

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Instituto de Geociências e Ciências Exatas
Campus de Rio Claro

NATHALIA FROIMAN CARMONA

RESPIROMETRIA APLICADA A SOLOS CONTAMINADOS
POR DERIVADOS DE PETRÓLEO E FLUORCARBONADOS
EM CONDIÇÕES CLIMÁTICAS REAIS

Trabalho de Formatura apresentado ao Instituto
de Geociências e Ciências Exatas - Campus de
Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho, para obtenção do grau
de Engenheiro Ambiental.

Rio Claro - SP

2016

NATHALIA FROIMAN CARMONA

**RESPIROMETRIA APLICADA A SOLOS CONTAMINADOS
POR DERIVADOS DE PETRÓLEO E FLUORCARBONADOS
EM CONDIÇÕES CLIMÁTICAS REAIS**

Trabalho de Formatura apresentado ao Instituto
de Geociências e Ciências Exatas - Campus de
Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho, para obtenção do grau
de Engenheiro Ambiental.

Comissão Examinadora

Dr. Renato Nallin Montagnolli (co-orientador)

Profa. Dra. Vânia Silvia Rosolen

Jaqueline Matos Cruz

Rio Claro, 24 de novembro de 2016.

Assinatura do orientador

Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia

Assinatura do co-orientador

Dr. Renato Nallin Montagnolli

Assinatura da aluna

Nathalia Froiman Carmona

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que tanto amo, Berta e Reinaldo, que sempre estiveram do meu lado, me apoiando e ajudando em todos os momentos. Obrigada por tudo. Tenho muito orgulho de vocês e de ter vocês como pais.

À minha avó, Miriam, por ter me criado, por todo o amor que me deu e por sempre acreditar no meu potencial.

Às minhas amigas de faculdade e república Espirro, Grilo, Fernanda C., Giovanna, Lari, Kika, Única, Lost, Cuti, Ditudo e Vitória. Tenho muita sorte de ter encontrado amigas e irmãs tão especiais nessa faculdade e que sem vocês não seria a mesma. Agradeço por todo o tempo que passamos juntas e que ainda iremos passar. Amo muito todas vocês.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia e ao meu co-orientador Dr. Renato Nallin Montagnolli por toda ajuda e assistência durante todo o tempo de pesquisa.

Ao Laboratório Multidisciplinar do Departamento de Bioquímica e Microbiologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Ao Jardim Experimental da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

A contaminação por derivados de petróleo ocorre de diversas formas no ambiente e seus efeitos podem permanecer por longos períodos de tempo. Acidentes da indústria petroquímica são frequentes e quando ocorrem, há possibilidades de incêndios com a combustão destes derivados. Para conter as chamas, geralmente são usadas espumas extintoras para maior eficiência e isolamento da área. Os resíduos, tanto do petróleo como da espuma, são persistentes e sua permanência no solo pode trazer problemas ao ambiente uma vez que desestabilizam todo um ecossistema, e também à população, visto que há a possibilidade de percolação para aquíferos de abastecimento que em certas quantidades podem ser prejudiciais à saúde.

Para tratamento de baixo custo de contaminantes, a biorremediação é uma técnica atualmente empregada pela introdução de micro-organismos específicos no local ou pela ação da microbiota autóctone, capazes de biodegradar a substância contaminante até que não seja prejudicial, tendo a liberação de gás carbônico e água como produtos finais, uma vez considerada completa.

Este trabalho teve como objetivo simular em pequena escala uma contaminação de óleo diesel em solo com a presença de espuma extintora de incêndio, e a partir disso estudar o processo de biorremediação realizado pelos micro-organismos presentes no solo com análise indireta de degradação dos compostos pela liberação de CO₂. Para isso, foi utilizado o método de respirometria, tendo como referência os respirômetros de Bartha e Pramer adaptados para condições climáticas reais. Ainda, para estudo da toxicidade dos contaminantes, foram feitos testes de germinação de sementes com os solos em estudo, antes e depois do processo de degradação analisado pelo método da respirometria. Posteriormente, o estudo propôs modelagens matemáticas que descrevem o processo de biodegradação do diesel e da espuma tendo como base modelagens de crescimento microbiano.

Como resultado, pôde-se confirmar que o óleo diesel possui uma biodegradabilidade maior que a espuma extintora AFFF com baixo grau de toxicidade nas concentrações estudadas. E foi possível ajustar os resultados de respirometria a uma modelagem matemática.

A espuma extintora AFFF, em contrapartida, se apresentou tóxica ao solo, com baixos índices de respiração microbiana analisados pela respirometria. Seu comportamento no solo, durante 90 dias, não foi satisfatório para que se pudesse modelar sua biodegradação.

Palavras chave: Biorremediação. Óleo Diesel. Respirometria. Toxicidade

ABSTRACT

The contamination by oil derivatives occurs in the environment in different ways and its effects may remain for long periods. Accidents in the oil industry are frequent and, when they occur, the combustion of these products might happen. In order to contain the flames, extinguishing foams are generally used for greater efficiency and area isolation. The waste from both the oil and the foam is persistent and its permanence in the ground may cause problems to the environment since it destabilizes the whole ecosystem. Furthermore, the population may be affected by the possibility of seepage into supply aquifers of certain amounts that may be harmful to health.

For low-cost treatment of contaminants, bioremediation is a technique currently employed by the introduction of specific microorganisms in the environment or by the action of the indigenous microflora. They are able to biodegrade the contaminant until it is not harmful anymore. The final products released when the reaction is considered complete are carbon dioxide and water.

This project aimed to run a small-scale simulation of diesel oil contamination in soil with the presence of extinguishing foam fire, and based on that examine the bioremediation process carried out by microorganisms with indirect analysis of the compound degradation by the release of CO₂. For this purpose, the respirometric method was used, based on the adaptation of the Bartha and Pramer's respirometers to the actual weather conditions. In addition to that, to study the toxicity of contaminants, seed germination tests were made with the soil under study, before and after the analysis of the process of degradation by the method of respirometry. Subsequently, the study proposed mathematical models in order to describe the biodegradation process of diesel and foam having as a reference the modeling of microbial growth.

