicial nos Frascos Utilizados nos Ensaios Preliminares

Frasco	Umidade Residual %	H₂O (mL)	Lodo (mL)	Nutrientes (mL)	Umidade Inicial %
1	2,85	18	0	0	21
2	2,85	18	0	10	31
3	2,85	18	40	0	61
4	2,85	18	40	10	71
5	15,78	0	20	0	54
6	15,78	0	20	5	64
7	15,78	0	0	5	24

No Ensaio I, o acerto da umidade inicial foi feito relativamente à capacidade de campo, no entanto, as umidades iniciais dos processos variaram de 20,8% no Frasco 1 a 70,8% no Frasco 4, em consequência das adições de lodo e nutrientes. No Ensaio II, onde foi considerada apenas a umidade natural do solo, as umidades iniciais variaram de 23,6% no Frasco 7 a 63,6% no Frasco 6.

Os resultados das determinações da umidade residual aplicando a norma CETESB L6.350 (CETESB,1990), são expressos relativamente à massa de solo seco, sendo este o cálculo utilizado para adição de água ao processo relativamente à capacidade de campo

do solo. Este valor, no entanto, não pode ser comparado à umidade inicial do solo em cada frasco, que foi determinada relativamente a massa total do solo, a exemplo dos cálculos da umidade utilizados para expressar os teores de contaminantes no solo e utilizados no monitoramento dos processos neste estudo.

Após a montagem de todos os frascos, foram determinados a temperatura dentro de cada frasco e o pH inicial do solo em cada processo (Tabela 30).

Tabela 30 – pH e temperatura no início do processo de biodegradação

Frasco	pH(H ₂ O)		Temperatura solo no Frasco °C
	Temperatura (°C)	pH	
Branco 1	25,0	6,21 – 6,24(*)	26,0
1	25,0	6,34	26,0
2	25,0	6,27	26,0
3	25,0	6,59	26,0
4	25,0	6,52	26,0
Branco 2	26,0	6,72 – 6,80(*)	27,0
5	25,5	6,92	27,0
6	25,5	6,81	27,0
7	25,5	6,60	27,0
Temperatura ambiente			31,0

(*)Faixa de variação

A temperatura do solo não foi monitorada durante a biodegradação e somente mensurada no início do processo, estando 4 a 5 °C abaixo da temperatura ambiente. De acordo com MOREIRA (2002), a atividade microbiana é máxima em torno de 28°C e sofre decréscimo em temperaturas menores que 25° C e maiores que 35° C.

4.1.2.2 Caracterização microbiológica do solo

Verificação dos métodos *pour plate* e *spread plate*

Utilizando as amostras de solo seco do Frasco Branco 1, as placas de Petri inoculadas na técnica *pour plate* apresentaram colônias pequenas, muito próximas, de coloração levemente esverdeada, totalizando $4,4 \times 10^2$, $8,0 \times 10^2$ e $1,2 \times 10^3$ UFC/g. Já as placas inoculadas na técnica *spread plate* não apresentaram colônias. Utilizando as amostras de solo natural do Frasco Branco 2, as placas de Petri inoculadas na técnica *pour plate* apresentaram elevado número de pequenas colônias, muito próximas, de coloração levemente esverdeada, impossibilitando a leitura, indicando a necessidade de maiores diluições. As placas inoculadas na técnica *spread plate* apresentaram colônias grandes e contínuas, de coloração esverdeada, porém mal distribuídas, também dificultando a leitura e totalizando $1,2 \times 10^4$, $2,3 \times 10^4$ e $2,9 \times 10^4$ UFC/g (Figura 22). Para os ensaios subseqüentes, optou-se pela técnica *pour plate*, por permitir maior repetibilidade e fácil homogeneização na distribuição da amostra nas placas, utilizando, no entanto, maiores diluições.

Solo seco (placas inferiores) e solo natural (placas superiores)

Figura 22 – Comparação métodos *pour plate* e *spread plate*

A coloração esverdeada das placas pode indicar a presença das bactérias “*Pseudomonas Fluorescentes*”, sendo estas identificadas na literatura como degradadoras de ftalatos (Zeng et al., 2002; Zeng et al., 2004).

Verificação dos meios de cultura

Foi realizada a contagem de bactérias heterotróficas utilizando amostras de solo retiradas do Frasco 1 (amostra preparada e umidade ajustada para 70% da capacidade de campo), devido à baixa densidade de bactérias encontradas na amostra Branco 1 na técnica *pour plate* e ausência, na técnica *spread plate*. As placas inoculadas com

amostras de solo Frasco 1 e amostras do solo Branco 2, em diluição 10^{-2} , considerando os dois meios de cultura, apresentaram elevado número de pequenas colônias, muito próximas, de coloração levemente esverdeada, impossibilitando a leitura. As placas inoculadas com amostras de solo em diluição 10^{-5} não apresentaram colônias. Foram consideradas as placas utilizando as diluições 10^{-3} e 10^{-4} , conforme Tabela 31.

Tabela 31 – Densidade de bactérias heterotróficas com diferentes diluições do solo e meios de cultura

Diluições	Frasco 1(Processo I1)						Frasco B2 (Branco 2)					
	<i>Plate Count</i>			<i>Agar R2A</i>			<i>Plate Count</i>			<i>Agar R2A</i>		
	1	2 ⁽¹⁾	3 ⁽¹⁾	1	2	3	1	2	3	1	2	3
10^{-3}	300	30	-	2000	2320	2400	640	800	80	1200	1360	1400
10^{-4}	240	10	-	300	⁽¹⁾	⁽¹⁾	240	240	200	240	260	280

(1) Placas desconsideradas no cálculo

Foram consideradas para a contagem final, as placas inoculadas com amostras de solo nas diluições 10^{-4} . No Frasco 1, a contagem de bactérias totalizou $2,4 \times 10^6$ UFC/g no meio *Plate Count* e $3,0 \times 10^6$ UFC/g, no *Agar R2A*; no Frasco Branco 2, estes valores foram de $2,3 \times 10^6$ UFC/g no *Plate Count* e $2,6 \times 10^6$ UFC/g, no *Agar R2A* (Figura 23).

Agar R2A

Plate Count

Figura 23 : Frasco 1(Processo I1) na diluição 10^{-4}

Os resultados obtidos com os dois meios de cultura foram próximos, e por esta razão, foi considerado o *Agar R2A* para as determinações posteriores, por ser um meio complexo, utilizado para amostras ambientais e por apresentar em sua composição, menores concentrações de nutrientes relativamente ao *Plate Count Agar*. Morano (2006) avaliou a densidade de bactérias heterotróficas do solo de uma área industrial

localizada na cidade de São Paulo, contaminada com BTEX e obteve resultados entre 30 e 300 colônias nas placas inoculadas no meio *Agar R2A* e resultados abaixo de 30 colônias nas placas inoculadas no meio *Plate Count Agar*, sendo a densidade de bactérias no solo $2,7 \times 10^3$ UFC/g.

4.1.2.3. Caracterização química do solo

Ensaio de verificação da eficiência de extração dos álcoois e plastificantes com diclorometano na extração direta e com cartucho

Os resultados dos ensaios de verificação da eficiência na extração dos álcoois (isobutanol, n-butanol, isoamílico, 2-etilhexanol, isodecanol) e dos plastificantes (DIBP, DBP, DIAP, DEHP, DOA, DIDP), em teores de 0,1, 1,0 e 20 mg, estão mostrados na Tabela 32.

Tabela 32- Eficiência na extração de álcoois e plastificantes do solo com o diclorometano.

% Recuperação 0,1mg						
Compostos	Extração Cartucho			Extração Direta		
	I	II	III	I	II	III
IBA	96,98	97,97	118,75	114,79	91,04	86,10
NB	105,73	87,94	133,40	119,57	103,75	76,09
IA	130,69	83,17	74,26	125,74	100,00	88,12
2EH	129,00	83,00	120,00	72,00	85,00	78,00
IDA	129,41	132,35	104,90	79,41	116,67	97,06
DIBP	81,37	107,84	81,37	97,06	100,98	113,73
DBP	127,72	141,58	131,68	153,47	113,86	124,75
DIAP	95,05	125,74	145,54	132,67	112,87	125,74
DOA	90,10	115,84	115,84	97,03	112,87	103,96
DEHP	91,06	87,80	88,62	102,44	99,19	112,20
DIDP	147,52	126,73	86,14	52,48	55,45	0,00

I, II e III - triplicatas

Tabela 32- Eficiência na extração de álcoois e plastificantes do solo com o diclorometano (continuação).

% Recuperação 1,0mg						
Compostos	Extração Cartucho			Extração Direta		
	I	II	III	I	II	III
IBA	105,45	104,26	101,78	101,09	100,30	99,21
NB	100,30	103,46	99,21	97,92	99,21	97,63
IA	99,01	102,07	99,51	103,15	101,48	101,18
2EH	101,10	99,90	105,58	90,64	100,70	101,00
IDA	106,94	95,89	100,88	99,61	102,05	100,68
DIBP	103,41	101,95	103,51	99,71	102,15	100,39
DBP	100,30	100,20	100,30	100,30	102,48	100,59
DIAP	99,21	100,20	103,26	100,40	98,52	99,60
DOA	96,94	100,20	101,87	99,80	101,68	103,25
DEHP	99,61	98,91	93,78	99,30	88,81	100,62
DIDP	107,08	101,47	97,64	106,39	105,41	105,31

I, II e III - triplicatas

Tabela 32- Eficiência na extração de álcoois e plastificantes do solo com o diclorometano(continuação).

% Recuperação 20mg						
Compostos	Extração Cartucho			Extração Direta		
	I	II	III	I	II	III
IBA	105,05	102,59	103,18	96,04	101,84	102,49
NB	105,00	98,27	102,10	95,09	99,70	101,95
IA	101,51	104,76	101,59	104,27	104,54	98,04
2EH	100,13	98,64	100,93	98,64	98,18	99,47
IDA	100,88	94,75	93,37	94,12	96,88	101,07
DIBP	98,10	102,45	102,43	96,54	96,23	103,18
DBP	108,58	104,33	102,75	98,86	98,89	101,94
DIAP	96,88	104,26	102,82	98,83	96,42	101,12
DOA	103,01	99,03	102,11	93,14	98,54	103,19
DEHP	92,37	99,33	93,51	93,96	97,45	103,46
DIDP	93,40	95,03	101,78	95,91	99,66	103,54

I, II e III - triplicatas

Verificando a recuperação dos compostos adicionados ao solo virgem, considerando que o mesmo estava isento destes compostos conforme cromatograma inicial, observa-se que para 0,1 mg, a menor recuperação entre os álcoois foi de 74,26% para o isoamílico e, entre os plastificantes, 81,37% para o DIBP. Considerando-se 1,0 mg, a menor recuperação entre os álcoois foi de 95,89% para o isodecanol e, entre os plastificantes, foi de 93,78% para o DEHP. Em 20 mg, a recuperação para os álcoois foi de 100% e a menor recuperação entre os plastificantes foi 92,37% para o DOP.

Comparando-se as metodologias de extração de álcoois, Extração Cartucho ou Extração Direta, observa-se que a eficiência de recuperação dos álcoois, para as quantidades 0,1 e 1,0 mg e 20 mg, foi maior no primeiro do que no segundo método, com exceção do álcool isoamílico para 1,0 e 20 mg e isodecanol para 20 mg. Portanto, pode-se considerar que as eventuais perdas de álcoois esperadas na metodologia EPA 3540 (EPA, 1996), aplicada aos plastificantes e que considera um ciclo de 24 horas de extração, não são expressivas em relação a um ciclo de 8 horas da Extração direta.

Ensaio de verificação da eficiência de extração de álcoois e plastificantes pelo diclorometano em temperatura ambiente

Os resultados dos ensaios de verificação da eficiência na extração dos álcoois (isobutanol, n-butanol, isoamílico, 2-etilhexanol, isodecanol) e dos plastificantes (DIBP, DBP, DIAP, DEHP, DOA, DIDP), em teores de 1,0 e 20 mg, estão mostrados na Tabela 33.

Tabela 33 – Eficiência na extração a temperatura ambiente de álcoois e plastificantes

Compostos	Extração 1mg			Extração 20mg		
	I	II	III	I	II	III
IBA	103,22	100,94	103,61	99,21	99,84	99,34
NB	103,75	102,17	98,91	99,40	99,05	99,56
IA	98,92	102,17	102,96	100,17	99,93	100,10
2EH	102,84	106,62	106,82	100,09	99,53	99,57
IDA	101,37	99,22	98,83	99,36	100,12	97,96
DIBP	101,85	100,39	103,70	99,79	99,64	99,58
DBP	101,83	104,60	103,32	97,78	96,22	99,76
DIAP	98,42	99,51	101,19	99,81	97,25	100,33
DOA	98,87	98,37	99,06	99,95	100,12	99,84
DEHP	95,69	99,34	95,61	100,33	99,95	99,68
DIDP	105,11	94,30	101,97	99,47	100,29	100,00

I, II, III – triplicatas

Verificando a recuperação dos compostos adicionados ao solo virgem, considerando que o mesmo estava isento destes compostos conforme cromatograma inicial, observa-se que em 1,0 mg, a menor recuperação entre os álcoois foi de 98,83% e em 20 mg, a menor recuperação para os álcoois foi de 97,96%. Comparando-se estes valores com os menores obtidos pelo método cartucho, de 93,37%, para 1,0 mg e de 95,89% para 20 mg, pode-se considerar que a perda dos álcoois por volatilização, esperada devido ao aquecimento e tempo de 24 horas de ciclo total, não é expressiva na metodologia de extração EPA 3540 (EPA,1996), podendo ser aplicada para a matriz contendo cotaminantes voláteis.

Teores de álcoois e plastificantes no solo

Após a definição da metodologia de extração, foram obtidos os teores de plastificantes e álcoois das amostras de solo (Tabela 34).

Tabela 34 - Teores de plastificantes e álcoois no solo inicial

Triplicatas	I		II		III	
Compostos	mg	mg/kg	mg	mg/kg	mg	mg/kg
IBA	0,9	51	0,9	52	0,9	52
NB	0,1	6	0,1	6	0,1	6
IA	2,4	143	2,4	139	2,3	137
2EH	13,2	778	13,7	804	13,6	798
IDA	83,7	4925	83,8	4929	83,3	4900
DIBP	31,6	1859	33,6	1976	33,3	1959
DBP	10,2	597	10,9	643	10,1	593
DIAP	18,8	1107	20,1	1181	20,2	1187
DOA	0,7	43	0,8	45	0,8	45
DEHP	42,3	2489	42,9	2521	42,7	2510
DIDP	64,8	3813	63,2	3719	61,0	3591

I, II e III - triplicatas

Observa-se da Tabela 34, que os menores e maiores teores encontrados para os álcoois isobutanol, álcool isoamílico, 2-etilhexanol e isodecanol foram iguais a 51 e 52 mg/kg, 137 e 143 mg/kg, 778 e 804 mg/kg e 4.900 e 4925 mg/kg, respectivamente. Para os plastificantes, os teores de DIBP e DBP variaram de 594 a 1859 mg/kg e de 643 a 1976 mg/kg, respectivamente. Para os demais plastificantes (DIAP, DOA, DEHP, DIDP), esta variação foi de 1.107 a 1.187 mg/kg, 43 a 45 mg/kg, 2489 a 2521 mg/kg, 3.591 a 3.813 mg/kg, respectivamente. Os teores encontrados para o isodecanol estão acima daqueles encontrados para o DEHP e DIDP, sendo estes os plastificantes correspondentes ao maior volume de produção. Considerando apenas os plastificantes, os teores totais encontrados no solo da Unidade Industrial estudada, estão entre 9909 e 10085 mg/kg solo. Estes teores estão na mesma ordem de grandeza daqueles encontrados por Juneson et al. (2001) - 8000 e 12000 mg/kg - que pesquisou um solo,

predominantemente siltoso, de área contaminada por indústria produtora de plastificantes.

Para ratificação do método de extração selecionado, foram determinados os teores de plastificantes e álcoois da amostra solo inicial, utilizando extração à temperatura ambiente. Os resultados estão ilustrados na Tabela 35.

Tabela 35 – Ensaio de extração dos plastificantes e álcoois do solo inicial em temperatura ambiente

Triplicatas	I		II		III		Média	Desvio Padrão
Compostos	mg	mg/kg	mg	mg/kg	mg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
IBA	0,2	26	0,2	26	0,3	27	26	1
NB	0,0	3	0,0	3	0,0	4	3	1
IA	0,5	59	0,6	62	0,6	60	60	1
2EH	3,9	427	3,9	425	4,1	441	431	9
IDA	15,1	1642	15,4	1669	15,7	1707	1673	33
DIBP	7,5	809	7,0	763	7,4	803	792	25
DBP	3,2	345	2,9	318	3,1	338	334	14
DIAP	5,2	563	4,8	521	5,1	551	545	22
DOA	0,1	8	0,1	8	0,1	9	8	0
DEHP	9,3	1007	8,6	934	8,9	969	970	36
DIDP	11,3	1231	10,5	1139	11,3	1229	1200	53

I, II e III - triplicatas

Verificando os resultados do ensaio com extração do solo inicial à temperatura ambiente, observa-se que os teores totais encontrados para os álcoois isobutanol, n-butanol, isoamílico e 2-etilhexanol representaram em média 52,6% daqueles encontrados no solo inicial, obtidos a partir da extração cartucho. Já para o isodecanol, os teores médios de remoção foram ainda menores e corresponderam a 43% daqueles encontrados a partir da extração cartucho, confirmando que o aquecimento e o tempo total de 24 horas neste último procedimento não é determinante na perda de compostos voláteis, mas ao contrário, o maior contato entre a matriz e o solvente, propiciado por este método, conduz à eficiente remoção dos plastificantes adsorvidos no solo. Os

álcoois, por sua vez, que não estão adsorvidos nas superfícies das partículas de solo, mas provavelmente, nos poros intrasticiais, são removidos por arraste, quando da dessorção dos plastificantes.

4.1.2.4. Amostragem e caracterização do inóculo

As amostras de lodo utilizado na pesquisa foram retiradas da Estação de Tratamento de Águas Residuárias da Unidade Industrial, que operava com 40% de sua capacidade produtiva no dia anterior e estava parada no dia da coleta. Para verificação das variações de cargas no sistema, foram coletados os dados (amostras do tanque de aeração) relativos aos 30 dias antecedentes (Tabela 36).

Tabela 36 – Resultados do monitoramento mensal da estação de tratamento de águas residuárias (amostras do tanque de aeração)

DIAS	Parâmetros de controle(mg/L)					
	DQO	DBO	MSH	SST	SSV	Fenóis
	4660	3014				
2	3520			1100	947	2,259
3	3640					
6	3320			1730	1593	
7	2880		59			0,939
8	2720	1744				
9	3100			1755	1617	
10	5140					
13	4820			1498	1339	
14	3300		82			0,268
15	2680	1708				
16	8640			1539	1400	
17	2840					
20	2520					
21	2220		77	977	812	0,293
22	3080	1834				
23	5220			1324	1208	
24	5780					
27	2620			1383	1240	
28	4040		15			0,264
29	3640	2241				
30	4120			1291	1278	

As concentrações relativas aos parâmetros analisados variaram significativamente durante o período, sendo de 2220 a 8640 mgO₂/L para a DQO; 15 a 82 mg/L para material solúvel em n-hexano; 264 a 2259 µg/L para fenol e 1708 a 3014 mg O₂/L para DBO. No entanto, a variação de SSV, 947mg/L a 1617mg/L, não foi coincidente com os picos de DQO, podendo demonstrar a adaptação dos microrganismos presentes no lodo a estas variações, em consequência do alto tempo de detenção no sistema (80 dias).

Os parâmetros pH e temperatura foram determinados em campo, durante a coleta (Tabela 37).

Tabela 37- pH e temperatura do lodo, inóculo utilizado no teste preliminar de biodegradação

Amostra	pH	Temperatura (°C)
I – 1	7,01	31
I – 2 (duplicata)	7,04	31

As determinações das concentrações de sólidos estão na Tabela 38.

Tabela 38 – Concentração de Sólidos do Inóculo Utilizado no Teste Preliminar de Biodegradação

Parâmetro	(MG/L)
Sólidos Totais	26280
Sólidos Totais Fixos	3690
Sólidos Totais Voláteis	22590
Sólidos em Suspensão Totais	13030
Sólidos em Suspensão Fixos	1660
Sólidos em Suspensão Voláteis	11370

A contagem de bactérias heterotróficas no inóculo, foi realizada na diluição 10^{-6} , devido ao elevado crescimento no meio utilizado, totalizando 138 e 143 colônias por placa ou $1,4 \times 10^8$ UFC/mL nas duplicatas. Os resultados indicam um elevado número de bactérias heterotróficas presentes, bem como uma elevada relação SSV/SST, correspondente a 87%, em função da concentração do lodo no decantador (12 horas sem descarte).

Foram determinados os teores de COT (1,01% a 1,15%), Nitrogênio Total (1,01% a 1,13%) e Fósforo Total (114 a 120 mg/L) na amostra de Lodo.

Caracterização química do Lodo

Os teores de plastificantes e álcoois no lodo estão apresentados na Tabela 39.

Tabela 39 - Concentrações de plastificantes e álcoois no lodo

Triplicatas	I		II		III	
Compostos	mg	mg/L	mg	mg/L	mg	mg/L
IBA	0,8	51	0,8	50	0,8	51
NB	0,1	4	0,1	3	0,1	3
IA	0,1	7	0,1	7	0,1	7
IDA	0,3	22	0,3	24	0,3	21
DIBP	0,1	8	0,1	8	0,1	8
DBP	0,1	6	0,1	6	0,1	6
DIAP	0,1	8	0,1	8	0,1	8
DOA	0,1	7	0,1	7	0,1	7
DEHP	1,0	70	0,9	62	1,0	67
DIDP	1,1	71	1,0	68	0,9	63

Nota: I, II e III - triplicatas

As maiores concentrações de álcoois encontradas no lodo foram do isobutanol, de 50 a 51 mg/L, apesar deste ser um composto de cadeia curta, mais leve e mais facilmente biodegradável do que os demais. Entretanto, ele é o mais utilizado no processo produtivo, podendo justificar estas altas concentrações. As concentrações de isodecanol foram de 21 a 24 mg/L; de isoamílico, de 7 mg/L e de n-butanol, de 3 a 4 mg/L. Entre os plastificantes, as concentrações de DIBP, DBP, DIAP e DOA estiveram abaixo de 8 mg/L, sendo os maiores valores encontrados para o DEHP (63 a 71 mg/L) e para o DIDP (62 a 70mg/L), a exemplo dos resultados obtidos para as amostras de solo, sendo estes os plastificantes mais empregados na unidade industrial.

4.1.2.5 Monitoramento do Ensaio Preliminar de Biodegradação

Teores dos plastificantes e álcoois

Após 90 dias de ensaios, foram retiradas amostras do solo em todos os Frascos para verificação da eficiência de remoção de contaminantes em todos os processos. Nos Ensaios I e II, as eficiências foram determinadas relativamente aos Frascos Branco 1 e Branco 2, respectivamente, considerando que as diferenças relativas encontradas sejam derivadas das remoções por biodegradação.

Os teores de álcoois e plastificantes no solo dos frascos relativos ao Ensaio I estão apresentados na Tabela 40.

Tabela 40 – Teores de álcoois e plastificantes no Ensaio I, após 90 dias

Composto	Branco 1		Frasco 1		Frasco 2		Frasco 3		Frasco 4	
	Média	D. P	Média	D. P	Média	D. P	Média	D. P	Média	D. P
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
IBA	12	1	10	1	10	1	8	1		
NB	*		*		*		*		*	
IA	231	8	230	2	9		*		*	
2EH	30	-	29	3	17	2	*		*	
IDA	675	5	753	69	308	22	104	11	*	
DIBP	566	6	541	15	86	2	10	1	6	1
DBP	192	4	191	7	37	4	20	5	9	1
DIAP	318	9	300	13	52	2	21	2	7	1
DOA	26	3	15	2	7	1	*		*	
DEHP	660	68	618	62	99	10	69	4	24	4
DIDP	1712	16	786	31	277	30	35	10	*	

D.P desvio padrão * Não detectado

Os percentuais de remoção no Ensaio I em relação à amostra Branco 1 estão apresentados na Tabela 41.

Tabela 41 - Eficiência (%) de remoção de poluentes em relação à amostra Branco 1

Composto	Frasco			
	1	2	3	4
IBA	14,1	21,5	35,7	100,0
IA	0,2	96,1	100,0	100,0
2EH	1,8	42,9	100,0	100,0
IDA	-11,6	54,4	84,6	100,0
DIBP	4,3	84,8	98,2	98,9
DBP	0,5	81,4	89,4	95,1
DIAP	5,5	83,5	93,4	97,7
DOA	41,4	71,7	100,0	100,0
DEHP	6,4	85,0	89,5	96,4
DIDP	54,1	83,8	97,9	100,0

Verificando as eficiências de remoção nos processos relativos ao Frasco 1, nota-se que apenas o DEHP e DIDP representaram valores expressivos, de 41,4% e 54,1%, respectivamente e entre os álcoois, apenas o isobutanol (14,1%). No Frasco 2, as remoções aumentaram significativamente em relação ao Frasco 1: estas estão acima de 81% para os plastificantes, com exceção do DOA (71,7%). Para os álcoois, o isoamílico foi o que apresentou a maior eficiência, 96,1%. No Frasco 3, dentre os álcoois, apenas o isobutanol não foi totalmente removido. Entre os plastificantes, o DBP e o DEHP apresentaram as menores eficiências de remoção, 89,4% e 89,5%, respectivamente, sendo o DOA o único plastificante totalmente removido. No Frasco 4, todos os álcoois foram totalmente removidos. O DBP apresentou a menor eficiência entre os plastificantes, correspondendo a 95,1%, sendo o DOA e o DIDP totalmente removidos.

Considerando os teores totais em mg de plastificantes removidos/kg solo seco, o Frasco 1, onde a umidade do solo foi ajustada para 70% de sua capacidade de campo, foi o que apresentou a menor eficiência média de remoção de plastificantes. Quando foram adicionados nutrientes, esta eficiência aumentou (Frasco 2). Os frascos, onde foram introduzidos microrganismos exógenos adaptados (Fracos 3 e 4), apresentaram os

maiores valores de eficiência média de remoção de plastificantes, sendo esta superior quando foram adicionados nutrientes.

Os teores de álcoois e plastificantes no solo dos frascos relativos ao Ensaio II estão apresentados na Tabela 42.

Tabela 42 – Teores de álcoois e plastificantes no Ensaio II, após 90 dias

Frascos	Branco 2		5		6		7	
	Média	D. P	Média	D. P	Média	D. P	Média	D. P
Compostos	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
IBA	12	1	9	1	11	1	11	1
NB	11	1	*		*		10	1
IA	77	4	*		14	1	39	1
2EH	816	9	16	3	36	5	68	3
IDA	4777	235	488	9	752	19	2860	79
DIBP	3188	92	34	3	299	20	2095	18
DBP	1094	62	19	1	136	23	880	11
DIAP	1973	88	65	1	243	5	1874	16
DOA	78	3	*		13	1	30	1
DEHP	3978	86	415	19	693	18	3915	95
DIDP	5072	303	418	44	1103	775	4672	129

D.P desvio padrão * Não detectado

Comparando os valores das Tabelas 40 e 42, constata-se os efeitos da secagem da amostras, de acordo com o procedimento CETESB L6.350 (CETESB,1995), que reduziu, além dos teores de álcoois, também os teores de plastificantes. A aplicação deste procedimento pode gerar resultados, a partir dos ensaios em escala de laboratório, não reprodutíveis em escalas de campo.

Os percentuais de remoção no Ensaio II em relação à amostra Branco 2 estão apresentados na Tabela 43.

Tabela 43 - Eficiência de remoção de poluentes no Ensaio II

Frascos	5	6	7
Compostos	%	%	%
IBA	25,7	1,3	6,1
NB	100,0	100,0	2,9
IA	100,0	80,9	48,9
2EH	98,0	95,5	91,7
IDA	89,8	84,3	40,1
DIBP	99,0	90,6	34,3
DBP	98,2	87,6	19,6
DIAP	96,7	87,7	5,0
DOA	100,0	82,9	61,7
DEHP	89,6	82,6	1,6
DIDP	91,8	78,3	7,9

Verificando as eficiências de remoção em todos os processos, nota-se que no Frasco 5, o DEHP apresentou o menor valor de remoção entre os plastificantes (89,6%), já o isobutanol foi o álcool que apresentou o mais baixo valor de eficiência (25,7%). No Frasco 6, o DIDP e o isobutanol foram, respectivamente, o plastificante e o álcool que foram menos removidos (78,0% e 1,3%). No Frasco 7, o DEHP apresentou o menor valor de eficiência de remoção entre os plastificantes (1,6%) e o n-butanol, entre os álcoois (6,1%).

Os menores valores de remoção de contaminantes foram obtidos com microrganismos indígenas que receberam adição de nutrientes (Frasco 7). Já os Frascos 5 e 6, com microrganismos indígenas e exógenos adaptados, apresentaram os maiores valores de eficiência média de remoção de plastificantes e de álcoois. Assim, a introdução do

inóculo aumentou a remoção dos contaminantes, entretanto a adição de nutrientes, além das quantidades inicialmente presentes no lodo, aos microrganismos indígenas e exógenos adaptados, não causou aumento da eficiência do processo (Frasco 6). Considerando que o pH e temperatura inicial dos Frascos 5 e 6 estavam próximos, a umidade inicial elevada do Frasco 6 (64%), comparando-se ao Frasco 5 (54%), pode ter sido determinante neste processo.

Os teores iniciais de plastificantes no solo do Ensaio I variaram de 26 a 1712mg/kg e no Ensaio II, de 78 a 5072mg/kg, justificando possivelmente as menores eficiências de remoção de contaminantes neste último, em um mesmo intervalo de tempo. Esta conclusão é corroborada por Jianlong et al. (1995), que identificaram e isolaram microrganismos capazes de degradar o DBP e verificaram aumento nos tempos necessários para a completa degradação deste plastificante em função da concentração inicial. Chang et al (2004), também verificaram aumento das porcentagens remanescentes de 08 ftalatos, após 7 dias de incubação, em função do aumento das concentrações iniciais destes compostos.

Dos resultados obtidos, observa-se que a presença de álcoois e de plastificantes de menor cadeia alquílica no solo não impediu a biodegradação dos plastificantes DEHP e DIDP. Chang et al.(2004) conduziram testes com as bactérias *Corynebacterium sp*, utilizando-se conjuntamente ou individualmente os ftalatos DEP, DPrP, DBP, DPP, BBP, DHP, DCP e DEHP, em concentrações de 5 mg/L cada, pH igual a 7,0 e temperatura de 30 °C e verificaram uma elevação nas taxas de degradação quando todos os oito ésteres ftálicos estavam presentes simultaneamente no meio. Atribuíram esta elevação à maior disponibilidade de carbono e energia para os microrganismos.

Considerando que os teores iniciais de DIDP eram maiores que os de DEHP no solo Branco 1 (5072 mgDIDP/kg e 3978 mgDEHP/kg) e Branco 2 (1711 mgDIDP/kg e 660 mgDEHP/kg), observa-se que os teores finais obtidos para o DEHP foram maiores do que os do DIDP no Ensaio I (24 mgDEHP/kg e DIDP não detectado) e próximos no Ensaio II (415 mgDEHP/kg e 418 mgDIDP/kg). Portanto, a velocidade de biodegradação do DIDP foi maior do que a do DEHP no Ensaio I, apesar do primeiro ser um composto de cadeia mais longa, porém menos ramificada que o segundo. Zeng et al.(2004) correlacionaram as taxas de degradação de seis ftalatos pelas bactérias

Pseudomonas Fluorescentes FS1 com o comprimento e a ramificação das cadeias alquílicas dos respectivos compostos e observaram que as mesmas eram decrescentes na seguinte ordem: DMP > DEP > DnBP > DIBP > DnOP > DEHP.

Contagem de Bactérias Heterotróficas no solo

A contagem de bactérias heterotróficas foi realizada após 90 dias de ensaios. A Tabela 44 apresenta as diluições utilizadas em cada determinação, sendo consideradas as placas que apresentaram entre 30 e 300 colônias.

Tabela 44 - Contagem de bactérias heterotróficas nos frascos do teste de biodegradação, após 90 dias

Frasco	Diluição	Bactérias/ placa			UFC/g solo		
		I	II	III	I	II	III
1	10^{-4}	230	400	800	$2,3 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	$8,0 \times 10^6$
1	10^{-5}	*	*	16	*	*	$1,6 \times 10^6$
2	10^{-5}	16	30	10	$1,6 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$
2	10^{-6}	74	160	40	$7,4 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$	$4,0 \times 10^7$
3	10^{-6}	296	280	196	$3,0 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$
3	10^{-7}	40	42	56	$4,0 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$	$5,6 \times 10^8$
4	10^{-6}	240	160	156	$2,4 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$
4	10^{-7}	200	190	230	$2,0 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$
Branco 2	10^{-4}	305	300	380	$3,1 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$
Branco 2	10^{-5}	190	175	160	$1,9 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$
7	10^{-5}	400	600	600	$4,0 \times 10^7$	$6,0 \times 10^7$	$6,0 \times 10^7$
7	10^{-6}	290	230	230	$2,9 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$
5	10^{-6}	270	160	200	$2,7 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$
5	10^{-7}	140	190	260	$1,4 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$	$2,6 \times 10^9$
6	10^{-6}	400	440	390	$4,0 \times 10^8$	$4,4 \times 10^8$	$3,9 \times 10^8$
6	10^{-7}	110	220	180	$1,1 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$

I, II e III – triplicatas

* placas desconsideradas por não apresentaram unidades formadoras de colônias

Os resultados das amostras do Frasco 2, placas abaixo de 30 colônias, podem ser atribuídos à incorreta distribuição do substrato nas mesmas, justificado pelo crescimento melhor e mais uniforme em placas com diluições maiores e subseqüentes ou ainda pela presença do solo nas alíquotas das amostras inoculadas. Morano (2006) avaliou a densidade de bactérias heterotróficas do solo de uma área industrial, localizada na cidade de São Paulo, contaminada com BTEX e utilizando o meio R2A, após 5 tentativas, variando de 13 a 20 diluições, obteve maiores densidades de bactérias em maiores diluições da amostra, bem como não observou repetibilidade das replicatas. A pesquisadora avaliou a influência das partículas do solo no crescimento das colônias, inoculando alíquotas das diluições do solo após homogeneização e alíquotas do sobrenadante das diluições. Obteve resultados acima de 30 colônias por placa apenas para aquelas que continham alíquotas da suspensão homogeneizada e abaixo de 30 colônias por placa para aquelas com alíquotas do sobrenadante das diluições.

A composição granulométrica do solo pode ser outro fator de interferência nesta metodologia. O solo avaliado neste estudo apresentou uma composição arenosa, dificultando sobremaneira a dissolução e transferência de alíquotas. Para este tipo de solo, a aplicação da norma Cestesb L5.201 utilizada neste ensaio, que recomendava diluições em razões volumétricas e mistura da amostra no mínimo 25 vezes, não garantiu a homogeneização das amostras nas respectivas diluições.

A Tabela 45 apresenta a contagem de bactérias heterotróficas inicial e final nos Ensaios I e II de biodegradação.

Tabela 45 – Contagem de bactérias heterotróficas no início e fim do teste de biodegradação

Frasco	Início do ensaio (solo)			Lodo			Final do ensaio (solo)		
	UFC/g solo			UFC/mL			UFC/g solo		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Branco 1	$8,0 \times 10^2$	$4,4 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$						
1	$3,0 \times 10^6$	*	*				$2,3 \times 10^6$	*	*
2	$3,0 \times 10^6$	*	*				$7,4 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$	$4,0 \times 10^7$
3	$3,0 \times 10^6$	*	*	$1,4 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	(1)	$3,0 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$
3	$3,0 \times 10^6$	*	*	$1,4 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	(1)	$4,0 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$	$5,6 \times 10^8$
4	$3,0 \times 10^6$	*	*	$1,4 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	(1)	$2,4 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$
4	$3,0 \times 10^6$	*	*	$1,4 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	(1)	$2,0 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$
Branco 2	$2,6 \times 10^6$	*	*				$1,9 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$
5	$2,6 \times 10^6$	*	*	$1,4 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	(1)	$2,7 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$
5	$2,6 \times 10^6$	*	*	$1,4 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	(1)	$1,4 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$	$2,6 \times 10^9$
6	$2,6 \times 10^6$	*	*	$1,4 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	(1)	$1,1 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$
7	$2,6 \times 10^6$	*	*				$2,9 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$

I, II e III – triplicatas. * amostras desconsideradas (1) análises em duplicatas

Observando a contagem de bactérias heterotróficas no início e fim dos ensaios, pode-se verificar:

- a amostra do Frasco 1, que recebeu apenas adição de água, não apresentou crescimento bacteriano, no entanto remoções de 0,5 a 54,1% para os plastificantes foram observadas, o que pode ser explicado pela não seletividade da contagem de bactérias heterotróficas ou por hidrólise dos plastificantes (Afgham & Chau, 1989);
- a amostra do Frasco 2, que recebeu adição de água e nutrientes, apresentou um crescimento bacteriano da ordem de 1 log. As altas remoções de plastificantes (71,1 a 85,0%) e de álcoois (21,5 a 96,1%) corroboram este resultado;
- a amostra do Frasco 3, a qual recebeu água e 50% v/v de inóculo, não apresentou crescimento bacteriano, pois a contagem de bactérias final é da mesma ordem de magnitude que a do lodo, apesar das elevadas remoções de plastificantes (89,4 a 100,0%) e álcoois (35,7 a 100,0%);

- a amostra do Frasco 4, a qual recebeu água; 50% v/v de inóculo e nutrientes, apresentou crescimento bacteriano da ordem de 1 log, considerando que o lodo tem aproximadamente 10^8 UFC/g solo e apresentou elevadas remoções de plastificantes (95,1 a 100,0%) e álcoois (100%);
- a amostra do Frasco 5, a qual recebeu água e 50% v/v de inóculo e a amostra do Frasco 6, que recebeu água, 50% v/v de inóculo e nutrientes, apresentou crescimento bacteriano da ordem de 1 log e remoções de 89,6 a 100% (Frasco 5) e 78,3 a 90,6% (Frasco 6) para plastificantes e de 25,7 a 100% (Frasco 5) e 1,3 a 100% (Frasco 6) para álcoois;
- a amostra do Frasco 7, a qual recebeu adição de nutrientes, apresentou um crescimento bacteriano da ordem de 2 logs, apesar da eficiência de remoção de plastificantes (1,6 a 61,7%) e álcoois (2,9 a 91,7%).

Carrara (2003), tratando solo contaminado com 100mg DEHP/kg com microrganismos indígenas e exógenos adaptados, ajustando a umidade do solo para 70% da capacidade de campo e adicionando nutrientes, obteve nos resultados da contagem de bactérias, um aumento correspondente a 2 logs (de $4,9 \times 10^6$ a $3,3 \times 10^8$ UFC/gsolo), após 49 dias de biodegradação.

A Tabela 46 mostra a contagem de bactérias heterotróficas comparando os Ensaios I e II.

Tabela 46 - Comparação das contagens de bactérias heterotróficas obtidas nos Ensaios I e II

Contagem de bactérias heterotróficas (UFC/g solo)							
Ensaio I				Ensaio II			
Frasco	A	B	C	Frasco	A	B	C
1	$2,3 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	$8,0 \times 10^6$	Branco 2	$1,9 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$
2	$7,4 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$	$4,0 \times 10^7$	7	$2,9 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$
3	$4,0 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$	$5,6 \times 10^8$	5	$1,4 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$	$2,6 \times 10^9$
4	$2,0 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$	6	$1,1 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$

A, B, C - triplicatas

Observa-se que os resultados obtidos no Ensaio II foram superiores a 1 log em relação àqueles obtidos no Ensaio I (com exceção do Frasco 6), apesar dos teores de contaminantes mais elevados.

Chang et al. (2004) conduziram testes com as bactérias *Corynebacterium sp*, utilizando os ftalatos DEP, DPrP, DBP, DPP, BBP, DHP, DCP e DEHP em meio aquoso e observaram um aumento de $8,9 \times 10^6$ CFU/mL para $1,4 \times 10^8$ CFU/mL em 5mg/L; uma diminuição de $5,6 \times 10^5$ CFU/mL para $9,8 \times 10^4$ CFU/mL em 30mg/L e uma redução de $8,9 \times 10^4$ CFU/mL para $1,9 \times 10^3$ CFU/mL em 100 mg/L, demonstrando aumento da toxicidade à medida que a concentração dos ftalatos aumentava. A inibição das bactérias com o aumento dos teores iniciais de plastificantes não foi observada no presente trabalho, provavelmente por estes serem inferiores ao limite de toxicidade.

Teores de contaminantes do lodo introduzido nos ensaios de biodegradação

Os teores de contaminantes introduzidos nos processos, através da adição do lodo, estão demonstrados na Tabela 47 em mg/kg solo seco.

Tabela 47 – Contaminantes introduzidos a partir do lodo – Ensaios I e II

Composto	Total lodo adicionado Ensaio I (mg)	Total solo Branco 1 (mg)	Total lodo/Frasco 3 e 4 (%)	Total lodo adicionado Ensaio II (mg)	Total solo Branco 2 (mg)	Total lodo/ Frascos 5 e 6 (%)
IBA	2	1	149,2	1	1	96,3
NB						
IA	*	22	1,3	*	3	2,0
2EH	*	3		*	37	0,0
IDA	1	68	1,3	*	216	0,1
DIBP	*	56	0,6	*	144	0,1
DBP	*	19	1,3	*	49	0,1
DIAP	*	32	1,0	*	89	0,1
DOA	*	3	10,2	*	4	2,0
DEHP	3	73	3,6	1	180	0,4
DIDP	3	169	1,6	1	229	0,3

* valores abaixo 1mg

Considerando que foi adicionado nos Frascos 3 e 4, um volume de 40 mL de lodo em 99,36 g de solo seco e nos Frascos 5 e 6, um volume de 20 mL de lodo em 43,11 g de solo seco, o composto que teve aumento significativo de seu teor no solo, em função da adição do lodo, foram o isobutanol (149,2% no Ensaio I e 96,3% no Ensaio II).

Monitoramento do pH e da umidade no teste preliminar de biodegradação

As medições de pH (Tabela 48) e teor de umidade (Tabela 49) no teste preliminar de biodegradação foram realizadas no início do experimento e após 90 dias.

Tabela 48 - Determinação do pH e da temperatura nos frascos do Ensaio Preliminar de biodegradação

Frasco	Inicial	90dias	
	pH	T°C	pH
Branco 1	6,22	22,0	5,78 a 5,9
1	6,34	22,0	6,46 a 6,53
2	6,27	22,0	7,01 a 7,18
3	6,59	22,0	7,6 a 7,81
4	6,52	22,0	7,17 a 7,35
Branco 2	6,75	22,5	7,35 a 7,41
5	6,92	22,5	7,65 a 7,64
6	6,81	22,5	7,55 a 7,57
7	6,60	22,5	7,3 a 7,36

Nos Ensaio I e II, comparando-se os valores iniciais do pH das amostras de solo com aqueles obtido após 90 dias, observa-se um acréscimo deste parâmetro; exceto para a amostra Branco 1.