As a result, it was confirmed that the diesel oil is a biodegradable fuel with low degree of toxicity. In addition to that, it was possible to adjust the presented results of respirometry to a mathematical modeling. In the other hand, the extinguishing foam AFFF performed as toxic to the soil, with low microbial respiration rates analyzed by respirometry. During the 90 days of study, its behavior in soil was not satisfactory to model its biodegradation.

Keywords: Bioremediation. Diesel. Respirometry. Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de extinção de incêndio com o uso da AFFF.	17
Figura 2 - Diferentes fases presentes nas zonas insaturada e saturada.	20
Figura 3 - Esquema representativo de um respirômetro de Bartha.	25
Figura 4 - Curva de crescimento bacteriano.	26
Figura 5 - Esquematização piloto 1.	30
Figura 6 - Esquematização piloto 2.	31
Figura 7 - Esquematização experimento final.	32
Figura 8 - Estruturas de medida de uma semente.	36
Figura 9 - Ensaios controle (C) em triplicata.	41
Figura 10 - Ensaios com diesel (D) em triplicata.	42
Figura 11 - Ensaios com espuma AFFF (F) em triplicata.	43
Figura 12 - Ensaios co-contaminados (B) em triplicata.	44
Figura 13 - Reta padrão de condutividade.	45
Figura 14 - Gráfico da respiração microbiana em semanas.	46
Figura 15 - Gráfico de respiração microbiana acumulada em semanas.	47
Figura 16 - Contagem e medição de sementes do ensaio C4.	48
Figura 17 - Contagem e medição de sementes do ensaio D3.	48
Figura 18 - Resultados qualitativos do crescimento de sementes anterior à respirometria.	49
Figura 19 - Resultado da germinação de sementes com contaminante AFFF.	50
Figura 20 - Placas de Petri germinadas dos ensaios A ao E e referentes diluições.	51
Figura 21 - Contagem e medição de sementes do ensaio B (1:2).	51
Figura 22 - Contagem e medição de sementes do ensaio C (1:5).	52
Figura 23 - Contagem e medição de sementes do ensaio D (1:10).	52
Figura 24 - Contagem e medição de sementes do ensaio E (1:100).	53
Figura 25 - Contagem e medição de sementes do ensaio E (1:100).	53
Figura 26 - Resultado qualitativo do crescimento de sementes com o contaminante AFFF.	54
Figura 27 - Resultado qualitativo do crescimento de sementes em concentração diluída posterior ao processo de respirometria.	56
Figura 28 - Resultado qualitativo do crescimento de sementes em concentração original posterior ao processo de respirometria.	58
Figura 29 - Modelo matemático de liberação de CO ₂ dos ensaios (D).	59

Figura 30 - Modelo matemático de liberação de CO ₂ dos ensaios (B).	60
Figura 31 - Ensaios (C) de produção de CO ₂ acumulado.....	61
Figura 32 - Ensaios (D) de produção de CO ₂ acumulado.....	61
Figura 33 - Ensaios (F) de produção de CO ₂ acumulado.	62
Figura 34 - Ensaios (B) de produção de CO ₂ acumulado.....	62
Figura 35 - Fases da mistura de ar, solução de surfactante aquosa e hidrocarbonetos.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do óleo diesel.	14
Tabela 2 - Tipos de hidrocarbonetos do óleo diesel.	15
Tabela 3 - Concentrações de contaminantes - piloto 1.	29
Tabela 4 - Concentrações de contaminantes - piloto 2.	30
Tabela 5 - Concentrações de contaminantes - experimento final.	32
Tabela 6 - Dados para construção da reta padrão de condutividade.	34
Tabela 7 - Anterior ao processo de biodegradação.	35
Tabela 8 - Ensaios da toxicidade de AFFF anterior ao processo de biodegradação.	35
Tabela 9 - Posterior ao processo de biodegradação.	35
Tabela 10 - Valores comparativos (Jardim x Estufa).	40
Tabela 11 - Germinação dos ensaios de respirometria em porcentagem (%).	55
Tabela 12 - Germinação dos ensaios de respirometria em porcentagem (%).	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Gerais.....	13
2.2 Específicos.....	13
3 REVISÃO BIBLIGRÁFICA	14
3.1 Petróleo e Óleo Diesel	14
3.2 Espuma extintora e a AFFF	15
3.3 Solo e Micro-organismos	18
3.4 Contaminação de solos por hidrocarbonetos e AFFF.....	19
3.5 Biorremediação por micro-organismos	21
3.6 Método da Respirometria	23
3.6.1 Respirômetro de Bartha e Pramer.....	24
3.7 Toxicidade e testes com sementes	25
3.8 Degradação microbiana e a modelagem matemática	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Área de estudo e coleta de solo	28
4.2 Método da respirometria em condições climáticas reais	28
4.2.1 Experimentos Piloto	29
4.2.2 Experimento Final	31
4.2.3 Reta padrão de condutividade (S) e molaridade de CO ₂	33
4.3 Toxicidade dos contaminantes em sementes de alface.....	34
4.4 Modelagem matemática e software SIGMAPLOT	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Biorremediação por ensaios de respirometria	38
5.1.1 Experimento Piloto 1	38
5.1.2 Experimento Piloto 2.....	38
5.1.3 Experimento Final	39
5.2 Toxicidade dos contaminantes.....	47
5.2.1 Testes de toxicidade anteriores ao processo de respirometria.....	47

5.2.2	Testes de toxicidade com a espuma extintora	50
5.2.3	Testes de toxicidade posteriores ao processo de respirometria	54
5.2.3.1	Testes com diluição (1:5)	54
5.2.3.2	Testes sem diluição.....	56
5.3	Degradação de contaminantes comparado a modelagem de crescimento microbiano	58
6	CONCLUSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1 INTRODUÇÃO

A partir da década de 70 em contexto de regime militar, o crescimento e desenvolvimento econômico brasileiro exigiu grande estruturação de toda a cadeia produtiva dos derivados do petróleo no setor industrial. As indústrias petrolíferas resultantes desse desenvolvimento são hoje umas das principais fontes poluidoras do ambiente, responsáveis por graves acidentes que envolvem petróleo e seus derivados. A partir delas podem ocorrer contaminações em qualquer etapa da produção de petróleo, seja na extração, refinamento, transporte ou no armazenamento (KULKAMP, 2003).