A diminuição de pH esperada, devido a degradação dos diésteres e formação de ácidos ftálicos (Staples et al, 1997; Juneson et al, 2001), não foi observada. No Ensaio I, as melhores remoções ocorreram na faixa de pH 6,59 a 7,81; no Ensaio II, as melhores remoções ocorreram na faixa de pH 6,92 a 7,64. Chang et al. (2004) verificaram como condições ótimas de biodegradação dos ftalatos DEP, DPrP, DBP, DPP, BBP, DHP, DCP e DEHP, em concentrações de 5 mg/L cada e temperatura de 30°C, após 7 dias de incubação, o pH igual a 7,0 .

A umidade residual nos frascos dos Ensaio I e II, após 90 dias, estão mostrados na Tabela 49.

Tabela 49 - Umidade residual nos frascos dos Ensaios I e II de biodegradação

Frasco	% Umidade inicial	% Umidade residual – Triplicatas		
		I	II	III
Branco 1	2,85(*)	1	0	1
1	21	13	12	12
2	31	19	18	19
3	61	35	34	33
4	71	36	35	36
Branco 2	15,78(*)	10	10	10
5	54	25	24	25
6	64	29	28	29
7	24	18	16	17

(*)umidade residual

Durante os ensaios de biodegradação, não houve reposição de água no frascos, além das quantidades adicionadas inicialmente. Observa-se da Tabela 50, uma diminuição média de 50% da umidade no Ensaio I: as maiores variações ocorreram no Frasco 3, de 61% a 33% e no Frasco 4, de 71% a 35%. No Ensaio II, nota-se uma diminuição média de umidade de 44%: as maiores variações ocorreram no Frasco 5, de 54% a 24% e no Frasco 6, de 64% a 28%. Considerando as eficiências de remoção obtidas nos Ensaios I e II, Frascos 3, 4, 5 e 6, entende-se que a diminuição de umidade dentro das faixas encontradas não foi restritiva para o processo de biodegradação, no entanto, a elevada umidade inicial foi determinante para o processo (Frasco 6), devendo ser este um parâmetro de controle para os ensaios de biorremediação *ex-situ* em escala piloto. A umidade do solo afeta diretamente sua permeabilidade ao ar, assim a umidade excesso, pode prejudicar a distribuição de oxigênio (EPA, 1995). Já nos Frascos 1, 2 e 7, as umidades finais, abaixo de 20%, estavam próximas a capacidade de campo do solo.

Observando as características organolépticas das amostras após 90 dias, constatou-se que os Frascos 3, 4, 5 e 6, com as melhores eficiências de remoção de contaminantes, apresentaram amostras com menor odor (Tabela 50).

Tabela 50 - Odor e coloração das amostras de solo nos frascos dos Ensaio Preliminares após 90 dias

Frascos (processos)	Características organolépticas após 90 dias
Branco 1	Forte odor de contaminantes, cor amarelada
1	Forte odor de contaminantes, cor amarelada.
2	Leve odor de contaminantes, cor amarelada
3	Sem odor de contaminantes, cor acinzentada
4	Sem odor de contaminantes, cor acinzentada
Branco 2	Forte odor de contaminantes, cor amarelo escuro
5	Sem odor contaminantes, cor amarelo claro
6	Sem odor contaminantes, cor amarelo claro
7	Forte odor contaminantes, cor amarelo escuro

4.1.2.6. Verificação dos teores de contaminantes após um ano

Após um ano do início do processo, a amostra inserida no *erlenmeyer*, denominada “Branco 1”, fechada com tampa envolta em papel de alumínio, deixada próxima à janela, no mesmo local onde foi realizado o Ensaio Preliminar, e a que permaneceu fechada em armário, sem a incidência de luz, denominada “Branco 1 - 01 ano sem luz” foram analisadas. Os teores de contaminantes estão mostrados na Tabela 51 e 52, respectivamente.

Tabela 51 - Teores de contaminantes na Amostra Branco 1 após um ano

Triplicatas	Branco 1-1 ano		Branco 1-1 ano		Branco 1-1 ano		Média	Desv. Pad
Compostos	mg	mg/kg	mg	mg/kg	mg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
IBA	*		*		*		*	
NB	*		*		*		*	
IA	0,4	28	0,4	26	0,5	30	28	2
2EH	0,3	17	0,2	15	0,3	18	17	2
IDA	7,2	444	7,0	431	7,1	442	439	7
DIBP	6,4	395	6,2	387	6,3	388	390	4
DBP	2,7	170	2,7	168	2,8	172	170	2
DIAP	3,7	226	3,5	219	3,7	230	225	5
DOA	0,1	8	0,1	9	0,1	9	9	0
DEHP	7,9	490	7,6	473	8,1	503	489	15
DIDP	2,4	150	2,7	165	2,8	175	163	13

* Não detectado

Tabela 52 – Teores de contaminantes da Amostra Branco 1-01 ano sem luz após um ano

Triplicatas	Branco 1-1 ano		Branco 1-1 ano		Branco 1-1 ano		Média	Desv. Pad
Compostos	mg	mg/kg	mg	mg/kg	mg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
IBA	*		*		*		*	
NB	*		*		*		*	
IA	0,2	10	0,2	11	0,1	8	10	1
2EH	0,1	6	0,1	8	0,1	8	8	1
IDA	3,9	251	4,2	271	3,9	249	257	12
DIBP	6,5	416	6,2	396	5,6	359	390	29
DBP	3,0	194	2,4	154	2,6	166	171	20
DIAP	3,9	250	3,7	235	3,4	219	235	16
DOA	0,1	4	0,1	4	0,1	5	4	0
DEHP	6,9	444	7,1	451	7,0	446	447	4
DIDP	2,2	140	2,1	136	2,2	138	138	2

* Não detectado

Após um ano do início do processo, os teores de plastificantes da amostra inicial deixada para secagem em bandeja inox, não peneirada em malha 2mm, denominada “Amostra inicial bandeja – 01 ano sob luz”, e daquela protegida da luz solar, colocada em armário, denominada “Amostra inicial bandeja – 01 ano sem luz”, foram analisadas. Os teores de contaminantes estão apresentados na Tabela 53 e 54, respectivamente.

Tabela 53 – Teores de contaminantes da Amostra inicial bandeja – 01 ano sob luz após um ano

Triplicatas	Branco 1-1 ano		Branco 1-1 ano		Branco 1-1 ano		Média	Desv. Pad
Compostos	mg	mg/kg	mg	mg/kg	mg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
IBA	*		*		*		*	
NB	*		*		*		*	
IA	*		*		*		*	
2EH	0,1	6	0,1	5	0,1	5	6	0
IDA	1,7	101	1,9	118	1,6	98	106	11
DIBP	4,5	273	4,5	277	4,7	286	279	6
DBP	1,8	109	1,8	107	1,8	113	110	3
DIAP	2,2	137	2,3	138	2,3	141	139	2
DOA	0,0	3	0,0	2	0,0	2	2	0
DEHP	5,7	348	4,7	285	5,1	313	315	32
DIDP	1,4	88	1,7	105	1,8	112	102	12

* Não detectado

Tabela 54 – Teores de contaminantes da Amostra inicial bandeja – 01 ano sem luz após um ano

Triplicatas	Branco 1-1 ano		Branco 1-1 ano		Branco 1-1 ano		Média	Desv. Pad
Compostos	mg	mg/kg	mg	mg/kg	mg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
IBA	*		*		*		*	
NB	*		*		*		*	
IA	0,5	27	0,4	27	0,5	30	28	2
2EH	0,1	5	0,1	6	0,1	6	5	1
IDA	5,9	355	6,0	361	6,4	384	367	15
DIBP	4,8	287	4,6	276	4,8	290	284	7
DBP	1,9	115	1,9	115	1,9	114	115	1
DIAP	2,3	140	2,4	145	2,4	146	144	3
DOA	0,0	3	0,0	1	0,0	2	2	1
DEHP	3,7	220	3,6	217	3,6	216	218	2
DIDP	0,9	55	1,0	60	1,0	60	58	3

* Não detectado

Após um ano do início do processo os teores de plastificantes encontrados entre as amostras denominadas “Branco 1” e “Branco 1 - 01 ano sem luz”, podem ser considerados similares, bem como os teores de plastificantes entre as amostras denominadas “Inicial bandeja – 01 ano sob luz” e “Inicial bandeja – 01 ano sem luz”. Portanto, a fotólise não pode ser considerada um mecanismo de remoção para os plastificantes. Gledhill et al. (1980) verificaram que uma solução contendo 1 mg/L de BBP, exposta a luz solar por 28 dias, resultou em menos de 5% de degradação deste composto; Wolfe et al. (1980b) estimaram a meia-vida de ésteres ftálicos de 144 dias em águas superficiais, devido à fotólise; Howard (1991) estimou meia-vida de fotooxidação em meio aquoso de 2,4 a 12 anos, respectivamente, para o DEP e DBP e, de 0,12 a 1,5 anos para o DEHP.

Comparando as amostras peneiradas e não-peneiradas, os teores médios de plastificantes encontrados nestas últimas estão abaixo daqueles encontrados nas primeiras, provavelmente devido à menor área superficial para adsorção.

4.2 ENSAIOS CONFIRMATÓRIOS

4.2.1. MATERIAIS E MÉTODOS

Para ratificação dos resultados obtidos nos ensaios preliminares de biodegradação do solo da Unidade Industrial, foram realizados ensaios confirmatórios. Além dos teores de contaminantes, densidade de bactérias e umidade que foram avaliados de 30 em 30 dias, monitorou-se o pH e temperatura, semanalmente, durante 90 dias de processo. Foram efetuadas, ainda, avaliações mineralógicas e físico-químicas para fins de levantamento no solo.

4.2.1.1. Amostragem do solo

Foram coletadas amostras de solo deformadas para o ensaio e para as determinações físico-químicas e geotécnicas. O local da coleta foi o mesmo dos ensaios preliminares, no entanto, as amostras foram retiradas na profundidades de 1,0 m a partir do nível do piso industrial. Foi aberta uma nova cava nas dimensões 50x50x100cm (largura x comprimento x profundidade), sendo identificados água/óleo no local (Figura 24).

Figura 24 – Local de coleta de amostra para os Ensaio Confirmatórios

Foram coletados 200 kg de amostra deformada (Branco 2), que foram homogeneizados em betoneira de 125 litros e colocados em sacos plásticos de 25 kg. Alíquotas desta amostra foram enviadas ao Laboratório de Saneamento para as determinações físico-químicas e ensaios de biodegradação; ao Laboratório de Pedologia da Faculdade de

Geografia da USP para as determinações geotécnicas; à Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da USP, para a caracterização físico-química e ao Laboratório da Unidade Industrial (solo inicial), onde foram realizadas as determinações dos teores de álcoois e plastificantes. Foram coletados, ainda, 200mL do sobrenadante e enviados ao Laboratório da Unidade Industrial para determinação das concentração de álcoois e plastificantes

4.2.1.2. Caracterização físico-química do solo para fins de levantamento

As amostras de solo, após homogeneização, separadas em triplicatas, na quantidade de 1kg cada, foram enviadas à Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, para a caracterização físico-química do solo contaminado. Foram determinados os parâmetros pH (H₂O), pH (KCl), Alumínio, Matéria Orgânica, P Total, N Total, Na, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn, Zn, soma das bases, T, V, utilizando os métodos do Instituto Agronômico de Campinas (2001) e da EMBRAPA (1999).

4.2.1.3. Caracterização geotécnica

Preparação da amostra

Aproximadamente 6 kg de solo homogeneizado foram distribuídos em duas bandejas de aço inox (AISI 304), isenta de contaminações, para secagem à temperatura ambiente, durante 4 dias. Tais procedimentos foram efetuados em laboratório, sob capela. Eventuais torrões, formados durante o período de secagem, foram desagregados. Posteriormente, o solo foi peneirado em malha com diâmetro de 2,0 mm (Figura 25A/B). Esta amostra foi denominada Branco 1.

Figura 25 A/B – Preparação da amostra - solo seco e solo peneirado

A caracterização geotécnica e mineralógica do solo contaminado foi efetuada na amostra de solo Branco 1, sendo segregados 500g para a determinação da composição mineralógica e 100g, para a análise granulométrica.

A composição mineralógica foi determinada através de difratometria de raios-X e fluorescência de raios-X. O procedimento da difratometria de raios-X , método do pó, consistiu no quarteamento da amostra de solo, obtendo-se uma amostra de aproximadamente 20 g e posterior redução granulométrica, utilizando peneira “mesh” 200; a amostra resultante (alíquota de 1 a 3 g) foi compactada sobre a cavidade de um suporte metálico (27 mm de diâmetro por 2,5 mm de profundidade) e introduzido no equipamento de difratometria de raios-x, marca PANanalytical, modelo Xpert PRO com detector XCelerator. O procedimento para a fluorescência de raios-x consistiu no quarteamento da amostra de solo, obtendo-se aproximadamente 50 g e posterior redução granulométrica utilizando peneira “mesh” 400; a amostra resultante foi compactada em prensa de 20 t e introduzida no equipamento de fluorescência de raios-x, marca PANanalytical, modelo AXIOS Advanced.

A análise granulométrica foi realizada conforme o procedimento do Manual de Métodos de Análises de Solo (Embrapa,1999), sendo aplicado o “método da pipeta para solos normais”. Foram utilizados 20 g de solo, em triplicatas, colocados em *beaker*, adicionado 100mL de água e 10mL de hexametáfosfato tamponado com carbonato de sódio, levado a agitação em *shaker* durante 8 horas. Posteriormente, o conteúdo foi peneirado em malha de 0,053 mm de diâmetro e coletado em proveta de 1000mL. O material retido na peneira foi lavado com água, completando o volume da proveta. Foi realizada agitação durante 20 segundos com bastão, contendo tampa de borracha perfurada na extremidade inferior. Foi realizado o mesmo procedimento para a prova em branco (sem solo). As amostras e a prova em branco ficaram em repouso durante 3 horas e 28 minutos, sendo este o tempo de sedimentação da fração argila, para 5 cm de profundidade, na temperatura 20°C. Posteriormente, foram coletados 50 mL com pipetador automático de borracha até 5cm de profundidade a partir do nível superior do líquido na proveta. As alíquotas foram transferidas para cápsulas de porcelana, previamente pesadas com a porção de lavagem da pipeta, e levadas à estufa a 103 °C durante 24 horas, resfriadas em dessecador e pesadas para determinação da fração argila. O mesmo procedimento foi feito para as frações retidas na peneira em malha de 0,053 mm de diâmetro - fração areia (Figura 26).

Figura 26 – Provetas utilizadas para a análise granulométrica

Densidade aparente, umidade residual, capacidade de campo e pH

As determinações relativas à densidade aparente, umidade residual, capacidade de campo e pH foram realizadas utilizando a amostra de solo seco e peneirado em malha com diâmetro de 2,0 mm, Branco 1, de acordo com a Norma CETESB L6.350 (CETESB, 1990), sendo os ensaios efetuados em triplicatas.

4.2.1.4. Determinação da densidade de bactérias heterotróficas

A determinação da densidade de bactérias heterotróficas no solo foi efetuada de acordo com a Norma CETESB L5.201 (CETESB, 1996), utilizando o meio R2A e a técnica *Pour-plate*.

4.2.1.5. Caracterização química do solo

As determinações dos teores de plastificantes presentes nas amostras do solo foram efetuadas por cromatografia gasosa de acordo com o método 8061A da EPA. A extração destes plastificantes foi realizada de acordo com o método 3540 da EPA, sendo utilizada a amostra solo inicial.

4.2.1.6. Amostragem e caracterização do inóculo

O inóculo utilizado para o teste de biodegradação dos poluentes do solo foi o lodo da estação de tratamento de águas residuárias da unidade industrial de plastificantes. As amostras de inóculo foram coletadas em recipientes de vidro (1 Litro) e posteriormente preservadas à temperatura de 4°C até seu uso.

Para caracterização do inóculo, foram determinados os seguintes parâmetros: pH, Temperatura, Série de Sólidos, nitrogênio e fósforo, conforme os procedimentos descritos no APHA, AWWA, WEF (1998). A contagem de bactérias heterotróficas foi realizada pelo método “pour-plate”, utilizando meio de cultura R2A. As concentrações dos plastificantes e álcoois foram determinadas por cromatografia gasosa, seguindo o método da EPA 8061A (EPA, 1996) e a extração realizada de acordo com o método 3540 da EPA (EPA, 1996).

4.2.1.7 Ensaios Confirmatórios de Biodegradação

Os ensaios de biodegradação do solo foram conduzidos em *beaker*, a temperatura ambiente (Figura 27). Os frascos permaneceram fechados com papel alumínio e foram abertos uma vez por semana para homogeneização manual, durante todo o período do processo, nas retiradas de amostras. Foram realizados ensaios utilizando amostras de solo branco 1 (Ensaio I) e branco 2 (Ensaio II), com microrganismos indígenas (Tratamento I) ou indígenas e exógenos adaptados (Tratamento E).

Figura 27 – Ensaios Confirmatórios de Biodegradação

Ensaio I

Os Frascos B1, 1, 2, 3 e 4 foram preenchidos inicialmente com 250g de solo Branco 1 (Tabela 55):

- Frasco B1 (Branco 1): solo Branco 1
- Frasco 1 (Processo I1): A umidade inicial do solo foi ajustada para 50% através da adição de água destilada.
- Frasco 2 (processo I2): Foram adicionados 135mg/kg solo de nitrogênio ($\text{N-NH}_4\text{Cl}$) e 30mg/kg solo de fósforo ($\text{P-KH}_2\text{PO}_4$). A umidade inicial do solo foi ajustada para 50% com adição de água destilada.
- Frasco 3 (processo E3): Foram adicionados 50% em volume de inóculo. A umidade do solo foi ajustada para 50% através da adição de água destilada.
- Frasco 4 (processo E4): Foram adicionados 50% em volume de inóculo, 135 mg/kg solo de nitrogênio ($\text{N-NH}_4\text{Cl}$) e 30 mg/kg solo de fósforo ($\text{P-KH}_2\text{PO}_4$). A umidade inicial do solo foi ajustada para 50% com adição de água destilada.

Ensaio II

Os Frascos B2, 5, 6, 7 e 8 foram preenchidos inicialmente com 250g de solo Branco 2 (Tabela 55).

- Frasco B2 (Branco 2): solo Branco 2.

- Frasco 5 (processo E5): Foram adicionados 50% em volume de inóculo. A umidade inicial do solo foi ajustada para 50% através da adição de água destilada.
- Frasco 6 (processo E6): Foram adicionados 50% em volume de inóculo, 170 mg/kg solo de nitrogênio (N-NH₄Cl) e 37 mg/kg solo de fósforo (P-KH₂PO₄). A umidade inicial do solo foi ajustada para 50% com adição de água destilada.
- Frasco 7 (processo I7): Foram adicionados 170 mg/kg solo de nitrogênio (N-NH₄Cl) e 37 mg/kg solo de fósforo (P-KH₂PO₄). A umidade inicial do solo foi ajustada para 50% com adição de água destilada.
- Frasco 8 (processo I7): A umidade inicial do solo foi ajustada para 50% através da adição de água destilada.

Tabela 55 – Ensaios confirmatórios de biodegradação com o solo contaminado

Solo Branco 1		
Processo	Variável	Descrição do processo
Branco 1	-	Controle
I1	Umidade	Umidade ajustada para 50%
I2	Nutrientes	Umidade ajustada para 50% e adição de N e P
E3	Inóculo	Umidade ajustada para 50% com adição de inóculo
E4	Inóculo + nutrientes	Umidade ajustada para 50% com adição de inóculo e nutrientes
Solo Branco 2		
Processo	Variável	Descrição do processo
B2	—	Controle
E5	Inóculo	Umidade ajustada para 50% com adição de inóculo
E6	Inóculo + nutrientes	Umidade ajustada para 50% com adição de inóculo e nutrientes
I7	Nutrientes	Umidade ajustada para 50% e adição de nutrientes
I8	Umidade	Umidade ajustada para 50%

Inicialmente, foi verificada a possibilidade de homogeneização do solo nos frascos através de agitadores mecânicos (tipo paletas), no entanto a mistura não foi efetiva, devido a elevada resistência (plastificação do solo), e optou-se pela homogeneização manual.

4.2.1.8. Monitoramento do processo de biodegradação

Semanalmente, foram determinados os parâmetros temperatura e pH de acordo com os procedimentos do Manual de Métodos de Análises do Solo (EMBRAPA,1999).

Após 30,60 e 90 dias de ensaios foram retiradas amostras do solo dos frascos para determinação dos seguintes parâmetros:

- teores dos plastificantes e álcoois: as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa seguindo o método da EPA 8061A (EPA,1996). A extração foi realizada de acordo com o método 3540 da EPA;
- Contagem das bactérias heterotróficas: as amostras foram analisadas pelo método “pour plate” de acordo com a Norma CETESB L5.201 (CETESB, 1996).

4.2.2. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.2.2.1. Caracterização geotécnica e físico-química do solo

Composição mineralógica do solo

As análises por difratometria de raios x da amostra de solo Branco 1 mostraram que o solo é constituído por caulinita ($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5$), gibsitita ($\text{Al}(\text{OH})_3$), muscovita ($\text{KAl}_2(\text{Si}_3\text{Al})\text{O}_{10}(\text{OH},\text{F})_2$) e quartzo (SiO_2). Os resultados das análises semi-quantitativas de espectrometria por fluorescência de raios x, expressos em porcentual de óxidos estão na Tabela 56.

Tabela 56 – Resultados da espectrometria por fluorescência de raios X da amostra de solo Branco 1

Óxidos	%	Óxidos	%	Óxidos	%
Na ₂ O	0,29	TiO ₂	1,71	Rb ₂ O	0,01
MgO	0,21	V ₂ O ₅	0,02	SrO	*
Al ₂ O ₃	31,90	Cr ₂ O ₃	*	Y ₂ O ₃	0,01
SiO ₂	53,50	MnO	0,02	ZrO ₂	0,07
P ₂ O ₅	0,05	Fe ₂ O ₃	2,24	BaO	0,04
SO ₃	0,09	ZnO	*	WO ₃	0,03
K ₂ O	2,74	Ga ₂ O ₃	*	PbO	0,01
CaO	0,26				

* Não detectado

Os maiores percentuais de óxidos encontrados foram para a SiO₂ (53,5%) e Al₂O₃ (31,9%), sendo os teores de ferro baixos (2,24%).

As análises granulométricas obtidas em relação a 20 g do solo Branco 1, com 7,6% de umidade, identificaram as frações (médias de triplicatas) correspondentes a 1,5 % de argila, 31,9% de silte e 66,6% de areia total, sendo este solo classificado como arenoso, o que corrobora com os resultados obtidos pela fluorescência de raios X, sendo os maiores percentuais de óxidos de silício. As relações silte/argila, consequentemente, foram elevadas e correspondentes a 21.

As determinações físico-químicas realizadas nas amostras de solo Branco 2 estão apresentados na Tabela 57.

Tabela 57 – Caracterização físico-química do solo para fins de levantamento

Parâmetro	pH		M.O.	C*	SB	T	V
Triplicatas	H ₂ O	KCl	g/kg	g/kg	mmol/kg	mmol/kg	%
I	6,5	6,1	14	8,1	75,7	78,7	96
II	6,6	6,2	18	10,4	56,6	59,6	96
III	6,5	6,1	16	9,3	75,5	77,5	97
Parâmetro	Na	K	Ca	Mg	Al	Al+H	Ntotal
Triplicatas	mmol/kg	mmol/kg	mmol/kg	mmol/kg	mmol/kg	mmol/kg	mg/kg
I	*	2,7	69	4	0	3	265
II	*	2,6	50	4	0	3	265
III	*	2,5	69	4	0	2	265
Parâmetro	P Total	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
Triplicatas	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
I	3	51	0,35	0,3	37	2	0,5
II	2	49	0,35	0,4	35	2	0,8
III	2	47	0,35	0,4	36	1,9	0,6

* Não determinado

Os valores de pH do solo em água (6,5 a 6,6) estão ligeiramente acima daqueles encontrados em KCl (6,1 a 6,2), demonstrando que o solo apresenta carga líquida negativa. Os valores elevados encontrados para a capacidade de troca catiônica deste solo, entre 59,6 e 78,7mmol/kg, e os valores de V acima de 96% não foram condizentes com os demais resultados, mostrando que a troca de cargas é advinda possivelmente dos contaminantes, bem como as interferências destes nas determinações geoquímicas inerentes ao solo.

Os teores de Carbono Orgânico do solo estão entre 0,81 a 1,04%, sendo considerados baixos para solos tropicais (Fassbender,1975). Os baixos teores de ferro, 35 a 37mg/kg, corroboram os resultados encontrados por espectrometria de fluorescência de raio x; já os teores de micronutrientes (K, Ca, Mg) variaram entre 2,5 a 2,7 mmol/kg para o

potássio, de 50 a 69 mmol/kg para o cálcio e 4,0 mmol/kg para o magnésio. Os teores de Nitrogênio Total foram de 265mg/kg e de Fósforo Total entre 2 e 3 mg/kg, estando as relações no solo de C/N entre 31 a 39 e C/P entre 2700 a 5200. Considerando as relações C/N 60:1 e C/P 300:1 recomendadas pela CETESB para a biodegradação de compostos orgânicos no solo, seria necessária a adição de fósforo para a manutenção da atividade dos microrganismos indígenas e a biodegradação dos contaminantes nestas condições.

Densidade aparente, umidade residual, capacidade de campo e pH

A Tabela 58 apresenta a densidade aparente, umidade residual, capacidade de campo e pH da amostra de solo Branco 1, utilizada no Ensaio I.

Tabela 58 - Densidade aparente, umidade residual, capacidade de campo e pH da amostra de solo seco

Determinação nº (triplicatas)	Densidade (g/cm ³)	Umidade (%)	Capacidade Campo (%)	pH a 25 °C
1	1,15	8,25	39	5,76
2	1,14	7,34	37	5,7
3	1,24	7,19	38	5,6
Média	1,18	7,59	38	5,6 a 5,76 (faixa de variação)

A umidade residual do solo Branco 1, após preparação e secagem da amostra por 4 dias, foi de 7,6%. A amostra correspondente a este perfil do solo (profundidade de 1 metro) apresentou menor pH (5,6 a 5,8), maior capacidade de campo (38%) em relação a amostra utilizada nos ensaios preliminares (0,60m profundidade).

As determinações em triplicatas da umidade residual e densidade da amostra de solo natural Branco 2, utilizada no Ensaio II, foram realizadas, obtendo-se, respectivamente, valores de 26,5%; 26,6%; 26,9% e 1,46; 1,48; 1,50 g/cm³. Estas determinações foram

realizadas sem peneiramento da amostra, pois a mesma apresentava-se extremamente plastificada e oleosa. Estes valores estão acima daqueles encontrados para a amostra de solo Branco 2 do Ensaio Preliminar (umidade 15,78%), sendo que o nível estático estava a 1,0 m no ponto de amostragem do Ensaio Confirmatório .

A umidade da amostra do solo inicial utilizada para caracterização química foi determinada em triplicatas e foram obtidos os seguintes valores: 20,5%, 21% e 21%.

Após a determinação dos parâmetros físico-químicos, foram calculadas as quantidades de água, nutrientes e lodo a serem introduzidas em cada processo. Verificando os melhores resultados obtidos nos Ensaios preliminares, a umidade inicial do solo foi corrigida para 50% após a adição de lodo, correspondente em média a 10gSSV/kg solo. Foram preparadas soluções contendo 24 g $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{L}$ e 6 g $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{L}$, sendo adicionados 5 mL de cada solução nos frascos 2, 4, 6 e 7 (Tabela 59). Para a determinação das quantidades de nutrientes necessárias, os teores de N e P no solo e no lodo foram levados em consideração.

Tabela 59 - Quantidades de solo, lodo, nutrientes e água dos frascos utilizados nos Ensaio Confirmatórios

Frasco	Solo (g)	Lodo (mL)	gSSV /kgsolo	Nutrientes (mL)	H₂O (mL)
1	250	0		0	100
2	250	0		10	90
3	250	100	9	0	10
4	250	100	9	10	
5	250	90	11	0	10
6	250	90	11	10	
7	250	0		10	90
8	250	0			100

Após a montagem de todos os Frascos foram determinados a temperatura dentro de cada frasco e o pH inicial do solo em cada processo (Tabela 60).

Tabela 60 – pH e temperatura do solo no início do processo de biodegradação – Ensaios Confirmatórios

Frasco	Temperatura (°C)			pH		
	I	II	III	I	II	III
Branco 1	30,0	29,5	30,0	5,8	5,7	5,6
1	29,5	29,5	29,5	5,6	5,6	5,5
2	29,5	29,5	29,0	5,7	5,7	5,7
3	29,5	29,5	29,5	5,6	5,6	5,5
4	29,5	29,5	29,5	5,8	5,8	5,8
Branco 2	28,0	28,0	28,0	5,4	5,3	5,3
5	28,0	28,0	28,0	6,1	6,1	6,0
6	28,0	28,0	28,0	5,9	5,9	5,8
7	28,0	28,0	28,0	5,6	5,6	5,6
8	29,0	29,0	29,0	5,6	5,5	5,5

Nota: I, II e III – triplicatas

4.2.2.2. Caracterização microbiológica do solo

As densidade de bactérias das amostras de solo seco do Frasco Branco 1 e de solo natural do Frasco Branco 2 estão mostradas na Tabela 61. Foram consideradas apenas as placas onde o número de pontos representando colônias estava entre 30 e 300.

Tabela 61 - Densidade de bactérias das amostras de solo Branco 1 e Branco 2

Frasco	Diluição	Triplicatas – Total colônias/placa		
		I	II	III
Branco 1	10^{-1}	4800	4400	4600
	10^{-2}	90	80	40
	10^{-3}	2	2	1
Branco 2	10^{-4}	40	43	13
	10^{-5}	70	120	40

As placas da amostra Branco 2 apresentaram coloração levemente esverdeada e, a exemplo da amostra Branco 2 do Ensaio Preliminar após 90 dias, apresentaram resultados entre 30 e 300 colônias em duas diluições consecutivas. A densidade de bactérias para a amostra Branco 1 foi $9,0 \times 10^3$, $8,0 \times 10^3$ e $4,0 \times 10^3$ UFC/g e para a amostra Branco 2, $7,0 \times 10^6$, $1,2 \times 10^7$ e $4,0 \times 10^6$ UFC/g. Os valores encontrados estão acima daqueles obtidos no Ensaio Preliminar ($4,4 \times 10^2$, $8,0 \times 10^2$ e $1,2 \times 10^3$ UFC/g na amostra solo Branco 1 e $2,6 \times 10^6$ na amostra solo Branco 2), indicando possivelmente um melhor horizonte a ser considerado na retirada de solo para o tratamento *ex-situ*.

4.2.2.3. Caracterização química do solo

Os teores de álcoois e plastificantes do solo inicial estão na Tabela 62.

Tabela 62 - Teores de álcoois e plastificantes do solo inicial – Ensaios Confirmatórios

Triplicatas	I		II		III		Média	Desv Pad
Compostos	mg	mg/kg	mg	mg/kg	mg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
IBA	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
NB	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IA	1,8	109	1,8	106	1,8	109	108	2
2EH	27,2	1627	28,3	1689	26,6	1592	1636	49
IDA	81,1	4846	83,9	5016	73,9	4415	4759	309
DIBP	31,8	1903	32,6	1946	31,9	1907	1919	24
DBP	23,3	1393	23,9	1428	23,2	1388	1403	22
DIAP	35,9	2144	36,3	2172	35,4	2114	2143	29
DOA	0,2	13	0,3	17	0,2	13	15	2
DEHP	48,8	2915	50,9	3045	54,5	3261	3074	175
DIDP	27,8	1659	29,4	1760	28,0	1676	1699	54

nd- não detectado I, II e III – triplicatas

Os teores encontrados para o isodecanol nesta amostra estão acima daqueles encontrados para o DEHP e DIDP, a exemplo da amostra solo inicial, utilizada nos Ensaios Preliminares. Os teores médios de 2-etilhexanol, DBP e DIAP estão acima daqueles encontrados na amostra inicial dos Ensaios Preliminares (798mg/kg, 593mg/kg, 1187mg/kg, respectivamente). Contrariamente, os teores médios de DIDP foram menores (3593mg/kg no Ensaio Preliminar), demonstrando também uma heterogenia nas quantidades de cada contaminante em diferentes perfis do solo.

4.2.2.4. Amostragem e caracterização do inóculo

As amostras do lodo utilizado na pesquisa foram retiradas da Estação de Tratamento de Águas Residuárias da Unidade Industrial, sendo coletados os dados (amostras do tanque de aeração) relativos aos 30 dias antecedentes (Tabela 63).

Tabela 63 - DQO, DBO, Material solúvel em n-hexano, SST, SSV e índice de fenóis do lodo utilizado no Ensaio Confirmatório

DATAS	Parâmetros analisados (mg/L)					
	DQO	DBO	MSH	SST	SSV	Fenóis
1/3/2007	4200			939	883	
2/3/2007	2140					
5/3/2007	3200			1132	894	
6/3/2007	4240		102			0,486
7/3/2007	2960	1909				
8/3/2007	3660			789	613	
9/3/2007	4080					
12/3/2007	2800			630	570	
13/3/2007	5260		32			1,133
14/3/2007	5040	3202				
15/3/2007	3460					
16/3/2007	3760					
19/3/2007	2880			679	626	
20/3/2007	2600		107			0,21
21/3/2007	2740	1819				
22/3/2007	2600			1027	964	
23/3/2007	4260					
24/3/2007	2280					
27/3/2007	3440		73			0,64
28/3/2007	3740	2423				
29/3/2007	3840			580	140	
30/3/2007	4160					

As variações observadas para a DQO e fenóis foram menores em relação às aquelas encontradas no mesmo período no Ensaio Preliminar, assim como as concentrações de SSV.

Os parâmetros pH e temperatura foram determinados em campo durante a coleta da amostra utilizada nos ensaios (Tabela 64).

Tabela 64 - pH, temperatura e densidade do lodo, inóculo utilizado no Ensaio Confirmatório de biodegradação

Amostra	pH	Temperatura (°C)	Densidade (g/cm³)
I	6,81	29,5	0,986
II	6,81	29,5	0,990
III	6,83	29,5	0,990

As concentrações de Sólidos do Inóculo utilizado no Ensaio Confirmatório está na Tabela 65.

Tabela 65 – Concentração de sólidos do inóculo utilizado no Ensaio Confirmatório de biodegradação

Parâmetro	(mg/L)
Sólidos Totais	27500
Sólidos Totais Fixos	3000
Sólidos Totais Voláteis	24500
Sólidos em Suspensão Totais	25000
Sólidos em Suspensão Fixos	2600
Sólidos em Suspensão Voláteis	22400

A contagem de bactérias heterotróficas no inóculo foi realizada na diluição de 10^{-6} , devido ao elevado crescimento no meio utilizado, totalizando $1,72 \times 10^8$ UFC/mL, $2,2 \times 10^8$ UFC/mL e $2,5 \times 10^8$ UFC/mL. Os resultados indicam um elevado número de bactérias heterotróficas presentes, bem como uma elevada relação SSV/SST, correspondente a 90%, confirmando os resultados obtidos na amostra do lodo utilizado nos Ensaios Preliminares, embora as concentrações de SSV do inóculo utilizado nestes últimos fossem menores (11370 mg/L). O pH (6,81 a 6,83), no entanto, apresentou valores abaixo daqueles encontrados no inóculo utilizado no Ensaio Preliminar.

Os teores de Carvão Orgânico Total no Lodo foram de 13600 a 14100mg/kg, Nitrogênio Total Kjeldahl de 1868 a 1887mg/kg e Fósforo Total de 204 a 207mg/kg.

Caracterização química do Lodo

As concentrações de plastificantes e álcoois no lodo estão apresentados na Tabela 66.

Tabela 66 - Concentração de plastificantes e álcoois no lodo utilizado nos ensaios confirmatórios

Triplicatas	I		II		III	
Compostos	mg	mg/L	mg	mg/L	mg	mg/L
IBA	nd		nd		nd	
NB	nd		nd		nd	
IA	nd		nd		nd	
2EH	nd		nd		nd	
IDA	nd		nd		nd	
DIBP	0,1	9	0,1	11	0,1	11
DBP	0,0	5	0,0	4	0,0	5
DIAP	0,0	2	0,0	3	0,0	2
DOA	0,0	3	0,0	4	0,0	3
DEHP	0,3	30	0,4	35	0,3	32
DIDP	0,5	48	0,5	47	0,5	51

nd - não detectado

Os álcoois não foram identificados nesta amostra do lodo, contrariamente àquela utilizada nos Ensaios preliminares. Entre os plastificantes, as concentrações de DIBP, DBP, DIAP e DOA estão abaixo de 11 mg/L, sendo os maiores valores encontrados para o DEHP (30 a 35mg/L) e para o DIDP (47 a 51 mg/L), estando estes valores, no entanto, abaixo daqueles encontrados para estes compostos na amostra do lodo utilizado no Ensaio Preliminar.

4.2.2.5. Monitoramento do Ensaio Confirmatório de biodegradação

O monitoramento semanal do pH está na Tabela 67.

Tabela 67 – Monitoramento do pH no Ensaio Confirmatório

Frascos	pH											
	inicial			7 dias			14 dias			21 dias		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Branco1	5,8	5,7	5,6	5,5	5,4	5,4	6,0	5,9	5,9	5,4	5,5	5,5
1	5,6	5,6	5,5	5,4	5,3	5,2	5,5	5,4	5,4	5,8	5,6	5,6
2	5,7	5,7	5,7	5,4	5,5	5,4	5,9	5,9	5,9	6,1	6,1	6,2
3	5,6	5,6	5,5	5,5	5,5	5,5	5,8	5,8	5,8	6,1	6,1	6,1
4	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,9	6,0	6,1	6,0	6,2	6,2	6,1
Branco2	5,4	5,3	5,3	5,7	5,5	5,4	5,3	5,2	5,3	5,4	5,4	5,4
5	6,1	6,1	6,0	5,8	5,9	5,8	5,9	5,9	5,9	6,0	6,1	6,1
6	5,9	5,9	5,8	5,8	5,8	5,9	6,1	6,1	6,1	6,2	6,2	6,2
7	5,6	5,6	5,6	5,8	5,8	5,8	5,9	5,9	5,9	5,9	6,0	6,0
8	5,6	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,7	5,7	5,7	5,8	5,8	5,8
Frascos	pH											
	30 dias			37 dias			45 dias			52 dias		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Branco1	5,7	5,4	5,4	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3	5,5	5,3	5,3
1	5,4	5,3	5,2	5,4	5,4	5,4	5,3	5,3	5,3	5,4	5,3	5,4
2	5,7	5,7	5,6	5,8	5,7	5,6	5,5	5,5	5,5	5,2	5,2	5,3
3	5,8	5,8	5,8	6,2	6,1	6,2	6,1	6,1	6,1	6,1	6,2	6,2
4	5,9	5,9	5,9	6,4	6,5	6,5	6,5	6,6	6,6	6,5	6,6	6,6
Branco2	5,5	5,3	5,2	5,5	5,3	5,3	5,4	5,2	5,2	5,4	5,3	5,2
5	5,7	5,7	5,7	5,9	5,9	5,9	6,0	6,1	6,1	6,6	6,4	6,3
6	5,8	5,8	5,8	6,1	6,2	6,2	6,3	6,4	6,3	6,7	6,6	6,6
7	5,5	5,4	5,3	5,4	5,4	5,5	5,4	5,4	5,4	5,3	5,4	5,3
8	5,4	5,4	5,3	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5

I, II e III – triplicatas

Tabela 67 – Monitoramento do pH no Ensaio Confirmatório (continuação)

Frascos	pH											
	60 dias			68 dias			74 dias			80 dias		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Branco1	5,4	5,3	5,3	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	5,3	5,2	5,2	5,2
1	5,5	5,5	5,4	6,0	5,9	5,8	5,5	5,5	5,5	5,3	5,3	5,3
2	5,1	5,0	5,1	5,1	5,0	5,0	5,1	5,0	5,1	5,1	5,2	5,1
3	6,2	6,3	6,3	6,4	6,5	6,5	6,6	6,7	6,7	6,5	6,6	6,7
4	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,7	6,7	6,8	6,6	6,6	6,6
Branco2	5,2	5,2	5,1	5,3	5,2	5,2	5,2	5,2	5,1	5,3	5,3	5,2
5	6,1	6,1	6,2	6,3	6,3	6,3	6,4	6,4	6,4	6,5	6,6	6,6
6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,7	6,7	6,7	6,9	6,9	6,9
7	5,2	5,1	5,0	5,0	4,9	4,9	4,8	4,8	4,8	4,8	4,8	4,8
8	5,4	5,4	5,4	5,5	5,4	5,4	5,5	5,5	5,4	5,5	5,5	5,5
Frascos	pH											
	85 dias			90 dias								
	I	II	III	I	II	III						
Branco1	5,4	5,4	5,3	5,5	5,4	5,3						
1	5,5	5,5	5,5	5,6	5,5	5,5						
2	5,2	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1						
3	6,6	6,7	6,7	6,3	6,5	6,5						
4	6,6	6,6	6,6	6,5	6,5	6,5						
Branco2	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2						
5	6,7	6,8	6,8	6,4	6,5	6,5						
6	7,0	7,0	7,0	6,8	6,8	6,8						
7	4,9	4,9	4,9	4,8	4,8	4,8						
8	5,6	5,6	5,5	5,4	5,3	5,3						

I, II e III triplicatas

No Ensaio I, observa-se:

- no Frasco Branco 1 (5,6-5,8), observou-se um ligeiro decréscimo no pH (5,3 – 5,5) após 90 dias;
- no Frasco 1 (5,5-5,6), apenas com a adição de água, observou-se pequena elevação deste parâmetro próximo a 70 dias (5,8-6,0), voltando ao valor inicial aos 90 dias;
- no Frasco 2 (5,7), com a adição de nutrientes e água, observou-se pequena elevação deste parâmetro próximo a 30 dias (5,8-6,0), com os valores decrescendo após os 40 dias e alcançando 5,1 aos 90 dias;
- no Frasco 3 (5,5-5,6), a elevação ocorreu após 30 dias (6,1 a 6,2), atingindo 6,5-6,7 aos 90 dias;
- no Frasco 4 (5,9), a elevação ocorreu após 30 dias (6,2), alcançando 6,5 após 90 dias

No Ensaio II:

- no Frasco Branco 2 (5,3-5,4), observou-se um ligeiro decréscimo do pH (5,2);
- no Frasco 5 (6,0-6,1), a elevação ocorreu após 30 dias, atingindo (6,7-6,8) após 90 dias;
- no Frasco 6 (5,5-5,6), a elevação ocorreu após 30 dias, chegando a (6,7-6,8) após 90 dias;
- no Frasco 7 (5,6), houve uma pequena elevação até 30 dias (5,9-6,0), decrescendo posteriormente durante o período restante, atingindo 4,8 após 90 dias
- no Frasco 8 (5,5-5,6), houve uma pequena elevação até 30 dias(5,8), decrescendo posteriormente durante o período restante e alcançando 5,3 após 90 dias.

Acompanhando a evolução do pH durante todo o período monitorado, pode-se observar que todos os processos, com exceção dos correspondentes ao Branco 1 e 2, apresentaram um aumento de pH nos 30 dias iniciais, com a tendência à elevação do pH após este período nos frascos que receberam bactérias exógenas e com tendência a decréscimo do pH nos frascos contendo apenas as bactérias indígenas.

No Ensaio I, a biodegradação ocorreu no Frasco 3 na faixa de pH de 5,5 a 6,7 e no Frasco 4, na faixa de pH de 5,9 a 6,5. Estes valores estão abaixo daqueles encontrados no Ensaio preliminar, onde as maiores eficiências de biodegradação ocorreram na faixa

de pH 6,59 a 7,81. No entanto, a amostra Branco 1 (5,5 a 5,6) no Ensaio Confirmatório já apresentava pH menor que a do Ensaio Preliminar (6,21 – 6,24).

No Ensaio II, a biodegradação ocorreu no Frasco 5 na faixa de pH 6,0 a 6,8 e no Frasco 6, na faixa de 5,5 a 6,8. Estes valores estão abaixo daqueles encontrados no Ensaio preliminar, onde as maiores eficiências de biodegradação ocorreram na faixa de pH 6,92 a 7,64. Porém, a amostra Branco 2 (5,3-5,4) no Ensaio Confirmatório já apresentava pH menor que a do Ensaio Preliminar (6,72-6,80).

O inóculo utilizado nestes ensaios também apresentou pH (6,81-6,83) abaixo daquele utilizado no Ensaio preliminar (7,04-7,29), contribuindo ainda para valores de pH mais baixos na biodegradação.

A temperatura do ar durante os 90 dias de processo variou de 19 a 30°C, iniciando em 30°C e apresentando declínio correspondente ao período de outono–inverno. A temperatura dos processos estava 1 a 2°C abaixo da temperatura ambiente: no Ensaio I, variou de 17 a 29°C, sendo a inicial 29°C e apresentando os menores valores após 60 dias. No Ensaio II, a temperatura inicial foi de 28°C e o menor valor, 17°C, também ocorreu após 60 dias de processo.

Monitorando a umidade durante o período, observou-se que a inicial efetiva não correspondeu a teórica esperada (50%) com a adição de água, lodo e solução de nutrientes, estando abaixo em todos os frascos. A água adicionada pode ter participado de reações de hidrólise dos diésteres carboxílicos: $(\text{ácido} + \text{álcool} \rightleftharpoons \text{diéster} + \text{água})$. A plastificação do solo, que dificultou a homogeneização inicial, também pode ter contribuído para as diferenças encontradas. Após 90 dias, a umidade final estava abaixo da capacidade de campo do solo (Tabela 68).

Tabela 68 – Umidade do solo (%) durante a biodegradação – Ensaios Confirmatórios

Frasco	Teórica	Inicial	30dias	60dias	90dias
Branco 1	-	8	3	1	1
1	54	38	34	29	24
2	54	34	33	28	23
3	56	36	33	28	25
4	54	35	34	31	26
Branco 2	-	26	21	18	12
5	58	41	39	32	23
6	58	45	45	36	27
7	58	35	34	28	20
8	58	38	32	29	21

Teores de plastificantes e álcoois

Após 30, 60 e 90 dias de ensaios, foram retiradas amostras do solo em todos os Frascos, em triplicatas, para determinação dos teores de álcoois e plastificantes e para verificação da eficiência de remoção de contaminantes em todos os processos.

Frasco 1

Os teores de álcoois e plastificantes no Frasco 1, obtidos durante o monitoramento, estão nas Figuras 28 e 29A/B/C/D/E, respectivamente.

Figura 28 - Teores de álcoois no Frasco 1 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 29A - Teores de plastificantes no Frasco 1 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 29B - Teores de plastificantes no Frasco 1 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 29C - Teores de plastificantes no Frasco 1 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 29D - Teores de plastificantes no Frasco 1 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 29E - Teores de plastificantes no Frasco 1 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Frasco 2

Os teores de álcoois e plastificantes no Frasco 2, obtidos durante o monitoramento, estão nas Figura 30 e 31A/B/C/D/E, respectivamente.

Figura 30 - Teores de álcoois no Frasco 2 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 31A - Teores de plastificantes no Frasco 2 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 31B - Teores de plastificantes no Frasco 2 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 31C - Teores de plastificantes no Frasco 2 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 31D - Teores de plastificantes no Frasco 2 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 31E - Teores de plastificantes no Frasco 2 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Frasco 3

Os teores de álcoois e plastificantes no Frasco 3, obtidos durante o monitoramento, estão nas Figuras 32 e 33A/B/C/D/E, respectivamente.

Figura 32 - Teores de álcoois no Frasco 3 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 33A - Teores de plastificantes no Frasco 3 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 33B - Teores de plastificantes no Frasco 3 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 33C - Teores de plastificantes no Frasco 3 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 33D - Teores de plastificantes no Frasco 3 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 33E - Teores de plastificantes no Frasco 2 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Frasco 4

Os teores de álcoois e plastificantes no Frasco 4, obtidos durante o monitoramento, estão nas Figuras 34 e 35A/B/C/D/E/F, respectivamente.

Figura 34 - Teores de álcoois no Frasco 4 Após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 35A - Teores de plastificantes no Frasco 4 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 35B - Teores de plastificantes no Frasco 4 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 35C - Teores de plastificantes no Frasco 4 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 35D - Teores de plastificantes no Frasco 4 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 35E - Teores de plastificantes no Frasco 4 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 35F - Teores de plastificantes no Frasco 2 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Frasco 5

Os teores de álcoois e plastificantes no Frasco 5, obtidos durante o monitoramento, estão nas Figuras 36 e 37 A/B/C/D/E/F, respectivamente.

Figura 36- Teores de álcoois no Frasco 5 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 37A- Teores de plastificantes no Frasco 5 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 37B - Teores de plastificantes no Frasco 5 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 37C - Teores de plastificantes no Frasco 5 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 37D - Teores de plastificantes no Frasco 5 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 37E - Teores de plastificantes no Frasco 5 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 37F - Teores de plastificantes no Frasco 5 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Frasco 6

Os teores de álcoois e plastificantes no Frasco 6, obtidos durante o monitoramento, estão nas Figuras 38 e 39 A/B/C/D/E, respectivamente.

Figura 38 - Teores de álcoois no Frasco 6 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 39A - Teores de plastificantes no Frasco 6 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 39B - Teores de plastificantes no Frasco 6 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 39C - Teores de plastificantes no Frasco 6 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 39D - Teores de plastificantes no Frasco 5 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 39E - Teores de plastificantes no Frasco 6 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Frasco 7

Os teores de álcoois e plastificantes no Frasco 7, obtidos durante o monitoramento, estão nas Figuras 40 e 41A/B/C/D/E, respectivamente.

Figura 40- Teores de álcoois no Frasco 7 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 41A - Teores de plastificantes no Frasco 7 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 41B - Teores de plastificantes no Frasco 7 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 41C - Teores de plastificantes no Frasco 7 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 41D - Teores de plastificantes no Frasco 7 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 41E - Teores de plastificantes no Frasco 7 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Frasco 8

Os teores de álcoois e plastificantes no Frasco 8, obtidos durante o monitoramento, estão nas Figuras 42 e 43A/B/C/D/E.

Figura 42 - Teores de álcoois no Frasco 8 Após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 43A - Teores de plastificantes no Frasco 8 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 43B - Teores de plastificantes no Frasco 8 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 43C - Teores de plastificantes no Frasco 8 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 43D - Teores de plastificantes no Frasco 8 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Figura 43E - Teores de plastificantes no Frasco 8 após 30, 60 e 90 dias – Ensaio Confirmatório

Nos Ensaios I e II, as eficiências foram determinadas relativamente aos Frascos Branco1 e Branco 2, respectivamente.

Em relação ao Ensaio I, pode-se concluir:

- no Frasco 1, nota-se que as remoções foram acima de 94% para todos os compostos;

- no Frasco 2, as remoções foram acima de 98% para os plastificantes e acima de 89% para o isodecanol;
- nos Frascos 3 e 4, com exceção do 2-etil-hexanol e do DOA inicialmente presentes no solo, nenhum dos demais compostos foi totalmente removido. As remoções de isodecanol foram acima de 98% e 92% nos Frascos 3 e 4, respectivamente. Entre os plastificantes, o DEHP apresentou a menor eficiência de remoção no Frasco 3 (87,5%) e o DOA, no Frasco 4 (86,0%).

No Frasco 1, onde a umidade do solo foi ajustada para 50% (umidade inicial efetiva igual a 38%), os teores de álcoois e plastificantes estavam abaixo de 16% e 4% respectivamente, em relação àqueles do solo Branco 1 já a partir de 30 dias, contrariamente aos elevados teores finais encontrados no Ensaio Preliminar (umidade inicial de 21%). A remoção, neste caso, pode ser atribuída a outros mecanismos além da biodegradação, uma vez que só foi adicionada água no frasco.

No Frasco 2 (umidade inicial efetiva de 34%), as remoções de plastificantes foram acima daquelas obtidas no Ensaio Preliminar, considerando que neste último, a umidade inicial era mais baixa (31%). As altas remoções de contaminantes aos 30 dias sugerem que além da biodegradação pelos microrganismos indígenas outros mecanismos de remoções podem ter ocorrido, tais como a hidrólise dos plastificantes DEHP e DIDP.

Os Frascos 3 e 4, contendo microrganismos indígenas e exógenos adaptados, apresentaram elevados valores de eficiência de remoção de plastificantes, a exemplo dos resultados obtidos no Ensaio Preliminar. Os menores teores de plastificantes remanescentes no solo do Frasco 3 foram 4mg/kg, 5mg/kg e 5mg/kg para o DIBP, DBP e DIAP e 544mg/kg e 687mg/kg para o DEHP e DIDP. No solo do Frasco 4, os menores teores de plastificantes remanescentes foram 3mg/kg, 2mg/kg e 7mg/kg para o DIBP, DBP e DIAP e 25mg/kg, 23mg/kg e 311mg/kg para o DOA, DEHP e DIDP.

Em relação ao Ensaio II, pode-se concluir:

- nos Frascos 5 e 6, com exceção do 2-etil-hexanol inicialmente presentes no solo, nenhum dos demais compostos foi totalmente removido. As remoções de isodecanol foram acima de 91% e 97% nos Frascos 5 e 6, respectivamente. Entre

os plastificantes, o DIDP apresentou a menor eficiência de remoção no Frasco 5 (70,4%) e no Frasco 6 (82,6%);

- o Frasco 7, onde foram adicionados nutrientes aos microrganismos indígenas, apresentou as menores eficiências de remoção para os álcoois e plastificantes (maior do que 64,4% e 47,3%, respectivamente);
- o Frasco 8, onde a umidade foi corrigida para 50%, apresentou eficiências de remoção de álcoois e plastificantes de 94,4% e 72,2%, respectivamente.

No Frasco 7, onde a umidade do solo foi ajustada para 50% e adicionados nutrientes aos microrganismos indígenas (umidade inicial efetiva igual a 35%), as remoções relativas de álcoois e plastificantes foram elevadas em relação àquelas encontradas no Ensaio Preliminar, sendo a umidade inicial neste último similar (31%). No Frasco 8 (umidade inicial efetiva igual a 38%), as remoções foram elevadas, considerando que não foram adicionados nutrientes aos microrganismos indígenas, a exemplo dos resultados do Frasco 1 deste Ensaio. Estas remoções podem ser atribuídas a outros mecanismos.

Os Frascos 5 e 6, contendo microrganismos indígenas e exógenos adaptados, apresentaram elevados valores de eficiência de remoção de plastificantes, a exemplo dos resultados obtidos no Ensaio Preliminar. Os menores teores de plastificantes remanescentes no solo do Frasco 5 foram 21mg/kg, 9mg/kg, 28mg/kg e 28mg/kg para o DIBP, DBP, DIAP e DOA, 785mg/kg e 3062mg/kg para o DEHP e DIDP. No solo do Frasco 6, os menores teores de plastificantes remanescentes foram 6mg/kg, 27mg/kg e 14mg/kg para o DBP, DIAP e DOA e 114mg/kg, 540mg/kg e 1705mg/kg para o o DIBP, DEHP e DIDP.

Comparando-se os resultados dos Ensaio I e II, verifica-se que as eficiências de remoção para os plastificantes, considerando microrganismos indígenas e exógenos adaptados no Ensaio I, foram ligeiramente superiores àquelas encontradas no Ensaio II, a exemplo dos resultados obtidos nos Ensaios Preliminares. A adição de nutrientes aos microrganismos indígenas e exógenos adaptados aumentou a eficiência do processo no Frasco 6, contrariamente ao Ensaio Preliminar (aumento apenas no Frasco 4). Nestes ensaios confirmatórios, entretanto, os teores iniciais de plastificantes nas amostras dos Ensaios I e II estavam próximas, porém acima daqueles encontrados nos Ensaios Preliminares.

Observa-se novamente que a presença dos álcoois (co-substratos) e de plastificantes de menor cadeia alquílica não impediu a biodegradação do DEHP e DIDP, conforme resultados obtidos nos Ensaio Preliminares. Embora os teores iniciais de DIDP fossem o triplo dos teores de DEHP nas amostras solo Branco 1 e Branco 2, verificou-se que os teores finais para estes compostos foram próximos, confirmando a possibilidade de diminuição da taxa de degradação do plastificante em função do comprimento e da ramificação das cadeias alquílicas, já observada nos Ensaio Preliminares.

Contagem de Bactérias Heterotróficas nas amostras de solo

A contagem de bactérias heterotróficas foi realizada após 30, 60 e 90 dias de ensaio. A Tabela 69 mostra as diluições utilizadas em cada determinação, sendo consideradas as placas que apresentaram entre 30 e 300 pontos identificados como bactérias heterotróficas.

Tabela 69 - Contagem de Bactérias Heterotróficas nos Frascos do Ensaio Confirmatório

Frasco	UFC/placa											
	30 dias				60 dias				90 dias			
	D	I	II	III	D	I	II	III	D	I	II	III
Branco 1	10^{-2}	36	30	37	10^{-1}	100	15	10	10^{-1}	69	32	86
	10^{-3}	5	(*)	(*)	10^{-2}	10	14	(*)				
1	10^{-2}	440	408	464	10^{-3}	118	94	87	10^{-2}	80	111	139
	10^{-3}	120	83	113	10^{-4}	18	17	-	10^{-3}	17	21	41
	10^{-4}	26	15	9								
2	10^{-3}	480	520	448	10^{-4}	234	178	90	10^{-4}	110	180	410
	10^{-4}	180	130	(*)	10^{-5}	104	62	64	10^{-5}	300	200	130
	10^{-5}	49	26	46	10^{-6}	29	30	30	10^{-6}	5	4	5
3	10^{-5}	860	270	160	10^{-5}	390	490	(1)	10^{-6}	(1)	(1)	(*)
	10^{-6}	220	340	134	10^{-7}	300	387	290	10^{-6}	100	111	130
	10^{-7}	60	84	27					10^{-7}	51	40	(*)

D – diluição I, II, III – triplicatas (1) placas com mais de 1000 UFC

(*) placas desconsideradas por não apresentaram unidades formadoras de colônias

Tabela 69 - Contagem de Bactérias Heterotróficas nos Frascos do Ensaio Confirmatório (continuação)

Frasco	UFC/placa											
	30 dias				60 dias				90 dias			
	D	I	II	III	D	I	II	III	D	I	II	III
4	10^{-5}	170	720	(1)	10^{-6}	362	405	484	10^{-8}	260	275	292
	10^{-6}	67	99	116	10^{-7}	187	190	53	10^{-6}	182	101	102
	10^{-7}	32	44	62					10^{-7}	33	12	21
Branco 2	10^{-4}	240	220	140	10^{-4}	80	60	88	10^{-8}	102	110	38
	10^{-5}	80	109	111	10^{-5}	40	30	55	10^{-3}	1	3	1
	10^{-6}	11	4	(*)					10^{-4}	14	16	23
5	10^{-5}	342	382	318	10^{-5}	676	810	(1)	10^{-5}	916	920	792
	10^{-6}	48	59	50	10^{-6}	190	159	192	10^{-6}	172	280	205
	10^{-7}	9	21	(*)	10^{-7}	(*)	(*)	(*)	10^{-7}	29	16	19
6	10^{-6}	180	163	169	10^{-6}	100	110	114	10^{-8}	244	208	228
	10^{-7}	100	78	140	10^{-7}	110	40	(*)	10^{-6}	113	87	106
7	10^{-5}		240	360	10^{-5}	66	46	60	10^{-7}	39	40	42
	10^{-6}		180	173	10^{-6}	43	40	30	10^{-5}	1	2	1
8	10^{-4}	260	268	213	10^{-4}	54	45	50	10^{-6}	260	268	213
	10^{-5}	61	73	87	10^{-5}	3	(*)	1	10^{-3}	61	73	87
					10^{-6}	(*)	(*)	(*)				

D – diluição I, II, III – triplicatas

(*) placas desconsideradas por não apresentaram unidades formadoras de colônias

(1) placas com mais de 1000 UFC

A exemplo dos resultados encontrados no Ensaio Preliminar, foram detectados valores entre 30 e 300 colônias em diferentes diluições das amostras de solo para o mesmo frasco, com exceção do Branco 1. A repetibilidade entre as triplicatas também não foi observada, como por exemplo, os resultados obtidos para os Frascos 3 e 4 em 30 dias. Nota-se, ainda, o aumento do número de colônias em função do aumento da diluição nas amostras do Frasco 2. Gigena (2005) avaliou a densidade de bactérias heterotróficas do solo de uma área industrial, localizada na cidade de São Paulo, contaminada com

BTEX, utilizando o meio R2A e obteve maiores densidades de bactérias em maiores diluições da amostra. A pesquisadora não relatou se observou repetibilidade das replicatas e atribuiu os resultados à inibição no crescimento de microrganismos, sendo que em amostras progressivamente diluídas, obteve-se um número maior de unidades formadoras de colônias. Contrariamente, no presente estudo de biodegradação, as propriedades dos contaminantes (altamente adsorvidos no solo), aliadas às características geotécnicas do solo e idade da contaminação podem ter sido fatores preponderantes, justificando a não repetibilidade entre triplicatas, bem como a divergência de resultados em função do aumento das diluições. A inibição da população bacteriana em função do aumento da concentração de contaminantes não foi considerada, uma vez que os teores iniciais de plastificantes no solo eram altos, bem como a elevada idade de contaminação.

As placas relativas aos Frascos Branco 2, 5, 6 e 7 apresentaram coloração esverdeada em todas as datas, contrariamente às placas relativas aos Frascos do Ensaio I, as quais não apresentaram esta coloração.

Na Tabela 70 estão apresentadas as densidades de bactérias heterotróficas obtidas em cada frasco do Ensaio Confirmatório.

Tabela 70 – Densidade de Bactérias Heterotróficas nos Frascos do Ensaio Confirmatório

UFC/g solo									
Frasco	30 dias			60 dias			90 dias		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Branco 1	$3,6 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	$3,7 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	(*)	(*)	$6,9 \times 10^2$	$3,2 \times 10^2$	$8,6 \times 10^2$
1	$1,2 \times 10^5$	$8,3 \times 10^4$	(*)	$1,2 \times 10^5$	$9,4 \times 10^4$	$8,7 \times 10^4$	$8,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$
							$1,7 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$4,1 \times 10^4$
2	$1,8 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	(*)	$2,3 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$9,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$4,1 \times 10^6$
	$4,9 \times 10^6$	(*)	$4,6 \times 10^6$	$1,04 \times 10^7$	$6,2 \times 10^6$	$6,4 \times 10^6$	$3,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$
3	(*)	$2,7 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$3,0 \times 10^9$	(*)	$2,9 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$
	$2,2 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$				$5,1 \times 10^9$	$4,0 \times 10^9$	(*)
	$6,0 \times 10^8$	$8,4 \times 10^8$	(*)						
4	$1,7 \times 10^7$	(*)	(*)	$1,9 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$	$5,3 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$2,75 \times 10^8$	$2,92 \times 10^8$
	$6,7 \times 10^7$	$9,9 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$				$1,82 \times 10^9$	$1,01 \times 10^9$	$1,02 \times 10^9$
	$3,2 \times 10^8$	$4,4 \times 10^8$	$6,2 \times 10^8$				$3,3 \times 10^9$	(*)	(*)

I, II, III – triplicatas

(*) placas desconsideradas por não apresentarem unidades formadoras de colônias

Tabela 70 – Densidade de Bactérias Heterotróficas nos Frascos do Ensaio Confirmatório (continuação)

UFC/g solo									
Frasco	30 dias			60 dias			90 dias		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Branco 2	2,4x10 ⁶	2,2x10 ⁶	1,4x10 ⁶	8,0x10 ⁵	6,0x10 ⁵	8,8x10 ⁵	1,0 x10 ⁵	1,1x10 ⁵	3,8x10 ⁴
	8,0x10 ⁶	1,1x10 ⁷	1,1x10 ⁶	4,0x10 ⁶	3,0x10 ⁶	5,5x10 ⁶			
5	3,4x10 ⁷	3,8 10 ⁷	3,2x10 ⁷	1,9x10 ⁸	1,59x10 ⁸	1,92x10 ⁸	1,7x10 ⁹	2,8x10 ⁹	2,05x10 ⁹
	4,8x10 ⁷	5,9 10 ⁷	5,0x10 ⁷						
6	1,8x10 ⁸	1,6x10 ⁸	1,7x10 ⁸	1,0x10 ⁸	1,1x10 ⁸	1,14x10 ⁸	2,44x10 ⁸	2,08x10 ⁸	2,28x10 ⁸
	1,0x10 ⁹	7,8x10 ⁸	1,4x10 ⁹	1,1x10 ⁹	4,0x10 ⁸	(*)	1,1x10 ⁹	8,7x10 ⁸	1,1x10 ⁹
							7,1 x10 ⁹	(*)	4,0 x10 ⁹
7		2,4x10 ⁶	3,6x10 ⁶	6,6 x10 ⁶	4,6x10 ⁶	6,0x10 ⁶	2,9 x10 ⁶	4,0 x10 ⁶	4,2 x10 ⁶
		1,8x10 ⁷	1,73x10 ⁷	4,3 x10 ⁷	4,0x10 ⁷	3,0x10 ⁷			
8	2,6x10 ⁶	2,68x10 ⁶	2,13x10 ⁶	5,4x10 ⁵	4,5x10 ⁵	5,0x10 ⁵	2,6x10 ⁵	2,68 10 ⁵	2,13x10 ⁵
	6,1x10 ⁶	7,3x10 ⁶	8,7x10 ⁶				6,1x10 ⁵	7,3x10 ⁵	8,7x10 ⁵

I, II, III – triplicatas

(*) placas desconsideradas por não apresentaram unidades formadoras de colônias

Observando a densidade de bactérias heterotróficas após 30, 60 e 90 dias de ensaio, pode-se verificar:

- a amostra Branco 1 apresentou uma diminuição de 1 log após 90 dias;
- a amostra do Frasco 1, a qual recebeu apenas adição de água, não apresentou crescimento bacteriano, mantendo-se aproximadamente o mesmo número de bactérias no início e no final do ensaio, no entanto remoções superiores a 94% foram observadas para todos os compostos. As remoções de contaminantes sem o respectivo aumento na densidade de bactérias pode ser explicado pela não seletividade da contagem de bactérias heterotróficas, por co-metabolismo ou ainda pelo fato de que os teores iniciais considerados foram os do solo Branco 1 e não aqueles encontrados imediatamente após a adição de água;
- a amostra do Frasco 2, que recebeu adição de água e nutrientes, apresentou crescimento bacteriano de 1 log, a exemplo dos resultados obtidos no Ensaio Preliminar. As remoções superiores a 98% para os plastificantes e 89% para os álcoois;
- a amostra do Frasco 3, a qual recebeu água e 50% v/v de inóculo, apresentou crescimento bacteriano de 1 log após 60 dias. As remoções foram superiores a 87,5% para os plastificantes e 98% para os álcoois;
- a amostra dos Frasco 4, que recebeu água, 50% v/v de inóculo e nutrientes, apresentou crescimento bacteriano da ordem de 1 log, após 60 dias. As remoções foram de 86% para os plastificantes e 92% para os álcoois;
- a amostra do Frasco 5, a qual recebeu água e 50% v/v de inóculo, apresentou crescimento de 1 log após 60 dias e de 2 logs após 90 dias, porém a ordem de grandeza da densidade de colônias iniciais (10^7) estava abaixo de 1 log em relação aos demais processos nos quais foi adicionado o lodo (10^8). As remoções foram superiores a 70,4% para os plastificantes e 91% para os álcoois;
- a amostra do Frasco 6, que recebeu água, 50% v/v de inóculo e nutrientes, apresentou crescimento bacteriano da ordem de 1 log após 90 dias. As remoções foram superiores a 82,6% para os plastificantes e 97% para os álcoois;
- a amostra do Frasco 7, que recebeu adição de nutrientes, não apresentou crescimento bacteriano, mantendo-se aproximadamente a mesma densidade no início e no final do ensaio. As eficiências de remoção foram superiores a 47,3% para os plastificantes e 64,4% para os álcoois;

- a amostra do Frasco 8, que recebeu adição de água, apresentou diminuição da ordem de 1 log. As eficiências de remoção foram superiores a 72,2% para os plastificantes e de 94,4% para os álcoois. As remoções de contaminantes, sem o respectivo aumento na densidade de bactérias, podem ser explicadas pelas razões descritas para o Frasco 1.

A Tabela 71 mostra a contagem de bactérias heterotróficas comparando os Ensaio I e II após 90 dias.

Tabela 71 - Comparação das densidades de bactérias heterotróficas obtidas nos Ensaio I e II

Triplicatas UFC/g solo							
Ensaio I				Ensaio II			
Frasco	I	II	III	Frasco	I	II	III
1	$8,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	8	$6,1 \times 10^5$	$7,3 \times 10^5$	$8,7 \times 10^5$
2	$3,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	7	$2,9 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	$4,2 \times 10^6$
3	$1,0 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	5	$1,7 \times 10^9$	$2,8 \times 10^9$	$2,05 \times 10^9$
4	$1,82 \times 10^9$	$1,01 \times 10^9$	$1,02 \times 10^9$	6	$1,1 \times 10^9$	$8,7 \times 10^8$	$1,1 \times 10^9$

Comparando-se os ensaios I e II, observa-se que o aumento da densidade de bactérias após 90 dias nos Frasco 5 e 6 do Ensaio II foram equivalentes a 1 log e similares àqueles obtido nos Frascos 3 e 4 do Ensaio I. No Ensaio preliminar, os resultados obtidos para a densidade de bactérias após 90 dias, para todos os frascos do Ensaio II, foram superiores a 1 log em relação àqueles encontrados no Ensaio I.

Conforme resultados obtidos nos Ensaio Preliminares e Confirmatórios, o monitoramento biológico através da contagem de bactérias heterotróficas não representou um bom indicador da biodegradação dos plastificantes no solo objeto do presente estudo, devido aos seguintes fatores:

- Não seletividade do meio de cultura utilizado;
- Granulometria e características geotécnicas do solo;
- Elevada adsorção dos contaminantes às partículas de solo, dificultando a homogeneização das amostras;

- Repetibilidade e reprodutibilidade do método.

Esta conclusão corrobora com a encontrada por Fuhrman et al. (1993), que diz que os resultados obtidos por métodos baseados no cultivo de microrganismos são considerados insuficientes para a recuperação do número total destes no solo e da sua biodiversidade.

A Tabela 72 contém um resumo dos resultados dos parâmetros de monitoramento inicial e após 90 dias, dos Ensaios Preliminares e Confirmatórios .

Tabela 72 – Resumo dos resultados obtidos nos Ensaios Preliminares e Confirmatórios

Ensaio Parâmetro	Preliminar		Confirmatório	
	Ensaio I Frascos 3 e 4	Ensaio II Frascos 5 e 6	Ensaio I Frascos 3 e 4	Ensaio II Frascos 5 e 6
Teores iniciais de Plastificantes (mg/kg) – menor e maior valor	26(DOA) a 1712(DIDP)	78(DOA) a 5072(DIDP)	178 (DOA) a 15552(DIDP)	153(DOA) a 11360(DIDP)
Umidade inicial %	61 e 71	54 e 64	35 e 36	41 e 45
pH na biodegradação	6,52 a 7,81	6,81 a 7,64	5,50 a 6,70	5,50 a 6,80
gSSV/kg solo	5	5	9	11
Aumento densidade de bactérias (log)	1	1	1	1
Remoções de plastificantes (%) - menor valor	89,4 e 95,1	89,6 e 78,3	87,5 e 86,0	70,4 e 82,6
Teores finais de plastificantes (mg/kg) – menor e maior valor	10(DIBP) a 69(DEHP) e 6(DIBP) a 24(DEHP)	19(DBP) a 418 (DIBP) e 13(DOA) a 1103(DIDP)	4(DIBP) a 687(DIDP) e 2(DBP) a 311(DIDP)	9(DBP) a 3113(DIDP) e 6(DBP) a 1828(DIDP)

Comparando-se os resultados dos Ensaio Preliminares e Confirmatórios, verifica-se que, dentro dos teores de plastificantes estudados, para o solo arenoso utilizado, pode-se considerar:

- A biodegradação utilizando solo úmido natural apresentou maior número de bactérias heterotróficas iniciais e manteve as condições mais próximas ao ambiente natural, devendo ser considerado para o tratamento *ex-situ*;
- A umidade inicial efetiva não correspondeu à teórica esperada pela adição de água, nutrientes e lodo, estando abaixo. As reações de hidrólise podem ter ocorrido com os plastificantes. Assim, a presença de compostos finais da biodegradação de plastificantes deve ser avaliada no tratamento *ex-situ* para verificação da biodegradação;
- A metodologia analítica para determinação da umidade deve considerar a perda de massa por evaporação dos álcoois de interesse presentes no solo e a secagem das amostras deverá ocorrer a 90°C durante 24 horas;
- A fotólise não é um mecanismo de remoção a ser considerado para os plastificantes, bem como a perda por volatilização, não sendo portanto restritivos para a utilização de betoneiras (reatores) no tratamento *ex-situ*.
- Nos resultados do Ensaio Confirmatório, a umidade efetiva da biodegradação ficou na faixa de 40% a 50%, devendo a mesma ser considerada para o tratamento *ex-situ* do solo, bem como possíveis reposições de água durante o processo de biodegradação, para garantir valores acima da capacidade de campo;
- Embora a biodegradação nos Ensaio Confirmatórios tenha ocorrido em valores de pH mais baixos daqueles obtidos nos Ensaio Preliminares, não serão feitas correções de pH no solo durante o tratamento *ex-situ*. Só será realizada a adição de nutrientes no início do processo, considerando o teor de Carbono Orgânico Total da lama inicial no reator.
- Na faixa de teores totais de plastificantes estudada (3.000 a 30.000mg/kg), a adição de lodo na razão 10 gSSV/kg solo seco foi adequada e portanto, deverá ser utilizada no tratamento *ex-situ*

- As elevadas remoções nos teores de plastificantes em relação ao solo inicial nos Frascos 1 e 8 (não receberam adição de organismos exógenos e/ou nutrientes), encontradas no Ensaio Confirmatório, não puderam ser atribuídas à biodegradação, não sendo observado crescimento bacteriano, mas possivelmente a outros mecanismos de remoção: a hidrólise dos diésteres. As elevadas remoções de DIDP e DEHP no Frasco 2 (recebeu adição de nutrientes), após 30 dias, apesar do crescimento bacteriano de 1 log, também podem ser atribuídas a hidrólise destes diésteres. A heterogenia das amostras devido a intensa plastificação do solo, também deve ser considerada. No tratamento *ex-situ*, os teores iniciais de contaminantes no solo devem ser considerados somente após adição de lodo, água e nutrientes, bem como deve ser garantido um tempo mínimo de homogeneização do solo no reator.
- Os elevados teores finais de plastificantes nos Frascos 5 e 6 dos Ensaios Confirmatórios podem ser indicativos da necessidade de maior tempo de biodegradação para elevados teores iniciais destes compostos no solo. No tratamento *ex-situ*, o tempo total de biodegradação será de 90 a 120 dias.
- Conforme resultados obtidos nas amostras iniciais de solo, Brancos 1 e 2, foram identificados elevados teores iniciais dos plastificantes DEHP e DIDP, mas também do álcool isodecanol, devendo permancer o monitoramento desta família de compostos no solo durante o tratamento *ex-situ*.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DO SOLO DA ÁREA DE PLASTIFICANTES

4.3.1. MATERIAIS E MÉTODOS

Anteriormente à retirada das quantidades de solo para biorremediação *ex-situ*, foi efetuada uma caracterização do solo da área de plastificantes. A amostragem e investigação do solo foram executadas de acordo com as recomendações do manual de gerenciamento de áreas contaminadas da CETESB (CETESB; GTZ, 2001). Os pontos de amostragem foram selecionados em função do histórico da implantação da fábrica, dos perfis dos estudos realizados anteriormente na área, dos dados coletados dos poços de bombeamento existentes, da proximidade dos reatores e tanques de estocagem de produtos, bem como do livre acesso para remoção do piso industrial. Foram selecionados 10 pontos de amostragem, denominados S-01 a S-10. As amostras relativas a estes pontos foram coletadas utilizando amostrador tubular acoplado a um marteleiro rompedor elétrico, composto por tubos de polietileno removíveis em seu interior. O amostrador tubular, bem como todos os acessórios utilizados, eram lavados com vapor após cada amostragem. Foram retiradas amostras a cada 1 m até o nível máximo de 5 metros no solo, identificando-se os diferentes horizontes, sendo ainda efetuadas as determinações de VOC (volatile organic compounds – compostos orgânicos voláteis) em campo, utilizando equipamento fotoionizador portátil do tipo PID. Foram coletadas amostras de solo indeformadas para realização de ensaios geotécnicos e amostras deformadas para as determinações físico-químicas (Figura 44, 45 e 46).

Nota: S-01 a S-10 - Pontos de coleta de amostras de solo PE-i – Poços de extração

Figura 44 - Pontos de amostragem para caracterização do solo da área contaminada e poços de extração existentes na área de plastificantes

Figura 45 – Retirada de amostra indeformada

Figura 46 – Retirada de amostras deformadas utilizadas para a caracterização do solo da área de plastificantes

As amostras deformadas, contidas nos tubos de polietileno, foram preservadas a 4°C, conforme as recomendações do manual de gerenciamento de áreas contaminadas da CETESB (CETESB; GTZ, 2001). Posteriormente, todas as amostras coletadas em cada perfil do solo foram retiradas dos tubos de polietileno, homogeneizadas e enviadas em duplicatas ao laboratório Ceimic, para análises de compostos semi-voláteis, conforme método EPA 8270 (EPA,1996). Para extração destas amostras foi utilizada a metodologia EPA 3550 (EPA,1996).

As amostras indeformadas foram coletadas utilizando um batedor, contendo anel de inox removível em seu interior, acoplado a um cabo prolongador e retiradas até o nível máximo de dois metros da superfície do solo. Os anéis contendo estas amostras foram enviados ao Laboratório de Saneamento Professor Lucas Garcez do Departamento de

Engenharia Hidráulica e Sanitária da Escola Politécnica da USP, para análises de densidade e porosidade total, de acordo com o manual da EMBRAPA (1999).

4.3.2. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.3.2.1. Geologia regional

A área onde está localizada a indústria petroquímica é formada por rochas pré-cambrianas, constituídas de granitos e granodioritos, em parte gnaíssicos, micaxistos e meta-arenitos, bem como xistos miloníticos, encontrados em zona de movimentação tectônica. Abrange sedimentos geológicos terciários, constituídos por argilas, areias e cascalhos da Formação São Paulo e sedimentos aluvionares quaternários, conforme Carta Geológica da Região Metropolitana de São Paulo, 1980 (Ambiterria, 2004). Conforme o Mapa Pedológico do Estado de São Paulo, a região onde se localiza a referida unidade industrial é caracterizada como Cambissolo Háplico (IBGE, 2005).

4.3.2.2. Solo da área de plastificantes

Descrição litológica dos perfis do solo e avaliação de VOCs no campo

Ponto S-01

O solo nos primeiros 0,40 m de profundidade apresentou uma composição areno-argilosa com muscovitas placóides, variando até 1cm de largura e coloração marrom avermelhada com pontos pretos. Entre 0,40 m e 1,40 m de profundidade, o solo apresentou uma composição argilosa, com intercalações arenosas de granulometria fina e de coloração marrom. Neste ponto, já a 0,80 m de profundidade, observou-se a ocorrência de óleo livre. A amostra retirada deste perfil, correspondente à profundidade entre 1,0 e 1,4 m, para quantificação local de VOCs, apresentou teor de 0 ppm, embora apresentasse odor de solventes. Após esta camada, apresentou um material siltoso até a profundidade de 3,5 m, com porções arenosas, areia de granulação fina e muscovita. As amostras retiradas, correspondentes à profundidade entre 1,8 e 2,2 m e entre 2,6 e 3,0 m, para quantificação local de VOCs, apresentaram também teores de 0 ppm, embora apresentasse odor de solventes. A última retirada do perfil de solo, entre 3,5 e 4,5 m, não pôde ser avaliada, devido à deformação e perda de amostras em função da

umidade. O nível d'água neste ponto encontrava-se a 1,40 m, sendo relativamente baixo para o local, por tratar-se de um período de estiagem (Figura 47).

Figura 47 - Amostras de solo S-01 retiradas em diferentes profundidades

Ponto S-02

Este ponto estava alocado dentro da área de processo, apresentando um contra-piso de maior espessura. O solo nos primeiros 0,40m de profundidade apresentou composição areno-siltosa de coloração marrom. Entre 0,40 m e 0,80 m de profundidade, ele apresentou muscovitas finas com intercalações cinza, areia fina e coloração marrom avermelhada, observando-se já odor de plastificantes e plasticidade do solo. Entre 0,80 e 2,10 m, o solo apresentou um material areno-siltoso, com camadas de muscovitas finas, coloração marrom-avermelhado, forte odor e com aspecto plástico. As amostras retiradas nas profundidades 1,0 a 1,4 m e 2,0 a 2,4 m apresentaram teores de 17 a 37 ppm de voláteis, respectivamente, estando os maiores teores de VOCs na profundidade de 2,0 a 2,4 m, sendo que o nível estático estava a 1,8 m. Após esta camada, o solo apresentou as mesmas características, no entanto de coloração acinzentada até a profundidade de 4,0 m (Figura 48) e teores de compostos voláteis de 2 ppm nas amostras retiradas nas profundidades entre 3,0 e 3,4 m.

Figura 48 - Amostras de solo S-02 retiradas em diferentes profundidades

Ponto S-03

Este ponto estava localizado dentro da bacia de contenção de tanques de estocagem de plastificantes. O solo nos primeiros 0,60 m de profundidade apresentou um material silto-arenoso com matéria orgânica e de coloração preta. Entre 0,60 e 2,80 m, encontrou-se um material silto-arenoso ocre, ainda com matéria orgânica, forte odor e coloração predominante preta. As amostras retiradas nas profundidades de 1,7 a 2,1 m apresentaram teores de 42 ppm de VOC, sendo que o nível estático estava a 1,40 m. Após 2,80 m de profundidade, foi verificada uma camada silto-arenosa, areia de granulometria fina, micácea e de coloração acinzentada a preta até o final da sondagem. As amostras retiradas nas profundidades entre 2,8 a 3,2 m, entre 4,0 a 4,4 m e entre 5,0 a 5,4 m apresentaram teores de 6 ppm, 1 ppm e 2 ppm de compostos voláteis, respectivamente (Figura 49).

Figura 49 - Amostras de solo S-03 retiradas em diferentes profundidades

Ponto S-04

O solo até 1,20 m de profundidade é composto por uma camada silto-arenosa, micácea, marrom, homogênea, forte odor. As amostras retiradas entre 1,0 e 1,4 m apresentaram teores de 157 ppm de compostos voláteis. Entre 1,20 e 5,50 m, constatou-se a presença de um material silto-arenoso, semelhante ao anterior, porém de coloração acinzentada e plastificado. As amostras relativas à profundidade entre 3,0 e 3,4 m apresentaram teores de VOC de 227 ppm. Já as relativas à profundidade entre 5,0 e 5,4 m apresentaram teores de compostos voláteis de 17 ppm (Figura 50).

Figura 50 - Amostras de solo S-04 retiradas em diferentes profundidades

Ponto S-05

O solo até 1,5 m de profundidade apresentou composição silto-arenosa, areia fina com frações argilosas, de coloração marrom escura e manchas pretas; a amostra relativa à profundidade entre 1,0 e 1,4 m apresentou teores de compostos voláteis de 43 ppm, sendo que o nível estático estava a 1,5 m. Entre 1,50 e 5,0 m, notou-se composição de material semelhante, porém de coloração acinzentada a preta com muscovitas. Os teores de VOC nas profundidades entre 3,0 e 3,4 m, entre 4,0 e 4,4 m e entre 5,0 e 5,4 m foram 43 ppm, 67 ppm e 60ppm, respectivamente, estando os maiores teores na profundidade de 4,0 m (Figura 51).

Figura 51 - Amostras de solo S-05 retiradas em diferentes profundidades

Ponto S-06

O solo apresentou estrutura homogênea até 5,5 m, composto por material silte-arenoso, areia fina, micáceo, de coloração marrom e com intercalações centimétricas acinzentadas. A partir dos 3,50 m de profundidade, o material apresentava-se bastante plastificado. Os teores de compostos voláteis em profundidades entre 1,0 a 1,4 m, entre 2,0 a 2,4 m, entre 3,0 a 3,4 m, entre 4,0 a 4,4 m foram 44 ppm, 19 ppm, 35ppm e 30 ppm, respectivamente, estando os maiores teores entre 1,0 a 4,0 m. O nível estático estava a 0,9 m (Figura 52).

Figura 52 - Amostras de solo S-06 retiradas de diferentes profundidades

Ponto S-07

O solo apresentou até os 2,50 m de profundidade um material silto-arenoso, areia de granulação fina, marrom escura, com intercalações avermelhadas. A amostra relativa à profundidade entre 1,5 e 1,9 m apresentou teor de compostos voláteis de 7 ppm, sendo que o nível estático estava a 1,1 m. A partir de 2,0 m, o solo apresentou óleo de coloração preto escuro aderido. Entre 2,5 e 5,5 m, notou-se uma camada silto-arenosa, areia fina a média, de coloração esbranquiçada. As amostras retiradas nas profundidades de 2,5 a 2,9 m e de 3,5 a 3,9 m apresentaram teores de 4 e 3 ppm de VOC, respectivamente, estando os maiores teores situados nas profundidades entre 1,5 e 1,9 m (Figura 53).

Figura 53 - Amostras de solo S-07 retiradas em diferentes profundidades

Ponto S-08

Até 1,20 m, o solo apresentou um material arenoso, com porções siltosas, de intercalações milimétricas de areia fina a média e de coloração esbranquiçada. Entre 1,20 e 2,00 m, constatou-se composição semelhante à camada anterior, porém bastante plastificado. Neste ponto, a sondagem foi interrompida a 2,00 m, tendo-se encontrado rocha. As amostras retiradas nas profundidades de 1,0 a 1,4 m e de 1,5 a 1,9 m apresentaram teores de 4 e 3 ppm de VOC, respectivamente, sendo que o nível estático estava a 1,3 m (Figura 54).