No momento em que o combustível atinge o solo, seus componentes separam-se em três fases: dissolvida, líquida e gasosa. Uma parte da fração dos componentes da mistura se dissolve na água do lençol freático, uma segunda porção é retida nos espaços porosos do solo na sua forma líquida pura como saturação residual e outra parte dos contaminantes passíveis de evaporação dão origem à contaminação atmosférica (NADIM et al., 1999).

A contaminação por petróleo e seus derivados pode ser desastrosa, podendo permanecer no ambiente por longos períodos e ainda contaminar aquíferos e nascentes os quais muitas vezes são utilizados para abastecimento urbano e industrial. Ainda, incêndios e explosões são tão graves quanto a poluição ambiental e de acordo com a NFPA (1991), podem ocorrer tanto em espaços confinados (como tanques de armazenamento de combustíveis em refinarias ou postos de gasolina), quanto em áreas abertas (como poços de petróleo e derramamentos). (MONTAGNOLLI, 2011).

O óleo diesel é um hidrocarboneto derivado de petróleo largamente utilizado no Brasil, visto ao grande desenvolvimento do sistema rodoviário no país. Segundo a ANP (2015), o consumo de diesel ultrapassou 56 milhões de m³ neste mesmo ano. Ainda, referente a dados de 2016, ocorreram pelo menos cinco acidentes rodoviários e em refinarias só neste segundo semestre, com a combustão deste derivado com presença de incêndios. (Folha de São Paulo).

Nestes casos, como procedimento de conter o fogo, o uso da água nem sempre é o mais adequado, sendo utilizadas espumas extintoras. Essas espumas podem também permanecer nos solos misturadas aos restos de hidrocarbonetos incendiados.

A contaminação de hidrocarbonetos com a espuma extintora tem impacto considerável, uma vez que o diesel, tomado como exemplo, não é caracterizado com alta volatilização e apresenta decomposição lenta comparado a outros derivados como a gasolina. Assim, uma possível co-contaminação pode ter uma permanência ainda maior no solo e formar plumas mais facilmente.

A técnica de biorremediação é uma alternativa de baixo custo que pode ser avaliada em casos de contaminação com o uso de agentes biológicos capazes de decompor os resíduos presentes no local. O resultado do processo é a mineralização do poluente, isto é, liberação de gás carbônico, água e biomassa a partir de micro-organismos autóctones (do próprio local, sem qualquer interferência de outras tecnologias). Segundo Mariano (2006), isto ocorre devido a uma reação de oxirredução em que o hidrocarboneto é oxidado e o aceptor de elétrons é reduzido, que no caso da biorremediação aeróbia, este aceptor seria o oxigênio (O_2). Neste processo, são necessários três fatores: contato entre o micro-organismo e a substância a ser degradada; condições ambientais favoráveis para que o micro-organismo realize a degradação e; o micro-organismo deve ser capaz de realizar a degradação ou transformação da substância (DOMINGUES, 2007).

Um método de acompanhamento da biodegradação é a respirometria que estuda um sistema aeróbio a partir da quantidade de CO_2 produzido e O_2 consumido em locais contaminados. Esta pesquisa utilizou ensaios respirométricos de Bartha e Pramer (1965) adaptados os quais avaliam a liberação indireta de CO_2 de solos contaminados com óleo diesel e espuma extintora.

Ainda, em estudos ambientais, testes toxicológicos são de grande importância em processos de biorremediação. Ensaios de toxicidade permitem avaliar, através de bioindicadores, se a biodegradação reduziu ou não o potencial tóxico do contaminante no ambiente. Este trabalho estudou, por testes de germinação de sementes, o grau de toxicidade dos contaminantes no solo antes e depois do tratamento por biorremediação.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Estudar a biorremediação por micro-organismos autóctones em solo contaminado com óleo diesel e espuma extintora AFFF.

2.2 Específicos

-Analisar a eficiência da atividade microbiana com resultados obtidos de biodegradação quando o solo possui apenas um dos contaminantes e ambos; e relacionar os processos.

-Avaliar a toxicidade dos contaminantes nos solos antes e depois do processo de degradação.

-Apresentar modelos matemáticos que mais se adequem à dinâmica de biodegradação dos hidrocarbonetos em solo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Petróleo e Óleo Diesel

O petróleo é uma mistura complexa de compostos orgânicos, na maior parte alcanos e hidrocarbonetos aromáticos, com pequenas quantidades de compostos como oxigênio, nitrogênio e enxofre (FETTER, 1993).

O óleo diesel é um produto inflamável derivado do fracionamento do petróleo caracterizado por uma mistura complexa de destilados intermediários do óleo cru, com hidrocarbonetos de cadeia simples, não ramificadas, variando de C8 a C25. É um composto de aproximadamente 40% de n-alcanos, 40% de iso e cicloalcanos, 20% de hidrocarbonetos aromáticos e o restante de isoprenóides, enxofre, nitrogênio e compostos oxigenados. A composição de um óleo diesel específico, entretanto, dependerá da fonte do petróleo, do método de produção e dos processos de destilação (KULKAMP, 2003). Em relação a gasolina, o diesel é caracterizado por apresentar maiores cadeias, maior densidade, menor solubilidade em água e menor volatilidade. Na Tabela 1, pode-se verificar propriedades do diesel:

Tabela 1- Propriedades físico-químicas do óleo diesel

Propriedades	Óleo Diesel
Fórmula	C8 a C25
Peso Molecular (g/mol)	200 (aproximado)
Pressão de Vapor (mmHg)	10,34
Ponto de Ebulição (°C)	139,1
Solubilidade em água, mg/L (20-25 °C)	2,7-3,2

Fonte: CENPES/Petrobrás

O diesel é constituído de uma mistura de hidrocarbonetos monoaromáticos (BTX e TMB) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). (KULKAMP, 2003) A Tabela 2 relaciona em porcentagem (%), os tipos de hidrocarbonetos presentes neste derivado de petróleo.