Figura 54 - Amostras de solo S-08 retiradas em diferentes profundidades

Ponto S-09

O solo é composto por um material silto-arenoso, areia de granulometria fina, micáceo e de coloração acinzentada, com aumento da plasticidade a partir de 3,50 m. Já a partir de 0,6 m de profundidade, observou-se óleo de coloração preta. Este ponto estava locado próximo à caixa separadora de óleo da bacia de contenção, citada na descrição do ponto S-03. Os teores de VOC em profundidades entre 2,0 a 2,4 m, entre 3,0 a 3,4 m, entre 5,0 a 5,9 m foram 50 ppm, 5 ppm e 2 ppm, respectivamente, estando os maiores teores entre 2,0 a 2,4 m; sendo que o nível estático estava a 0,8 m (Figura 55).

Figura 55 - Amostras de solo S-09 retiradas em diferentes profundidades

Ponto S-10

O solo apresentou composição areno-siltosa, areia fina, acinzentada e bastante plástica até 2,50 m de profundidade. Entre 2,50 e 5,50 m, o solo era composto por um material arenoso, areia fina plastificada, de coloração marrom, com muscovita fina e com intercalações centimétricas pretas, provavelmente de óleo. Os teores de compostos voláteis em profundidades entre 2,0 a 2,4 m, entre 4,0 a 4,4 m, entre 5,0 a 5,4 m foram de 100 ppm, 71 ppm e 57 ppm, respectivamente, estando os maiores teores entre 2,0 a 2,4 m; sendo que o nível estático estava a 1,0 m (Figura 56).

Figura 56 - Amostras de solo S-10 retiradas em diferentes profundidades

A composição do solo da área de plastificantes apresentou-se bastante variável nos 10 pontos amostrados e entre os horizontes em cada ponto, demonstrando tratar-se de um aterro com diferentes origens. De maneira geral, pôde-se identificar seis grupos de composição do solo:

- Areno-argiloso marrom avermelhado;
- Areno-argiloso acinzentado;
- Silto-arenoso ocre;
- Silto-arenoso marrom micáceo;
- Silto-arenoso acinzentado e
- Silto-arenoso marrom avermelhado.

Verificando-se os teores de VOC nos diversos horizontes, observa-se que os maiores teores encontram-se próximos a 2,0 m de profundidade na área de plastificantes, exceto para o ponto S-04, onde o maior teor esteve em 3,0 m. O nível estático variou de 0,8 a 1,8 m.

Quantificação de compostos semi-voláteis

Os resultados das análises para determinação dos teores de compostos semi-voláteis na área de plastificantes, estão mostrados detalhadamente no anexo 6.1.

Verificando-se os resultados apresentados para os diferentes horizontes no solo, observa-se que os maiores teores dos contaminantes-alvo estão entre 2,0 e 3,5 m de profundidade nos pontos S-01 (DIDP 5mg/kg), S-02 (DEHP 37mg/kg), S-03 (DEHP 5mg/kg), S-05 (DEHP 5874mg/kg), S-07 (DBP 1mg/kg) e S-10 (DEHP 658mg/kg); entre 1,0 e 2,0 m nos pontos S-04 (DEHP 5640mg/kg), S-06 (DEHP 5744mg/kg) e S-08 (DEHP 314mg/kg); e entre 5,0 e 6,0 m para o ponto S-09 (DEHP 863mg/kg).

Densidade Total e porosidade

As amostras dos pontos S-01, S-03, S-04 e S-07, coletadas até 1,0m de profundidade, e as do ponto S-06, retiradas até 1,30 m, apresentaram porosidade variando de 40,7% a 42,7%; de 46,2% a 51,9%; de 41,7% a 45,9% ; de 40,9% a 43,2% e de 43,5% a 49,5%, respectivamente. Estes valores estão dentro da faixa esperada para solos tropicais com porosidade acima de 40% (Fassbender,1975). Já as amostras dos pontos S-08, S-09, S-10, também coletadas até 1,0 m de profundidade, e as relativas ao ponto S-05, retiradas a 0,50 m de profundidade, indicaram porosidades mais baixas, variando de 30,8% a 38,1%; de 34,2% a 35,4%; de 30,5% a 39,1% e de 35,0% a 36,0%, respectivamente. As amostras indeformadas do Ponto S-02 foram desconsideradas, pois o material contido nos anéis não estava íntegro, ocorrendo a perda de massa durante a amostragem. Considerando os valores encontrados para o ponto S-10 nos Ensaios Preliminares, a 0,60 m profundidade (20,95% a 21,8%), observa-se que a porosidade aumentou a 1 m de profundidade neste ponto, contrariamente ao decréscimo esperado em função do aumento da profundidade para solos compactados (BRADY,1983), sendo que este decréscimo também não foi observado nas profundidades de 0,50 a 1,50 m nos demais pontos.

As amostras coletadas nos diversos pontos de amostragem apresentaram densidades acima de $1,5 \text{ g/cm}^3$, sendo os menores resultados encontrados nos pontos S-03 e S06, correspondentes a $1,27 \text{ g/cm}^3$ e $1,34 \text{ g/cm}^3$, respectivamente (Tabela 73).

Tabela 73- Densidade e porosidade das amostras de solo nos diferentes pontos de amostragem

Amostra		AI	Densidade	Porosidade
		cm	(g/cm ³)	(%)
S1	1	50	1,57	40,67
	2	50	1,52	42,51
	3	100	1,52	42,70
S3	1	60	1,27	51,89
	2	80	1,40	47,18
	3	90	1,43	46,19
S4	1	50	1,55	41,66
	2	70	1,43	45,87
S5	1	150	1,70	36,02
	2	150	1,72	35,01
S6	1	80	1,34	49,54
	2	130	1,50	43,47
S7	1	50	1,54	41,74
	2	70	1,51	43,17
	3	90	1,57	40,85
S8	1	80	1,83	30,79
	2	100	1,64	38,14
S9	1	60	1,74	34,16
	2	90	1,71	35,44
S10	1	60	1,73	34,53
	2	80	1,84	30,51
	3	100	1,61	39,14

Nota: 1, 2 e 3 – Amostras retiradas em diferentes profundidades AI

4.4. ENSAIO DE BIORREMEDIAÇÃO “EX-SITU”

4.4.1. MATERIAIS E MÉTODOS

4.4.1.1. Coleta e caracterização do solo para o ensaio de biorremediação

Após os resultados das análises das amostras relativas aos 10 pontos selecionados para a caracterização do solo da área de plastificantes, foram escolhidos 8 pontos para retirada do solo utilizado no ensaio de biorremediação *ex-situ*, sendo dois pontos excluídos devido a impossibilidade da retirada de 110 kg de solo. As retiradas ocorreram em duas semanas distintas, sendo na primeira, coletadas as quantidades de solo relativas aos pontos S-05, S-06, S-07 e S-10 e na segunda, as relativas aos pontos S-01, S-02, S-03 e S-09.

Foram retirados aproximadamente 110 kg de solo de cada ponto, sendo esta quantidade homogeneizada manualmente e segregados 100 kg para o teste de biorremediação. A quantidade restante foi preservada a 4°C e posteriormente, segregada para as caracterizações geotécnicas, mineralógicas e físico-químicas. As amostras relativas à caracterização biológica foram segregadas imediatamente após homogeneização e congeladas.

Caracterização geotécnica, mineralógica e físico-química do solo

As amostras de solo, após homogeneização, foram separadas em triplicatas, nas quantidades equivalentes a 3 kg por ponto de amostragem e enviadas à Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, para a caracterização geotécnica e físico-química do solo contaminado. Foram determinados os parâmetros a seguir descritos, utilizando os métodos do Instituto Agronômico de Campinas (2001) e da Embrapa (1999):

- curva granulométrica: areia grossa, média, fina, total, silte e argila;
- pH (H₂O), pH (CaCl₂) e pH(HCl), Alumínio, Matéria Orgânica, P, N, K, Ca, Mg, soma das bases, T, V e m;
- Ataque sulfúrico para determinação dos teores SiO₂, Al₂O₃, Fe₂O₃, TiO₂, MnO e dos parâmetros Ki e Kr.

Densidade aparente, umidade residual e capacidade de campo

Foram segregadas ainda, quantidades equivalentes a 1 kg de amostras para determinações da densidade aparente, umidade residual e capacidade de campo, de acordo com a Norma CETESB L6.350 (CETESB, 1990), realizadas em triplicatas, nas dependências do laboratório da unidade industrial estudada. Os procedimentos para estas determinações foram descritos no item 4.1.1.2.

Caracterização química do solo

As determinações dos teores de plastificantes presentes nas amostras de solo foram efetuadas por cromatografia gasosa, de acordo com o método 8061A da EPA (EPA, 1996).

Foi efetuada, ainda, varredura com cromatografia gasosa e espectrometria de massa nas amostras do solo da unidade industrial, para identificação de outros compostos orgânicos presentes. A extração destes compostos foi realizada de acordo com o método 3540 da EPA (EPA, 1996) e para tanto, foram utilizados os solventes diclorometano, acetona e hexano, separadamente.

Extração de plastificantes

Foram introduzidos 20 gramas da amostra de solo em um cartucho de extração, com 20g de sulfato de sódio p.a. (anidro), previamente seco a 400 °C, durante 4 horas. O cartucho foi inserido em um extrator Soxhlet, conectado a um condensador e a um balão de 500 mL contendo 150 mL de diclorometano grau HPLC. A extração foi realizada durante 24 horas a 6 ciclos/hora. A amostra foi resfriada a temperatura ambiente e preservada em geladeira. A adição dos compostos utilizados como padrão interno foi realizada após o resfriamento do extrato e foram utilizados o álcool n-hexanol e o plastificante dimetil maleato, sendo adicionado 1mL de cada somente nas amostras utilizadas para quantificação dos plastificantes por cromatografia.

A extração de compostos do solo para análises de varredura seguiu o mesmo procedimento, sendo adicionado, no entanto, 100 mL de acetona e 100 mL de hexano.

Cromatografia gasosa

As determinações dos teores de plastificantes foram realizadas injetando-se 2µL do extrato do solo em um cromatógrafo gasoso CP-3380 da Varian, operando nas condições:

- Injetor: modo *splitless* (sem divisão da amostra), temperatura no injetor 280° C
- gás de arraste: Hélio, vazão 48 mL/min
- Forno: temperatura inicial 40° C, durante 2 minutos, rampa de temperatura 20° C/minuto, temperatura final 300° C.
- Coluna: RTX - 35 Restec (*cross-linked methylsilicone*), com diâmetro interno de 0,32 mm, comprimento de 30 m e espessura do filme de 1,5 µm. Gás de arraste: Hélio, vazão 7,0 mL/min, pressão 30,30 psi (constante), velocidade média 86 cm/s.
- Detector: Detector de ionização de chama (FID), temperatura 300° C, gases empregados (ar comprimido: 300 mL/min e hidrogênio: 15 mL/min), gás make-up Nitrogênio: 30 mL/min

Cromatografia gasosa e Espectrometria de massa

As análises de varredura para identificação dos sub-produtos da biodegradação foram realizadas por cromatógrafo GC-17A da Shimadzu, acoplado a espectrômetro de massa ShimadzuMassa GCMS-QP5050 A, que operava nas seguintes condições:

- Injetor: modo “split”, temperatura no injetor 280 °C.
- gás de arraste: Hélio, vazão de 30 mL/min.
- Forno: temperatura inicial 60° C durante 1 minuto, rampa de temperatura de 5 °C/minuto, temperatura final de 280° C, tempo total de 65 minutos.
- Coluna: ZB5 (5% *phenyl*-95% *dimethylpolysiloxane*), diâmetro interno de 0,25 mm, comprimento de 30 m e espessura do filme de 0,25µm. Gás de arraste: Hélio, vazão 4,9 mL/min, pressão 250kpa (constante), velocidade linear de 81 cm/s.

Determinação de Carbono Orgânico, Nitrogênio e Fósforo Totais das amostras de solo

Os parâmetros Carbono Orgânico e Nitrogênio Total foram também determinados por análise elementar e o Fósforo Total, por espectrometria de emissão atômica com plasma induzido ICP-AES, no Instituto de Química da USP.

As determinações dos parâmetros Carbono Orgânico Total e Nitrogênio Total no solo foram efetuadas utilizando o equipamento Elementar Analyzer 2400 da Perkin Elmer. A Análise Elementar consiste na oxidação completa da amostra de massa conhecida do material orgânico ou inorgânico, sob oxigênio puro, formando gases de combustão (CO_2 , H_2O , NO_2 , N_2O_2). A mistura desses gases passa sobre um tubo que contém cobre metálico, que reduz os óxidos nitrosos em N_2 . A mistura resultante (CO_2 , H_2O , N_2) é direcionada para uma coluna cromatográfica, onde os compostos são separados em carbono, nitrogênio e hidrogênio e os elementos determinados através de um Detector de Condutividade Térmica.

O parâmetro Fósforo Total foi determinado espectrometria de emissão atômica com plasma induzido - ICP-AES, utilizando o equipamento Gênesis SOP. O procedimento para a determinação analítica consistiu na homogeneização prévia de 1g da amostra em almofariz de ágata, sendo adicionados 10 mL de ácido nítrico concentrado e levado a aquecimento sob refluxo a 100 °C (utilizando balão de 100mL e condensador) durante 3 horas. Posteriormente, foram adicionados 4,0 mL de peróxido de hidrogênio (30% volume) e levados a aquecimento por 1 hora. Após resfriamento, a solução foi filtrada e coletada em balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com água desionizada Milli-Q, sendo posteriormente levada a leitura no ICP-AES.

4.4.1.2. Coleta e caracterização do inóculo utilizado no teste de biorremediação

O inóculo utilizado no teste de biorremediação foi o lodo da estação de tratamento de águas residuárias da unidade industrial de plastificantes. Ele foi coletado em duas semanas consecutivas. Na noite anterior a cada coleta, foi suspenso o descarte de lodo do decantador secundário para possibilitar sua concentração. O inóculo foi retirado na manhã seguinte, na saída da bomba de descarte e retorno de lodo ao tanque de aeração. O lodo coletado na primeira semana, denominado de Lodo L1, foi retirado em 3 bombonas de 50 litros cada, no dia da montagem das betoneiras B5 a B8. Já, o inóculo

retirado na segunda semana foi denominado Lodo L2 e coletado em 3 bombonas de 50 litros cada, no dia da montagem das betoneiras B1 a B4. As coletas das amostras para caracterização do inóculo foram efetuadas em frascos de vidros de 100 mL, correspondentes a cada bombona de lodo, sendo posteriormente preservadas a temperatura de 4°C, até a realização das determinações analíticas em triplicatas. As amostras relativas à caracterização microbiológica foram imediatamente congeladas.

Nas amostras de lodo, foram determinados os parâmetros pH e temperatura imediatamente após a coleta, Sólidos Totais e Sólidos em Suspensão Voláteis, DQO e Nitrogênio Total Kjehldal, conforme os procedimentos descritos no APHA, AWWA, WEF (1998).

Os parâmetros Carbono Orgânico e Nitrogênio Totais foram determinados por análise elementar e o Fósforo Total, por espectrometria de emissão atômica com plasma induzido ICP-AES no Instituto de Química da USP, conforme descrito no item 4.4.1.1.

As determinações das concentrações de plastificantes presentes nas amostras do lodo foram efetuadas de acordo com o método 8061A da EPA (EPA, 1996), conforme descrito no item 4.4.1.1.

Foram efetuadas, ainda, análises de varredura nas amostras do lodo da unidade industrial, para identificação de outros compostos possivelmente presentes por cromatografia gasosa seguida de espectrometria de massa. A extração dos compostos presentes foi realizada de acordo com o método 3540 da EPA e para tanto, foram utilizados os solventes diclorometano, acetona e hexano separadamente, conforme descrito no item 4.4.1.1.

4.4.1.5. Caracterização molecular da microbiota do solo e inóculo

No tratamento *ex-situ*, não foi utilizada a contagem de bactérias heterotróficas como indicador microbiológico no solo e lodo. Optou-se por utilizar a biologia molecular, através da técnica de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), para

verificação da diversidade genética das populações bacterianas denominadas indígenas, presentes no solo, bem como daquelas denominadas exógenas, presentes no lodo.

Protocolo Extração de DNA Genômico

A extração do DNA genômico seguiu as instruções do fabricante do kit *FastDNA® SPIN kit for Soil* (QBiogene, USA).

Alíquotas de 0,5 g das amostras de solo foram inseridas nos Tubos *Lysing Matrix E*, onde e adicionados 978 µL de tampão fosfato de sódio e 122 µL de tampão MTe, sendo agitados em *Bead beater*, com ciclo de 40 segundos a 3800 rpm. Estes tubos foram centrifugados a 13200 rpm por 30 segundos e os sobrenadantes, transferidos para novos tubos de 1,5 mL. A seguir, foram adicionados 250 µL do reagente PPS e os tubos foram invertidos manualmente por 10 vezes e centrifugados a 13200 rpm por 3 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos de 2 mL, onde foram adicionados 1 mL da suspensão de matriz de ligação (*Binding Matrix Suspension*) e homogeneizados por inversão por 2 minutos. Os tubos foram mantidos em repouso por 5 minutos, para decantação da matriz de sílica ou até o sobrenadante ficar translúcido. A seguir, foram descartados 500 µL do sobrenadante e a matriz, misturada ao restante do sobrenadante que permaneceu nos tubos. Foram transferidos 600 µL desta mistura para colunas com filtro (*SPINTM Filter*) e centrifugados a 13200 rpm por 1 minuto. O tubo coletor das colunas com filtro foi esvaziado e adicionada a mistura novamente ao filtro e centrifugado, repetindo esta operação até o término da mistura. Posteriormente, 500 µL do reagente *SEWS-M* foram adicionados às colunas e centrifugados a 13200 rpm por 1 minuto. Após serem esvaziados os tubos coletores, os filtros foram centrifugados por mais 2 minutos para secagem da matriz. Os filtros foram transferidos para novos tubos coletores e mantidos à temperatura ambiente por 5 minutos para secagem da matriz. O DNA foi eluído através da adição de 50 µL de DES (água livre de Dnase e pirogênio) à matriz dos filtros. Estes foram centrifugado a 13200 rpm por 2 minutos e o DNA eluído foi preservado a -20 °C.

PCR do gene RNAr 16S

O DNA da comunidade microbiana total das amostras de lodo e solo foi amplificado com os primers 968-GC (5'-gc *clamp*- AAC GCG AAG AAC CTT AC -3') e 1401r (5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG- 3') em uma reação de PCR (volume final de 40 µL) contendo 100 ng de DNA, 0,2 µM de cada *primer*, 200 µL de desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs), 1,5 mM de MgCl₂, 5 µL de tampão de reação 10X, e 2 U de Taq polimerase (Invitrogen). A estratégia de PCR “*touchdown*” foi utilizada com o objetivo de aumentar a especificidade da amplificação e reduzir a formação de falsos produtos de PCR. O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, e 10 ciclos “*touchdown*” de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 58 °C (com decréscimo de 0,5 °C por ciclo) por 30 segundos, e extensão a 72 °C por 2 minutos, seguido de 25 ciclos de 94°C por 1 minuto, 53 °C por 30 segundos, 72 °C por 2 minutos. Extensão final de 72 °C por 2 minutos. A qualidade do produto de amplificação foi verificada em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL).

Os produtos de PCR da comunidade total foram analisados por *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE), utilizando o Bio-RadCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad) e o procedimento efetuado conforme o manual do fabricante.

DGGE

As amostras de PCR (180 a 300 ng de DNA amplificado adicionadas a um volume de 10 µL de Tampão de amostra 2X, foram aplicadas diretamente em gel de poliacrilamida 6%, com gradiente desnaturante de uréia/formamida de 35-65%, e submetidas à eletroforese a 60 °C, por 14 horas a 50 V. Em seguida, o gel foi corado com *SYBR Green I* (*Molecular Probes*) por 2 h no escuro, observado em luz ultravioleta e fotodocumentado utilizando o sistema *EpiChemi 3 Darkroom* (UVP, *Biolmaging System*).

4.4.1.5. Tratamento “ex-situ”

Os estudos em escala piloto foram conduzidos utilizando-se a técnica da biorremediação com reatores aeróbios em fase de lama (*slurry phase*). Para tanto, foram utilizadas 08 betoneiras, como reatores aeróbios, sendo que a aeração do meio foi garantida e controlada por temporização automática da rotação destes equipamentos: as betoneiras permaneceram 15 minutos ligadas e 45 minutos desligadas, através de controle lógico programável. As características das betoneiras são apresentadas na Figura 57.

Figura 57 – Desenho construtivo das betoneiras utilizadas no ensaio de biorremediação *ex-situ*

A preparação do solo a ser biorremediado constou apenas de homogeneização manual, sendo introduzido na betoneira na umidade e pH original de campo.

Os trabalhos operacionais de preparação do solo e biorremediação foram realizados na Unidade de plastificantes estudada, sendo selecionada uma área correspondente a 75 m² (Largura 5m x Comprimento 15m), com cobertura e fechamento lateral.

A biorremediação do solo contaminado com resíduos da produção de plastificantes ocorreu pela utilização de microrganismos indígenas e exógenos adaptados, através da adição de inóculo, em quantidades variando de 6 a 11 gSSV/kg de solo seco. Não foram adicionados co-substratos ou água no início da operação dos sistemas, sendo introduzido apenas o fósforo como nutriente. Estes ensaios foram conduzidos conforme resultados dos Ensaio Preliminares e Confirmatórios e não tinham por objetivo avaliar outros mecanismos de remoção dos plastificantes, não sendo portanto, montadas betoneiras de controle. Os tratamentos foram iniciados em duas semanas subsequentes.

Na primeira, foram montadas as betoneiras denominadas de alto teor de contaminantes, de acordo com a caracterização inicial do solo da área de plastificantes. As betoneiras foram identificadas como B5, B6, B7 e B8 e foram utilizados os solos relativos aos pontos S-05, S-06, S-07 e S10, respectivamente. Foram adicionados: 100 kg solo, 15 litros de lodo L1 e 100 mL de solução de $50 \text{ gKH}_2\text{PO}_4/\text{L}$. Na segunda, foram montadas as betoneiras denominadas de baixo teor de contaminantes, que foram identificadas como B1, B2, B3 e B4 e foram utilizados os solos relativos aos pontos S-01, S-02, S-03 e S-09, respectivamente. Foram adicionados: 100 kg solo, 15 litros de lodo L2 e 100 mL de solução de $50 \text{ gKH}_2\text{PO}_4/\text{L}$. A Figura 58 ilustra um exemplo da plastificação do solo utilizado nas betoneiras.

Figura 58 - Solo S-02 utilizado na betoneira B2

Após 16 dias, foram iniciadas adições semanais de água industrial às betoneiras, objetivando manter a umidade do solo entre 40% e 50%. A quantidade adicionada variou de 6 a 15 litros em cada betoneira, em função da temperatura ambiente e das umidades determinadas semanalmente. Após 25 dias do início do processo, o motor da betoneira B6 queimou, sendo trocado após 5 dias e o processo reiniciado com a adição de 15 litros de inóculo (denominado Lodo L3).

4.4.1.5. Monitoramento do processo de biorremediação

Após o início da operação da instalação piloto, foram retiradas amostras quinzenais do solo nas betoneiras para monitoramento dos seguintes parâmetros: teores de plastificantes, pH, umidade e temperatura. Foram também coletadas amostras mensais para a varredura de compostos orgânicos e determinação das características microbiológicas. Amostras no início e no final da operação da instalação piloto foram retiradas para determinação do teor de carbono orgânico total e nutrientes.

- **Teores de plastificantes**

As determinações dos teores de plastificantes foram realizadas conforme metodologia analítica descrita no item 4.4.1.1., em triplicatas.

- **Análises de varredura**

As análises de varredura foram realizadas por cromatografia gasosa e espectrometria de massa, conforme metodologia analítica descrita no item 4.4.1.1.

- **pH e umidade**

Estas determinações foram realizadas conforme Norma CETESB L6.350 (CETESB, 1990), em triplicatas, conforme descrito no item 4.1.1.2.

- **Carbono e nutrientes**

As determinações de Carbono Orgânico, Nitrogênio e Fósforo Totais foram realizadas conforme procedimento descrito no item 4.4.1.1., em triplicatas.

- **Monitoramento biológico**

No monitoramento do tratamento *ex-situ*, utilizou-se a técnica de DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*), para verificação das alterações da estrutura das populações bacterianas durante o processo de biorremediação, conforme procedimento descrito no item 4.4.1.3. Utilizando um mesmo gel, composto por 12 canaletas, foram aplicadas em cada canaleta, as amostras em triplicatas das lamas relativas ao tempo inicial, 30 dias, 60 dias e 100 dias de processo por betoneira. Foram ainda aplicadas em

um mesmo gel de DGGE, as amostras em duplicatas relativas ao solo inicial, lodo utilizado e as amostras das lammas inicial, 30, 60 e 100 dias por betoneira.

4.4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.2.1. Caracterização do solo para o ensaio de biorremediação

Caracterização geotécnica

A Tabela 74 contém a composição granulométrica das amostras de solo nos dez pontos de amostragem. Verifica-se que o solos retirados dos pontos S-01, S-02, S-03, S-06 e S-07 apresentaram classe de textura argilosa; já os solos retirados dos pontos S-05, S-09 e S-10 apresentaram classe de textura média argilosa; no entanto, os pontos S-05 e S-10 apresentaram textura média arenosa em uma das triplicatas.

Tabela 74 – Composição granulométrica das amostras de solo nos diferentes pontos de amostragem

Ánalse Granulométrica - Solo Inicial						
Ponto profundidade retirada das amostras	Areia %			Silte %	Argila %	Classe de Textura
	Grossa	Fina	Total			
S-01 0,5 a 1,3 m	8,00	41,00	49,00	12,00	39,00	argilosa
	8,00	35,00	43,00	19,00	38,00	argilosa
	8,00	36,00	44,00	14,00	42,00	argilosa
S-02 1,2 a 2,1 m	5,00	37,00	42,00	10,00	48,00	argilosa
	5,00	35,00	40,00	14,00	46,00	argilosa
	6,00	34,00	40,00	14,00	46,00	argilosa
S-03 1,0 a 2,3 m	5,00	37,00	42,00	8,00	50,00	argilosa
	5,00	31,00	36,00	8,00	56,00	argilosa
	5,00	35,00	40,00	8,00	52,00	argilosa
S-09 0,4 a 0,6 m	8,00	51,00	59,00	10,00	31,00	md argilosa
	8,00	50,00	58,00	10,00	32,00	md argilosa
	8,00	52,00	60,00	8,00	32,00	md argilosa
S-05 1,4 a 2,2 m	11,00	59,00	70,00	6,00	24,00	md arenosa
	10,00	58,00	68,00	4,00	28,00	md argilosa
	10,00	58,00	68,00	4,00	28,00	md argilosa
S-06 1,0 a 2,0 m	10,00	43,00	53,00	18,00	29,00	md argilosa
	10,00	41,00	51,00	16,00	33,00	md argilosa
	10,00	39,00	49,00	13,00	38,00	argilosa
S-07 1,0 a 2,6m	8,00	46,00	54,00	8,00	38,00	argilosa
	7,00	43,00	50,00	8,00	42,00	argilosa
	8,00	41,00	49,00	9,00	42,00	argilosa
S-10 1,0 a 2,0 m	12,00	56,00	68,00	8,00	24,00	md arenosa
	13,00	53,00	66,00	8,00	26,00	md argilosa
	13,00	55,00	68,00	4,00	28,00	md argilosa

Determinação dos parâmetros físico-químicos

O solo inicial do ponto S-01 apresentou os valores mais elevados de pH relativamente aos demais pontos, estando o pH em água na faixa de 8,30-8,50, já os valores de pH em água dos pontos S-02, S-07 e S-09 estavam na faixa de 7,10 -7,40; 7,00 e 7,37-7,40 respectivamente, enquanto os dos pontos S-03, S-05, S-06 e S-10 estavam na faixa de 5,70; 5,80; 6,0 e 5,50-5,60.

Os resultados para pH em CaCl_2 e pH em KCl de todas as amostras foram próximos entre si e ambos abaixo dos respectivos valores de pH em água, indicando carga líquida negativa em todas as amostras de solo (Fassbender, 1975).

Os teores de matéria orgânica das amostras de solo, expressos em Carbono Orgânico Total, variaram entre 0,6% (solo ponto S-01) e 1,2% (solo ponto S-05). Fassbender (1975) compilou dados de teor de carbono orgânico de 91 amostras de solo do Brasil, obtidos por diferentes autores, e concluiu que deste total, 50% apresentavam valores entre 0,5% e 2,0%; somente 10% ultrapassavam 4% e 5% estavam abaixo de 0,5%.

Os teores de fósforo total de todas as amostras estiveram entre 1 e 7 mg/kg, sendo a única exceção o solo do ponto S-05, que apresentou o maior valor (93 mg/kg). O menor teor de nitrogênio total foi de 215 mg/kg, obtido na amostra de solo do ponto S-05 e o maior, 418 mg/kg para o S-06. Já os teores de micronutrientes (K, Ca, Mg) variaram entre 1,8 mmol/kg no ponto S-07 e 4,4 mmol/kg no S-01 para o potássio; 8,0 mmol/kg no S-02 e 58 mmol/kg no S-01 para o cálcio e entre 1,0 mmol/kg no S-07 e 5,0 mmol/kg no S-01 para o magnésio. Os maiores teores de micronutrientes foram encontrados no ponto S-01 (Tabelas 75 e 76).

Considerando as relações C/N e C/P recomendadas pela CETESB para biodegradação de compostos orgânicos no solo, todos os pontos apresentam relação carbono:nitrogênio abaixo de 60:1, não sendo necessária a adição deste nutriente, no entanto a relação carbono/fósforo está acima de 700:1 para todos os pontos, com exceção do S-05, sendo necessária a adição deste nutriente para a manutenção da atividade dos microrganismos indígenas e a biodegradação dos contaminantes nestas condições .

Tabela 75 - Valores de pH, matéria orgânica, carbono orgânico, fósforo e nitrogênio totais das amostras de solo utilizadas no ensaio de biorremediação

Solo	pH			MO g/kg	C* %	P mg/kg	Ntotal mg/kg
	H ₂ O	CaCl ₂	KCl				
S-01	8,3	7,4	7,5	10	0,58	7	276
	8,4	7,0	7,5	9	0,52	7	282
	8,5	7,1	7,5	10	0,58	7	269
S-02	7,4	6,5	6,5	11	0,64	1	230
	7,1	6,4	6,6	12	0,70	1	224
	7,2	6,4	6,5	12	0,70	1	236
S-03	5,7	5,3	5,3	17	0,99	1	398
	5,7	5,2	5,3	17	0,99	1	406
	5,7	5,2	5,3	18	1,04	1	418
S-09	7,4	6,7	6,7	12	0,70	3	298
	7,4	6,4	6,6	12	0,70	1	301
	7,3	6,6	6,6	12	0,70	3	294
S-05	5,8	5,6	5,6	20	1,16	93	217
	5,8	5,6	5,6	20	1,16	79	221
	5,8	5,5	5,6	22	1,28	81	215
S-06	6,0	5,6	5,7	20	1,16	4	242
	6,0	5,7	5,7	20	1,16	2	236
	6,0	5,5	5,7	20	1,16	4	239
S-07	7,0	6,1	*	14	0,81	6	312
	7,0	6,1	6,2	14	0,81	5	306
	7,0	6,0	6,2	15	0,87	6	301
S-10	5,6	5,4	5,3	17	0,99	2	280
	5,5	5,4	5,3	17	0,99	1	274
	5,5	5,3	5,3	18	1,04	1	283

* amostra não considerada

Tabela 76 – Teores de micronutrientes e parâmetros geoquímicos das amostras de solo utilizadas no ensaio de biorremediação

Amostra (Profundidade retirada)	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	T	V	m
	mmol/kg							%	
S-01 0,5 a 1,3 m	3,5	58	5	0	2	66,5	68,5	97	0
	4,3	57	3	0	2	64,3	66,3	97	0
	4,4	57	3	0	2	64,4	66,4	97	0
S-02 1,2 a 2,1 m	2,4	8	3	0	5	13,4	18,4	73	0
	3	8	2	0	5	13,0	18,0	72	0
	3,3	8	2	0	8	13,3	21,3	62	0
S-03 1,0 a 2,3 m	1,8	21	2	0	26	24,8	50,8	49	0
	2,1	18	1	0	26	21,1	47,1	45	0
	2,4	18	1	0	28	21,4	49,4	43	0
S-09 0,4 a 0,6 m	2,5	35	3	0	5	40,5	45,5	89	0
	3,1	24	2	0	5	29,1	34,1	85	0
	3,2	24	2	0	5	29,2	34,2	85	0
S-05 1,4 a 2,2 m	1,9	31	2	0	13	34,9	47,9	73	0
	1,9	30	1	0	13	32,9	45,9	72	0
	2,0	30	1	0	14	33,0	47,0	70	0
S-06 1,0 a 2,0 m	2,4	24	2	0	17	28,4	45,4	63	0
	2,6	25	1	0	17	28,6	45,6	63	0
	2,8	25	1	0	17	28,8	45,8	63	0
S-07 1,0 a 2,6 m	1,5	30	2	0	13	33,5	46,5	72	0
	1,7	26	1	0	13	28,7	41,7	69	0
	1,9	26	1	0	13	28,9	41,9	69	0
S-10 1,0 a 2,0 m	2,1	25	1	0	9	28,1	37,1	76	0
	1,7	23	1	0	9	25,7	34,7	74	0
	2,0	23	1	0	9	26,0	35,0	74	0

Verificando os teores de minerais na amostras de solo dos pontos S-01 a S-10 (Tabela 77), observa-se que os maiores percentuais de óxidos encontrados em todos os pontos de amostragem foram de Al_2O_3 , sendo o menor valor de 9,35% no ponto S-05 e o maior, de 17,64% no ponto S-02.

Os teores de ferro variaram de 6,99% no ponto S-07 a 9,97% no ponto S-02. Os pontos S-05 e S-10, no entanto, apresentaram baixos teores (1,29% a 1,41% e 1,79% a 1,97%, respectivamente). Verificando as análises granulométricas, estes dois pontos

apresentaram composição média arenosa em uma das triplicatas e coloração acinzentada, sendo que todos os demais apresentaram composição argilosa (S-09 média argilosa) e coloração marrom.

Os parâmetros Ki e Kr referem-se ao grau de intemperismo do solo. Em todos os pontos, os valores de Ki estavam abaixo de 1,8, demonstrando o domínio da gibssita ($\text{Al}(\text{OH})_3$) na fração argila e os valores de Kr, acima de 0,75, demonstrando tratar-se no entanto de solos cauliniticos e não oxídicos (Fassbender, 1975; EMBRAPA, 1999). As relações silte/argila em todos os pontos foram menores que 0,6, com exceção de uma das triplicatas do ponto S-06, que apresentou valor igual a 0,62.

Tabela 77 – Teores de minerais e valores de Ki e Kr das amostras de solo utilizadas no ensaio de biorremediação

Ponto (Profundidade retirada)	Parâmetro						
	SiO ₂ (%)	Al ₂ O ₃ (%)	Fe ₂ O ₃ (%)	TiO ₂ (%)	MnO (%)	Ki	Kr
S-01 0,5 a 1,3 m	10,3	12,21	8,62	0,39	0,02	1,43	0,99
	9,9	12,01	8,69	0,38	0,02	1,4	0,96
	10,1	12,13	8,76	0,38	0,02	1,42	0,97
S-02 1,2 a 2,1 m	13,1	17,26	9,77	0,4	0,02	1,29	0,95
	12,9	17,42	9,97	0,39	0,02	1,26	0,92
	12,5	17,64	9,92	0,41	0,02	1,2	0,89
S-03 1,0 a 2,3 m	10,9	16,31	9,36	0,38	0,02	1,14	0,83
	10,8	16,57	9,55	0,41	0,02	1,11	0,81
	11,2	16,47	9,62	0,41	0,02	1,16	0,84
S-09 0,4 a 0,6 m	9,8	11,58	8,15	0,35	0,02	1,44	0,99
	10,4	12,11	8,44	0,36	0,02	1,46	1,01
	9,9	11,47	8,37	0,37	0,02	1,47	1
S-05 1,4 a 2,2 m	7,4	9,45	1,41	0,27	0,01	1,33	1,22
	7,3	9,77	1,34	0,25	0,01	1,27	1,17
	7,2	9,35	1,29	0,26	0,01	1,31	1,2
S-06 1,0 a 2,0 m	9,9	11,79	8,71	0,37	0,03	1,43	0,97
	10,4	11,9	8,83	0,38	0,03	1,49	1,01
	9,6	11,47	8,6	0,37	0,02	1,42	0,96
S-07 1,0 a 2,6 m	9,6	11,95	7,08	0,36	0,02	1,37	0,99
	9,3	11,74	6,99	0,37	0,02	1,35	0,98
	9,4	11,68	7,1	0,35	0,02	1,37	0,98
S-10 1,0 a 2,0 m	7,1	10,52	1,97	0,26	0,01	1,15	1,02
	7,4	10,62	1,79	0,27	0,01	1,18	1,07
	6,9	10,41	1,91	0,26	0,01	1,13	1,01

Em relação à capacidade de troca catiônica, os maiores valores encontrados foram os relativos ao ponto S-01 (66,63 a 66,85mmol/kg) e os menores, os do S-02 (18,0 a 21,3 mmol/kg). Para os demais pontos, este parâmetro variou de 21,1 a 40,5mmol/kg. No entanto, tanto o ponto S-01 como o S-02 apresentaram os menores teores de matéria orgânica, maiores valores de pH e menores teores de contaminantes. Portanto, a CTC nestes pontos S-01 e S-02 não pode ser atribuída ao teor de matéria orgânica. Os valores de V para todos os pontos foram acima de 50%, caracterizando os solos como eutróficos, com exceção do ponto S-03, que apresentou V abaixo de 50% e portanto, é distrófico. O parâmetro m, que define o caráter álico do solo, ou seja, a saturação das cargas superficiais das argilas por íons Al^{3+} , em todos os pontos, foi igual a zero. Estes valores estão inconsistentes com aqueles encontrados para os valores de K_i , os quais indicaram o domínio da gibssita ($Al(OH)_3$) na fração argila, sendo que esta foi maior que 24% em todos os solos (Fassbender, 1975; EMBRAPA, 1999).

Os parâmetros geotécnicos, utilizados sobretudo para verificações do solo para fins agrícolas, tiveram uma aplicação limitada neste estudo, devido a interferência dos teores de contaminantes presentes no solo. Conforme descrição litológica dos perfis encontrados na caracterização do solo da área de plastificantes, trata-se de um aterro, constituído por materiais de diferentes origens advindos do entorno, não podendo desta maneira ser considerado solo e tampouco receber uma classificação pedológica.

Determinação da umidade residual das amostras de solo coletadas nos pontos S-01 a S-10 utilizadas no ensaio de biorremediação

A Tabela 78 contém os valores de umidade das amostras de solo coletados nos pontos para caracterização da área contaminada.

Tabela 78 - Umidade das amostras de solo utilizadas no ensaio de biorremediação

Ponto de amostragem de Solo	Umidade (%)
S-01	22,39
	21,48
	18,98
S-02	25,68
	26,11
	25,13
S-03	24,95
	25,35
	25,26
S-09	20,21
	18,60
	27,82
S-05	19,54
	20,33
	20,00
S-06	23,01
	23,06
	23,77
S-07	24,97
	25,52
	24,20
S-10	22,41
	21,97
	23,39

Teores de COT, N e P no solo inicial utilizado nos ensaios de biorremediação

Na Tabela 79 estão apresentados os resultados dos teores de COT, N e P das amostras de solo, utilizadas no ensaio de biorremediação, determinados por análise elementar.

Tabela 79 - Teores de COT, N e P no solo inicial, determinados através da análise elementar

Ponto de amostragem	COT mg/kg	N mg/kg	P mg/kg
S-01	8117	2448	222
	9170	2293	193
	8269	1481	189
S-02	6728	269	92
	6496	2707	58
	6545	801	106
S-03	17188	133	33
	17282	134	22
	14852	1873	27
S-09	8146	376	72
	8477	2948	76
	9005	3186	60
S-05	29953	746	166
	30377	879	171
	30000	500	171
S-06	28703	1299	106
	27554	1950	187
	30042	918	159
S-07	15061	1466	170
	13830	1343	112
	14116	264	154
S-10	24357	902	74
	22171	513	79
	27152	1175	56

Conforme os resultados encontrados nas determinações de COT, N e P efetuadas através de análises elementar no solo inicial (Tabela 79), verifica-se, a exemplo dos resultados apresentados utilizando a metodologia Embrapa (Tabela 75), que todos os pontos apresentaram teores elevados de nitrogênio, estando a relação C:N abaixo de 60:1, com exceção de dois resultados das triplicatas do solo S-03. Os resultados dos teores de fósforo também permitiram a relação C:P abaixo de 300:1, com exceção dos pontos S-03 e S-10, sendo no entanto adicionados fósforo em todos os processos na montagem das betoneiras.

4.4.2.2. Caracterização química do solo

A caracterização química do solo está mostrada na Tabela 80.

Tabela 80 – Teores de contaminantes nas amostras de solo utilizadas no ensaio de biorremediação

Compostos	S-01 (mg/kg)		S-02 (mg/kg)		S-03 (mg/kg)		S-09 (mg/kg)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
IBA	26	2	11	2	22	3	49	12
NB	*		*	-	*	-	3	
IA	*		12	1	*	-	*	-
2EH	*		*	-	*	-	1	
IDA	1		27	2	51	-	213	-
DIBP	1	0	27	2	8	0	235	17
DBP	1	0	2	1	8	1	7	1
DIAP	1	0	8	1	11	0	51	4
DOA	*		7		*		3	
DEHP	7	2	144	2	58	8	286	22
DIDP	8	2	120	41	276	12	135	3
Compostos	S-05 (mg/kg)		S-06 (mg/kg)		S-07 (mg/kg)		S-10 (mg/kg)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
IBA	4	3	5	3	80	9	41	4
NB	*	-	2	-	32	3	1	0
IA	3		*	-	15	3	1	0
2EH	195	1	5	1	*		855	23
IDA	2.523	146	1.544	59	*		2.044	179
DIBP	2.921	37	2.114	54	25	11	1.292	40
DBP	164	30	346	19	16	9	599	34
DIAP	754	14	1.004	208	18	1	1.038	75
DOA	47	5	36	9	*	-	35	5
DEHP	3.067	196	2.062	99	988	66	1.458	142
DIDP	2.371	217	1.300	102	1.016	53	1.800	193

Nota: DP – desvio padrão * Não detectado

Verificando os resultados dos teores de álcoois e plastificantes presentes no solo da Unidade Industrial, observa-se que dentre os plastificantes investigados, o DOA foi o único que não foi identificado em todos os pontos e entre os álcoois, o isobutanol.