Tabela 2 – Tipos de hidrocarbonetos do óleo diesel

Hidrocarbonetos	Óleo Diesel (%)
Saturados+olefinas	74,8+0,4
Monoaromáticos	17,7
Diaromáticos	5
Poliaromáticos	2,1
Aromáticos Totais	24,8

Fonte: CENPES/Petrobrás

O diesel é largamente utilizado em motores de combustão e altamente empregado como combustível de automóveis, ônibus, caminhões. Em razão disso, é considerado o derivado de petróleo mais consumido no Brasil devido a predominância do transporte rodoviário no país.

No ambiente, o diesel pode ser encontrado como resultado de liberações acidentais ou vazamentos de pequeno à grande porte. Em meio aquoso, o diesel se espalha rapidamente, onde componentes polares e de baixo peso molecular se dissolvem e são lixiviados, podendo ficar adsorvidos às partículas do sedimento de fundo, enquanto que partículas voláteis se desprendem devido à evaporação.

A biodegradação do óleo diesel em solo é incompleta (GALLEGO et al., 2001), isso ocorre ou porque há a limitação na transferência de hidrocarbonetos ou por causa da quantidade insuficiente de oxigênio disponível no meio.

3.2 Espumas extintoras e a AFFF

Espumas são sistemas termodinamicamente instáveis que apresentam estrutura tridimensional composta por células gasosas e líquidas capazes de se estabelecer em uma camada de filme contínua podendo ter grandes propriedades em extinção de incêndios (FIGUEREDO, 1998).

Elas são produzidas com soluções aquosas, porém com propriedades extintoras que as tornam mais eficientes que a água, dependendo do tipo e extensão do fogo. As espumas foram desenvolvidas para se obter melhor aderência ao material em chamas, produzindo um recobrimento contínuo sobre ele. Como apresentam baixa densidade, espalham-se sobre a superfície do material em combustão, abafando-a e isolando-a do contato com o oxigênio atmosférico (MONTAGNOLLI, 2015).

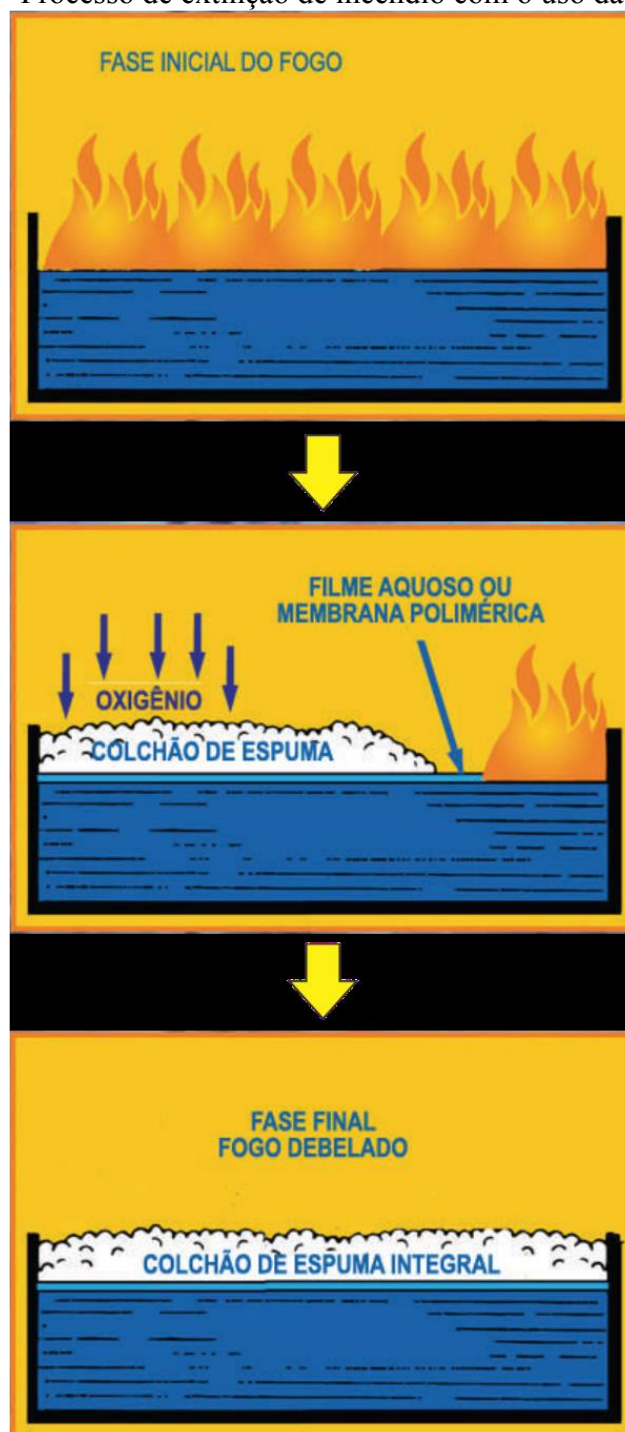
Dentre todas as espumas, a AFFF (da sigla em inglês *aqueous film forming foam*) é um Líquido Gerador de Espuma (LGE) desenvolvido em 1962 pela marinha americana, a partir de

hidrocarbonetos e surfactantes fluorados com a capacidade de formar um filme aquoso sobre a superfície de combustíveis de hidrocarbonetos, necessitando baixa energia para produção de espuma de qualidade, em que além de isolar o combustível, realiza também o seu resfriamento para que não haja reignição do material.

A eficiência de espumas geradas pelo concentrado AFFF se deve principalmente à estrutura destes surfactantes perfluorados ligados à uma cadeia carbônica, solventes e um grupo hidrofílico de polissacarídeos, com grande estabilidade térmica e química (BOBERT et al., 1997; FIGUEREDO, 1998).

A espuma atua de diversas maneiras: criando colchões de espuma na superfície do combustível, sufocando o fogo e separando as chamas da superfície do combustível. O colchão de espuma suprime a liberação dos vapores inflamáveis que poderiam se misturar com o ar e provocar as chamas novamente (MONTAGNOLLI, 2015). Os procedimentos realizados pela espuma pode ser verificado na Figura 1.

Figura 1- Processo de extinção de incêndio com o uso da AFFF.



Fonte: Traduzido de Overige Blussystemen (2008)

De sua disponibilidade, existem diversos fabricantes de AFFF com uma formulação distinta, porém não se sabe ao certo quais são todos os constituintes necessários para a fabricação da AFFF, visto que os compostos exatos são protegidos por patentes e não são divulgados com precisão pelos fabricantes.

A preocupação com a utilização da AFFF tem se intensificado pois sua aplicação é vista como fundamental em situações necessárias para cessar incêndios que ocorrem frequentemente em indústrias petroquímicas. Como consequência, tem-se surfactantes compostos por perfluorclorados (PFCs) persistentes, bioacumulativos, tóxicos e contaminantes liberados no ambiente. Porém, no Brasil, a legislação atesta erroneamente a AFFF 3% e 6% como um Líquido Gerador de Espuma (LGE), não tóxico e biodegradável.

Ainda, a forte ligação entre flúor e carbono, constituintes das AFFF não são facilmente degradados. Uma vez liberados no ambiente, são o principal fator de limitação da biodegradabilidade dos PFCs (MONTAGNOLLI, 2015). A degradação microbiana, no entanto, apesar de ser relativamente lenta, pode contribuir de forma significativa para minimizar o impacto ambiental em longo prazo, visto que há índice de biodegradabilidade de alguns compostos halogenados (FETZNER, 1998; DOLFING, 2000; WHITACRE, 2008).

3.3 Solo e Micro-organismos

O solo é originado a partir das rochas por meio de processos físicos, químicos e biológicos que promovem a desintegração, decomposição e recombinação, e consiste na camada externa e agricultável da superfície terrestre (REICHARDT e TIMM, 2004). Ele é constituído de três fases: gasosa, líquida e sólida. A fase líquida é representada pela solução do solo, onde se encontram em suspensão elementos químicos e moléculas solúveis. A fase gasosa é composta pelos gases presentes na atmosfera, porém em diferentes proporções (MOREIRA, 2006). A fase sólida é formada por partículas minerais (areia, silte e argila), raízes de plantas, populações de organismos macros e microscópios com metabolismo ativo ou dormente, e materiais orgânicos em vários estágios de decomposição (COSTA FILHO, 2011).

A porosidade do solo permite uma maior permeabilidade de materiais de superfície, podendo ter grande distribuição de nutrientes, porém, se existente em altos índices, poderá ocorrer também uma maior percolação de contaminantes estranhos ao solo. Os micro-organismos ocupam em torno de 0,5% desse espaço poroso do solo (MOREIRA, 2006).

Os cinco principais grupos de micro-organismos presentes nos solos são as bactérias, os actinomicetos, os fungos, as algas e os protozoários. A maior parte da comunidade microbiana presente nos solos é formada pelas bactérias, tanto em quantidade de indivíduos (de 10⁹ a 10¹⁰ por grama de solo) quanto em variedade de espécies (MELLO, 2005). Estes se encontram mais presentes nas camadas mais superficiais do solo em que o oxigênio necessário está disponível, além de haver também maiores quantidades de matéria orgânica para consumo.

Os micro-organismos mineralizam a matéria orgânica resultando em produção de biomassa e compostos secundários. A temperatura é um fator que interfere diretamente na ação enzimática de micro-organismos, em que em as altas temperaturas facilitam este processo, e as baixas temperaturas diminuem a permeabilidade da membrana celular, que controla o transporte de nutrientes e contaminantes entre o meio exterior e o interior da célula microbiana. (USEPA, 1995).

3.4 Contaminação de solos por hidrocarbonetos e AFFF

A maioria dos contaminantes é capaz de permear até camadas mais profundas do solo, assim, para ocorrer a biorremediação é necessário fornecer as condições adequadas e quando um contaminante entra em contato com o solo, ocorre uma série de transformações físicas, químicas e biológicas, tanto em micro quanto em macro escala (BAKER E HERSON, 1994).

As bactérias são os principais representantes de micro-organismos com potencial de degradação dos contaminantes. O uso de bactérias em processos de biorremediação é bastante eficiente. Entretanto, os fungos também possuem um importante papel, visto que são mais resistentes às mudanças de condições ambientais como pH e salinidade do meio.

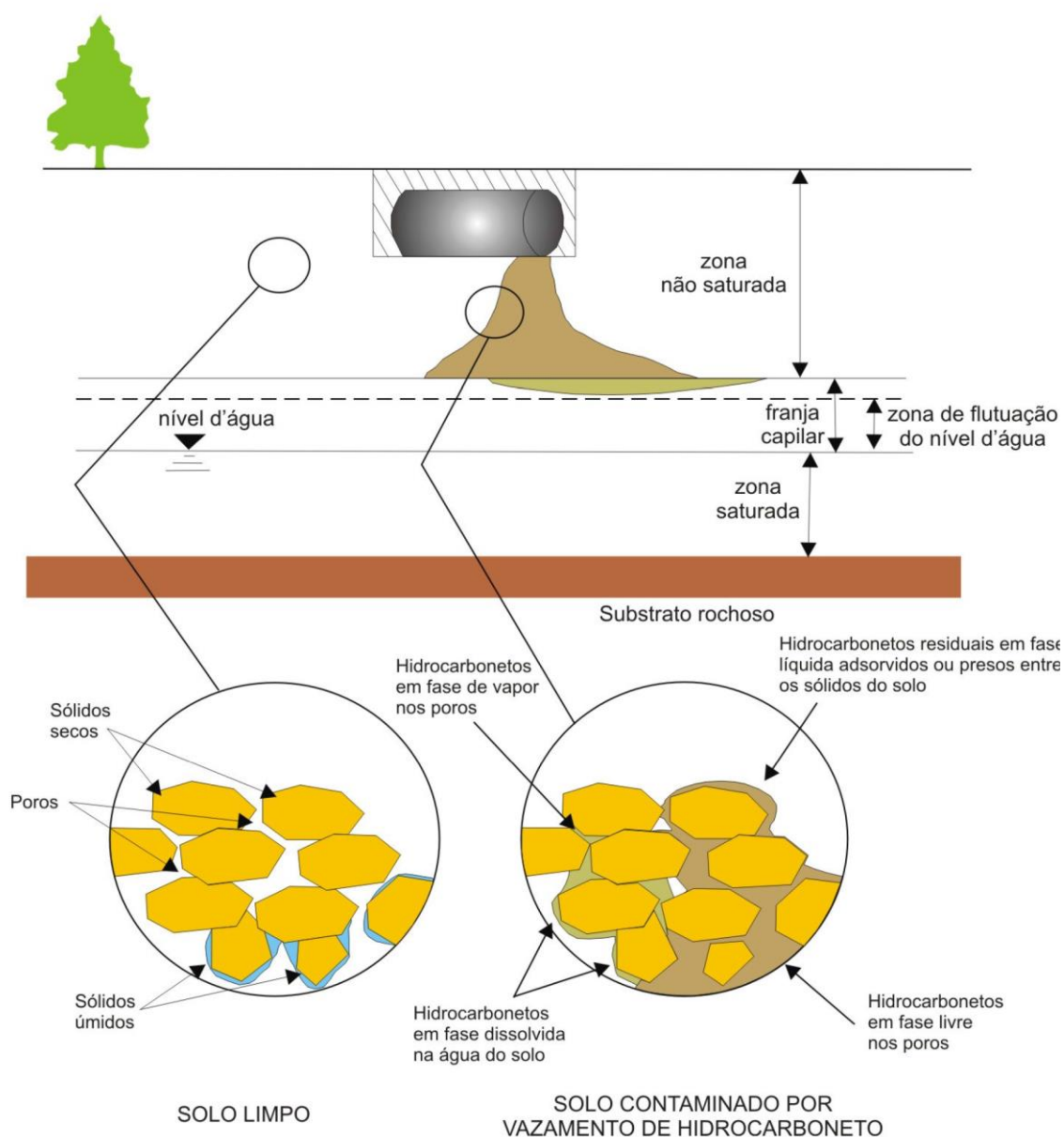
Ainda, para o crescimento da população microbiana, muitas vezes torna-se necessária a adição dos nutrientes fósforo e nitrogênio. O nitrogênio é necessário para a síntese celular de proteínas e de componentes da parede celular, podendo ser utilizado também como um aceptor de elétrons alternativo. O fósforo é necessário para os ácidos nucleicos, membranas celulares e ATP. Tanto nitrogênio quanto fósforo são, frequentemente, limitantes em solos (BAKER e HERSON, 1994).