Os pontos S-01, S-02, S-03 e S-04 foram denominados pontos de baixos teores de contaminantes, apresentaram textura argilosa e menor fase livre. Os pontos S-05, S-06, S-07 e S-10 foram denominados pontos de altos teores de contaminantes e apresentaram

maior fase livre, no entanto os pontos S-05 e S-10, onde foram encontrados os mais elevados teores de contaminantes, apresentaram textura média arenosa a média argilosa, podendo esta característica ter facilitado a extração dos compostos na determinação analítica, o que explicaria os maiores teores obtidos.

Na caracterização química do solo de uma área contaminada por compostos hidrofóbicos, deve-se levar em consideração as características geotécnicas do solo, principalmente em locais de aterro, pois estas diferem entre os pontos de amostragem e ao longo da profundidade. Esta caracterização será determinante para possibilitar uma apropriada seleção da técnica de remediação a ser adotada.

4.4.2.3 . Caracterização físico-química do lodo

Foram coletados os dados relativos ao monitoramento do tanque de aeração da estação de tratamento de águas residuárias, durante os 30 dias antecedentes à montagem das betoneiras (Tabela 81).

Tabela 81 – Dados do monitoramento mensal do tanque de aeração da estação de tratamento de águas residuárias

Data	DQO	DBO	MSH	SST	SSV	Fenóis
3/9/2007	4080			1616	1076	
4/9/2007	3880		117			0,328
5/9/2007	4860	3203				
6/9/2007	3520			1677	1484	
10/9/2007	2040			1723	1501	
11/9/2007	2500		139			0,463
12/9/2007	2680	1848				
13/9/2007	2540			2260	2076	
14/9/2007	6000					
17/9/2007	4780			1340	1253	
18/9/2007	3480		63			0,307
19/9/2007	2740	1762				
20/9/2007	2300			1776	1719	
21/9/2007	3760					
24/9/2007	8380					
24/9/2007	2140		118			0,288
26/9/2007	4060					
27/9/2007	8120			1888	1684	
28/9/2007	5760					
1/10/2007	4860			1770	1558	
3/10/2007	2940	1885				
4/10/2007	3180			1921	1622	
5/9/2007	11460					
8/10/2007	4460					
9/10/2007	4160					0,188
10/10/2007	4320	2720				
11/10/2007	2800			1621	1540	

As concentrações relativas aos parâmetros analisados apresentaram variações significativas durante o período. Observa-se que os picos de DQO encontrados estão acima daqueles verificados nos ensaios anteriores, no entanto, a variação de SSV, 1076mg/L a 2076mg/L, demonstrou novamente a adaptação dos microrganismos presentes no lodo a estes choques de carga, em consequência do alto tempo de detenção celular no sistema (80 dias).

A caracterização físico-química dos lodos utilizados na montagem das betoneiras estão na Tabela 82, 83 e 84.

Tabela 82 – Características físico-químicas do Lodo L1

Parâmetro	Temp. °C	pH	Densidade (g/cm ³)	SST mg/L	SSV mg/L
Amostra					
1.1	26,4	6,27	1,0078	36160	34190
1.2	26,4	6,27	1,0144	34357	32607
1.3	26,4	6,28	1,0118	36940	34450
Parâmetro	COT %	P (mg/L)	N (mg/L)	NKT mg/L	
Amostra					
1.1	2,50	305	4700	1557	
1.2	2,35	293	4900	1568	
1.3	2,24	306	5100	1624	

Tabela 83 - Características físico-químicas do Lodo L2

Parâmetro	Temp. °C	pH	Densidade g/cm ³	SST mg/L	SSV mg/L
Amostra					
2.1	26,4	5,88	1,0103	25540	23720
2.2	22,0	5,86	1,0178	24310	22140
2.3	22,0	5,93	1,0192	27360	25050
Parâmetro	COT %	P mg/L	N mg/L	NKT mg/L	
Amostra					
2.1	1,63	272	2700	1100	
2.2	1,81	262	1900	1102	
2.3	1,74	261	2610	1153	

Tabela 84 - Características físico-químicas do Lodo L3

Parâmetro	Temp. °C	pH	Densidade g/cm ³	SST mg/L	SSV mg/L
Amostra					
3.1	26,0	7,00	1,0055	18300	17020
3.2	26,0	7,05	1,0055	17600	16430
3.3	26,0	7,03	1,0055	18650	17230
Parâmetro	COT %	P mg/L	N mg/L	NKT mg/L	
Amostra					
3.1	2,78	191	6000	788	
3.2	3,24	185	6800	798	
3.3	3,18	190	7400	786	

As concentrações de álcoois e plastificantes nos lodos L1, L2 e L3 estão mostradas nas Tabela 85, 86 e 87. O único álcool identificado foi o isobutanol no lodo L1 e entre os plastificantes, o DEHP e DIDP em todas as amostras, além do DIAP no lodo L1.

Tabela 85 – Concentrações de álcoois e plastificantes no lodo L1

Triplicatas	I		II		III		Média	D P
Compostos	mg	mg/L	mg	mg/L	mg	mg/L	mg/L	mg/L
IBA	0,02	1	0,01	1	0,01	1	1	0
NB	*	-	*	-	*	-	*	-
IA	*	-	*	-	*	-	*	-
2EH	*	-	*	-	*	-	*	-
IDA	*	-	*	-	*	-	*	-
DIBP	*	-	*	-	*	-	*	-
DBP	*	-	*	-	*	-	*	-
DIAP	0,03	1	*	-	*	-	*	-
DOA	*	-	*	-	*	-	*	
DEHP	1,26	58	1,29	60	1,12	51	56	4
DIDP	1,66	76	1,61	74	1,77	81	77	4

D P – desvio padrão * Não detectado

Tabela 86 – Concentrações de álcoois e plastificantes no lodo L2

Triplicatas	I		II		III		Média	D P
Compostos	mg	mg/L	mg	mg/L	mg	mg/L	mg/L	mg/L
IBA	*	-	*	-	*	-	*	-
NB	*	-	*	-	*	-	*	-
IA	*	-	*	-	*	-	*	-
2EH	*	-	*	-	*	-	*	-
IDA	*	-	*	-	*	-	*	-
DIBP	*	-	*	-	*	-	*	-
DBP	*	-	*	-	*	-	*	-
DIAP	*	-	*	-	*	-	*	-
DOA	*	-	*	-	*	-	*	-
DEHP	0,74	37	0,62	31	0,68	34	34	3
DIDP	2,70	134	2,88	143	3,04	151	143	9

* Não detectado

Tabela 87 – Concentrações de álcoois e plastificantes no lodo L3

Triplicatas	I		II		III		Média	D P
Compostos	mg	mg/L	mg	mg/L	mg	mg/L	mg/L	mg/L
IBA	*	-	*	-	*	-	*	-
NB	*	-	*	-	*	-	*	-
IA	*	-	*	-	*	-	*	-
2EH	*	-	*	-	*	-	*	-
IDA	*	-	*	-	*	-	*	-
DIBP	*	-	*	-	*	-	*	-
DBP	*	-	*	-	*	-	*	-
DIAP	*	-	*	-	*	-	*	-
DOA	*	-	*	-	*	-	*	-
DEHP	0,62	35	0,63	36	0,63	36	36	0
DIDP	2,67	152	2,60	147	2,63	149	149	2

D P – desvio padrão * Não detectado

4.4.2.4. Caracterização molecular da microbiota do solo e Lodo

A diversidade genética das populações bacterianas denominadas indígenas, presentes nos solos S-01, S-02, S-03 e S-09, foi verificada através das bandas de DGGE (Figura 59). A análise destes resultados revelou perfis de bandas muito similares entre as amostras, sugerindo que as populações dominantes são as mesmas entre amostras analisadas. A replicata **S9.2** representou uma exceção, exibindo uma banda intensa que não foi visualizada nas outras amostras.

S1.1: solo S-01 1ªtriplicata S1.2: solo S-01 2ªtriplicata S1.3 : solo S-01 3ªtriplicata S2.1: solo S-02 1ªtriplicata S2.2 soloS-02 2ªtriplicata S2.3 S-02 3ªtriplicata S3.1 solo S-03 1ªtriplicata S3.2 S-03 2ªtriplicata S3.3 S-03 3ªtriplicata S9.1 S-09 1ªtriplicata S9.2 S-09 2ªtriplicata S9.3 S-09 3ªtriplicata

Figura 59 - Bandas de DGGE das amostras de solo S-01, S-02, S-03 e S-09

Na Figura 60, estão apresentados os perfis das bandas de DGGE das amostras dos solos S-05, S-06, S-07 e S-10, em triplicatas. A similaridade entre os perfis encontrados, sugere que as populações dominantes são as mesmas entre as amostras analisadas. Apenas a replicata **S7.3** representou uma exceção, exibindo três bandas intensas que permitiram a distinção com relação às demais amostras. Ainda, os perfis de DGGE dos solos S-05, S-06, S-07 e S-10 revelaram um maior número de bandas do que aqueles encontrados para os solos S-01, S-02, S-03 e S-09, possivelmente devido a maior riqueza de bactérias na comunidade das amostras com elevados teores de contaminantes.

S5.1: solo S-05 1ªtriplicata S5.2: solo S-05 2ªtriplicata S5.3 : solo S-05 3ªtriplicata S6.1: solo S-06 1ªtriplicata S6.2 solo S-06 2ªtriplicata S6.3 S-06 3ªtriplicata S7.1 solo S-07 1ªtriplicata S7.2 S-07 2ªtriplicata S7.3 S-07 3ªtriplicata S10.1 S-10 1ªtriplicata S10.2 S-10 2ªtriplicata S10.3 S-10 3ªtriplicata

Figura 60 - Bandas de DGGE das amostras de solo S-05, S-06, S-07 e S-10

As amostras S-01 a S-09, denominados solos com baixos teores de contaminantes, foram retiradas nas profundidades entre 0,5 e 2 m, apresentado pH maior do que 7,0 (com exceção do S-03) e contendo teores entre 14 a 762 mg/kg de plastificantes. Os maiores teores de plastificantes foram encontrados no solo S-09, além de compostos não identificados nas demais amostras (n-butanol e 2-etil hexanol). Uma de suas triplicatas apresentou uma banda excedente. Já, as amostras S-05 a S-10, denominados solos com altos teores de contaminantes, foram retiradas nas profundidades entre 1,0 e 2,0 m, apresentando pH menor ou igual a 7,0 e contendo teores entre 2.174 a 10.695 mg/kg de plastificantes, sendo identificado maior número de álcoois e plastificantes em relação aos solos de baixos teores de contaminantes, justificando possivelmente a maior diversidade de bandas presentes. As amostras de solo S-07, nas quais foram identificadas três bandas distintas com relação às demais amostras, foram retiradas até 2,6 m de profundidade, apresentaram os menores teores de plastificantes deste grupo, não sendo identificado o DOA, além do pH ser mais alto (7,0).

Mera & Iwasaki (2007) avaliaram a alteração na comunidade de bactérias indígenas de solo contaminado com HgCl_2 e tricloroetileno. Utilizando as técnicas de PCR e DDGE, os autores concluíram que as bandas nos *fingerprints* da comunidade bacteriana eram similares nos teores equivalentes a 0 e 10 ppm de HgCl_2 , no entanto, observaram

alterações nestas bandas em teores de 100 ppm. Para o tricloroetileno, os autores concluíram que as bandas encontradas nos teores de 10 e 100 ppm eram diferentes daquelas encontradas nos teores de 0 ppm.

Shi & Bending (2007) investigaram a biodegradação do herbicida *Isoproturon*, composto de fenil-ureia, pelas bactérias *Sphingomonas ssp.* Utilizando a técnica PCR e DDGE, os autores verificaram que as bandas presentes nos *fingerprints* destas bactérias, em pH maior que 7,5, eram diferentes daquelas apresentadas em pH menor que 7,5. Os autores concluíram que a capacidade de degradação dos contaminantes estava relacionada às alterações na estrutura das bactérias *Sphingomonas ssp* em função do pH.

A diversidade genética das populações bacterianas denominadas exógenas, presentes nos lodos L1, L2 e L3, foi verificada através da comparação dos perfis de bandas de DGGE (Figura 61). A análise dos resultados revela também perfis muito similares entre as amostras, sugerindo que as populações dominantes são as mesmas entre as amostras analisadas. Apenas o lodo L1 apresentou, em todas as triplicatas, 3 bandas não presentes nas demais amostras. Neste lodo, as concentrações de SSV (33749 mg/L) estavam acima daquelas encontradas nos lodos L2 e L3 (23595 mg/L e 16893 mg/L, respectivamente). Os perfis de DGGE destas amostras também sugerem uma maior diversidade de bactérias na comunidade presente.

L1.1: lodo L-01 1ªtriplicata L1.2: lodo L-01 2ªtriplicata L1.3 : : lodo L-01 3ªtriplicata L2.1: lodo L-02 1ªtriplicata L2.2: lodo L-02 2ªtriplicata L2.3 : : lodo L-02 3ªtriplicata L3.1: lodo L-03 1ªtriplicata L3.2: lodo L-03 2ªtriplicata L3.3 : : lodo L-03 3ªtriplicata

Figura 61 - Bandas de DGGE dos lodos L-01, L-02 e L-03

Microscopia do Lodo

Verificando as amostras do lodo L1 ao microscópio, observa-se um floco biológico compacto com a presença de alguns rotíferos, embora estes apresentassem baixa mobilidade, possivelmente devido à elevada toxicidade da água residuária (Figura 62).

Figura 62 – Microscopia ótica mostrando a estrutura do floco biológico do reator do sistema de lodos ativados da indústria (lodo L1) com aumento de 100 vezes

4.4.2.5. Características da Água Industrial adicionada ao processo

A água adicionada às betoneiras durante o ensaio de biorremediação, captada de um corpo d'água nas dependências da unidade industrial, passa pela estação compacta de tratamento água (ETA), filtro de carvão e resinas de troca iônica (Figura 63). Esta água apresentou pH variável (6,8 a 9,2) durante os 120 dias de monitoramento (Tabela 88). Através de cromatografia gasosa e espectrometria de massa, identificou-se o 3,3-butanol-2, 1-nitropropano, 2-nitropropano e isobutanonitrila.

Figura 63 – Fluxograma simplificado do tratamento da água industrial

Tabela 88 - Propriedades físicas da água industrial produzida na empresa e quantidades adicionadas às betoneiras

Dias	Adição (L)		pH	T °C	Condutividade µS/cm	T °C
	B1 a B4	B5 a B8				
16 a 21	6	6 B6 parada	7,70	22,0	12,0	22,0
			7,40	22,0	13,0	22,0
			7,90	22,0	10,0	22,0
20 a 25	7	7	6,34	24,0	23,9	24,0
			6,33	24,0	24,9	24,0
		13 (B6)	6,33	24,0	25,1	24,0
25 a 30	15 exceto B2:	8	6,69	25,0	12,0	24,0
			6,73	25,0	11,9	24,0
	10	LODO (B6)	6,62	25,0	12,1	24,0
30 a 35	10	10	8,76	24,0	3,4	24,0
			8,86	24,0	3,22	24,0
			8,70	24,0	3,3	24,0
40 dias		12 B5/B8	6,99	23,0	16,5	23,0
			6,71	23,0	14,3	23,0
		6 (B6/B7)	6,66	23,0	13,7	23,0
40 a 45	8	4 Exceto B6 e B7	8,25	21,5	6,8	21,5
			8,93	21,5	6,5	21,5
			8,23	21,5	6,5	21,5
45 a 50	8	8	7,22	22,0	7,7	22,0
			7,14	22,0	7,3	22,0
			6,87	22,0	7,8	22,0
50 a 55	10	10	8,22	23,0	7,4	23,0
			8,08	23,0	7,2	23,0
			8,1	23,0	7,1	23,0
55 a 60	10	10	8,85	25,0	6,7	25,0
			8,58	25,0	6,4	25,0
			8,5	25,0	6,2	25,0

Tabela 88 - Propriedades físicas da água industrial produzida na empresa e quantidades adicionadas às betoneiras(continuação)

Dias	Adição(L)		pH	T °C	Condutividade μS/cm	T °C
	B1 a B4	B5 a B8				
65 a 70	10	10	7,78	25,0	3,6	25,0
			7,83	25,0	3,8	25,0
			7,74	25,0	3,8	25,0
75 a 80	10	10	8,7	25,0	12,2	25,5
			8,73	25,0	10,8	25,5
			8,75	25,0	12,7	25,5
85 a 90	10	10	9,16	24,0	10,2	24,0
			9,14	24,0	9,8	24,0
			9,13	24,0	9,7	24,0
90 a 95	10	10	6,69	25,0	130,0	25,0
			6,73	25,0	143,7	25,0
			6,62	25,0	N.D.	25,0
95 a 100	10	10	8,8	25,0	2,0	25,0
			8,86	25,0	1,9	25,0
			8,8	25,0	2,0	25,0
100	10		8,28	24,0	4,1	24,0
			8,28	24,0	4,1	24,0
			8,28	24,0	4,1	24,0

N.D Não determinado T - Temperatura da amostra na determinação analítica

(*) Água efluente do filtro de carvão descrito Figura 80

4.4.2.6. Monitoramento do Teste Piloto de Biorremediação “*ex-situ*”

Na data de montagem de cada processo, após adição do solo, lodo e nutrientes, as betoneiras permaneceram 06 horas ligadas continuamente, para permitir a homogeneização e somente após este período, foram retiradas as amostras de solo, denominadas lamas, para as determinações físico-químicas iniciais.

Os valores de Carbono, Nitrogênio e Fósforo estão na Tabela 89.

Tabela 89 - Teores de COT, N e P na lama inicial, determinados através de análise elementar

Betoneira	COT mg/kg	H mg/kg	N mg/kg	P mg/kg
B1	11395	53827	1499	208
	10496	45581	750	216
	10945	55927	1499	257
B2	15684	50379	1199	204
	14994	59375	1199	206
	17579	55927	900	215
B3	20299	57266	1815	188
	21289	54461	1650	157
	22775	55946	1650	165
B4	11295	37938	1158	190
	11150	39531	1014	171
	10571	42716	869	185
B5	45167	45167	598	195
	39484	45466	1346	227
	41129	47261	598	223
B6	32858	52050	1228	261
	30094	52358	921	322
	30401	57731	921	279
B6 Reinício 30 dias	36703	59276	3102	125
	36014	65135	2240	104
	37048	65652	1551	132

Tabela 89 - Teores de COT, N e P na lama inicial, determinados através de análise elementar (continuação)

Betoneira	COT mg/kg	H mg/kg	N mg/kg	P mg/kg
B7	19698	36878	2518	251
	19994	36285	1925	251
	19253	32731	2666	257
B8	31546	29630	1179	105
	30809	27713	1032	108
	29630	31694	884	116

Verificando as relações C:N e C:P em todas as betoneiras, observa-se que os valores iniciais encontrados estão de acordo com as relações recomendadas pela CETESB, exceto a B5, que apresentou valores da relação carbono:nitrogênio de 76:1 e 69:1 (duplicatas). No entanto, não foi adicionado nitrogênio a esta betoneira.

Umidade durante a biorremediação

Nas betoneiras de altos teores de contaminantes, a umidade durante a biorremediação variou de 28,89 a 39,08% na B5; de 31,83 a 40,81% na B6; de 28,49 a 36,85% na B8 e 28,13% a 42,95% na B7. Os menores valores foram obtidos após 15 dias de processo (Figura 64). Verificando a quantidade e o teor de sólidos do lodo adicionado a cada processo, as umidades teóricas iniciais na B5, B6, B7 e B8 seriam de 45%; 48%; 50% e 45%, respectivamente, no entanto, as determinadas através da secagem em estufa por 24 horas a 90 °C foram 32%; 35%; 33% e 30%, respectivamente.

Nas betoneiras de baixos teores de contaminantes, a umidade durante a biorremediação variou de 30,34 a 40,89% na B1; de 34,22 a 44,11% na B2; de 33,55 a 43,21% na B3 e de 26,59 a 40,10% na B4. Os menores valores foram obtidos após 15 dias de processo (Figura 65). Verificando a quantidade e o teor de sólidos do lodo adicionado a cada processo, as umidades teóricas iniciais na B1, B2, B3 e B4 seriam, respectivamente, 41%; 46%; 45% e 42%, no entanto, as determinadas por secagem em estufa durante 24 horas a 90 °C foram 33%; 42%; 39% e 31%, respectivamente.

Figura 64 – Evolução da umidade do solo durante o ensaio de biorremediação – betoneiras B5 a B8

Figura 65 – Evolução da umidade do solo durante o ensaio de biorremediação – betoneiras B1 a B4

A água foi introduzida às betoneiras após 16 dias do início do processo e continuou semanalmente até os 100 dias. No período subsequente até a parada final das betoneiras, em 120 dias, não foi adicionada água ao processo para que se chegasse a umidade inicial do solo. Após cada adição de água, as betoneiras permaneciam ligadas continuamente por 6 horas e somente após este período, eram retiradas as amostras para o monitoramento. A água foi adicionada de tal forma a manter a umidade teórica entre

40% e 50%, no entanto, observa-se que as umidades nas betoneiras de altos teores de contaminantes estiveram entre 30 e 40% e nas de baixos teores, entre 30 e 45%.

Embora as reações de esterificação (ácido+álcool $\longrightarrow$ diéster + água) ocorram sob condições de pressão e temperatura adequadas e excesso de um dos reagentes para manter o equilíbrio da reação para a direita, a água adicionada na betoneira pode ter participado da reação de hidrólise dos diésteres, deslocando o equilíbrio para a esquerda (Afgham & Chau, 1989).

Evolução do pH durante a biorremediação

As betoneiras de altos teores de contaminantes B5, B6 e B8 apresentaram valores de pH inicial próximos e elevação dos mesmos durante a biorremediação, apresentando os menores valores sete dias após o início do processo e os maiores, após 100 dias. Já a B7 apresentou faixa de pH mais alta, com os menores valores 15 dias após o início do processo e os maiores, após 95 dias (Figuras 66 a 69):

- a faixa de pH inicial da B5 foi 5,74 a 5,79 e durante a biorremediação, os menores valores foram 5,42 a 5,54 e os maiores, 6,89 a 6,91;
- a faixa de pH inicial da B6 foi 6,18 a 6,42 e durante a biorremediação, os menores valores foram 5,82 a 5,86 e os maiores, 7,31 a 7,33;
- a B7 apresentou pH inicial na faixa de 7,34 a 7,37 e durante a biorremediação, os menores valores foram 6,97 a 7,01 e os maiores, 8,01 a 8,04;
- a faixa de pH inicial da B8 foi 5,95 a 6,01 e durante a biorremediação, os menores valores foram 5,74 a 5,78 e os maiores, 6,76 a 6,81 aos 50 dias de experimento.

Entre 75 a 90 dias, observou-se um declínio do pH nestas betoneiras. O pH da água adicionada no período estava elevado (8,7 a 8,75), não contribuindo portanto para o declínio do pH da lama. A identificação do maior número de sub-produtos ácidos nas análises de varredura a partir de 60 dias, pode explicar este declínio do pH.

Figura 66 – Evolução do pH ao longo do ensaio de biorremediação – Betoneira B5

Figura 67 – Evolução do pH ao longo do ensaio de biorremediação – Betoneira B6

Nota: I,II e III - triplicatas

Figura 68 – Evolução do pH ao longo do ensaio de biorremediação – Betoneira B7

Nota: I,II e III - triplicatas

Figura 69 – Evolução do pH ao longo do ensaio de biorremediação – Betoneira B8

As betoneiras de baixos teores de contaminantes B1, B2 e B4 apresentaram faixas de pH inicial próximas e elevação das mesmas durante a biorremediação, com exceção da B2. Os maiores valores foram observados após 60; 30 e 60 dias, respectivamente para as betoneiras B1, B2 e B4, e os menores, 15 e 50 dias após o início do processo, respectivamente para a B4 e B2. Já a B3 apresentou faixa de pH mais baixa, com maiores valores 100 dias após o início do processo (Figura 70 a 73):

- o pH do lama inicial da B1 variou de 7,36 a 7,54 e durante a biorremediação, os maiores valores estiveram entre 8,42 e 8,44;
- o pH inicial da lama da B2 variou de 7,60 a 7,77 e durante a biorremediação, os menores valores foram de 7,44 a 7,48 e os maiores, 7,99 a 8,01;
- a faixa de pH inicial da lama da B3 foi de 5,83 a 5,88 (menores valores) e durante a biorremediação, os maiores valores estiveram entre 7,16 e 7,18;
- a lama da B4 apresentou pH inicial na faixa de 7,36 a 7,51 e durante a biorremediação, os menores valores foram de 7,19 a 7,26 e os maiores, 8,28 a 8,31.

Entre 40 a 50 dias, observou-se declínio do pH nas betoneiras B2 e B4. O pH da água adicionada no período estava entre 6,87 e 7,22, não contribuindo, portanto, para o declínio do pH da lama. O maior número de sub-produtos ácidos nestas betoneiras ocorreu a partir de 30 dias (vide análises de varredura), fato que pode explicar este declínio de pH.

O declínio de pH durante a biodegradação de plastificantes, observado por outros autores citados neste estudo (Juneson et al, 2001; Staples et al, 1997), também não foi observado na biorremediação *ex-situ*, contrariamente observou-se a tendência a elevação e verificando os sub-produtos formados através das análises de varredura, observa-se a presença de cianocompostos nas betoneiras B-03, B-04, B-05, B-06 e B-08 e a presença de amidas nos solos S-01 e S-02, utilizados nas betoneiras B-01 e B-02 e aminas no solo S-07, utilizado na Betoneira B-07.

I,II e III - triplicatas

Nota:

Figura 70 – Evolução do pH ao longo do ensaio de biorremediação – Betoneira B1

Nota: I,II e III - triplicatas

Figura 71 – Evolução do pH ao longo do ensaio de biorremediação – Betoneira B2

Nota: I,II e III - triplicatas

Figura 72 – Evolução do pH ao longo do ensaio de biorremediação – Betoneira B3

Nota: I,II e III - triplicatas

Figura 73 – Evolução do pH ao longo do ensaio de biorremediação – Betoneira B4

A plastificação do solo, bem como a presença de outros óleos, dificultaram o preparo das amostras e a leitura do pH, apesar da utilização de eletrodo específico para suspensões. Durante as determinações deste parâmetro, os sólidos das lamas das betoneiras de baixos teores de contaminantes, B1 a B4, não sedimentavam após uma hora de repouso, permanecendo em suspensão com a fase oleosa, o que demandava maior tempo para atingir o equilíbrio (Figura 74). Já as lamas das betoneiras de altos teores de contaminantes, B5 a B8, não homogeneizavam com as soluções de cloreto de cálcio e cloreto de potássio e após uma hora de repouso apresentavam três fases distintas, com óleo sobrenadante, água ou solução e partículas do solo sedimentadas. Constatou-se tendência a declínio do pH no sedimento e elevação na interface água-óleo. As faixas de pH em água das betoneiras B1 a B4 foram mais altas que as das B5 a B8, porém todas apresentaram valores de pH mais altos em água do que em soluções KCl e CaCl_2 , o que demonstrava que as partículas do solo possuíam carga líquida negativa, durante todo o processo de biorremediação.

Figura 74 - Amostras da lama da betoneira B3 utilizadas para determinação do pH

Evolução da Temperatura durante a biorremediação

As lamas das betoneiras de altos teores de contaminantes B5 a B8 apresentaram temperatura de 13 a 26 °C durante a biorremediação (Figuras 75 a 78). A temperatura da lama nas betoneiras estava 1 a 5 °C abaixo da temperatura ambiente (Figura 79). Os

menores valores encontrados foram os iniciais e entre 40 e 60 dias de experimento, sendo observada uma diminuição na remoção de alguns plastificantes neste período.

Nota: I, II e III - triplicatas

Figura 75 - Evolução da temperatura da lama da betoneira B5 durante a biorremediação

Nota: I, II e III - triplicatas

Figura 76 - Evolução da temperatura da lama da betoneira B6 durante a biorremediação

Nota: I, II e III - triplicatas

Figura 77 - Evolução da temperatura da lama da betoneira B7 durante a biorremediação

Nota: I, II e III - triplicatas

Figura 78 - Evolução da temperatura da lama da betoneira B8 durante a biorremediação

Figura 79 - Evolução da temperatura do ar durante o teste de biorremediação

A temperatura das lamas das betoneiras de baixos teores de contaminantes B1, B2, B3 e B4 variou de 17 a 26°C durante o ensaio de biorremediação (Figuras 80 a 83). A temperatura ambiente estava 1,0 a 5,5 °C acima destas temperaturas (Figura 84). Os menores valores encontrados foram após 15 dias e entre 40 e 60 dias de teste, sendo observada uma diminuição na remoção de alguns plastificantes neste período.

Figura 80 – Evolução da temperatura da lama do reator B1 durante o teste de biorremediação

Nota: I, II e III - triplicatas

Figura 81 – Evolução da temperatura da lama do reator B2 durante o teste de biorremediação

Nota: I, II e III - triplicatas

Figura 82 – Evolução da temperatura da lama do reator B3 durante o teste de biorremediação

Nota: I, II e III - triplicatas

Figura 83 – Evolução da temperatura da lama do reator B4 durante o teste de biorremediação

Nota: I, II e III - triplicatas

Figura 84 – Evolução da temperatura ambiente durante o teste de biorremediação

Chang et al. (2004) identificaram como condições ótimas para a biodegradação de oito ftalatos: pH igual a 7,0 e temperatura de 30 °C . Carrara (2003) verificou a biorremediação de 100 mg/kg de DEHP no solo por microrganismos indígenas e exógenos adaptados, com remoções de 98,83%, em faixa de pH em água entre 7,20 e

7,97 e temperaturas entre 24 °C e 27 °C. No presente estudo, as temperaturas foram mais baixas (13 a 26 °C) e os valores de pH diferentes (5,4 a 8,4) dos pesquisados pelos autores mencionados anteriormente, no entanto, estas condições não se mostraram restritivas à biodegradação dos plastificantes, conforme remoções demonstradas nos parágrafos seguintes. Segundo a EPA (1995), a maioria das bactérias desempenham melhor suas atividades na faixa de pH 5 a 9, embora diferentes espécies apresentem valores diferentes do pH ótimo para o seu crescimento. Ainda, segundo esta referência, a temperatura ótima de crescimento das bactérias em um determinado solo depende do clima da região.

Teores de álcoois e plastificantes durante a biorremediação

B1

Os teores de álcoois e plastificantes nas lamas da B1 durante a biorremediação estão nas Figuras 85, 86A e 86B. O solo inicial S-01 utilizado nesta betoneira apresentou teores mais baixos: 24 a 27 mg/kg para o isobutanol, 5 a 9 mg/kg para o DEHP e 6 a 9 mg/kg para o DIDP, contrariamente ao observado nos demais reatores.

1, 2 e 3 – Triplicatas

Figura 85 – Evolução dos teores de álcoois ao longo do tempo de biorremediação da lama da B1

1, 2 e 3 – Triplicatas

Figura 86A – Evolução dos teores de plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B1

1, 2 e 3 – Triplicatas

Figura 86B – Evolução dos teores de plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B1

B2

Os teores de contaminantes na B2 estão nas Figuras 87A/B e 88 A/B, sendo que isobutanol e o isodecanol não foram identificados na lama após 75 e 45 dias, respectivamente. O solo inicial S-02 utilizado apresentou teores similares: 9 a 13 mg/kg para o isobutanol, 24 a 29 mg/kg para o isodecanol , 141 a 146 mg/kg para o DEHP e 139 a 148 mg/kg para o DIDP. O álcool isoamílico identificado no solo não foi detectado na lama inicial e entre os plastificantes, todos foram identificados no solo, sendo detectados apenas o DEHP e o DIDP na lama.

1, 2 e 3 – Triplicatas

Figura 87A – Evolução dos teores de álcoois ao longo do tempo de biorremediação na lama da B2

1, 2 e 3 – Triplicatas

Figura 87B – Evolução dos teores de álcoois ao longo do tempo de biorremediação na lama da B2

1, 2 e 3 – Triplicatas

Figura 88A – Evolução dos teores de plastificantes ao longo do tempo de biorremediação na lama da B2

1, 2 e 3 – Triplicatas

Figura 88B – Evolução dos teores de plasticantes ao longo do tempo de biorremediação na lama da B2

B3

Os teores de contaminantes na lama da B3 estão nas Figuras 89 A/B e 90A/B/C, sendo identificados os compostos DIBP (5 a 7 mg/kg) e DBP (7 mg/kg) apenas na lama inicial e o DIAP até 30 dias. O solo inicial S-03 apresentou teores mais elevados para os álcoois (19 a 25 mg/kg para o isobutanol e 48 a 56 mg/kg para o isodecanol) e plastificantes (52 a 67mg/kg para o DEHP e 267 a 289 mg/kg para o DIDP) e próximos para o DIBP, DBP, DIAP (7 a 9 mg/kg, 7 a 10 mg/kg, 11 mg/kg, respectivamente).

1, 2 e 3 – Triplicatas

Figura 89A – Evolução dos teores de álcoois ao longo do tempo de biorremediação da lama B3

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 89B – Evolução dos teores de álcoois ao longo do tempo de biorremediação da lama da B3

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 90A – Evolução dos teores de plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B3

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 90B– Evolução dos teores de plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B3

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 90C – Evolução dos teores de plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B3

B4

Os teores de contaminantes da B4 estão nas Figuras 91 A/B e 92 A/B. O solo inicial S-09 apresentou teores próximos para o isobutanol (35 a 56 mg/kg), teores menores para o isodecanol (3 a 4 mg/kg) e DIDP (134 a 139 mg/kg) e mais elevados para DEHP (263 a 306 mg/kg); os álcoois n-butanol e 2-etilhexanol identificados no solo S-09 não foram detectados na lama.

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 91A – Evolução dos teores de álcoois ao longo do tempo de biorremediação da lama da B4

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 91B – Evolução dos teores de álcoois ao longo do tempo de biorremediação da lama da B4

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 92A – Evolução dos teores de plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B4

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 92B – Evolução dos teores de plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B4

B5

Os teores iniciais do álcool 2-etilhexanol na lama da B5 foram 15 a 17 mg/kg, não sendo posteriormente identificado e os teores dos demais compostos estão nas Figuras 93 A/B e 94A/B/C/D/E/F. O solo inicial S-05 apresentou teores mais elevados para os álcoois 2-etilhexanol (195 a 196 mg/kg) e isodecanol (2387 a 2678 mg/kg), com exceção do isobutanol e mais elevados para todos os plastificantes.

1, 2 e 3 – Triplicatas

Figura 93A – Evolução dos teores de álcoois ao longo do tempo de biorremediação da lama da B5

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 93B – Evolução dos teores de álcoois ao longo do tempo de biorremediação da lama da B5

1, 2 e 3 – Triplicatas

Figura 94A – Evolução dos teores plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B5

1, 2 e 3 – Triplicatas

Figura 94B – Evolução dos teores plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B5

1, 2 e 3 – Triplicatas

Figura 94C – Evolução dos teores plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B5

1, 2 e 3 – Triplicatas

Figura 94D – Evolução dos teores plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B5

1, 2 e 3 – Triplicatas

Figura 94E – Evolução dos teores plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B5

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 94F – Evolução dos teores plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B5

B6

Os teores de álcoois e plastificantes na lama da B6 estão nas Figuras 95 A/B/C e 96A/B/C/D/E, não sendo identificado o álcool isoamílico após 15 dias. O solo inicial S-06 apresentou teores mais elevados para o isodecanol (1487 a 1605 mg/kg) e para todos os plastificantes. O n-butanol identificado no solo não foi detectado na lama, contrariamente ao que aconteceu com o álcool isoamílico.

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 95A – Evolução dos teores de álcoois ao longo do tempo de biorremediação da lama da B6

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 95B – Evolução dos teores de álcoois ao longo do tempo de biorremediação da lama da B6

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 95C – Evolução dos teores de álcoois ao longo do tempo de biorremediação da lama da B6

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 96A – Evolução dos teores de plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B6

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 96B – Evolução dos teores de plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B6

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 96C – Evolução dos teores de plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B6

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 96D – Evolução dos teores de plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B6

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 96E – Evolução dos teores de plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B6

B7

Os teores de contaminantes na lama da B7 estão nas Figuras 97 A/B e 98 A/B/C/D/E, sendo identificados na lama inicial o n-butanol (1 mg/kg) e o 2-etilhexanol (1 mg/kg). O solo inicial S-07 apresentou teores mais elevados para todos os compostos, com exceção do isodecanol. Após 7 dias, os teores dos plastificantes na lama, com exceção do DIDP, aumentaram significativamente. A dificuldade de homogeneizar a lama durante todo o processo pode justificar essas diferenças.

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 97A – Evolução dos teores de álcoois ao longo do tempo de biorremediação da lama da B7

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 97B – Evolução dos teores de álcoois ao longo do tempo de biorremediação da lama da B7

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 98A – Evolução dos teores de plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B7

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 98B – Evolução dos teores de plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B7

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 98C – Evolução dos teores de plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B7

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 98D – Evolução dos teores de plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B7

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 98E – Evolução dos teores de plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B7

Os teores de contaminantes presentes na lama da B8 estão nas Figuras 99 A/B/C e 100A/B/C/D/E/F, sendo identificados o n-butanol e isoamílico (10 mg/kg e 7 a 8 mg/kg, respectivamente) somente na lama inicial. O solo inicial S-10 apresentou teores mais elevados para todos os compostos, com exceção dos álcoois n-butanol e isoamílico.

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 99A – Evolução dos teores de álcoois ao longo do tempo de biorremediação da lama da B8

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 99B – Evolução dos teores de álcoois ao longo do tempo de biorremediação da lama da B8

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 99C – Evolução dos teores de álcoois ao longo do tempo de biorremediação da lama da B8

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 100A – Evolução dos teores de plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B8

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 100B – Evolução dos teores de plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B8

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 100C – Evolução dos teores de plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B8

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 100D – Evolução dos teores de plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B8

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 100E – Evolução dos teores de plastificantes ao longo do tempo de biorremediação da lama da B8

1, 2 e 3 - Triplicatas

Figura 100F – Evolução dos teores de álcoois ao longo do tempo de biorremediação da lama da B8

Após a biorremediação os plastificantes DEHP e DIDP apresentaram os maiores teores nos solos. Os teores finais de DEHP foram abaixo de 5mg/kg nas betoneiras B1 e B3; entre 15 e 22 mg/kg nas betoneiras B2, B4, B5 e B7 e somente as betoneiras B6 e B8 apresentaram teores finais elevados (56 e 134 mg/kg, respectivamente). Os teores finais de DIDP foram 20 a 26 mg/kg na B1, B2 e B3, 6 mg/kg na B4, 14 a 28 mg/kg na B5, B6 e B7, apresentando os maiores valores na B8 (138 a 143 mg/kg).

Comparando os teores de plastificantes no solo com os encontrados, na lama inicial, observa-se que os mesmos estão próximos nas betoneiras B1 e B3. Já na B2, a diferença é de duas vezes; na B4, três vezes; na B5, B7 e B8, quatro vezes e na B6, doze vezes em relação aos teores encontrados no solo, confirmando as hipóteses levantadas a partir dos resultados obtidos nos Ensaios Preliminares e Confirmatórios, de que os teores iniciais de contaminantes na lama eram menores do que os do solo, após adição de lodo, água e nutrientes, possivelmente, devido a outros mecanismos de remoção.

A biodegradação retardada de alguns álcoois nas betoneiras B-03, B-06 e B-08 (Figuras 89A, 95C e 99A) pode ser atribuída, possivelmente à sua presença nos interstícios das partículas do solo, tornando-se biodisponíveis apenas com a biodegradação dos

plastificantes ou de outros óleos que estavam adsorvidos no solo. A presença de outros óleos foi observada nas amostras iniciais das lamas das betoneiras B-03, B-06 e B-08 e nas amostras de lodo extraídas com solventes acetona-hexano (Figura 101 a 105).

Figura 101 - Extratos das amostras iniciais das betoneiras B5 e B6

Figura 102 - Extratos das amostras iniciais das betoneiras B7 e B8

Figura 103 - Extratos das amostras iniciais das betoneiras B1 e B2

Figura 104 - Extratos das amostras iniciais das betoneiras B3 e B4

Figura 105 - Extratos das amostras iniciais de lodo L1 e L2

Equações cinéticas de degradação na biorremediação *ex-situ*

A Tabela 90 apresenta as equações obtidas, bem como os coeficientes de correlação.

Tabela 90 –Teores de contaminantes na lama inicial, equação cinética, constantes de biodegradação e coeficientes de correlação na biorremediação *ex situ*

Composto	B-01				B-02			
	Teores (mg/kg)	Equação cinética	k 1/dia	r ²	Teores (mg/kg)	Equação cinética	k 1/dia	r ²
IB	69	y = 27,143e-0,0246x	0,0246	0,7659	12	y = 10,148e-0,016x	0,0160	0,8003
IDA					35	y = 32,659e-0,0364x	0,0364	0,8501
DEHP	16	y = 14,943e-0,0132x	0,0132	0,9016	133	y = 77,387e-0,0141x	0,0141	0,8094
DIDP	69	y = 64,401e-0,0096x	0,0096	0,9622	146	y = 61,604e-0,0091x	0,0091	0,4588
Composto	B-03				B-04			
	Teores (mg/kg)	Equação cinética	k 1/dia	r ²	Teores (mg/kg)	Equação cinética	k 1/dia	r ²
IB	21	y = 145,55e-0,037x	0,0370	0,8612	54	y = 69,69e-0,0217x	0,0217	0,9097
IDA	22	y = 28,251e-0,0172x	0,0172	0,5965	33	y = 41,064e-0,0104x	0,0104	0,6320
DEHP	37	y = 49,423e-0,0252x	0,0252	0,8782	45	y = 60,588e-0,0101x	0,0101	0,8227
DIDP	56	y = 35,773e-0,0047x	0,0047	0,2770	195	y = 386,42e-0,0352x	0,0352	0,912

Y: teor de contaminante (mg/kg) e x: tempo(dias); k: constante de degradação; r² - Coeficiente de correlação; Teores: Teores iniciais na lama(mg/kg)

Tabela 90 –Teores de contaminantes na lama inicial, equação cinética, constantes de biodegradação e coeficientes de correlação na biorremediação *ex situ* (continuação).