Quando tratamos de contaminantes derivados do petróleo, os quais são caracterizados por longas cadeias carbônicas, os micro-organismos são os principais agentes responsáveis pela sua ciclagem e mineralização. Em muitos ecossistemas existe uma comunidade autóctone de micro-organismos capazes de degradar hidrocarbonetos (KATAOKA, 2001).

Os hidrocarbonetos em contato com o solo migram verticalmente pela zona não saturada sob a influência das forças gravitacional e capilar. Alguma expansão horizontal também ocorrerá devido à atração das forças capilares (DEHAINI, 2001 apud MANCINI, 2002). Forças capilares são as que influenciam o movimento dos hidrocarbonetos em fase líquida pelos poros do solo. Essas forças dependem de: a) solo molhado com água ou com hidrocarbonetos em fase líquida; b) propriedades físicas e químicas dos hidrocarbonetos em fase líquida; c) características do solo (GUIGUER, 2000). Segundo Mariano (2006), o transporte dos

hidrocarbonetos no solo é caracterizado pela formação de quatro fases distintas que regulam o processo de migração do produto: fase líquida residual, fase líquida livre, fase dissolvida e fase vapor como observado na Figura 2.

Figura 2 - Diferentes fases presentes nas zonas insaturada e saturada.



Fonte: GUIGUER (2000)

A fase líquida residual pode existir no solo como resíduos líquidos relativamente imóveis, adsorvidos ou retidos entre os sólidos do solo. O líquido livre não residual que passa pelo solo é chamado de fase líquida livre, que quando atinge o nível freático subterrâneo passa a flutuar sobre o mesmo. Hidrocarbonetos em fase dissolvida podem estar presentes na água do solo e

quando atingem o nível d'água formam a chamada pluma de contaminação. Os hidrocarbonetos em fase de vapor podem existir como componentes do vapor do solo, podendo também se condensar e adsorver-se na superfície sólida ou dissolver-se na água do solo (GUIGUER, 2000).

A AFFF, usada em grande escala em refinarias de petróleo, afeta diretamente o meio ambiente, podendo contaminar solos e ser carregado para corpos d'água locais quando ocorrem incêndios de líquidos inflamáveis (MONTAGNOLLI, 2015). Apesar de em sua embalagem estar descrito que o AFFF é uma substância atóxica e biodegradável, sua decomposição total é dificilmente alcançada, principalmente devido aos compostos perfluorados que apresentam ligações de difícil quebra com o carbono. Sua biodegradação consiste sobretudo na quebra da parcela não fluorada da molécula (butil carbitol). Assim, resquícios originais de AFFF podem permanecer no meio ambiente por tempo indeterminado (ISTOK et al., 2010).

A co-contaminação de óleo diesel e concentrado AFFF pode apresentar diferentes resultados quanto ao grau de biodegradação do composto final e ao tempo de processo. Propriedades distintas do derivado de petróleo são capazes de influenciar o processo de biodegradação do AFFF e vice-versa em questões de superfície de contato, infiltração, distribuição e retenção.

3.5 Biorremediação por micro-organismos

A biorremediação representa uma tecnologia limpa, simples e de baixo custo, a qual pode ser descrita como um processo em que ocorrem reações bioquímicas mediadas por reações de oxirredução por micro-organismos autóctones (presentes naturalmente na área) ou alóctones (introduzidos no local). Um composto orgânico quando é oxidado perde elétrons para um aceptor final. O oxigênio comumente atua como aceptor final de elétrons quando presente e a oxidação de compostos orgânicos com a redução do oxigênio molecular é chamado de respiração aeróbia heterotrófica. No entanto, quando o oxigênio não está presente, micro-organismos podem usar compostos orgânicos ou íons inorgânicos como aceptores finais de elétrons alternativos, condições estas chamadas de anaeróbias. A biodegradação anaeróbia pode ocorrer pela desnitrificação, redução do ferro, entre outros. (CORDAZZO, 2000).

- Biodegradação aeróbia: o oxigênio é um cosubstrato para a enzima que pode inicializar o metabolismo do hidrocarboneto e por fim ele é utilizado como aceptor final de elétrons para a geração de energia (YOUNG, 1984).
- Biodegradação utilizando o nitrato: quando a quantidade de oxigênio diminui e nitrato está presente (ou outras formas oxidadas de nitrogênio), alguns micro-

organismos anaeróbios facultativos utilizam nitrato (NO_3^-) ao invés de oxigênio como aceptor final de elétrons.

- Biodegradação utilizando o íon férrico: uma vez que as quantidades de oxigênio e nitrato reduzem, os micro-organismos podem utilizar o íon férrico (Fe^{III}) como aceptor de elétrons. Grandes quantidades de ferro na forma férrica estão presentes em sedimentos de muitos aquíferos e esta pode ser uma potencial fonte desse composto para a biodegradação em condições anaeróbias.

A degradação aeróbia, a mais comumente estudada para hidrocarbonetos, quando completa tem como produtos finais gás carbônico, água e biomassa. Porém, quando parcial, deve-se apenas utilizar do método da biorremediação se os subprodutos formados forem não-tóxicos ao meio ambiente.

As condições para que a biodegradação ocorra são, basicamente, três: (1) o micro-organismo deve estar próximo ao composto orgânico, (2) o composto orgânico deve estar disponível ao micro-organismo e (3) o micro-organismo deve ter a capacidade de participar em alguma parte do processo de biodegradação ou transformação retirando energia para si (RÉGIS, 2000).

O processo de biorremediação que se dá no local contaminado é denominado biorremediação *in situ*. Porém, para demonstrar que uma tecnologia de biorremediação é potencialmente útil, é importante verificar a biodegradação dos poluentes sob condições controladas. Isto geralmente não é possível de se obter *in situ*, assim, esta verificação deve ser obtida através de experimentos laboratoriais (MARIANO, 2006).

Para maiores resultados em processos de biodegradação, há o estudo condições hidrogeológicas e fatores que auxiliam na eficiência do processo (USEPA, 1990):

- Permeabilidade do solo e materiais de subsuperfície: quanto maior a permeabilidade mais fácil é a distribuição dos nutrientes e do receptor de elétrons no solo contaminado e na água subterrânea;
- Tipo de solo: como a permeabilidade, o tipo de solo afeta o grau de adsorção de contaminantes e nutrientes. Areia e cascalho são os materiais mais favoráveis para o transporte de nutrientes; argilas são os menos favoráveis;
- Concentração de minerais: os nutrientes básicos exigidos para o desenvolvimento microbiano são o nitrogênio, fósforo, enxofre e, em baixo nível, diversos metais (Fe, Mn, etc.), podendo variar de acordo com o poluente;

- Potencial Redox (Eh): a concentração de oxigênio é um dos parâmetros mais importantes dentro dos processos microbiológicos, o qual é usualmente medido através do potencial redox;
- pH: enzimas são polímeros de aminoácidos e suas atividades requerem um grau de protonação adequado dos aminoácidos. Este processo é controlado pelo pH. O pH ótimo para a ação dos micro-organismos é usualmente próximo da neutralidade;
- Temperatura: a temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que influenciam a atividade e a sobrevivência dos micro-organismos (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996). Altas temperaturas são associadas com atividades enzimáticas mais altas e taxas de biodegradação mais rápidas, até um valor que é específico de cada espécie, porém se a temperatura aumenta muito acima do valor ótimo, proteínas, enzimas e ácidos nucleicos tornam-se desnaturados e inativos.

3.6 Método da Respirometria

A respirometria consiste na medida de ação microbiana na biodegradação de compostos orgânicos, isto porque consegue medir a quantidade de CO₂ gerado no processo por unidade de volume e de tempo, a qual pode ser relacionada como produto da atividade enzimática dos micro-organismos em petróleo, derivados e outros contaminantes.

Como não é possível medir as taxas de respiração no interior das células, são utilizadas as medidas do volume de oxigênio consumido ou de CO₂ produzido (BERNARDES e SOARES, 2005). Os ensaios respirométricos têm como finalidade estimar o tempo para a estabilização de um resíduo orgânico inserido no solo e detectar uma possível toxicidade aos micro-organismos devido à presença de determinados elementos no resíduo (NUVOLARI, 1996).

Porém, como um fator negativo, quando essa metodologia é realizada com misturas de contaminantes, é impossível prever qual contaminante está sendo metabolizado em determinado momento (BAKER e HERSON, 1994). Além disso, o consumo de oxigênio e liberação de gás carbônico não podem ser justificados exclusivamente pela remoção de carbono do contaminante, pois existem também outros processos oxidativos no solo, como o de compostos inorgânicos.

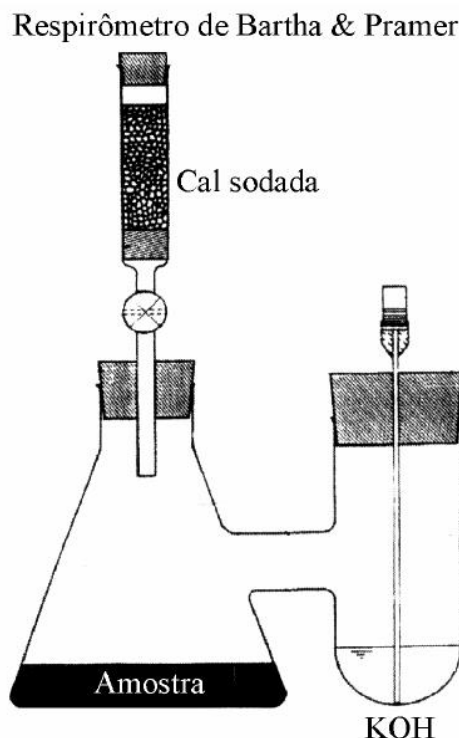
A Norma Técnica L6.350 da CETESB (1990), afirma que a medida de CO₂ produzida nos respirômetros pode ser efetuada em sistemas de análise em fluxo contínuo ou em sistemas fechados.

Para medir a variação de CO₂ em sistema fechado, sob condições controladas, são utilizados respirômetros, também denominados como reatores, ou câmaras de respiração. Na câmara de respiração são colocados em contato o substrato a ser degradado, a biomassa e o oxigênio disponível, que será consumido (FERREIRA, 2002). Uma das técnicas que se destaca é a medida indireta da liberação de CO₂ por substância alcalina (normalmente hidróxido de potássio - KOH ou hidróxido de sódio – NaOH).