Composto	B-05				B-06			
	Teores	Equação cinética	k	r ²	Teores	Equação cinética	k	r ²
IB	162	y = 203,12e-0,0215x	0,0215	0,966	80	y = 49,767e-0,0245x	0,0245	0,7256
IDA	516	y = 732,84e-0,0267x	0,0267	0,9147	85	y = 110,62e-0,022x	0,0220	0,8814
DIBP	361	y = 276,75e-0,0303x	0,0303	0,9061	62	y = -0,4495x + 42,624	0,4495	0,6878
DBP	44	y = 27,61e-0,0323x	0,0323	0,8433	20	y = -0,1286x + 16,783	0,1286	0,6829
DIAP	96	y = 66,152e-0,0258x	0,0258	0,7156	31	y = 48,783e-0,0246x	0,0246	0,7578
DOA	11	y = -0,1957x + 9,4471	0,1975	0,7608				
DEHP	362	y = 253,59e-0,0304x	0,0304	0,8141	147	y = 124,15e-0,0076x	0,0076	0,7734
DIDP	226	y = 139,41e-0,0224x	0,0224	0,7709	172	y = 145,39e-0,0141x	0,0141	0,8812
Composto	B-07				B-08			
	Teores	Equação cinética	k	r ²	Teores	Equação cinética	k	r ²
IB	23	y1 = 16,987e-0,0143x	0,0143	0,9140	29	y = 49,736e-0,0233x	0,0233	0,7689
IDA	319	y2 = 253,28e-0,0517x	0,0517	0,7133	1013	y = 975,97e-0,0170x	0,0170	0,9699
DIBP					221	y = 225,74e-0,0101x	0,0101	0,9360
DBP					159	y = 158,42e-0,0084x	0,0084	0,7925
DIAP					229	y = 226,88e-0,0089x	0,0089	0,9431
DEHP	20	y1 = 106,94e-0,015x	0,0150	0,5930	373	y = 327,04e-0,0079x	0,0079	0,9003
DIDP	151	y1 = 110,37e-0,0144x	0,0144	0,7310	712	y = 537,18e-0,0129x	0,0129	0,8040

Y: teor de contaminante (mg/kg) e x: tempo(dias); k: constante de degradação (1/dia); r² - Coeficiente de correlação; Teores: Teores iniciais na lama(mg/kg)

Os resultados obtidos indicam que a biorremediação dos alcoóis e plastificantes seguiu uma cinética de primeira ordem, em todas as betoneiras. Zeng et al. (2004) verificaram que a biodegradação dos seis PAE's pelas bactérias *Pseudomonas Fluorescentes FSI* seguia uma cinética de primeira-ordem.

A cinética de degradação para um determinado composto foi diferente nas diversas betoneiras, sugerindo que a degradação deste variou com a presença dos demais compostos. Neste estudo de biorremediação, entretanto, não foi observado necessariamente a diminuição da constante de biodegradação em função do aumento dos teores iniciais de plastificantes, conforme observado por Zeng et al.(2004), bem como não foi observado uma diminuição na constante de degradação dos ftalatos em função do aumento e ramificação da cadeia alquílica, em um mesmo reator. Por outro lado, os alcoóis, por serem co-substratos de cadeias mais simples que os plastificantes, não foram degradados mais rapidamente, mesmo estando presente em todos os reatores. Nas betoneiras B1 e B8, por exemplo, o isobutanol apresentou a maiores constantes de degradação, já na B2 e B7 foi o álcool isodecanol, de cadeia mais longa; nas betoneiras B3 e B4, foram os plastificantes DIAP e DIDP e nas betoneiras B5 e B6 foram os plastificantes DIBP e DOA, respectivamente.

Verificando as constantes de degradação para todos os plastificantes, observa-se que os maiores valores foram obtidos na betoneira B5, a qual apresentou todos os contaminantes investigados preentes e nos maiores teores, relativamente aos demais reatores. Chang et al. (2004) notaram uma elevação nas taxas de degradação de oito ftalatos, quando todos estavam presentes simultaneamente no meio.

No presente trabalho, não se observou uma fase lag para os plastificantes, ao contrário dos resultados encontrados por Jianlong et al. (1995) e Carrara (2003).

Considerando apenas os valores de k para o DEHP nos diversos reatores, para atingir o valor de 10mg DEHP/kg solo recomendado pela CETESB para solo industrial, seriam necessários 148 dias na B2, 178 dias na B4, 331 dias na B6, 158 dias na B7 e 441 dias na B8.

A Tabela 91 contém um resumo dos principais parâmetros de processo na biorremediação *ex-situ*.

Tabela 91 - Principais parâmetros de processo na biorremediação *ex-situ*

Betoneiras com baixos teores plastificantes				
Parâmetro (menor e maior valor)	B1	B2	B3	B4
Teores iniciais Plastificantes (mg/kg)	16(DEHP) a 69(DIDP)	133(DEHP) a 155(DIDP)	5(DIBP) a 56(DIDP)	45(DEHP) a 195(DIDP)
Umidade na biorremediação(%)	30,34 a 40,89	34,22 a 44,11	33,55 a 43,21	26,59 a 40,1
pH na biorremediação	7,36 a 8,44	7,44 a 8,01	5,83 a 7,18	7,19 a 8,31
gSSV/kg solo	6	6	6	6
Remoções de plastificantes (%)	70 a 81	83 a 89	55 a 100	58 a 97
Teores finais de plastificantes (mg/kg)	3(DEHP) a 21(DIDP)	15(DEHP) a 26(DIDP)	2(DOEH) a 25(DIDP)	6(DEHP) a 19(DIDP)
Teores finais de álcoois (mg/kg)	3 (IBA)	-	5 (IBA e IDA)	6 a 7 (IBA)

Tabela 91 - Principais parâmetros de processo na biorremediação *ex-situ* (continuação)

Betoneiras altos teores plastificantes				
Parâmetro (menor e maior valor)	B5	B6	B7	B8
Teores iniciais de Plastificantes (mg/kg)	11(DOA) a 367(DEHP)	19(DBP) a 178(DIDP)	1(DIBP) a 153(DIDP)	7(DOA) a 723(DIDP)
Umidade inicial (%)	28,89 a 39,08	31,83 a 40,81	28,49 a 36,85	28,13 a 42,95
pH na biodegradação	5,42 a 6,91	5,82 a 7,33	6,97 a 8,04	5,74 a 6,81
gSSV/kg solo	10	11	11	11
Remoção de plastificantes (%)	95 a 100	57 a 100	79 a 100	59 a 100
Teores finais de plastificantes (mg/kg)	1(DBP) a 21(DEHP)	1(DIAP) a 71(DEHP)	21(DEHP) a 28(DIDP)	22(DBP) a 145(DEHP)
Teores finais de álcoois (mg/kg)	44 a 47 (IBA e IDA)	29 a 33 (IBA e IDA)	5(IBA)	134 a 145 (IBA e IDA)

Comparando os diferentes processos, tem-se:

- A umidade inicial efetiva, bem como a umidade da lama durante o monitoramento, não corresponderam às teóricas esperadas após adição de água, possivelmente devido às reações de hidrólise com os diésteres. A varredura confirmou, no entanto, a presença de compostos finais da biodegradação de plastificantes;
- A biodegradação ocorreu em faixa de pH de 5,42 a 8,44;
- Na faixa de teores de plastificantes estudada, adição de lodo na razão de 6 a 10 gSSV/kg foi eficiente;

- Os elevados teores finais de plastificantes na B8 podem ser indicativos da necessidade de maior tempo de biodegradação para os elevados teores iniciais de plastificantes encontrados no solo;
- Os álcoois persistentes foram o isobutanol e isodecanol e os plastificantes recalcitrantes, o DEHP e o DIDP.

Ánálises microbiológicas no monitoramento

Betoneira B1

As análises de *fingerprint* da comunidade total de bactérias das lamas da betoneira B1, monitoradas durante 100 dias de processo (Figura 106A), bem como o respectivo dendograma de similaridade (Figura 107), revelaram uma alteração significativa na estrutura das comunidades após 30 dias, evidenciando mudanças nas populações dominantes no processo. As amostras referentes ao tempo inicial de tratamento (0 d) foram consistentes e apresentaram 92 a 100% de similaridade entre as triplicatas. Entretanto, estas amostras mostraram-se significativamente distintas das correspondentes aos demais tempos de tratamento (30, 60 e 100 dias), com nível de similaridade em torno de 48%.

O dendograma de similaridade relativo às análises de *fingerprint* do solo inicial S-01, lodo L2 e da lama da betoneira B1, todos em duplicatas (Figura 106B e 108) evidenciou que os perfis de bandas encontradas no início do processo são altamente similares com aquelas do lodo (95%), sugerindo que as bactérias presentes no lodo correspondem às populações dominantes no instante inicial do processo. Após 30 dias, os perfis de bandas apresentaram 95% de similaridade com os perfis do solo inicial S-01, demonstrando que nesta fase do processo, as bactérias indígenas do solo passaram a dominar a comunidade do reator, possivelmente em função de sua adaptação aos teores de contaminantes presentes e eventual capacidade de degradação dos mesmos, com a respectiva redução média de 43% nos teores dos plastificantes presentes após 30 dias em relação ao tempo inicial.

Os perfis de bandas das amostras de solo inicial S-01 apresentaram ainda entre 50 a 70% de similaridade com as amostras de 60 e 100 dias de processo, indicando que as populações foram se diferenciando ao longo do tratamento em relação àquelas presentes na lama inicial, com as respectivas remoções médias de 55% e 67% de plastificantes.

pb inicio 30 d 60 d 100 d pb

0d: amostras iniciais 30d: amostras 30 dias
60d: amostras 60dias 100d: amostras 100 dias

pb S-01 L2 0d 30d 60d 100d pb

S-01:solo S-01 L2: lodo L2
0d: amostras iniciais 30d: amostras 30 dias
60d:amostras inicial 100d: amostras 100 dias

Figura 106A-Bandas DGGE da lama B1 Figura 106B-Bandas DGGE de S-01, L2 e B1

inicio1: lama inicial 1ªtriplicata inicio2: lama inicial 2ªtriplicata inicio3: lama inicial 3ªtriplicata
30d1: lama 30dias 1ªtriplicata 30d2: lama 30dias 2ªtriplicata 30d3: lama 30dias 3ªtriplicata
60d1: lama 60dias 1ªtriplicata 60d2: lama 60dias 2ªtriplicata 60d3: lama 30dias 3ªtriplicata
100d1: lama 100dias 1ªtriplicata 100d2: lama 100dias 2ªtriplicata 100d3: lama 100dias 3ªtriplicata

Figura 107 - Dendograma de similaridade da Betoneira B1

S-01.1:solo S-01 1ªtriplicata S-01.2:solo S-01 2ªtriplicata L2.1: lodo L02 1ªtriplicata L2.2: lodo L-02 2ªtriplicata início1: lama inicial 1ªtriplicata início2: lama inicial 2ªtriplicata 30d1: lama 30dias 1ªtriplicata 30d2: lama 30dias 2ªtriplicata 30d3: lama 30dias 3ªtriplicata 60d1: lama 60dias 1ªtriplicata 60d2: lama 60dias 2ªtriplicata a 100d1: lama 100dias 1ªtriplicata 100d2: lama 100dias 2ªtriplicata

Figura 108 - Árvore de similaridades solo inicial S-01, lodo L2 e lamas da Betoneira B1

Betoneira B2

As análises de *fingerprint* da comunidade total de bactérias das lamas da betoneira B2 monitoradas durante 100 dias de processo (Figura 109A), bem como o respectivo dendograma de similaridade (Figura 110), revelaram alterações na estrutura das comunidades após 30 dias (66% similaridade em relação ao início do processo); 60 dias (58% similaridade) e 100 dias (40% similaridade), evidenciando mudanças nas populações dominantes no processo. O dendograma de similaridade relativo às análises de *fingerprint* do solo inicial S-02, lodo L2 e das lamas da betoneira B2 (Figuras 109B e 111) evidenciou que os perfis de bandas encontradas no início do processo são altamente similares com aquelas do lodo L2 (80% de similaridade), sugerindo que as bactérias presentes no lodo correspondem às populações dominantes no instante inicial do processo. Após 30 dias, os perfis de bandas apresentaram 66% de similaridade com as do solo inicial S-01 e 50% com as do lodo, demonstrando que nesta fase do processo, as bactérias indígenas do solo estiveram também presentes na comunidade do reator, com a respectiva remoção média de 75% de plastificantes após 30 dias de processo. Após 100 dias e remoções médias de 84% de plastificantes, a similaridade dos perfis das bandas encontradas está abaixo de 40% em relação aos perfis do solo inicial e do

lodo, indicando o favorecimento de novas populações dominantes nesta etapa final do processo.

Figura 109A-Bandas DGGE da lama B2 Figura 109B-Bandas DGGE de S-02, L2 e B2

Figura 110 - Dendograma da lama da Betoneira B2

S-02.1:solo S-02 1ªtriplicata S-02.2:solo S-02 2ªtriplicata L2.1: lodo L02 1ªtriplicata L2.2: lodo L-02 2ªtriplicata início1: lama inicial 1ªtriplicata início2: lama inicial 2ªtriplicata 30d1: lama 30dias 1ªtriplicata 30d2: lama 30dias 2ªtriplicata 30d3: lama 30dias 3ªtriplicata 60d1: lama 60dias 1ªtriplicata 60d2: lama 60dias 2ªtriplicata a 100d1: lama 100dias 1ªtriplicata 100d2: lama 100dias 2ªtriplicata

Figura 111 - Árvore de similaridades solo inicial S-02, lodo L2 e lamas da Betoneira B2

Betoneira B3

As análises de *fingerprint* da comunidade total de bactérias das lamas da betoneira B3, monitoradas durante 100 dias (Figura 112A), bem como o respectivo dendograma de similaridade (Figura 113), revelaram uma alteração significativa na estrutura das comunidades após 30 dias, cujos perfis apresentaram 65% de similaridade em relação ao início do processo (após 60 e 100 dias, a similaridade foi abaixo de 50%), evidenciando mudanças nas populações dominantes no processo. O dendograma de similaridade relativo às análises de *fingerprint* do solo inicial S-03, lodo L2 e das lamas da betoneira B3 (Figuras 112B e 114) evidenciou que os perfis de bandas encontrados até 30 dias são altamente similares àqueles do lodo L2 (90% de similaridade), sendo que a diferenciação das populações dominantes vai aumentando após 60 e 100 dias (60% de similaridade), demonstrando possivelmente uma predominância das bactérias exógenas oriundas do Lodo L2 apenas durante os 30 dias iniciais do processo. Os perfis das bandas encontradas no solo S-03 apresentaram similaridade abaixo de 40% com os perfis das bandas de uma amostra de 60 dias e abaixo de 30% em relação às demais. Estes resultados indicam que as alterações encontradas após 60 dias de processo, remoções médias de 84% de plastificantes, refletem a seleção de novas populações

dominantes em relação às amostras de lodo e de solo inicial (remoções médias de 87% de plastificantes após 100 dias).

pb inicio 30d 60d 100d pb

0d; amostras iniciais 30d: amostras 30 dias
60d: amostras 60dias 100d: amostras 100 dias

pb S-03 L2 0d 30d 60d 100d pb

S-03:solo S-03 L2: lodo L2
0d; amostras iniciais 30d: amostras 30 dias
60d:amostras inicial 100d: amostras 100 dias

Figura 112A-Bandas DGGE da lama B3 Figura 112B-Bandas DGGE de S-03, L2 e B3

inicio1: lama inicial 1ªtriplicata inicio2: lama inicial 2ªtriplicata inicio3: lama inicial 3ªtriplicata
30d1: lama 30dias 1ªtriplicata 30d2: lama 30dias 2ªtriplicata 30d3: lama 30dias 3ªtriplicata
60d1: lama 60dias 1ªtriplicata 60d2: lama 60dias 2ªtriplicata 60d3: lama 60dias 3ªtriplicata
100d1: lama 100dias 1ªtriplicata 100d2: lama 100dias 2ªtriplicata 100d3: lama 100dias 3ªtriplicata

Figura 113 - Dendograma da lama da Betoneira B3

S-03:solo S-03 1ªtriplicata S-03:solo S-01 2ªtriplicata L2.1: lodo L02 1ªtriplicata L2.2: lodo L-02 2ªtriplicata inicio1: lama inicial 1ªtriplicata inicio2: lama inicial 2ªtriplicata 30d1: lama 30dias 1ªtriplicata 30d2: lama 30dias 2ªtriplicata 30d3: lama 30dias 3ªtriplicata 60d1: lama 60dias 1ªtriplicata 60d2: lama 60dias 2ªtriplicata a 100d1: lama 100dias 1ªtriplicata 100d2: lama 100dias 2ªtriplicata

Figura 114 - Árvore de similaridades solo inicial S-03, lodo L2 e lamas da Betoneira B3

Betoneira B4

As análises de *fingerprint* da comunidade total de bactérias das lamas da betoneira B4, monitoradas durante 100 dias (Figura 115A), bem como o respectivo dendograma de similaridade (Figura 116), revelaram uma alteração significativa nas populações dominantes após 30 e 100 dias, as quais apresentaram 60% e abaixo de 50% de similaridade, respectivamente, em relação ao início do processo. Os perfis das bandas presentes nas amostras de 30 e 60 dias, no entanto, apresentaram maior similaridade entre si (75%). Nesta betoneira, as remoções médias de plastificantes foram apenas 20% após 30 dias e 70%, após 100 dias. O dendograma de similaridade relativo às análises de *fingerprint* do solo inicial S-09, lodo L2 e das lamas da betoneira B4 (Figuras 115B e 117) evidenciou que os perfis de bandas encontrados após 30, 60 e 90 dias têm baixa similaridade com os perfis de bandas do lodo L2 (<60%), sendo que as bactérias exógenas, oriundas do Lodo 2, dominaram apenas na comunidade presente inicialmente na betoneira. Os perfis obtidos para o solo S-09 apresentaram similaridade abaixo de 30% em relação àqueles encontrados nas lamas da B4 durante todo o monitoramento.

0d: amostras iniciais 30d: amostras 30 dias
60d: amostras 60dias 100d: amostras 100 dias

Figura 115A-Bandas DGGE da lama B4

S-09:solo S-09 L2: Iodo L2
0d: amostras iniciais 30d: amostras 30 dias
60d:amostras inicial 100d: amostras 100 dias

Figura 115B-Bandas DGGE S-09, L2 e B4

inicio1: lama inicial 1ªtriplicata inicio2: lama inicial 2ªtriplicata inicio3: lama inicial 3ªtriplicata
30d1: lama 30dias 1ªtriplicata 30d2: lama 30dias 2ªtriplicata 30d3: lama 30dias 3ªtriplicata
60d1: lama 60dias 1ªtriplicata 60d2: lama 60dias 2ªtriplicata 60d3: lama 60dias 3ªtriplicata
100d1: lama 100dias 1ªtriplicata 100d2: lama 100dias 2ªtriplicata 100d3: lama 100dias 3ªtriplicata

Figura 116 - Dendograma da lama da Betoneira B4

S-09:solo S-09 1ªtriplicata S-09:solo S-01 2ªtriplicata L2.1: lodo L2 1ªtriplicata L2.2: lodo L2 2ªtriplicata inicio1: lama inicial 1ªtriplicata inicio2: lama inicial 2ªtriplicata 30d1: lama 30dias 1ªtriplicata 30d2: lama 30dias 2ªtriplicata 30d3: lama 30dias 3ªtriplicata 60d1: lama 60dias 1ªtriplicata 60d2: lama 60dias 2ªtriplicata a 100d1: lama 90dias 1ªtriplicata 100d2: lama 100dias 2ªtriplicata

Figura 117 - Árvore de similaridades solo inicial S-09, lodo L2 e lamas da Betoneira B4

Betoneira B-05

As análises de *fingerprint* da comunidade total de bactérias das lamas da betoneira B5, monitoradas durante 100 dias (Figura 118A), bem como o respectivo dendograma de similaridade (Figura 119), revelaram uma alteração significativa nas populações inicialmente presentes após 30, 60 e 90 dias, cujos perfis de bandas apresentaram similaridade menor que 60% com àqueles correspondentes ao início do processo. O dendograma de similaridade relativo às análises de *fingerprint* do solo inicial S-05, lodo L1 e das lamas da betoneira B5 (Figuras 118B e 120) evidenciou que os perfis de bandas encontradas no início do processo são altamente similares com aquelas do lodo L2 (75% de similaridade), sugerindo que as bactérias presentes no lodo correspondem às populações dominantes no instante inicial do processo. Após 30 dias, esta similaridade diminuiu (menor que 40%). Os perfis das bandas encontradas no solo S-05 apresentaram similaridade de 55% em relação aos das lamas da betoneira durante o monitoramento. Após 30 e 60 dias de processo, os perfis de bandas mostraram-se similares, sugerindo uma nova população dominante na betoneira, sendo as remoções médias de plastificantes de 89 e 90%, respectivamente. Depois de 100 dias, entretanto, a comunidade mostrou-se mais diferenciada, indicando a predominância de outras populações. Estas populações selecionadas após 100 dias revelaram maior capacidade de remoção média de plastificantes (95%).

pb inicio 30d 60d 100d pb

0d; amostras iniciais 30d: amostras 30 dias
60d: amostras 60dias 100d: amostras 100 dias

Figura 118A-Bandas DGGE da lama B5

pb S-05 L1 0d 30d 60d 100d pb

S-05:solo S-05 L1: lodo L1
0d: amostras iniciais 30d: amostras 30 dias
60d:amostras inicial 100d: amostras 100 dias

Figura 118B-Bandas DGGE S-05, L1 e B5

inicio1: lama inicial 1ªtriplicata inicio2: lama inicial 2ªtriplicata inicio3: lama inicial 3ªtriplicata
30d1: lama 30dias 1ªtriplicata 30d2: lama 30dias 2ªtriplicata 30d3: lama 30dias 3ªtriplicata
60d1: lama 60dias 1ªtriplicata 60d2: lama 60dias 2ªtriplicata 60d3: lama 60dias 3ªtriplicata
100d1: lama 100dias 1ªtriplicata 100d2: lama 100dias 2ªtriplicata 100d3: lama 100dias 3ªtriplicata

Figura 119 - Dendrograma da lama da Betoneira B5

S5.1:solo S-05 1ªtriplicata S5.2:solo S-05 2ªtriplicata L1.1: lodo L01 1ªtriplicata L1.2: lodo L-01 2ªtriplicata inicio1: lama inicial 1ªtriplicata inicio2: lama inicial 2ªtriplicata 30d1: lama 30dias 1ªtriplicata 30d2: lama 30dias 2ªtriplicata 30d3: lama 30dias 3ªtriplicata 60d1: lama 60dias 1ªtriplicata 60d2: lama 60dias 2ªtriplicata a 100d1: lama 90dias 1ªtriplicata 100d2: lama 100dias 2ªtriplicata

Figura 120 - Árvore de similaridades solo inicial S-05, lodo L1 e lamas da Betoneira B5

Betoneira B6

As análises de *fingerprint* da comunidade total de bactérias das lamas da betoneira B6, monitoradas durante 100 dias (Figura 121A), bem como o respectivo dendograma de similaridade (Figura 122), revelaram uma alteração significativa nas populações após 60 e 90 dias, cujos perfis de bandas apresentaram similaridade menor do que 50% em relação aos do início do processo. O dendograma de similaridade relativo às análises de *fingerprint* do solo inicial S-06, lodo L1 e L3 e das lamas da betoneira B6 (Figuras 121B e 123) evidenciou que os perfis de bandas encontradas no início do processo têm similaridade de 62% com os perfis das bandas do lodo L2, sugerindo que as bactérias presentes no lodo corresponderam às populações inicialmente dominantes. Os perfis das bandas encontradas no solo S-06 apresentaram similaridade abaixo de 40% em relação àquelas encontradas nas lamas da B6 durante todo o monitoramento, sugerindo que as bactérias indígenas não corresponderam às populações dominantes na betoneira. Após 60 e 100 dias de processo, os perfis de bandas encontradas sugerem uma comunidade diferenciada no reator, contendo populações do solo e lodo, com remoções médias de 65% e 81% de plastificantes, respectivamente.

0d; amostras iniciais 30d: amostras 30 dias
60d: amostras 60dias 100d: amostras 100 dias

S-06:solo S-06 L1: lodo L1 L3:Lodo L3
0d: amostras iniciais 30d: amostras 30 dias
60d:amostras inicial 100d: amostras 100 dias

Figura 121A-Bandas DGGE lama B6

Figura 121B-Bandas DGGE S-06, L1/3 e B6

inicio1: lama inicial 1ªtriplicata inicio2: lama inicial 2ªtriplicata inicio3: lama inicial 3ªtriplicata
30d1: lama 30dias 1ªtriplicata 30d2: lama 30dias 2ªtriplicata 30d3: lama 30dias 3ªtriplicata
60d1: lama 60dias 1ªtriplicata 60d2: lama 60dias 2ªtriplicata 60d3: lama 60dias 3ªtriplicata
100d1: lama 100dias 1ªtriplicata 100d2: lama 100dias 2ªtriplicata 100d3: lama 100dias 3ªtriplicata

Figura 122 - Dendograma da lama da Betoneira B6

S-06:solo S-06 1ªtriplicata S-06:solo S-06 2ªtriplicata L1.1: lodo L-01 1ªtriplicata L3.1: lodo L-03 1ªtriplicata início1: lama inicial 1ªtriplicata início2: lama inicial 2ªtriplicata 30d1: lama 30dias 1ªtriplicata 30d2: lama 30dias 2ªtriplicata 30d3: lama 30dias 3ªtriplicata 60d1: lama 60dias 1ªtriplicata 60d2: lama 60dias 2ªtriplicata a 100d1: lama 90dias 1ªtriplicata 100d2: lama 100dias 2ªtriplicata

Figura 123 - Árvore de similaridades solo inicial S-06, lodo L1 e lamas da Betoneira B6

Betoneira B7

As análises de *fingerprint* da comunidade total de bactérias das lamas da betoneira B7, monitoradas durante 100 dias (Figura 124A), bem como o respectivo dendograma de similaridade, revelaram uma alteração significativa na estrutura das populações inicialmente presentes (Figura 125), sendo a similaridade abaixo de 50% dos perfis das bandas iniciais com aquelas encontradas após 60 e 100 dias, evidenciando claras mudanças nas populações dominantes no processo. Apenas uma das replicatas da lama da betoneira do início do processo é que mostrou um perfil diferente e se agrupou com replicatas de 90 dias. O dendograma de similaridades relativo às análises de *fingerprint* do solo inicial S-07, lodo L1 e das lamas da betoneira B7 (Figura 124B e 126), evidenciou que os perfis de bandas verificados no início do processo têm similaridade de 88% a 92% com os perfis das bandas do lodo L1, diminuindo para 75% após 30 dias, sugerindo que as bactérias presentes no lodo correspondem às populações dominantes no instante inicial do processo, alterando-se mais acentuadamente após 60 dias (similaridade menor 40%). Os perfis das bandas encontradas no solo S-07 apresentaram 52% de similaridade em relação àqueles verificados para as lamas da B7 de 60 e 100 dias, e menor que 40% em relação às amostras do início do processo e de 30 dias. As populações selecionadas no reator após 60 dias de processo apresentaram remoções médias de 94% de plastificantes.

Analisando especificamente os perfis de bandas da B7, pode-se sugerir que as populações presentes no final do processo e que correspondem aos perfis mais diferenciados são na verdade uma mistura de populações encontradas no lodo L1 e no solo inicial S-07, no entanto, para tal confirmação seriam necessárias excisão das bandas e sequenciamento das mesmas para a subsequente identificação das bactérias correspondentes.

pb início 30d 60d 100d pb

0d: amostras iniciais 30d: amostras 30 dias
60d: amostras 60dias 100d: amostras 100 dias

pb S-01 L1 0d 30d 60d 100d pb

S-07:solo S-07 L1: lodo L1
0d: amostras iniciais 30d: amostras 30 dias
60d:amostras inicial 100d: amostras 100 dias

Figura 124A-Bandas DGGE da lama B7

Figura 124B-Bandas DGGE S-07, L/3 e B7

início1: lama inicial 1ªtriplicata início2: lama inicial 2ªtriplicata início3: lama inicial 3ªtriplicata
30d1: lama 30dias 1ªtriplicata 30d2: lama 30dias 2ªtriplicata 30d3: lama 30dias 3ªtriplicata
60d1: lama 60dias 1ªtriplicata 60d2: lama 60dias 2ªtriplicata 60d3: lama 60dias 3ªtriplicata
100d1: lama 100dias 1ªtriplicata 100d2: lama 100dias 2ªtriplicata 100d3: lama 100dias 3ªtriplicata

Figura 125 - Dendograma da lama da Betoneira B7

1ªtriplicata início1: lama inicial 1ªtriplicata início2: lama inicial 2ªtriplicata 30d1: lama 30dias
 1ªtriplicata 30d2: lama 30dias 2ªtriplicata 30d3: lama 30dias 3ªtriplicata 60d1: lama 60dias
 1ªtriplicata 60d2: lama 60dias 2ªtriplicata a 100d1: lama 90dias 1ªtriplicata 100d2: lama
 100dias 2ªtriplicata

Figura 126 - Árvore de similaridades solo inicial S-07, lodo L1 e lamas da Betoneira B7

Betoneira B8

As análises de *fingerprint* da comunidade total de bactérias das lamas da betoneira B8, monitoradas durante 100 dias de processo (Figura 127A), bem como o respectivo dendograma de similaridade (Figura 128), revelaram uma alteração significativa nas populações dominantes inicialmente presentes. Estas apresentaram perfis de bandas com menos de 70% de similaridade com relação às populações encontradas após 30 e 60 dias processo, e 60% de similaridade com relação àquelas verificadas após 100 dias. O dendograma de similaridade relativo às análises de *fingerprint* do solo inicial S-10, lodo L1 e das lamas da betoneira B8 (Figuras 127B e 129) evidenciou baixa similaridade do lodo L1 com os perfis de bandas encontradas durante o monitoramento do reator (menor que 20%), sugerindo que as bactérias presentes no lodo não corresponderam às populações dominantes no processo. Os perfis das bandas encontradas no solo S-10 apresentaram similaridade baixa (menor que 40%) com os perfis das bandas das lamas da B8 e somente após 100 dias apresentaram 60% de similaridade, sugerindo que as bactérias indígenas do solo corresponderam às populações dominantes na betoneira. Observou-se que as bactérias inicialmente presentes possivelmente dominaram a

comunidade da betoneira até 60 dias e removeram 51% de plastificantes, alterando-se mais acentuadamente após 100 dias de processo e atingindo 72% de remoção dos plastificantes.

pb inicio 30d 60d 100d pb pb S-10 L1 1d 30d 60d 100d pb

0d; amostras iniciais 30d: amostras 30 dias
60d: amostras 60dias 100d: amostras 100 dias

S-10:solo S-10 L1: lodo L1
0d: amostras iniciais 30d: amostras 30 dias
60d:amostras inicial 100d: amostras 100 dias

Figura 127A-Bandas DGGE lama B8

Figura 127B-Bandas DGGE S-10, L1/3 e B8

inicio1: lama inicial 1ªtriplicata inicio2: lama inicial 2ªtriplicata inicio3: lama inicial 3ªtriplicata
30d1: lama 30dias 1ªtriplicata 30d2: lama 30dias 2ªtriplicata 30d3: lama 30dias 3ªtriplicata
60d1: lama 60dias 1ªtriplicata 60d2: lama 60dias 2ªtriplicata 60d3: lama 60dias 3ªtriplicata
100d1: lama 100dias 1ªtriplicata 100d2: lama 100dias 2ªtriplicata 100d3: lama 100dias 3ªtriplicata

Figura 128 - Dendograma da lama da Betoneira B8

1ªtriplicata inicio1: lama inicial 1ªtriplicata inicio2: lama inicial 2ªtriplicata 30d1: lama 30dias 1ªtriplicata 30d2: lama 30dias 2ªtriplicata 30d3: lama 30dias 3ªtriplicata 60d1: lama 60dias 1ªtriplicata 60d2: lama 60dias 2ªtriplicata a 100d1: lama 90dias 1ªtriplicata 100d2: lama 100dias 2ªtriplicata

Figura 129 - Árvore de similaridades solo inicial S-10, lodo L1 e lamas da Betoneira B8

Verificando os resultados apresentados pelas betoneiras B1 a B8, observa-se que as bactérias presentes no lodo foram dominantes no início do processo, alterando-se a dominância para as bactérias provenientes do solo entre 30 e 60 dias. Porém, os perfis de bandas obtidos levam a supor que após 100 dias de processo, quando ocorre uma diferenciação maior das populações em relação ao tempo inicial, a comunidade na verdade é composta por algumas populações dominantes provenientes do lodo e outras do solo.

Olaniram et al. (2007) verificaram as alterações na diversidade da comunidade indígena em um solo contaminado com cis-dicloroetano e trans-dicloroetano durante a biodegradação, utilizando culturas enriquecidas de águas residuárias. Empregando o gene 16S r RNA e PCR-DGGE, os autores identificaram uma alteração na estrutura inicial da comunidade e uma estabilização após 10 dias de degradação. Sequenciando o DNA e procedendo a análises filogenética das bandas selecionadas no DGGE, os autores identificaram as bactérias presentes nas população dominantes: *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Comamonas* e *Arthrobacter sp.*

As bactérias exógenas advindas do lodo foram primordiais no início do processo, confirmando os resultados obtidos nos Ensaio Preliminares e Confirmatórios. Não foram observadas eficiências na biodegradação dos contaminantes utilizando apenas bactérias indígenas. Estas bactérias exógenas já adaptadas aos referidos compostos, porém em concentrações menores (até 50 vezes) podem ter sido possivelmente responsáveis por funções essenciais no início da rota metabólica de biodegradação, não presentes nas bactérias indígenas do solo, no entanto, esta suposição não pode ser confirmada neste estudo.

Verificando as curvas de degradação dos compostos, observa-se que a redução dos teores iniciais foi imediata e dentre os metabólitos esperados (monoésteres ou os respectivos ácidos ftálicos e adípicos), foi identificado o MEHP nas análises de varredura até 30 dias nas betoneiras B3, B5 e B8; além de alguns compostos indicativos da biodegradação final, tais como acetatos e piruvatos, após 100 dias.

Análises de varredura dos compostos da biorremediação

As análises de varredura foram efetuadas a cada 30 dias, para todas as betoneiras. As amostras foram extraídas com diclorometano, acetona e hexano e analisadas utilizando cromatografia gasosa e espectrometria de massa. A partir do cromatograma, foram obtidos os espectros de massa dos compostos relativos a cada pico. A Figura 130 contém um cromatograma típico e o espectro de um composto correspondente a um pico. O composto com a maior probabilidade foi escolhido (Figura 131) e avaliado se este correspondia ao espectro obtido. Este procedimento foi empregado para todos os resultados obtidos dos ensaios com as betoneiras. Compostos de elevado peso molecular (acima do plastificante mais pesado considerado no presente estudo, o diisotrideciltalato) não puderam ser identificados por cromatografia gasosa, apresentando tempos de retenção acima de 50,00 minutos.

Acrobat Reader - [EXEMPLO ESPECTRO DOP.pdf]

File Edit Document Tools View Window Help

169%

Bookmarks

Thumbnails

Data: 20404.CG.D01
Mass Peak #: 45 Ret. Time: 37.317
Scan #: 4227
Base Peak #: 149.05 (253172)

<Hit List>

No	SI	Mol.Wgt.	Mol.Form./Compound Name	CAS No.	Entry	LIB#
1	94	390	C ₂₄ H ₃₈ O ₄ Di-n-octyl phthalate	117-84-0	20149	2
2	94	390	C ₂₄ H ₃₈ O ₄ 1,2-Benzenedicarboxylic acid, dioctyl ester (CAS) Dinopol NOP Polycizer 162 n-octyl phthalate Di-n-octyl phthalate Dioctyl o-benzenedicarboxylate Phthalic acid, dioctyl ester 1,2-Benzenedicarboxylic acid, dioctyl ester Dioctyl o-phthalate Di-(n-octyl)phthalate DI-N-OCTYL-PHTHALATE	117-84-0	190624	4
3	92	390	C ₂₄ H ₃₈ O ₄ 1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester Diisooctyl phthalate Hexaplas M/O Isooctyl phthalate	27554-26-3	91606	1
4	91	390	C ₂₄ H ₃₈ O ₄ 1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester (CAS) Bis(2-ethylhexyl) phthalate DOP DEHP DOP DNOP Octoil Fleximel Sicol 150 Eviplast 81 Staflex DOP Eviplast 80 VestinolAH Truflex DOP Bisoflex81 Witcizer 312 Kodaflex DOP Palatinol AH Compound 889 Vinicizer 80 Pittsburgh PX-138 Ethylhexyl phthalate Diethylhexyl phthalate 2-Ethylhexyl phthalate Di(Ethylhexyl) phthalate Di-(2-Ethylhexyl)-phthalate Phthalic acid dioctyl ester	117-81-7	190634	4
5	89	390	C ₂₄ H ₃₈ O ₄ 1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester (CAS) Bis(2-ethylhexyl) phthalate DOP DEHP DOP DNOP Octoil Fleximel Sicol 150 Eviplast 81 Staflex DOP Eviplast 80 VestinolAH Truflex DOP Bisoflex81 Witcizer 312 Kodaflex DOP Palatinol AH Compound 889 Vinicizer 80 Pittsburgh PX-138 Ethylhexyl phthalate Diethylhexyl phthalate 2-Ethylhexyl phthalate Di(Ethylhexyl) phthalate Di-(2-Ethylhexyl)-phthalate Phthalic acid dioctyl ester	117-81-7	190632	4
6	89	390	C ₂₄ H ₃₈ O ₄ 1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester (CAS) Bis(2-ethylhexyl) phthalate DOP DEHP DOP DNOP Octoil Fleximel Sicol 150 Eviplast 81 Staflex DOP Eviplast 80 VestinolAH Truflex DOP Bisoflex81 Witcizer 312 Kodaflex DOP Palatinol AH Compound 889 Vinicizer 80 Pittsburgh PX-138 Ethylhexyl phthalate Diethylhexyl phthalate 2-Ethylhexyl phthalate Di(Ethylhexyl) phthalate Di-(2-Ethylhexyl)-phthalate Phthalic acid dioctyl ester	117-84-0	190628	4

1 of 2 7.92 x 10,86 in

SOLO 01 Tese FORMATO FINAL ... 4 NTVDM.EXE Exemplo espectro DOP Acrobat Reader - [E...

Figura 131 - Lista de probabilidade de compostos relativos ao pico selecionado

Solo 1

O cromatograma da amostra do solo inicial S-01, extraída com solvente diclorometano (DCM), e a identificação dos compostos presentes estão mostrados na Figura 132.

Identificação Compostos

1	2 metil butano	10	2-butiloctanol
2	2,2-dimetil butano	11	DEHP
3	DIBP	12	triacontano
4	2,7 dimentil octano	13	Eicosano
5	2,9 dimentil decano	14	9-octadecenoamida
6	DIAP	15	2-oxo metil ester ácido octadecanoico
7	nonadecano	16	1-hexacosanol
8	2,3,3 – trimetil octano	17	octadecil vinil éter
9	pentacosano		

Figura 132 - Cromatograma da amostra do solo inicial S-01 (DCM)

O cromatograma da amostra do solo inicial S-01, extraída com solventes acetona-hexano (ACE-HEX), e a identificação dos compostos presentes estão ilustrados na Figura 133.

Identificação Compostos

1	aliléster do ácido isobutírico	3	etil 2-butilhexanoato
2	etil éster do ácido decanoico	4	DEHP
		5	DIDP

Figura 133 - Cromatograma da amostra do solo inicial S-01 (ACE-HEX)

Não foram detectados compostos orgânicos voláteis na amostra de solo inicial S-01 por *headspace* e cromatografia gasosa- espectrometria de massa.

Betoneira B1

Os cromatogramas das amostras da betoneira B1, extraídas com solvente diclorometano (DCM), e a identificação dos compostos presentes ao longo do monitoramento, estão indicados na Figura 134.

Identificação Compostos

1	n-heptano	5	3,5-dimetiloctano
2	2,2- dimetilbutano	6	2-metil undecano
3	1-metilbutilnitrito	7	9-octadecenoamida
4	2-propildecanol-1	8	2,4,6-trimetil-1-noneno

Identificação Compostos

1	4,5-dimetil-dioxano	5	2-metilheptano
2	2-etilbutanol	6	DEHP
3	1-heptanal	7	hexadecanal (aldeído palmítico)
4	2,3-dimetilhexano	8	2,4,6 trimetil-1-noneno

Figura 134 – Cromatogramas das amostras da betoneira B1 (DCM)

Identificação Compostos

1 3,3-dimetil-2-butanona **2** 2,4,6-trimetil-1-noneno

Identificação Compostos

1 2-propenil éster do ácido acético **3** 2,4,6 trimetil-1-noneno
2 Isobutil éster ácido nitroso

Figura 134 – Cromatogramas das amostras da betoneira B1 (DCM) - continuação

Identificação Compostos

- 1** 2-etil hexil éster do ácido octanóico

Figura 134 – Cromatogramas das amostras da betoneira B1 (DCM) - continuação

Os cromatogramas das amostras da betoneira B1, extraídas com solventes acetona-hexano(ACE-HEX), e a identificação dos compostos presentes ao longo do monitoramento, está mostrado na Figura 135.

Identificação Compostos

1	2,3-dimetilhexano	3	2,4,6,8-tetrametil-1-undeceno
2	DEHP	4	oxo-bis-2-metil propil ester do ácido propanodioico

Figura 135 – Cromatogramas das amostras da betoneira B1 (ACE-HEX)

Identificação Compostos

1	2,4,4-trimetil-2-pentenol-1	3	isopropil-2,2-difluordecanoato
2	2,4,6-trimetil-1noneno

Identificação Compostos

1	dialilcarbonato	5	1,2-propeniloxiheptano
2	isobutilésterácidonitroso	6	2,4,4-trimetil-1-noneno
3	alilésterácidobutirico	7	2,4,6,8 - tetrametil-1-undeceno
4	1-n-butoxi-3-metil-oxirano		

Figura 135 – Cromatogramas das amostras da betoneira B1 (ACE-HEX) - continuação

Identificação Compostos

1	3,5-dimetiloctano	2	2,4,4-trimetil-1-noneno
		3	2,4,4-trimetil-2-pentenol-1

Identificação Compostos

1	Isooctanol	2	3,5-dimetiloctano
----------	------------	----------	-------------------

Figura 135 – Cromatogramas das amostras da betoneira B1 (ACE-HEX) - continuação

Análises de varredura do solo S-02 e Betoneira B2

Solo S-02

O cromatograma da amostra do solo inicial S-02, extraída com solvente diclorometano (DCM), e a identificação dos compostos presentes, está mostrado na Figura 136.

Identificação Compostos

1	4-metil - ácido octanóico	4	DEHP
2	DIBP	5	9-octadecenoamida
3	DIAP	6	DIDP

Figura 136 – Cromatograma da amostra do solo inicial S-02 (DCM)

O cromatograma da amostra do solo inicial S-02, extraída com solventes acetona-hexano(ACE-HEX), e a identificação dos compostos presentes, está ilustrado na Figura 137.

Identificação Compostos

1	4- metil deceno	5	Isooctilviniléter
2	DIBP	6	DEHP
3	DIAP	7	DINP
4	Di-isobutilbenzeno-1,2- dicarboxilato	8	DIDP

Figura 137 – Cromatograma da amostra de solo inicial S-02 (ACE-HEX)

Não foram detectados compostos orgânicos voláteis na amostra do solo S-02 por *headspace* e cromatografia gasosa- espectrometria de massa.

Betoneira B2

Os cromatogramas das amostras da betoneira B-02, extraídas com solvente diclorometano(DCM), e a identificação dos compostos presentes ao longo do monitoramento, está mostrado na Figura 138.

Identificação Compostos

1	4-metil-ácido pentanóico	6	DIAP
2	4-metil- ácido octanóico	7	2,3 dimetilhexano
3	4,5-dimetil-1,3-dioxano	8	3,5 dimetil octano
4	DIBP	9	DEHP
5	2,4-dimetil -1-hepteno	10	DIDP

Identificação Compostos

1	4,5-dimetil-1,3-dioxano	6	DEHP
2	3-metil-2-heptanol	7	DINP
3	DIBP	8	DIDP
4	BOP		
5	DIAP		

Figura 138 – Cromatogramas das amostras da betoneira B2 (DCM)

Identificação Compostos

1	2,4 transdimetil oxitano	4	DEHP
2	Isopentano	5	2-metil heptadecano
3	3 metil hexano	6	Dihidroxiisobutilester ácido malônico

Identificação Compostos

1	Isooctiolviniléter	2	Isodecano
----------	--------------------	----------	-----------

Figura 138 – Cromatogramas das amostras da betoneira B2 (DCM) - continuação

Identificação Compostos

1	Éster 2-etil hexil octanóico	3	2,4,6 trimetil noneno
2	Isooctiolviniléter	4	2,4,4,trimetil-2-pentenol 1

Identificação Compostos

1	1-hexil acetileno	5	DIDP
2	1-propeniléster ácido carbônico	6	2-octil dodecanol-1
3	DEHP	7	terc-butil-5-metil-1,3dioxolano-4-do ácido carboxílico
4	4,8 dimetil -3,7-nodieniltio acetato		

Figura 138 – Cromatogramas das amostras da betoneira B2 (DCM) - continuação

Os cromatogramas das amostras da betoneira B-02, extraídas com solvente acetona-hexano(ACE-HEX) e a identificação dos compostos presentes ao longo do monitoramento, está mostrado na Figura 139.

Identificação Compostos

1	4-metil deceno	4	DEHP
2	2 butil-1-octanol	5	DINP
3	1-eteniloxioctadecano	6	DIDP

Identificação Compostos

1	1 heptanol	3	DEHP
2	Isooctano	4	DIDP

Figura 139 – Cromatogramas das amostras da betoneira B2 (ACE-HEX)

Identificação Compostos

1	2,3 dimetil butano	8	Nonano
2	Isobutilcianato	9	DEHP
3	2 metil-4-pentanal	10	1,2- propenil-oxi-heptano
4	2,4 dimetil- 1- hepteno	11	3,5 dimetil octano
5	2,2- dimetil butano	12	o-decilhidroxiamina
6	Isopentano	13	1,3-epoxi-4-metil-pentano
7	3-metil hexano	14	2-metil-1-undecano

Identificação Compostos

1	2-etil hexil ester do ácido etanóico	3	1,2 propemiloxiheptano
2	DEHP	4	2,4,6,8,tetrametilundecano

Figura 139 – Cromatogramas das amostras da betoneira B2 (ACE-HEX) - continuação

Identificação Compostos

1	2-etil hexil éster do ácido etanóico	3	1,2 propenil oxi heptano
2	DEHP	4	2,4,6,8-tetrametil undecano

Identificação Compostos

1	isooctil vinil éter	3	DINP
2	DEHP	4	DIDP

Figura 139 – Cromatogramas das amostras da betoneira B2 (ACE-HEX) - continuação

Análises varredura Solo S-03 e Betoneira B-03

Solo 3

Analizando o cromatograma e os espectros de massa do solo inicial S-03, obtidos pela extração das amostras com solvente diclorometano(DCM) e cromatografia gasosa-espectrometria de massa, foram identificados (Figura 140):

Identificação Compostos

1	Acido 4- metil octanóico	7	nonadecano
2	Ácido decanóico	8	DnOP
3	Eteniloxiisotano	9	DEHP
4	DIBP	10	DIDP
5	2 butil-1- octanol	11	DUP
6	DIAP		

Figura 140 – Cromatograma da amostra do solo inicial S-03 (DCM)

A Figura 127 mostra o cromatograma e a identificação dos compostos presentes em amostra de solo inicial S-03, extraída com solventes acetona-hexano (Figura 141).

Identificação Compostos

1	DIBP	4	DEHP
2	DIAP	5	DIDP
3	2-etilhexil éster ácido octanóico		

Figura 141 – Cromatograma da amostra do solo inicial S-03 (ACE-HEX)

Não foram detectados compostos orgânicos voláteis na amostra do solo S-03 por *headspace* e cromatografia gasosa- espectrometria de massa.

Betoneira B3

Os cromatogramas das amostras da betoneira B3, extraídas com solvente diclorometano(DCM), e a identificação dos compostos presentes ao longo do monitoramento, estão indicados na Figura 142.

Identificação Compostos

1	4-metil-ácido pentanóico	7	decano
2	ácido decanóico	8	isooctanol
3	5-etil-2-heptanol	9	DEHP
4	DIBP	10	2,4,6-trimetil-1-noneno
5	isooctilviniléter	11	Isodecano
6	DIAP

Identificação Compostos

1	4-metil-ácido octanóico	8	MEHP
2	ácido decanoico	9	3,7-dimetil-1-octanol
3	5-etil-2-heptanol	10	DEHP
4	5-etil-2-heptanol	11	DINP
5	DIBP	12	DIDP
6	DCHP	13	propil éster do ácido oleico
7	2-etil hexil éster do ácido butanoico		

Figura 142 – Cromatogramas da amostra da betoneira B3 (DCM)

Identificação Compostos

1	2-metoxi-2-metilpropano	5	Isobutanonitrila
2	2,4-dimetil-transoxitano	6	DEHP
3	di-2-propenil éster do ácido carbônico	7	2,4,6 trimetil-1-noneno
4	2-nitropropano	8	2,4,6,8 tetrametil-1-undeceno

Identificação Compostos

1	etenona	5	Isobutil éster do ácido nitroso
2	propeno	6	1-nitropropano
3	1-deceno	7	dibutil éster do ácido etanodióico

Figura 142 – Cromatogramas da amostra da betoneira B3 (DCM) - continuação

Identificação Compostos

1	Isobutano	4	isobutil éster ácido nitroso
2	2-nitropropano	5	2-etilhexanol
3	3 metil butanonitrila	6	2,4,6 trimetil-1- noneno

Identificação Compostos

1	2-etil hexil éster do ácido pirúvico	4	DEHP
2	etanal acetaldéido	5	DIDP
3	di-2-etil hexil éster do ácido adípico		

Figura 142 – Cromatogramas da amostra da betoneira B3 (DCM) - continuação

Os resultados obtidos com a extração das amostras da betoneira B3 com acetona e hexano (ACE-HEX), cromatografia e espectrometria de massa, são mostrados na Figura 143.

Identificação Compostos

1	Ácido 2-etil hexanóico	8	DIAP
2	Ácido decanóico	9	BOP
3	2-metil-1-octanol	10	DOA
4	2-etilhexilésterácido octanóico	11	DEHP
5	3,7-dimetil-1-octanol	12	DINP
6	2-etilhexilésterácido decanóico	13	DIDP
7	DIBP

Identificação Compostos

1	Ácido isobutírico	6	2,4-dimetil-1-heptano
2	1-undeceno	7	3,5 dimetiloctano
3	3,3dimetil-2-butanona	8	DEHP
4	2-metilpentanol	9	4-metil-1-deceno
5	di-2-propenil ftalato	10	DIDP

Figura 143 – Cromatogramas da amostra da betoneira B3 (ACE-HEX)

Identificação Compostos

1	heptil hidroperóxido	4	DEHP
2	2,4,4-trimetil-2- pentenol-1	5	2,4,6-trimetil- 1-noneno
3	1-(2-propeniloxi)heptano	6	o-decilhidroxiamina

Identificação Compostos

1	Heptil hidroperóxido	5	1-(2-propeniloxi)heptano
2	3,3-dimetil-2-butanona	6	DEHP
3	2,4-dimetil-1-hepteno	7	2,4,6 trimetil-1-noneno
4	2,4,4-trimetil-2- pentenol-1	8	o-decil hidroxiamina

Figura 143 – Cromatogramas da amostra da betoneira B3 (ACE-HEX) - continuação

Identificação Compostos

1	ácido isobutirico	5	1,5 dimetil hexil acetato
2	oxobutil éster ácido acético	6	DEHP
3	metil-(2-vinil etil)carbinol	7	3,5-dimetiloctano
4	2-metil anidrido do ácido propanóico	8	o-decilhidroxiamina

Identificação Compostos

1	DnOP	3	DINP
2	DEHP	4	DIDP

Figura 143 – Cromatogramas da amostra da betoneira B3 (ACE-HEX) - continuação

Análises de varredura do Solo S-09 e Betoneira B4

Solo S-09

Com a extração da amostra do solo inicial S-09 com solvente diclorometano(DCM), cromatografia gasosa e espectrometria de massa, foram identificados (Figura 144):

Identificação Compostos

1	Ácido 4-metil octanóico	8	DBP
2	Ácido decanóico	9	DIAP
3	2-etil1-hexanol	10	di-2-propenilftalato
4	2-etil1-hexil éster ácido octanoico	11	Isooctilviniléter
5	Isoamilbenzoato	12	DEHP
6	4-metil-2-propil-1-pentanol	13	5,9-dimetil-1-decanol
7	DIBP	14	2,4,6-trimetil-1-noneno

Figura 144 – Cromatogramas da amostra do solo inicial S-09 (DCM)

A amostra de solo inicial S-09, submetida à extração com acetona-hexano, cromatografia gasosa e espectrometria de massa, gerou como resultado o ilustrado na Figura 145.

Figura 145 - Cromatogramas da amostra do solo inicial S-09 (ACE-HEX)

Não foram detectados compostos orgânicos voláteis na amostra do solo S-09 por *headspace* e cromatografia gasosa- espectrometria de massa.

Betoneira B4

A Figura 146 mostra os resultados obtidos com a extração das amostras da betoneira B4 com o solvente diclorometano, cromatografia gasosa e espectrometria de massa.

Identificação Compostos

1	Ácido decanóico	7	DIAP
2	4,5-dimetil-1,3-dioxano	8	2,7 dimetiloctano
3	2-metil-3-butil-cis-oxirano	9	2,4-dimetil-1-hepteno
4	1-metil-hexilhidroperóxido	10	DEHP
5	DIBP	11	3-metil-1-hexano
6	DBP	12	2,4,6-trimetil-1-noneno

Figura 146 – Cromatogramas da amostra da betoneira B4 (DCM)

Identificação Compostos

1	Ácido decanóico	9	Isoamil decanoato
2 e 3	4,5-dimetil-1,3-dioxano	10	2-butil-1-octanol
4	2-metil-3-butil-cis-oxirano	11	3-etil-1-octeno
5	DIBP	12	DEHP
6	diciclohexilftalato	13	DIDP
7	metil-9-octadecaeno	14	ácido octadecanóico
8	isooctano	15	propil éster ácido oleico

Identificação Compostos

1	Isooctanol	3	isopropil-2,2-difluordecanoato
2	2-metil-1-dodecanol		

Figura 146 – Cromatogramas da amostra da betoneira B4 (DCM) - continuação

Identificação Compostos

1	1- nitropropano	4	1-(2-propeniloxiheptano)
2	2-metil-propil do ácido nitroso	5	isopropil-2,2-difluordecanoato
3	isooctanol

Identificação Compostos

1	acetonitrila	3	Oxo-butil ester ácido acético
2	3,5,5,triemtil-1-hexeno		

Figura 146 – Cromatogramas da amostra da betoneira B4 (DCM) - continuação

A Figura 147 mostra os resultados obtidos submetendo-se as amostras da betoneira B4 à extração com acetona e hexano(ACE-HEX), cromatografia gasosa e espectrometria de massa.

Identificação Compostos

1	Ácido 4-metiloctanóico	6	Isooctanol
2	4,5-dimetil-1,3-dioxano	7	Octil éster do ácido 10-undecenóico
3	DHP	8	DEHP
4	1-bromo-6-metil heptano	9	DIDP
5	di-amiléter

Identificação Compostos

1	1-nitropropano	4	DEHP
2	Isobutanol	5	2,4,6,8 tetrametil undeceno
3	Isobutil éster do ácido nitroso		

Figura 147 – Cromatogramas da amostra da betoneira B4 (ACE-HEX)

Identificação Compostos

1	2,4 dimetiloxitano	4	2,4,4-trimetil-2-pentenol-1
2	1-nitropropano	5	DEHP
3	Alil ester do ácido isobutirico	6	2,4,6,8 tetrametil-1-undeceno

Identificação Compostos

1	2-nitropropano	5	4-metil-1-penteno
2	3,3-dimetil-2-butanona	6	n-nonano
3	2-metil anidrido do ácido propanoico	7	DEHP
4	isocianobutano	8	2,4,6,8 tetrametil-1-undeceno

Figura 147 – Cromatogramas da amostra da betoneira B4 (ACE-HEX) - continuação

Identificação Compostos

1	Acetonitrila	4	Isobutanonitrila
2	2-nitropropano	5	2-etil-1-hexanol
3	Isobutil ester do ácido nitroso	6	2,4,6,8 tetrametil-1-undeceno

Figura 147 – Cromatogramas da amostra da betoneira B4 (ACE-HEX) - continuação

Análises de varredura do Solo S-05 e Betoneira B5

Solo S-05

Após análise do cromatograma e dos espectros de massa do solo inicial S-05, obtidos através da cromatografia gasosa–espectrometria de massa de amostras extraídas com solvente diclorometano(DCM), identificaram-se os seguintes compostos (Figura 148):

Identificação Compostos

1	2-etil hexanol	10	2-etilhexil ester ácido decanóico
2	trideceno	11	DIBP
3	ácido 2-etil hexanóico	12	BIDP
4	Acido 4- metil octanóico	13	DIAP
5	pentil éster ácido benzóico	14	BOP
6	ácido decanóico	15	DnOP
7	3,4-dimetil-1-deceno	16	DOA
8	2-etil hexil-2-etilhexanoato	17	DEHP
9	2-octil benzoato	18	DINP
		19	DIDP

Figura 148 – Cromatograma e identificação dos compostos presentes na amostra de solo inicial S-05, extraída com DCM

A Figura 149A mostra os resultados obtidos com a cromatografia gasosa-espectrometria de massa da amostra do solo inicial S-05, extraída com acetona-hexano e a Figura 149B mostra os resultados obtidos por análises de *Head space*, cromatografia gasosa e espectrometria de massa.

Identificação Compostos

1	ácido 2-etil hexanóico	8	DIAP
2	4- metil-1-deceno	9	DnOP
3	2-etilhexil ester do ácido octanóico	10	Diisobutilbenzeno-1,2-dicarboxilato
4	5-metil-1-hepteno	11	1-clorotetradecano
5	2-etilhexil ester ácido decanóico	12	DEHP
6	DIBP	13	DINP
7	BOP	14	DIDP

Identificação Compostos

1	3,5-propilciclopropano	4	1-nitro propano
2	1 Bromo -2-metil propano	5	heptil ester do acido propanoico
3	2,3 dimetil hexano		

Figura 149 A/B – Cromatograma e identificação de compostos presentes na amostra de solo inicial S-05, extraída com ACE-HEX e por *Head space* (HSS)

Betoneira B5

As amostras de lama da betoneira B5, retiradas no início, após 30, 60, 90 e 100 dias, foram extraídas com diclorometano (DCM) e submetidas à cromatografia gasosa-espectrometria de massa. Os resultados são mostrados na Figura 150.

Identificação Compostos

1	ácido 2-etil hexanóico	9	DIAP
2	Acido 4- metil octanóico	10	BOP
3	4-metil-1-deceno	11	DnOP
4	2-etil hexil-2-etilhexanoato	12	DOA
5	2-octil benzoato	13	DEHP
6	2-etilhexil ester ácido decanóico	14	DINP
7	DIBP	15	DIDP
8	BIDP		

Figura 150 – Cromatogramas e identificação dos compostos presentes na amostra da betoneira B5 (DCM)

Identificação Compostos

1	ácido 2-etil hexanóico	8	DIAP
2	Acido 4- metil octanóico	9	BOP
3	2-etil hexil-2-etilhexanoato	10	DnOP
4	2-octil benzoato	11	DOA
5	2-etilhexil ester ácido	12	DEHP
	decanóico		
6	DIBP	13	DINP
7	BIDP	14	DIDP

Figura 150 – Cromatogramas e identificação dos compostos presentes na amostra da betoneira B5 (DCM) - continuação

Identificação Compostos

1	ácido-2-etil-hexanóico	7	DIBP
2	2-heptil-hidroperóxido	8	3,5-dimetil octano
3	1-(2-propenil-oxi)heptano	9	4,5 dimetil-1-hexeno
4	2-heptenal	10	DnOP
5	n-octil acetato	11	DEHP
6	etenil oxi-isooctano	12	DIDP

Identificação Compostos

1	2-metoximetilpropano	6	3-metil hexano
2	2,4-dimetil-1-hepteno	7	DEHP
3	bis(1,1 dimetiletilnitroxido)	8	1,2-propeniloxiheptano
4	2-nitropentano	9	2-metil heptadecano
5	1-isocianobutano		

Figura 150 – Cromatogramas e identificação dos compostos presentes na amostra da betoneira B5 (DCM) – continuação

Identificação Compostos

1	2-metoximetilpropano	5	3-metil butil éster do ácido trifluoracético
2	bis(1,1 dimetil etil nitroxido)	6	DEHP
3	2-nitropentano	7	1(2-propeniloxy)heptano
4	1-isocianobutano	8	2-metil heptadecano

Figura 150 – Cromatogramas e identificação dos compostos presentes na amostra da betoneira B5 (DCM) - continuação

Os resultados das amostras de solo da betoneira B5, extraídas com acetona-hexano (ACE-HEX) e submetidas à cromatografia gasosa-espectrometria de massa, são mostrados na Figura 151.

Identificação Compostos

1	ácido 2-etil hexanóico	8	BOP
2	ácido-4-metiloctanóico	9	DIAP
3	4- metil-1-deceno	10	DnOP
4	2-etilhexil ester ácido octanóico	11	MEHP
5	5-metil-1-hepteno	12	DEHP
6	2-etilhexil ester ácido decanóico	13	DINP
7	DIBP	14	DIDP

Figura 151 – Cromatogramas e identificação dos compostos presentes nas amostras da betoneira B5, extraídas com ACE-HEX

Identificação Compostos

1	ácido-2-etil-hexanóico	8	BOP
2	heptil hidroperóxido	9	DIAP
3	isooctilviniléter	10	DnOP
4	2-etil-1-hexanol	11	MEHP
5	5-metil-1-hepteno	12	DEHP
6	2-etilester ácido decanóico	13	3,3-dimetil butil oxirano
7	DIBP	14	DIDP

Identificação Compostos

1	ácido-2-etil-hexanóico	7	DIAP
2	heptil hidroperóxido	8	DnOP
3	1-(2-propenil-oxi)heptano	9	7-etenil-oxi-isooctano
4	2-heptenal	10	DEHP
5	DIBP	11	3,3-dimetilbutiloxirano
6	BOP	12	DIDP

Identificação Compostos

1	ácido-2-etil-hexanóico	7	Alil pentil éter
2	heptil hidroperóxido	8	4,5 dimetil-1-hexeno
3	amil nitrito	9	DnOP
4	2-etil-4-metil-1-pentanol	10	3-metil-trideceno
5	etenil oxi isooctano	11	DEHP
6	DIBP	12	3,5,5-trimetil-1-hexeno
		13	DIDP

Figura 151 – Cromatogramas e identificação dos compostos presentes nas amostras da betoneira B5, extraídas com ACE-HEX - continuação

Identificação Compostos

1	ácido-2-etil-hexanóico	8	4,5 dimetil-1-hexeno
2	heptil hidroperóxido	9	1,2-propenil oxi-heptano
3	2,2 dimetil butano	10	isooctil vinil éter
4	2-etil hexanol	11	DEHP
5	n-octil acetato	12	3,5,5 trimetil-1-hexeno
6	di-2-propenil ftalato	13	2-metil heptadecano
7	Alil pentil éter		

Figura 151 – Cromatogramas e identificação dos compostos presentes nas amostras da betoneira B5, extraídas com ACE-HEX - continuação

Análises varredura Solo S-06 e Betoneira B6

Solo S-06

O cromatograma da amostra do solo inicial S-06, extraída com diclorometano (DCM), e a identificação dos compostos presentes, estão ilustrados na Figura 152.

Identificação Compostos

1	ácido 2-etil hexanóico	7	DIBP
2	Acido 4- metil octanóico	8	DHP
3	4-metil -1-deceno	9	DIAP
4	2-etiléster ácido octanóico	10	BOP
5	pentil éster ácido benzóico	11	DnOP
6	2-etil hexil éster ácido decanoico	12	DEHP
		13	DIDP

Figura 152 – Cromatograma e identificação dos compostos presentes na amostra do solo inicial S-06, extraída com diclorometano (DCM)

A Figura 153 mostra os resultados obtidos com a extração da amostra do solo inicial S-06 com acetona-hexano, cromatografia gasosa e espectrometria de massa.

Identificação Compostos

1	3-metil butil ester do ácido nitroso	6	Isooctilviniléter
2	DIBP	7	DEHP
3	DHP	8	DINP
4	DIAP	9	DIDP
5	BOP		

Figura 153 – Cromatograma e identificação de compostos presentes na amostra do solo inicial S-06, extraída com acetona e hexano (ACE-HEX)

Não foram detectados compostos orgânicos voláteis na amostra do solo S-06 por *headspace* e cromatografia gasosa- espectrometria de massa.

Betoneira B6

As amostras das lamas da betoneira B6, retiradas em diferentes tempos do processo de biorremediação, foram extraídas com diclorometano (DCM) e submetidas à cromatografia gasosa-espectrometria de massa. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 154.

Identificação Compostos

1	ácido 2-etil hexanóico	9	DIAP
2	Acido 4- metil octanóico	10	BOP
3	4-metil -2-propil-1-pentanol	11	DnOP
4	2-etilhexiléster ácido octanóico	12	DOA
5	pentil éster ácido benzóico	13	DEHP
6	2-etilhexilésterácidodecanoico	14	DINP
7	DIBP	15	DIDP
8	DHP		

Figura 154 – Cromatogramas e identificação de compostos presentes nas amostras da betoneira B6, extraídas com diclorometano (DCM)

Identificação Compostos

1	ácido 2-etil hexanóico	9	DIAP
2	Acido 4- metil octanóico	10	BOP
3	4,5-dimetil,1,3-dioxano	11	DnOP
4	2-etilhexiléster ácido octanóico	12	DOA
5	pentil éster ácido benzóico	13	DEHP
6	2-etilhexilésterácidodecanoíco	14	DINP
7	DIBP	15	DIDP
8	DHP		

Figura 154 – Cromatogramas e identificação de compostos presentes nas amostras da betoneira B6, extraídas com diclorometano (DCM) - continuação

Identificação Compostos

1	ácido isobutírico	6	1,1-di-isobutoxibutano
2	1-heptil hidroperóxido	7	3,5-dimetil octano
3	DIBP	8	DEHP
4	3,6-metil éster ácido octadecanodioico	9	2-metil heptadecano
5	2-metil-1-pentanol

Identificação Compostos

1	butiléster ácido nitroso	3	DEHP
2	dialil carbonato	4	2-metil heptadecano

Figura 154 – Cromatogramas e identificação de compostos presentes nas amostras da betoneira B6, extraídas com diclorometano (DCM) - continuação

Identificação Compostos

1	3-metilbutiléster ácido nitroso	3	DEHP
2	dialil carbonato	4	2-metil heptadecano

Figura 154 – Cromatogramas e identificação de compostos presentes nas amostras da betoneira B6, extraídas com diclorometano (DCM) - continuação

Verificando os espectros de massa de cada pico dos cromatogramas obtidos pela injeção de amostras da betoneira B6, extraídas com acetona-hexano, no cromatógrafo gasoso-espectrômetro de massa, foram identificados (Figura 155):

Identificação Compostos

1	ácido 2-etil hexanóico	9	DIAP
2	Acido 4- metil octanóico	10	BOP
3	4-metil -2-propil-1-pentanol	11	DnOP
4	2-etilhexiléster ácido octanóico	12	DOA
5	pentil éster ácido benzóico	13	DEHP
6	2-etilhexilésterácidodecanoíco	14	DINP
7	DIBP	15	DIDP
8	DHP		

Figura 155 – Cromatogramas e identificação dos compostos presentes nas amostras da betoneira B6, extraídas com acetona e hexano (ACE-HEX)

Identificação Compostos

1	Ácido 2-etil hexanóico	7	DHP
2	Heptil hidroperóxido	8	DIAP
3	2-etilhexiléster ácido octanóico	9	DnOP
4	pentil éster ácido benzóico	10	DOA
5	2-etil hexil éster do ácido decanoíco	11	DEHP
6	DIBP	12	DINP
		13	DIDP

Figura 155 – Cromatogramas e identificação dos compostos presentes nas amostras da betoneira B6, extraídas com acetona e hexano (ACE-HEX) - continuação

Identificação Compostos

1	ácido 2-etilhexanóico	6	3,5 dimetil octano
2	1-heptil hidroperóxido	7	4,5-dimetil-1-hexeno
3	álcool isoamílico	8	DnOP
4	2-heptenal	9	DEHP
5	DIBP	10	2-metilheptadecano

Identificação Compostos

1	Ácido 2-etil hexanóico	5	2-nitropentano
2	Heptil hidroperóxido	6	3,5-dimetiloctano
3	álcool isoamílico	7	DEHP
4	1,1 dimetil etil nitróxido	8	DINP

Figura 155 – Cromatogramas e identificação dos compostos presentes nas amostras da betoneira B6, extraídas com acetona e hexano (ACE-HEX) - continuação

Identificação Compostos

1	heptilhidroperóxido	4	1-(2-propeniloxy)heptano
2	isocianobutano	5	DEHP
3	dialilcarbonato	6	4 metil tridecano

Figura 155 – Cromatogramas e identificação dos compostos presentes nas amostras da betoneira B6, extraídas com acetona e hexano (ACE-HEX) - continuação

Análises de varredura do solo S-07 e betoneira B7

Solo S-07

O cromatograma da amostra do solo inicial S-07, extraída com solvente diclorometano (DCM), e a identificação dos compostos presentes, está mostrado na Figura 156.

Identificação Compostos

1	DIBP	3	DEHP
2	Alil éster ácido isobutírico		

Figura 156 – Cromatograma e identificação de compostos presentes na amostra do solo inicial S-07, extraída com diclorometano (DCM)

A Figura 157 mostra o cromatograma e a identificação dos compostos presentes na amostra do solo inicial S-07, extraída com acetona-hexano.

Identificação Compostos

1	isooctilviniléter	3	2,3,5,8 tetrametildecano
2	DEHP	4	DIDP

Figura 157 – Cromatograma e identificação de compostos presentes na amostra do solo inicial S-07, extraída com acetona-hexano (ACE-HEX)

Não foram detectados compostos orgânicos voláteis na amostra do solo S-07 por *headspace* e cromatografia gasosa- espectrometria de massa.

Betoneira B7

Analisando o cromatograma e os espectros de massa obtidos da extração das amostras de solo da betoneira B7 com diclorometano(DCM), foram identificados (Figura 158):

Identificação Compostos

1	4-metil-ácido pentanóico	5	diclohexilftalato
2	4,5 diemtil-1,3- dioxano	6	DIAP
3	1,3-propanodiamina	7	DEHP
4	DIBP	8	2,4,6 trimetil-1-noneno

Identificação Compostos

1	Carbometano	3	DEHP
2	2-nitropropano	4	2,4,6-trimetil noneno

Figura 158 – Cromatogramas e identificação dos compostos presentes nas amostras da betoneira B7, extraídas com diclorometano (DCM)

Identificação Compostos

1	Acetonitrila	3	isooctanol
2	isobutil éster do ácido nitroso	4	2,4,6 trimetil noneno

Identificação Compostos

1	3,3-dimetil-2-butanona	4	2,4,6- trimetil -1-noneno
2	metil ester ácido 3,6 octadecanóico	5	2,4,6,8 - tetrametil-1-undeceno
3	2- nitro pentano		

Figura 158 – Cromatogramas e identificação dos compostos presentes nas amostras da betoneira B7, extraídas com diclorometano (DCM) - continuação

Identificação Compostos

1	2-nitropropano	3	isooctanol
2	isobutilésterácidonitroso	4	2,4,6 trimetil-1-noneno

Figura 158 – Cromatogramas e identificação dos compostos presentes nas amostras da betoneira B7, extraídas com diclorometano (DCM)

A Figura 159 mostra os resultados obtidos com a extração das amostras da betoneira B-07 com acetona-hexano, cromatografia gasosa e espectrometria de massa.

Identificação Compostos

1	DEHP	3	4,6,8 trimetil-1-noneno
2	DINP

Identificação Compostos

1	DEHP	3	2,4,6-trimetil-1-noneno
2	1-(2-propenil-oxi)-heptano		

Figura 159 – Cromatograma e identificação de compostos presentes nas amostras da betoneira B7, extraídas com acetona e hexano (ACE-HEX)

Identificação Compostos

1	isooctilviniléter	3	1-(2-propenil-oxi)-heptano
2	DEHP	4	2,4,6-trimetil-1-noneno

Identificação Compostos

1	Butiloxoacetato	4	DEHP
2	1,2-propeniloxipentano	5	octil éster ácido propânico
3	2 nitro pentano	6	DINP

Figura 159 – Cromatograma e identificação de compostos presentes nas amostras da betoneira B7, extraídas com acetona e hexano (ACE-HEX) - continuação

1	DIBP	3	DEHP
2	DIAP	4	DINP
		5	DIDP

Figura 159 – Cromatograma e identificação de compostos presentes nas amostras da betoneira B7, extraídas com acetona e hexano (ACE-HEX) - continuação

Análises de varredura do solo S-10 e betoneira B8

Solo S-10

A amostra do solo S-10 foi submetida à extração com diclorometano (DCM), cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Após análise do cromatograma e dos espectros de massa, foram identificados os compostos presentes (Figura 160).

1	2-etil hexanol	10	BOP
2	1-nonanol	11	DIAP
3	6-metil-1-heptanol	12	DnOP
4	Acido 4- metil octanóico	13	Butil isodecilftalato
5	pentil éster ácido benzóico	14	DOA
6	4-metil-2-propil-1-pentanol	15	DEHP
7	2-octil benzoato	16	DINP
8	2-etilhexil ester ácido decanóico	17	DIDP
9	DIBP		

Figura 160 – Cromatograma e identificação dos compostos da amostra do solo inicial S-10, extraída com diclorometano (DCM)

A Figura 161A mostra os resultados obtidos com a cromatografia gasosa-espectrometria de massa da amostra do solo inicial S-10, extraída com acetona-hexano e a Figura 161B mostra os resultados obtidos por análises de *Head space*, cromatografia gasosa e espectrometria de massa.

Identificação Compostos

1	2-etil hexanol	9	DIBP
2	1-nonanol	10	BOP
3	ácido -2-nonenóico	11	DIAP
4	Acido 4- metil octanóico	12	DnOP
5	2-cloro octano	13	MEHP
6	isooctilviniléter	14	DEHP
7	2-octil benzoato	15	DINP
8	2-etil hexil ester ácido octanóico	16	DIDP

Identificação Compostos

1	2,3 dimetil hexano	3	3,5,5 trimetil-1-hexeno
2	2-etilhexanol	4	2,4,6 trimetil-1-noneno

Figura 161A/B – Cromatograma e identificação de compostos da amostra do solo inicial S-10, extraída com acetona-hexano (ACE-HEX) e por *Head space* (HSS)

Betoneira B8

O cromatograma das amostras da betoneira B8, extraídas com diclorometano (DCM), e a identificação dos compostos presentes, estão ilustrados na Figura 162.

Identificação Compostos

1	2-etil-1- hexanol	10	BOP
2	4-metil-1-heptanol	11	DIAP
3	ácido 2-etilhexanóico	12	DnOP
4	Acido 4- metil octanóico	13	MEHP
5	pentil éster ácido benzóico	14	DOA
6	4-metil-2-propil-1-pentanol	15	DEHP
7	2-octil benzoato	16	DINP
8	2-etilhexil ester ácido decanóico	17	DIDP
9	DIBP		

Figura 162 – Cromatograma e identificação de compostos presentes nas amostras da betoneira B8 extraídas com diclorometano (DCM)

Identificação Compostos

1	ácido 2-etilhexanóico	8	DnOP
2	Acido 4- metil octanóico	9	MEHP
3	2-octil benzoato	10	DOA
4	2-etilhexil ester ácido decanóico	11	DEHP
5	DIBP	12	DINP
6	BOP	13	DIDP
7	DIAP		

Figura 162 – Cromatograma e identificação de compostos presentes nas amostras da betoneira B8 extraídas com diclorometano (DCM) – continuação

Identificação Compostos

1	2-metoximetilpropano	6	4,5-dimetil hexeno
2	4-butil ácido pentanóico	7	heptil hidroperóxido
3	1-isociano-butano	8	3,5 dimetil octano
4	di-2-propenil ester ácido ftálico	9	DEHP
5	metil éster ácido octadecanodiinoico	10	2,4,6,8 – tetrametil-1-undeceno

Identificação Compostos

1	2-metoximetilpropano	6	4,5-dimetil hexeno
2	4-butil ácido pentanóico	7	heptil hidroperóxido
3	1-isocianobutano	8	3,5 dimetil octano
4	di-2-propenil ester ácido ftálico	9	isooctil vinil éter
5	metil éster ácido octadecanodiinoico	10	DEHP
		11	2,4,6,8 – tetrametil-1-undeceno

Figura 162 – Cromatograma e identificação de compostos presentes nas amostras da betoneira B8 extraídas com diclorometano (DCM) - continuação

Identificação Compostos

1	Isobutilnitrito	5	Isooctanol
2	2-metilpentanol ou isobutilálcool	6	DEHP
3	1-heptenal ou isobutil tricloro acetato	7	2,4,6,8 – tetrametil-1-undeceno
4	3-metil hexano		

Figura 162 – Cromatograma e identificação de compostos presentes nas amostras da betoneira B8 extraídas com diclorometano (DCM) - continuação

Os cromatogramas e a identificação dos compostos presentes nas amostras da betoneira B8, extraídas com acetona-hexano estão apresentados na Figura 163.

Identificação Compostos

1	2-etil hexanol	10	DIBP
2	4-metil-1-heptanol	11	BOP
3	ácido-2-etil-hexanóico	12	DIAP
4	Acido 4- metil octanóico	13	DnOP
5	5-metil-1-hepteno	14	MEHP
6	4-metil-2-propil-1-pentanol	15	DOA
7	propil-2-metilbutirato	16	DEHP
8	pentil éster ácido benzóico	17	DINP
9	2-etilester ácido decanóico	18	DIDP

Figura 163 – Cromatograma e identificação de compostos presentes nas amostras da betoneira B8 extraídas com acetona-hexano (ACE-HEX)

Identificação Compostos

1	4-metil-1-heptanol	8	BOP
2	ácido-2-etil-hexanóico	9	DIAP
3	Acido 4- metil octanóico	10	DnOP
4	4-metil-2-propil-1-pentanol	11	MEHP
5	pentil éster ácido benzóico	12	DEHP
6	2-etilester ácido decanóico	13	DINP
7	DIBP	14	DIDP

Figura 163 – Cromatograma e identificação de compostos presentes nas amostras da betoneira B8 extraídas com acetona-hexano (ACE-HEX) – continuação

Identificação Compostos

1	ácido-2-etil-hexanóico	8	DIAP
2	Acido 4- metil octanóico	9	DnOP
3	heptil hidroperóxido	10	4-metil-decano
4	5-metil-1-hepteno	11	DEHP
5	2-etilhexiléster ácido octanóico	12	DINP
6	DIBP	13	DIDP
7	BOP		

Figura 163 – Cromatograma e identificação de compostos presentes nas amostras da betoneira B8 extraídas com acetona-hexano (ACE-HEX) - continuação

Identificação Compostos

1	ácido-2-etil-hexanóico	8	di-2-propenil éster ácido ftálico
2	Acido heptanóico	9	DIAP
3	heptil hidroperóxido	10	1-(2-propeniloxi)heptano
4	trans-2-heptenal	11	3-metilbutil éster ácido trifluoracético
5	n-octil acetato	12	DEHP
6	2-etil-4-metil-1-pentanol	13	2,4,6,8 – tetrametil-1-undeceno
7	di-isobutoxibutano

Identificação Compostos

1	di-alil carbonato	5	isooctil vinil éter
2	1-nitropropano	6	isopropil terc-butil cetona
3	alil éster ácido isobutórico	7	2,4,6 trimetil-1-noneno
4	isooctanol		

Figura 163 – Cromatograma e identificação de compostos presentes nas amostras da betoneira B8 extraídas com acetona-hexano (ACE-HEX) - continuação

Staples et al. (1997) descreveram em sua revisão bibliográfica que a rota metabólica de biodegradação dos ftalatos inicia-se pela hidrólise do éster, formando o monoéster, o correspondente álcool e o ácido ftálico, sendo também definida como biodegradação primária. A próxima etapa (biodegradação última) resulta na completa mineralização do ácido ftálico, com a quebra do anel aromático tanto pelo caminho 3,4- ou 4,5-dihidroxitálato até o protocatecato. A clivagem do anel aromático pode ocorrer na posição orto, resultando na formação do piruvato e oxalacetato ou na posição meta, resultando em β -cetoadipato, sendo posteriormente degradado a acetil CoA e succinato.

Carrara (2003) verificou a biorremediação de 100mg/kg de DEHP no solo por microrganismos indígenas e exógenos e identificou, após 49 dias, em amostras extraídas com acetona e hexano, utilizando CG/MS, um subproduto de biodegradação aeróbia do DEHP, o ácido pirúvico.

Assim, nas betoneiras, pode-se observar:

B1: Os subprodutos iniciais da biodegradação dos plastificantes, os monoésteres dos ácidos ftálicos, não foram identificados. Já um dos possíveis subprodutos finais da biodegradação dos plastificantes foi identificado a partir de 90 dias de processo: o 2-propenil éster do ácido acético. Considerando-se 100 dias, os picos de maior intensidade no espectro de massa, foram do álcool isooctanol (B-01 100 dias ACE-HEX) e do 2-etilhexiléster ácido octanóico (B-01 100 dias DCM) e o maior hidrocarboretto ramificado identificado foi o 3,5- dimetiloctano. A presença de nitrocompostos, observada no solo inicial, permaneceu até o final do processo.

B2: Os subprodutos iniciais da biodegradação dos plastificantes, os monoésteres dos ácidos ftálicos, não foram identificados. A partir de 30 dias, observou-se a presença de ésteres de ácidos presentes nos radicais dos plastificantes e a partir de 60 dias, notou-se novas classes de compostos: aldeídos e cetonas. Já os possíveis subprodutos finais da biodegradação dos plastificantes foram identificados somente a partir de 120 dias de processo, o 1-propenil éster do ácido carbônico e 4,8 dimetil-3,7-nodieniltioacetato.

B3: Foi identificado o MEHP, um dos subprodutos da biodegradação dos ftalatos após 30 dias na amostra extraída com DCM. Identificou-se, também, ésteres de ácidos provenientes de radicais presentes nos plastificantes (2-etilhexiléster do ácido butanóico), possíveis subprodutos da biodegradação. A partir de 30 e 60 dias, notou-se a presença de novas classes de compostos: cetonas, éteres e hidroperóxidos. Já os subprodutos finais da biodegradação dos plastificantes, foram detectados a partir de 100 dias, tais como o butilacetato e após 120 dias, como o 2-etil hexil éster ácido pirúvico, sendo identificado um possível intermediário da biodegração última: o etanal acetaldéido.

B4: Os subprodutos iniciais da biodegradação dos plastificantes, os monoésteres dos ácidos ftálicos, não foram identificados nas amostras iniciais do solo e lama. Já os possíveis subprodutos da biodegradação dos plastificantes foram identificados a partir de 30 dias de processo, o álcool isobutírico e o isoamil decanoato e a partir de 60 dias, ésteres de ácidos de cadeia mais curtas do que aqueles inicialmente presentes (alil éster do ácido isobutírico). Após 100 dias, não foram identificados os subprodutos finais da biodegradação, apenas os acetatos nitrogenados. No entanto, observou-se uma redução no número de compostos presentes no solo.

B5: O único subproduto inicial da biodegradação dos plastificantes foi identificado na lama inicial: o MEHP. Já os subprodutos finais foram identificados a partir de 60 dias de processo, o n-octil acetato, bem como novas classes de compostos: éteres, aldeídos e hidroperóxidos. O DEHP foi identificado até a parada da B5, correspondendo ao maior pico no final do monitoramento.

B6: Os monoésteres dos ácidos ftálicos não foram identificados, no entanto, foram detectados após 60 dias ácidos derivados de radicais de plastificantes e hidrocarbonetos alifáticos de cadeia mais curta no final do monitoramento, com a possível formação de nitrocompostos e apenas o dialilcarbonato como possível subproduto final da biodegradação.

B7: Os subprodutos iniciais da biodegradação dos plastificantes não foram identificados, apenas os ésteres de ácidos, possivelmente derivados dos radicais dos respectivos plastificantes. Já alguns subprodutos finais da biodegradação foram identificados a partir de 30 dias (dialilcarbonato) e de 90 dias (butiloxoacetato), sendo o isooctanol correspondente ao maior pico do cromatograma do final do monitoramento.

B8: No solo inicial S-10, utilizado nesta betoneira, observou-se o maior número de plastificantes em relação aos demais, no entanto o único subproduto inicial da biodegradação dos plastificantes foi identificado na lama inicial (o metabólito MEHP) e até 30 dias de biodegradação. Após este período, identificou-se um ácido derivado dos radicais dos plastificantes (ácido 2-etilhexanóico). Já os subprodutos finais da biodegradação dos plastificantes foram identificados a partir de 90 dias (n-octil acetato), além da respectiva redução no número de plastificantes presentes. Após 100 dias, foi identificado outro possível subproduto da biodegradação, o dialilcarbonato e álcoois de cadeias mais curtas do que os inicialmente presentes, sendo que o DEHP foi identificado até a parada da B8.

Verificando os resultados apresentados, observa-se que o único metabólito identificado foi o MEHP, nas betoneiras com maiores teores iniciais de plastificantes, B5 e B8 além da B3 e no máximo até 30 dias. Os monoésteres dos demais plastificantes não foram identificados, estando presentes, no entanto, ésteres de ácidos de radicais possivelmente derivados dos plastificantes e após 30 dias, presentes em maior intensidade os éteres, cetonas e aldeídos. O DIOP foi o único plastificante detectado até o final do processo, sendo que os demais foram totalmente removidos a partir de 30 dias nas betoneiras B2, B3 e B7 e a partir de 60 dias, na B5 e B8.

Observa-se ainda que independente dos teores de plastificantes no solo e lama inicial, as betoneiras B1, B4, B7 e B8 apresentaram subprodutos finais da biodegradação (acetato) após 90 dias. Já a B5, que continha os mais elevados teores de plastificantes, apresentou subproduto final da biodegradação aos 60 dias. A betoneira B6, a qual recebeu quantidades de lodo adicionais aos 30 dias (reinício do processo após parada por 5 dias para troca do motor), não apresentou subprodutos da biodegradação no período monitorado (120 dias), sendo possivelmente o tempo total de processo insuficiente para o término da biodegradação. A betoneira B2 apresentou subprodutos finais de

biodegradação somente após 120 dias. Após este período, nas amostras das demais betoneiras, voltaram a ser identificados os plastificantes e outros compostos pesados inicialmente presentes na lama e não foram identificados subprodutos da biodegradação, assim os espectros de massa relativos a estas amostras não foram considerados. Após a parada de energia geral da unidade de produção por 18 horas, na data correspondente a 101 dias de ensaio, os solos nas betoneiras foram homogeneizados manualmente com a conseqüente raspagem do solo remanescente nas paredes, misturando-o à massa presente no centro da mesmas, justificando possivelmente o reaparecimento dos plastificantes iniciais. A biodegradação ocorre preferencialmente no centro do reator, onde a aeração e a homogeneização apresentam maior eficiência.

Nas análises de *Head-space* dos solos iniciais, foram identificados compostos voláteis apenas naqueles que apresentaram os maiores teores de contaminantes e maior número de compostos presentes, solos S-05 e S-10. A plastificação do solo pode ser um interferente nesta determinação e possivelmente, após a extração dos plastificantes com solventes, são liberados os compostos voláteis presentes em teores mais baixos, como os álcoois, por exemplo, identificados nos demais solos.

Propriedades geotécnica e físico-química do solo após biorremediação

A Tabela 93 contém a composição granulométrica do solo após a biorremediação. Verifica-se que a classe de textura após a biorremediação não foi alterada para os solos S-01, S-02, S-03 e S-07, que apresentaram classe de textura argilosa. No solo S-06, uma das triplicatas passou de média argilosa à argilosa, não alterando a classe de textura. Nos solos S-05 e S-10, uma das triplicatas passou de média arenosa a média argilosa, não alterando a classe de textura média argilosa. Apenas o solo S-09 apresentou alteração de classe de textura, passando de média argilosa para argilosa, sendo este o solo que apresentou os menores teores de plastificantes após a biorremediação. Para os demais solos, não se pode afirmar que a plastificação interferiu nesta determinação.

Tabela 92 – Análise granulométrica dos solos após a biorremediação

Betoneira	Areia %			Silte %	Argila %	Classe de Textura
	Grossa	Fina	Total			
B1	5,00	44,00	49,00	8,00	43,00	Argilosa
	5,00	44,00	49,00	5,00	46,00	Argilosa
	4,00	47,00	51,00	6,00	43,00	Argilosa
B2	6,00	37	43,00	6,00	51,00	Argilosa
	6,00	37,00	43,00	4,00	53,00	Argilosa
	6,00	41,00	47,00	6,00	48,00	Argilosa
B3	6,00	39,00	45,00	4,00	51,00	Argilosa
	6,00	39,00	45,00	4,00	51,00	Argilosa
	5,00	35,00	40,00	8,00	52,00	Argilosa
B4	3	51,00	54,00	10,00	36,00	Argilosa
	3	49,00	52,00	8,00	40,00	Argilosa
	3	51,00	54,00	10,00	36,00	Argilosa
B5	8,00	58,00	66,00	6,00	28,00	md argilosa
	8,00	56,00	64,00	4,00	32,00	md argilosa
	8,00	58,00	66,00	6,00	28,00	md argilosa
B6	5,00	47,00	52,00	6,00	42,00	argilosa
	8,00	44,00	52,00	8,00	40,00	argilosa
	8,00	44,00	52,00	8,00	40,00	argilosa
B7	5,00	47,00	52,00	6,00	42,00	argilosa
	5,00	45,00	50,00	8,00	42,00	argilosa
	5,00	47,00	52,00	6,00	42,00	argilosa
B8	16,00	48,00	64,00	8,00	28,00	md argilosa
	15,00	51,00	66,00	6,00	28,00	md argilosa
	15,00	49,00	64,00	8,00	28,00	md argilosa

Verificando os resultados dos teores de nitrogênio no solo (Tabela 94), determinados por análise elementar, observa-se que estes aumentaram após a biorremediação, podendo ser atribuído à adição de água nas betoneiras, na qual pôde-se identificar a presença de nitrocompostos através das análises CG/MS.

Tabela 93 - Teores de N e P determinados por análises elementar e N seguindo a metodologia Embrapa (1999)

Amostra	Lama Inicial (1)		Lama Final (1)		Lama (2) Final
	N (mg/kg)	P (mg/kg)	N (mg/kg)	P (mg/kg)	N (mg/kg)
S-01/B1	1499	208	2368	244	504
	750	216	1523	245	560
	1499	257	677	223	538
S-02/B2	1199	204	1594	119	714
	1199	206	2125	135	682
	900	215	1948	142	703
S-03/B3	1815	188	2091	102	924
	1650	157	2265	148	953
	1650	165	1742	144	941
S-09/B4	1158	190	1335	157	672
	1014	171	1169	145	700
	869	185	2300	168	688
S-05/S5	598	195	907	208	994
	1346	227	1512	215	980
	598	223	1512	224	984
S-06/B6	1228	261	2222	333	1512
	921	322	3174	336	1540
	921	279	3174	295	1523
S-07/B7	3102	125	2807	216	882
	2240	104	3119	223	924
	1551	132	3119	249	906
S-10/B8	2518	251	1790	90	770
	1925	251	1790	93	785
	2666	257	2386	90	775

(1) Metodologia Análise elementar (2) Metodologia Embrapa

5 CONCLUSÕES

O desenvolvimento dessa pesquisa de biorremediação de solos tropicais contaminados por resíduos da indústria de plastificantes permitiu chegar às seguintes conclusões:

Metodologias Analíticas verificadas nos Ensaios Preliminares, Confirmatórios e Biorremediação *ex-situ*

- A metodologia analítica para determinação da umidade em solos de sites de produção de plastificantes, contendo álcoois, deve considerar a perda de massa por evaporação destes, sendo a seleção da temperatura utilizada função do menor ponto de evaporação; não sendo portanto recomendada a aplicação da norma CETESB L6.350;
- A metodologia analítica para determinação dos teores de plastificantes no solo (EPA 8061) foi aplicável aos álcoois, neste estudo, devido a plastificação do solo, sendo que estes últimos só foram removidos após a extração dos primeiros;
- As análises de varredura, realizadas através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, foram primordiais para a identificação de outros compostos inicialmente presentes, por tratar-se de um solo industrial. Estas análises foram também primordiais para a identificação de possíveis subprodutos da biodegradação formados durante o processo possibilitando correlacioná-los com os demais parâmetros de monitoramento em função do tempo: pH, remoções e *fingerprint* das bactérias presentes no reator. Deve-se ressaltar que a literatura disponível não apresenta dados obtidos com tal metodologia para solos retirados de áreas contaminadas.

Outros mecanismos de remoção verificados nos Ensaios Preliminares e Confirmatórios

- A Fotólise não é um mecanismo de remoção a ser considerado para os plastificantes;

- Não foi observada a perda por volatilização para os álcoois de menor cadeia; estando estes possivelmente presentes nos espaços intersticiais do solo e diminuindo somente após a dessorção e biodegradação dos plastificantes;
- As reações de hidrólise dos diésteres devem ser consideradas, após adição de água, nutrientes e lodo no solo.

Biodegradação Ensaios Preliminares e Confirmatórios

- O solo úmido natural apresentou maior número de bactérias heterotróficas iniciais e manteve as condições mais próximas ao ambiente natural em relação à amostra seca, sendo esta última a preconizada pela norma CETESB L6.350, para uso no ensaio de biodegradação;
- Não foi necessário o ajuste do pH do solo para a biodegradação dos álcoois e plastificantes; não sendo portanto recomendada a Norma CETESB L.6350 para preparação do solo na biorremediação;
- As melhores remoções de plastificantes e álcoois por biodegradação foram obtidas com a adição de inóculo adaptado (lodo), proveniente do conteúdo do tanque de aeração do sistema de lodos ativados que trata as águas residuárias da indústria;
- Em pH entre 5,5 a 7,81, temperatura de 17 a 30°C, umidade de 35 a 71 %, adição de 5 a 11 gSSV/kg de solo, relações carbono:nitrogênio e carbono:fósforo de 60:1 e 300:1, respectivamente, foram obtidas remoções superiores a 70,4 % de plastificantes, após 90 dias, sendo que os teores iniciais variaram de 26 a 15552 mg/kg. Os teores finais para o DEHP, após 90 dias, variaram de 24 a 870 mgDEHP/kg solo, estando portando acima dos 10mg DEHP/kg solo industrial recomendados pela Cetesb e os teores finais de DIDP, ainda maiores, variaram de 31 a 1705 mg DIDP/kg, no entanto este último não consta na lista de valores de referência da CETESB, recomendando-se a inclusão deste composto, uma vez que as indústrias estão substituindo o DEHP pelo DIDP, no processo produtivo.
- O declínio de pH na biodegradação de plastificantes não foi observado nestes Ensaios;

- A presença dos álcoois (co-substratos) e de plastificantes de menor cadeia alquílica não impediu a biodegradação dos plastificantes de cadeia alquílica longa e ramificada: o DEHP e DIDP;
- A densidade de bactérias heterotróficas não foi um bom indicador da biodegradação no solo, não sendo recomendada a adaptação da Norma CETESB L5.201.

Biorremediação *ex-situ*

- As análises de *fingerprint* da comunidade total de bactérias das lamas das betoneiras, monitoradas durante 100 dias de processo na biorremediação *ex-situ* indicam que, possivelmente, as bactérias presentes no lodo foram dominantes no início do processo, alterando-se a dominância para as bactérias provenientes do solo entre 30 e 60 dias, ocorrendo no entanto uma diferenciação maior das populações após 100 dias, sendo a comunidade final composta por algumas populações dominantes provenientes do lodo e outras do solo; demonstrando possivelmente que as bactérias exógenas foram essenciais para o início da biodegradação dos plastificantes e as indígenas para a continuidade da mesma;
- Foi identificado, nos primeiros 30 dias, o metabólito Monoetilhexilftalato, oriundo da biodegradação dos plastificantes, nas betoneiras com maiores teores iniciais destes compostos. Os monoésteres dos demais plastificantes não foram identificados; possivelmente em função da frequência de amostragem para as análises de varredura, a cada 30 dias;
- Independente dos teores de plastificantes no solo inicial e lama inicial, as betoneiras B1, B4, B7, B8 apresentaram sub-produtos finais da biodegradação (acetato) após 90 dias. A B5, que continha os mais elevados teores de plastificantes iniciais, apresentou sub-produto final da biodegradação aos 60 dias, devido as mais maiores constantes de degradação dos plastificantes. Na B3, os sub-produtos finais da biodegradação foram identificados após 100 dias e na B2, que continha baixos teores de plastificantes, estes sub-produtos foram identificados somente após 120 dias;
- Na biorremediação *ex-situ*, as temperaturas foram mais baixas (13 a 26 °C) e os valores de pH diferentes (5,4 a 8,4) dos pesquisados por autores mencionados na

literatura, no entanto, estas condições não se mostraram restritivas à biodegradação dos plastificantes;

- Em pH entre 5,42 a 8,44, temperatura de 13 a 26°C, umidade de 26,6 a 44,1%, adição de 6 a 11 gSSV/kg de solo, relações máximas carbono: nitrogênio e carbono:fósforo de 60:1 e 300:1, respectivamente, e diferentes co-substratos, foram obtidas remoções superiores a 55 % de plastificantes em todas as betoneiras, após 120 dias, sendo que os teores iniciais variaram de 1 a 723mg/kg;
- Os teores finais de DEHP foram abaixo de 5mg/kg nas betoneiras B1 e B3; entre 15 e 22 mg/kg nas betoneiras B2, B4, B5 e B7 e somente as betoneiras B6 e B8 apresentaram teores finais elevados (56 e 134 mg/kg, respectivamente), estando portanto acima dos 10 mg/kg recomendados para o solo industrial. Considerando os valores de k para o DEHP entretanto, para atingir este limite, seriam necessários 148 dias na B2, 178 dias na B4, 331 dias na B6, 158 dias na B7 e 441 dias na B8. Recomenda-se, no entanto, a aplicação de análises de risco no local, considerando os valores finais atingidos após a biorremediação *ex-situ*, para o DEHP, bem como para os demais plastificantes não citados na lista de referência da CETESB, para se estabelecer então quais as metas a ser consideradas, frente ao uso futuro do referido solo industrial.

6 ANEXOS

6.1 - Caracterização do solo da área de plastificantes - Análises semi-voláteis

6.1A Análises semi-voláteis pontos S-01 a S-05

Compostos mg/kg														
Amostra	Profundidade	massa(g)	Diluição	DBP	DEHP	DIDP	IBA	IA	2EH	IDA	DIBP	DIAP	DOA	(*)
S-01	1,0 - 1,4m	15,8	1											
S-01	1,0 - 1,4m	15,3	2		4									
S-01	1,8 - 2,2 m	15,3	20		70	101								
S-01	1,8 - 2,2 m	15,5	20		52	62								
S-01	2,6 - 3,0 m	15,4	1		5	6								
S-01	2,6 - 3,0 m	15,4	1		2									
S-02	1,0 - 1,4 m	15,3	4		11	9								
S-02	1,0 - 1,4 m	15,6	8		17	13								
S-02	2,0 - 2,4 m	15,2	200		835	845								
S-02	2,0 - 2,4 m	15,1	40		2327	1474								
S-02	3,0 - 3,4 m	15,2	20		37	22								
S-02	3,0 - 3,4 m	15,3	2		6	4								
S-03	1,7 - 2,1 m	15,5	80		1254	72								
S-03	1,7 - 2,1 m	15,2	80		1220									
S-03	2,8 - 3,2 m	15,7	1		4									
S-03	2,8 - 3,2 m	15,5	1		3									
S-03	4,0 - 4,4 m	15,6	1		5					1				
S-03	4,0 - 4,4 m	15,1	1		4									
S-03	5,0 - 5,4 m	15,3	1							2				
S-03	5,0 - 5,4 m	15,1	1							4				
S-04	1,0 - 1,4 m	15,2	1000	2259	4787	3892			1384		2562441	2657586		
S-04	1,0 - 1,4 m	15,4	1000	2765	5640	4825175			1723268		3193142	3185087		
S-04	3,0 - 3,4 m	15,5	100	48	245									
S-04	3,0 - 3,4 m	15,2	100	100	449	176			98		97	130		
S-04	5,0 - 5,4 m	15,1	100		171									
S-04	5,0 - 5,4 m	15,6	20		79	37								
S-05	1,0 - 1,4 m	15,8	400		(*)2804	1459					453	428		
S-05	1,0 - 1,4 m	15,4	100	87	(*)3647	1018				148	713	466		(*) dil 800
S-05	3,0 - 3,4 m	15,2	500	210	(*)4957	1605					934	912		(*) dil 1000
S-05	3,0 - 3,4 m	15,2	100	235	(*)5874	(*)1874			111	137	(*)1338	(*)1237		(*) dil 1000
S-05	4,0 - 4,4 m	15,4	400		1067									
S-05	4,0 - 4,4 m	15,1	200		(*)2375	959					373	442		(*) dil 500
S-05	5,0 - 5,4 m	15	400	331	(*)3379	1015					603	694		(*) dil 800
S-05	5,0 - 5,4 m	15,3	100	405	(*)4400	(*)907				(*)118	(*)978	(*)1079		(*) dil 800

(*) dil: diluição utilizada

6.1B Análises semi-voláteis pontos S-06 a S-10

Compostos mg/kg														
Amostra	Profundidade	massa(g)	Diluição	DBP	DEHP	*DIDP	IBA	IA	2EH	IDA	DIBP	DIAP	DOA	(*)
S-06	1,0 - 1,4 m	15,1	500	1259	5744	1438					1411	1992		
S-06	1,0 - 1,4 m	15,2	100	1434	5626	1197				224	1546	2337		
S-06	2,0 - 2,4 m	15,1	400		1408									
S-06	2,0 - 2,4 m		50		(*)1399	88								(*) dil 300
S-06	3,0 - 3,4 m		200		214									
S-06	3,0 - 3,4 m		40		209									
S-06	4,0 - 4,4 m	15,1	200		488									
S-06	4,0 - 4,4 m	15,4	40		640	47								
S-07	1,5 - 1,9 m	15,1	1											
S-07	1,5 - 1,9 m	15,7	1											
S-07	2,5 - 2,9 m	15,4	1	1										
S-07	2,5 - 2,9 m	15,6	1	1										
S-07	3,5 - 3,9 m	15,1	1	1										
S-07	3,5 - 3,9 m	15,5	1											
S-08	1,0 - 1,4 m	15,6	100		133									
S-08	1,0 - 1,4 m	15,6	50		143									
S-08	1,5 - 1,9 m	15,5	200		314									
S-08	1,5 - 1,9 m	15,5	50		142									
S-09	2,0 - 2,4 m	15,1	20		37									
S-09	2,0 - 2,4 m	15,4	20		28									
S-09	3,0 - 3,4 m	15,5	1											
S-09	3,0 - 3,4 m	15,3	1											
S-09	5,0 - 5,9 m		400	293	863				401		338	400		
S-09	5,0 - 5,9 m		100	245	813	198			374	101	296	323		
S-10	2,0 - 2,4 m	15,2	400		361				338					
S-10	2,0 - 2,4 m	15,4	100	287	658	196			595	211	196	352		
S-10	4,0 - 4,4 m	15,5	4	3	10				17		5			
S-10	4,0 - 4,4 m	15,3	10		21				17		10			
S-10	5,0 - 5,4 m	15,4	1											
S-10	5,0 - 5,4 m	15,1	1											

(*) dil: diluição utilizada

6.2 - Biorremediação ex-situ - Cromatogramas água adicionada às betoneiras

6.2A Cromatogramas água utilizando diclorometano na extração

6.2 B Cromatogramas água utilizando acetona-Hexano na extração

6.3 - Ensaios Preliminares - Cromatogramas

Nos Ensaios Preliminares foram realizadas 96 análises cromatográficas, considerado as triplicatas. Devido ao elevado número de cromatogramas gerados, este anexo contém um cromatograma típico.

6.3 A - Ensaios Preliminares - Cromatograma do solo inicial (I Triplicata)

Operator : Operator Detector Type: ADCB (1 Volt)
 Workstation: COMPAQ Bus Address : 16
 Instrument : Instrument #1 Sample Rate : 10.00 Hz
 Channel : B = B Run Time : 19.440 min

** Star Chromatography Workstation Version 5.51 ** 00489-3620-1C2-0341 **

6.4 - Ensaios Confirmatórios - Cromatogramas

Nos Ensaios Confirmatórios foram realizadas 99 análises cromatográficas, considerado as triplicatas. Devido ao elevado número de cromatogramas gerados, este anexo contém um cromatograma típico.

6.4A - Ensaios Confirmatórios - Cromatograma do solo inicial (I Triplicata)

6.5 - Ensaios Biorremediação *ex-situ* - Cromatogramas

Nos Ensaios da Biorremediação *ex-situ* foram realizadas 273 análises cromatográficas, considerado as triplicatas. Devido ao elevado número de cromatogramas gerados este anexo contém um cromatograma típico.

6.5A - Ensaios *ex-situ* - Cromatograma do solo inicial S-10 (III Triplicata)

6.6 – Horizontes do solo considerados para retirada de amostras na Biorremediação *ex-situ* e para retirada de amostras indeformadas na caracterização do solo da área de plastificantes.

**Retiradas de solo para a Biorremediação *ex-situ*
Solo S-01**

Amostras	VOC	Instalação	Prof. (m)	Litologia	Descrição
				— — —	Concreto armado.
				S1.1 e S1.2	Aterro arenoso argiloso com muscovitas plásticas de até 1,0 centímetro, com leve odor. Intercalações de um material levemente foliado de coloração bege. A coloração predominante é marrom avermelhada.
				S1.	Material argiloso, marrom com intercalações de porções arenosas, areia fina de coloração acinzentada. Presença de muscovitas milimétricas. Observa-se odor adocicado.
	0 ppm	NA			
	0 ppm				Material silteoso, com porções arenosas, areia fina a média, com muita muscovita fina. Observa-se leve odor adocicado. Presença de bastante umidade.
	0 ppm				
	0 ppm				

- Horizontes considerados na retirada do solo para o tratamento *ex-situ*
— Horizontes considerados para a retirada das amostras indeformadas Sxx
NA Nível água

Retiradas de solo para a Biorremediação *ex-situ*
Solo S-02

Amostras	VOC	Instalação	Prof. (m)	Litologia	Descrição
					Concreto armado.
					Aterro de cor marrom, com presença de restos de concreto e pedregulhos de até 5,0 centímetros. Material arenoso com frações de silte.
					Aterro marrom avermelhado, presença de muscovitas finas. Ocorrem intercalações cinzas, areia fina. Observado forte odor. Aspecto plástico e com presença de foliação orientada pela muscovita.
					Aterro marrom avermelhado, presença de muscovitas finas, observado forte odor. Ocorrem manchas pretas. Material silte arenoso.
	17 ppm	NA			
	37 ppm				
	2 ppm				Aterro marrom avermelhado, areia silteosa, com muscovitas milimétricas. Presença de arento branco adzentado de tamanho centimétrico. Ocorrem manchas escuras. Observado odor diferente do acima amostrado.

- Horizontes considerados na retirada do solo para o tratamento *ex-situ*
— Horizontes considerados para a retirada das amostras indeformadas Sxx
NA Nivel água

Retiradas de solo para a Biorremediação *ex-situ*
Solo S-03

Amostras	VOC	Instalação	Prof. (m)	Litologia	Descrição
					Concreto armado.
					Material preto, silte arenoso, com matéria orgânica, e com porções avermelhadas. Material impregnado por substância oleosa. Presença de pedregulho com material rosa impregnado por forte odor.
				S3.1	
				S3.2	
				S3.3	Material avermelhado, silte arenoso, com intercalações de mesmo material, porém ocre. Presença de material oleoso em menor quantidade nesta amostra se comparada com a descrita anteriormente.
		NA			Material marrom silte arenoso, ocre com intercalações avermelhadas. Presença de manchas pretas com odor. Porém essas manchas estão em menor quantidade se comparadas com as amostras descritas anteriormente. Material bastante úmido.
	42 ppm				
	06 ppm				Material marrom silte arenoso, areia fina, intercalações de espessura milimétrica de material parecido com o anterior, porém miúdo e de coloração acinzentada. Observado leve odor.
	01 ppm				Material marrom silte arenoso, areia fina, presença de intercalações centimétricas de areia fina e de micas. Presença de matéria orgânica. Observa-se que as porções pretas continuam diminuindo conforme o aumento da profundidade.
	02 ppm		5		Material silte arenoso, areia fina, de coloração marrom acinzentada a preta. Presença de matéria orgânica (restos de galhos e raízes). Presença de bastante umidade. Observado leve odor.

- Horizontes considerados na retirada do solo para o tratamento *ex-situ*
— Horizontes considerados para a retirada das amostras indeformadas Sxx
NA Nivel água

Retiradas de solo para a Biorremediação *ex-situ*
Solo S-05

Amostras	VOC	Instalação	Prof. (m)	Litologia	Descrição
					Concreto armado.
					Solo marrom escuro, micáceo, silto arenoso, areia fina. Presença de manchas pretas e forte odor.
	43 ppm				
		NA		S5.1 e S5.2	Solo marrom escuro, micáceo, silto arenoso, areia fina de cor acinzentada. Presença de manchas pretas e forte odor.
	48 ppm				
	67 ppm				Solo acinzentado, silto arenoso, areia fina, micáceo. Presença de um forte odor.
	60 ppm		5		

- Horizontes considerados na retirada do solo para o tratamento *ex-situ*
— Horizontes considerados para a retirada das amostras indeformadas Sxx
NA Nível água

Retiradas de solo para a Biorremediação *ex-situ*
Solo S-06

Amostras	VOC	Instalação	Prof. (m)	Litologia	Descrição
		NA			Concreto armado.
					Solo marrom escuro, micáceo, silte arenoso, areia fina. Com presença de matéria orgânica e sem odor.
				<u>S6.1</u>	
	44 ppm				Solo marrom escuro, úmido, micáceo, silte arenoso, areia fina. Forte odor.
				<u>S6.2</u>	
					Solo de coloração preta, úmido, meloso, silte arenoso, areia fina de cor acinzentada, forte odor. Presença de material oleoso.
					Material marrom escuro, com forte odor, micáceo, silte arenoso, areia fina e com umidade.
	19 ppm				
	35 ppm				
	30 ppm				Material marrom escuro, com forte odor, micáceo, silte arenoso, areia fina e com umidade. Observado odor de plastificante. Amostra bastante plastificada.

- Horizontes considerados na retirada do solo para o tratamento *ex-situ*
— Horizontes considerados para a retirada das amostras indeformadas Sxx
NA Nível água

Retiradas de solo para a Biorremediação *ex-situ*
Solo S-07

Amostra	VOC	Instalação	Prof. (m)	Litologia	Descrição
					Concreto armado.
				S7.1	Solo marrom escuro com intercalações avermelhadas. Material silto arenoso, areia fina com presença de muscovita. Observado forte odor.
				S7.2	
				S7.3	
		NA			
	07 ppm				
	04 ppm				Material silto arenoso, areia fina, micáceo, com forte odor. Ocorre intercalações de areia fina esbranquiçada. A quantidade de areia e granulometria aumentam conforme maior profundidade.
	03 ppm				
			5		Areia média a grossa, com presença milimétrica a centimétrica de micas. Observado leve odor.

- Horizontes considerados na retirada do solo para o tratamento *ex-situ*
— Horizontes considerados para a retirada das amostras indeformadas Sxx
NA Nível água

Retiradas de solo para a Biorremediação *ex-situ*
Solo S-09

Amostra	VOC	Instalação	Prof. (m)	Litologia	Descrição
					Concreto armado.
					Material marrom, silte arenoso, areia fina, miúdo. Com intercalações avermelhadas.
				S 9.1	Material marrom escuro, silte arenoso, areia fina, miúdo. Presença de manchas pretas e forte odor.
		NA		S 9.2	Material marrom escuro, miúdo, silte arenoso, areia fina, plastificado. Observado manchas pretas de material oleoso e forte odor do mesmo.
	50 ppm				
	05 ppm				
	02 ppm		5		Material acinzentado, miúdo, silte arenoso, areia fina a média, plastificado, muito úmido. Observado manchas pretas semelhantes às descritas acima e forte odor do mesmo.

- Horizontes considerados na retirada do solo para o tratamento *ex-situ*
— Horizontes considerados para a retirada das amostras indeformadas Sxx
NA Nível água

Retiradas de solo para a Biorremediação *ex-situ*
Solo S-10

Amostras	VOC	Instalação	Prof. (m)	Litologia	Descrição
		NA			Concreto armado.
				S10.1	Material areno silteoso, areia fina, de cor branco acinzentado, presença de muscovita milimétrica. Amostra com plasticidade. Observado forte odor.
				S10.2	
				S10.3	
					Material areno silteoso, areia fina, de cor branco acinzentado, plástico. Presença de muscovita milimétrica. Observado forte odor. Forte evidência de fase adsorvida, haja visto que quando a amostra é submetida a pressão apresenta migração de substância oleosa.
	100 ppm				
	71 ppm				
	57 ppm		5		Areia fina com muscovita milimétricas, de coloração marrom, plástica, com forte odor. Presença de intercalações escuras no material.

- Horizontes considerados na retirada do solo para o tratamento *ex-situ*
- Horizontes considerados para a retirada das amostras indeformadas Sxx
- NA Nivel água

6.7. Ensaios Biorremediação *ex-situ* – Esquema Elétrico do painel de força e do painel de comando e controle de tempo de funcionamento das betoneiras

6.7 A Esquema de Ligação do painel

ESQUEMA DE LIGAÇÃO DO PAINEL DE FORÇA E DO PAINEL DE COMANDO E CONTROLE DE TEMPO DE FUNCIONAMENTO DAS BETONEIRAS

6.7 B Esquema Elétrico de Ligação do Painei

6.7 C Esquema Elétrico de Ligação do Painel (continuação)

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFGHAN, B.K. & CHAU, A.S.Y.; **Analysis of Trace Organics in the Aquatic Environment**. United States: CRC Press, 1989. 346p.
- ALBRO, P.; CORBETT, J.; SCHROEDER, J.; JORDAN, S.; MATTHEWS, H. Pharmacokinetics interactions with macromolecules and species differences in metabolism of DEHP. *Environ Health Perspect*, v. 45, p. 19-25, 1982.
- AMBITERRA – SOLUÇÕES AMBIENTAIS LTDA. **Instalação dos poços de extração (MPE) para execução do projeto de remoção de fase livre na área de plastificantes. Projeto 6578**. São Paulo. Jan/2004.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA), WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA), WATER ENVIRONMENTAL FEDERATION (WEF). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20 ed. Washington: APHA-WEF, 1998.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbio*, v. 59, p.143-169, 1995.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **Solo – Análise granulométrica** - NBR7181, 1984.
- _____. **Grãos de solos que passam na peneira de 4,8 mm - Determinação da massa específica** - NBR 6508, 1984a.
- BRADY, N.C. *Natureza e Propriedade dos solos*. Trad. de Antonio B. Neiva Figueiredo Fº. Livraria Freitas Bastos. Rio de Janeiro.1983.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigisolo: identificação de populações sob risco de exposição e priorização de áreas com populações expostas a solo contaminado**. 2005 Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=23900>. Acesso em:01 maio 2008.
- BROCKMAN, F.J. Nucleic-acid-based methods for monitoring the performance of *in situ* bioremediation. *Mol. Ecol*. v.4, p.45-58, 1995.
- BROWN, D.; THOMPSON, R.S.; STEWART, K.M.; CROUDACE, C.; GILLINGS, E. The effect of phthalate ester plasticisers on the emergence of midge (*Chironomus riparius*) from treated sediments. *Chemosphere*, v. 32, n. 11, p. 2177-2187, 1996.

CARRARA, S.M.C.M. **Biorremediação de áreas contaminadas por plastificantes: caso do ftalato de di-2-etilhexila**. 2003. 400 p. Tese (Doutorado)-Escola Politécnica, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003.

CARTWRIGHT, C.D.; OWEN, S.A.; THOMPSON, I.P.; BURNS, R.G. Biodegradation of diethyl phthalate in soil by a novel pathway. *FEMS Microbiology Letters*, v. 186, p. 23-34, 2000.

CHANG, B.V.; YANG, C.M.; CHENG, C.H.; YUAN, S.Y. Biodegradation of phthalates ester by two bacteria strains. *Chemosphere*, v. 55, p. 533-538, 2004.

CHATTERJEE, S.; DUTTA, T.K. Metabolism of butyl benzyl phthalate by *Gordonia* sp. strain MTCC 4818. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 309, p. 36-43, 2003.

CHEMICAL MANUFACTURERS ASSOCIATION. **Comments of the Chemical Manufactures Association phthalate ester panel in response to request for public input on seven phthalate esters**. FR Doc.99-9484. Washington,DC., 1999.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Determinação da biodegradação de resíduos – método respirométrico de Bartha. Norma L6 350**. São Paulo: CETESB, 1990. 15p.

_____. **Bactérias heterotróficas - contagem em placas**. São Paulo: CETESB. 1996. Norma técnica nº L5.201.

_____. **Diagnóstico da qualidade do solo e águas subterrâneas**. Parecer técnico nº 34/01/EQSS. São Paulo: CETESB, 2001a. Relatório interno.

_____. **Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo**. São Paulo : CETESB. 2001b.

_____. **Áreas contaminadas no Estado de São Paulo**. 2007. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp>.ovam.be/jahia/Jahia/pid/991?lang=en. Acesso em: 01 maio, 2008.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB); DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR TECHNISCHE ZUSAMMENARBEIT (GTZ). 2 ed.. **Manual de Gerenciamento de áreas contaminadas**. São Paulo: CETESB, 2001. 389 p. Projeto de cooperação técnica Brasil-Alemanha.

CRISP, T.M.; CLEGG, I.D.; KOOPER, R.L. Environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis. *Environ Health Perspect*, v. 106, p. 11-56, 1998.

DASTON, G.P.; GOOK, J.W.; BRESLIN, W.J. Environmental estrogens and reproductive health: A discussion of the human and environmental data. *Reprod Toxicol*, v. 1, n. 4, p. 465-481, 1997.

EICHNER, C.A.; ERB, R.W.; TIMMIS, K.N.; WAGNER-DÖBLER, I. Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* v.65, p.102-109, 1999.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa comunicação para transferência de tecnologia, 1999. 370p.

ENGELN, B.; MEINKEN, K.; WINTZINGERODE, F.; HEUER, H.; MALKONES, H.; BACKHAUS, H. Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprint in addition to conventional testing procedures. *Appl. and Environ. Microbiol.* v.64, n.8, p. 2814-282, 1998.

EUROPEAN GROUNDWATER AND CONTAMINATED LAND REMEDIATION INFORMATION SYSTEM (EUGRIS). **Portal for soils and water management in Europe**. 2000 Disponível em: http://www.eugris.info/FurtherDescription.asp?e=274&Ca=1&Cy=10&DocID=C&DocTitle=Statistics_and_related&T=Germany. Acesso em 01 maio, 2008

FASSBENDER, H.W.; **Química de suelos**. Instituto interamericano de ciencias agrícolas de la OEA. Turrialba, 1975. 385p.

GIAM, C.S.; ATLAS, E.; CHAN, H.S. Phthalic acid esters. In: HUTZINGER, O. **Handbook of Environmental Chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 1984, p. 67-142.

HARRIS, C.A.; HENTTU, P. PARKER, M.G. The estrogenic activity of phthalate esters *in vitro*. *Environ Health Perspect*, v. 105, p. 802-811, 1997.

HAZELTON, W.L. **A subchronic dietary oral toxicity study of di(2-ethylhexyl)phthalate in B6FC3F1 mice**. Washington DC: Submit to USEPA, Office of Toxic Substances. Eastman Kodak Company, 1992b.

HEUER, H.; KRSECK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16 rRNA and gel electrophoresis separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* v.63, p. 3233-3241, 1997.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* v.180, p.4765-4774, 1998.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS. **Análises químicas para avaliação da fertilidade de solos tropicais.** Campinas, Instituto Agrônômico, 2001. 285p

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Mapa Pedológico do Estado de São Paulo.** 2005. Escala 1:5.000.000. [1 mapa]. Disponível em www.ibge.gov.br-Mapas. Acesso em: 21 nov, 2005.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Summary of Data Reported and Evaluation,** v. 77, p. 41, Aug/2000.

JIANLONG, W., PING, L., Yi, Q. Microbial degradation of di-n-butylphthalate. *Chemosphere*, v. 31, n. 9, p. 4051-4056, 1995.

JIANLONG, W.; XUAN, Z.; WEIZHONG, W. Biodegradation of phthalic acid ester (PAE's) in soil bioaugmented with acclimated activated sludge. *Process Biochemistry*, v. 39, p.837-1841, 2004.

JOBLING, S.; REYNOLDS, T.; WHITE, R.; PARKER, M.G.; SUMPTER, J.P. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect*, v.103, p. 582-587, 1995.

JUNESON, C.; WARD, O.P.; SINGH, A. Biodegradation of bis(2-ethylhexyl)phthalate in a soil slurry-sequencing batch reactor. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 305-313, 2001.

KAEWPIPAT, K.; GRADY, C.L.P. Microbial Population dynamics in laboratory-scale activated sludge reactors. *Water Science and Technology*, v.46, n.1-2, p.19-27, 2002.

KEYS, D.A.; WALLACE, D.G.; KEPLER, T.B. Quantitative evaluation of alternative mechanisms of blood and testes disposition of di(2-ethylhexyl)phthalate and mono(2-ethylhexyl)phthalate in rats. *Toxicol Science*, v. 49, p. 172-185, 1999.

KURATA, Y.; MAKINODAM, F.; OKADA, M.; KAWASUSO, T.; DAVID, R.; GANS, G. Blood concentration and tissue distribution of ¹⁴C-di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in juvenile and adult common marmoset. *The Toxicologist*, v. 72, p. 384-385, 2003.

LAPARA, T.M.; NAKATSU, C.H.; PANTEA, L.; ALLEMAN, J.E. Phylogenetic analysis of bacterial communities in mesophilic and thermophilic bioreactors treating pharmaceutical wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* v.66, p.3951-3959, 2000.

- LLOYD-JONES , G.; LAURIE, A.D.; HUNTER, D. W. F.; FRASER, R.; Analysis of catabolic genes for naphthalene and phenanthrene degradation in contaminated New Zealand soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* v. 29, p.69-79, 1999.
- MEEK, M.E.; CHAN, P.K.L. Bis(2-ethylhexil)phthalate: evaluation of risks to health from environmental exposure in Canada. *J Environ Science Health Part C*, v. 12, p. 179-194, 1994.
- MERA, N. & IWASAKI, K. Use of plate wash samples to monitor the fates of culturable bacteria in mercury and trichloroethylene contaminated soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.77, p.437-445, 2007.
- MORANO, S.C. **Definição e otimização dos parâmetros de operação de uma barreira biológica para tratamento de BTEX em zona saturada.** 2006. 115p. Dissertação (Mestrado)-Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.
- MOREIRA, F.M.S.; **Microbiologia e bioquímica do solo.** Lavras: Editora UFLAS, 2002. 625 p.
- MUNSELL, A.H.; **Munsell book of color: Matte Finish Collection.** United States, 1979. 40p.
- MUYZER,G. & SMALLA,K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *J. Gen. Mol. Microbiol.*, v.73, p. 127-141, 1998.
- NETHERLANDS MINISTRY OF HOUSING, SPATIAL PLANNING AND THE ENVIRONMENT. Information on soil pollution. Disponível em <http://international.vrom.nl/pagina.html?id=8973>. Acesso em: 16 ago, 2005.
- NEW JERSEY DEPARTMENT OF HEALTH AND SENIOR SERVICES. **Hazardous Substance fact sheet: Dimethylphthalate.** May,2003.
- NTP Center for the evaluation of risks to human reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate. *Reproductive Toxicology*, v.16, p. 529-653, 2002.
- NTP Center for the evaluation of risks to human reproduction reports on phthalates: addressing the data gaps. *Reproductive Toxicology*, v.18, p. 51-22, 2004.
- OLANIRAM, A.O.; STAFFORD, W.H.; COWAN,D.A.; PILLAY, D.; PILLAY, B. Microbial community profiling in cis-and trans-dichloroethene enrichment systems using denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v.17, p.560-570, 2007.

- PAGANETO, G.O.; CAMPI, F.; VARANI, K. Endocrine-disrupting agents on health human tissues. *Pharmacol.Toxicol*, v. 86, p. 24-29, 2000.
- PARKS, L.G.; OSTIBY, J.S.; LAMBRIGHT, C.R. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol Science*, v. 58, p. 339-349, 2000.
- PETROVIC, M. & BARCELO, D. Determination of anionic and non ionic surfactants, their degradation products, and endocrine-disrupting compounds en sewage sludge by liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem*, v. 72, p. 4560-4567, 2000.
- PUBLIC WASTE AGENCY OF FLANDERS. **Soil remediation**. 2008 Disponível em <http://www.ovam.be/jahia/Jahia/pid/991?lang=en>. Acesso em: 01 maio, 2008.
- RÉPUBLIQUE FRANÇAISE. MINISTÈRE DE L' ECOLOGIE ET DU DEVELOPPEMENT DURABLE. **Pollution des sols**. Basol. 2008. Disponível em <http://basol.environnement.gouv.fr/tableaux/home.htm> Acesso em: 01 maio, 2008.
- RHODES, C.; ORTON, T.; PRATT, I.; BATTEN, P.; BRATT, H.; JACKSON, S. Comparative pharmacokinetics and subacute toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in rats and marmosets: extrapolation of effects in rodents to man. *Environ Health Perspect*, v.65, p.299-308, 1986.
- SAFE, S.; CONNOR,K.; RAMAMOORTHY,K. Human exposure to endocrine-active chemicals: Hazard assessment problems. *Reg Toxicol Pharmacol*, v. 26, p. 52-58, 1997.
- SHI,S. & BANDING,G.D. Changes to the structure of Sphingomonas spp. Communities associated with biodegradation of the herbicide isoproturon in soil. *FEMS Microbiol. Lett*, v.269, p.110-116, 2007.
- STAPLES, C.A.; PETERSON, D.R.; PARKERTON, T.F.; ADAMS, W.J. The environmental fate of phthalate esters: a literature review. *Chemosphere*, v. 35, n. 4, p. 667-749, 1997.
- U.S.CONTROL and DESEASE CENTER. **Second National Report on Human exposure to Environmental Chemicals**. 2003. Disponível em: <http://www.cdc.gov/exposure.report.html>. Acesso em: 20 maio, 2005
- U. S. DEPARTMENT OF DEFENSE (DOD). **Remediation Technologies screening matrix and reference guide**. Second edition. Oct/1994
- U. S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES – AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). **Toxicological profile for di(2-ethylhexil)phthalate**. Sept, 2002.

U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **A citizen's guide to bioremediation.** EPA 542-F-96-007. Apr/1996. Disponível em: <http://www.epa.gov/swertio1/products/citguide/biorem.html> . Acesso em: 25 de jan, 2005.

_____.**Special report on environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis.** EPA/630/R-96/012. Washington, 1997.

_____.Superfund. NPL site status information. Disponível em <http://www.epa.gov/superfund/sites/npl/status.html>. Acesso em: 16 ago, 2005.

_____.**SW-846 MANUAL. Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods.** Disponível em <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/sw846.htm>. Acesso em 23 ago, 2005.

_____.**MANUAL. Bioventing Principles and practice.** vI: Bioventing Principles. EPA/540/R-95/534a. Washington, 1995.

_____. **FY 2007 Superfund Annual Report.** Building on Success: Protecting Human Health and the Environment. Washington, 2007

VEGA, D. & BASTIDE, J. Dimethylphthalate hydrolysis by specific microbial esterase. *Chemosphere*, v. 51, p. 663-668, 2003.

WAGNER, M.; ERHART, R.; MANZ, W.; AMMAN, R.; LEMMMER, H.; WEDI, D.; SCHELEIFER, IK. Development of an rRNA targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* v.60, p.792-800, 1994.

WESSELINK, L. G.; NOTENBOOM, J.; TIKTAK, A. The consequences of the European Soil Framework Directive for Dutch policy. MNP report 500094003. Netherlands Environmental Assessment Agency. the Netherlands, dec. 2006

WOLF, N.L.; BURNS, L.A.; STEEN, W.C. Use of linear free energy relationships and an evaluative model to assess the fate and transport of phthalate esters in aquatic environment. *Chemosphere*, v. 9, p. 393-402, 1980.

ZACAREWSKY, T.R.; MEEK, M.D.; CLEMONS, J.H. Examination of the *in vitro* and *in vivo* estrogenic activities of eight commercial phthalate esters. *Toxicol Science*, v.46, p.282-293, 1998.

ZENG, F.; CUI, K.; FU, J.; SHENG, G.; YANG, H. Biodegradability of di(2-ethylhexyl)phthalate by *Pseudomonas fluorescens* FS1. *Water,Air,Soil Pollut*, 140, p. 297-305, 2002.

ZENG, F.; CUI, K.; LI, X.; FU, J.; SHENG, G. Biodegradation kinetics of phthalate ester by *Pseudomonas fluorescences FS1*. Process Biochemistry, 39, p. 1125-1129, 2002.