3.6.1 Respirômetros de Bartha

Um ensaio muito comum de respirometria para técnicas de biorremediação é o do respirômetro de Bartha e Pramer (1965), padronizado pela NBR 14.283, de 1999, é amplamente utilizado em trabalhos científicos nacionais. Ele utiliza de um frasco biométrico e uma solução alcalina de KOH para capturar o CO₂ gerado durante o processo de biodegradação dentro dos respirômetros. Para quantificar o CO₂ depois de um período de tempo capturado no KOH residual, é feita uma análise indireta por condutividade elétrica com o condutivímetro e uma solução padrão de condutividade 100 µS para calibração. A partir do volume de KOH residual e água destilada isenta de CO₂, pode-se medir em Siemens (S) a condutividade da solução e em seguida, converter para mol/L e analisar os resultados. A esquematização de um respirômetro de Bartha e Pramer (1965) pode ser verificada na Figura 3.

Figura 3 - Esquema representativo de um respirômetro de Bartha.



Fonte: MARIANO (2006)

Contudo, uma restrição deste ensaio é que ele é trabalhado em condições físicas ideais, com temperatura e pressão ajustadas. Além disso, a escala de laboratório empregada nos ensaios nem sempre corresponde às situações reais.

3.7 Toxicidade e testes com sementes

A toxicidade é uma propriedade inerente aos agentes químicos que produzem efeitos danosos a um organismo quando este é exposto, durante certo tempo, a determinadas concentrações (BERGMAN et al., 1986 apud NAVARRETE, 2006).

Os testes toxicológicos são aqueles que caracterizam o grau de toxicidade de um agente contaminante e eles são conclusivos a partir da germinação ou não de sementes. A germinação é um fenômeno biológico o qual o embrião sai do repouso fisiológico e entra em atividade metabólica em condições ambientais adequadas. Quando ocorrem alterações nos parâmetros ambientais devido à contaminação por substâncias tóxicas, o desenvolvimento do tecido vegetal pode ser afetado (AYERS e WESTCOT, 1999).

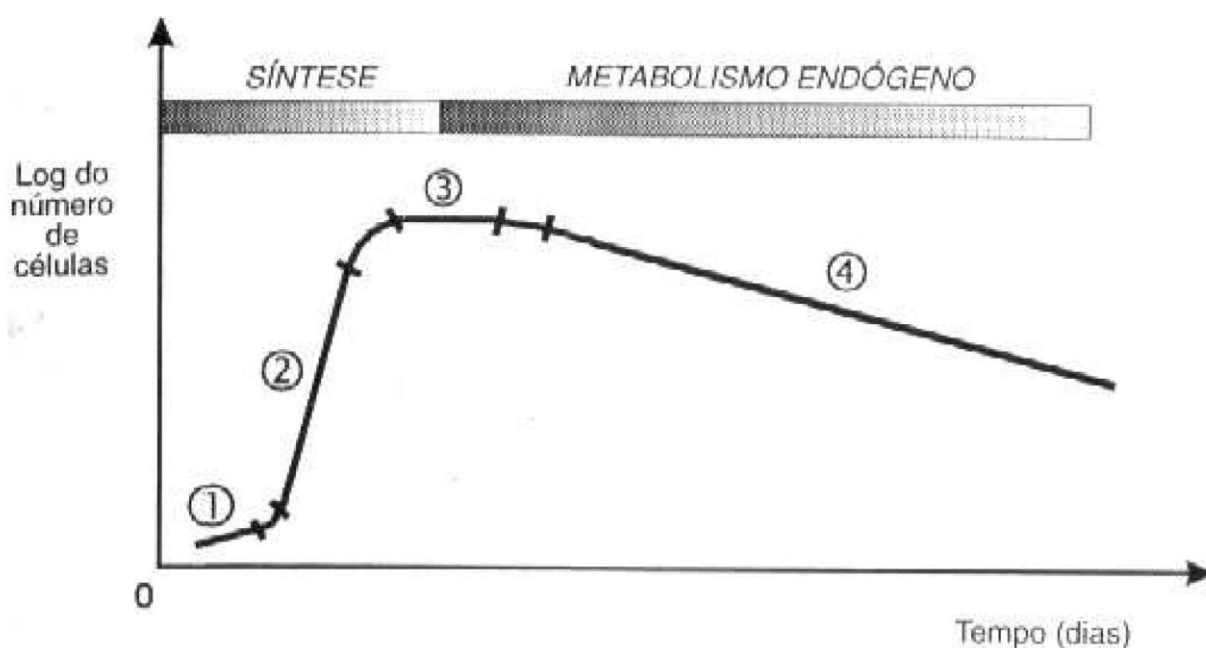
Em testes de toxicidade considera-se o agente como: a) *tóxico*, quando causa mortalidade a pelo menos 40% dos organismos-teste b) *não tóxico*, quando a mortalidade se situa entre 0 e 10% dos organismos e considera-se que o agente tóxico provoca *indícios de toxicidade*, quando a mortalidade se situa no intervalo entre 10 e 40% dos organismos-teste (BARBOSA, 2000).

A toxicidade de um contaminante pode ser reduzida devido a ação microbiana de biodegradação e atenuação natural ou ainda, pode aumentar uma vez que há a possibilidade de serem originados outros produtos desta degradação mais nocivos ao meio ambiente.

3.8 Degradação microbiana e a modelagem matemática

Em situações de contaminação, quando a quantidade de substrato é restrita, graficamente os ensaios de respirometria demonstram que, depois de certo tempo, ocorre a contínua queda da taxa de utilização de oxigênio por parte dos micro-organismos, fato que se deve à diminuição do alimento disponível. Deste modo, quando o contaminante, visto como alimento, se esgota, a única taxa a se desenvolver no sistema será a endógena (COSTA, 2009). A curva que representa as taxas de crescimento da biomassa está representada na Figura 4.

Figura 4 - Curva de crescimento bacteriano.



Fonte: VON SPERLING (1996)

1 - Fase de retardo ou adaptação: período de aclimação, no qual os micro-organismos presentes sofrem o processo de adaptação enzimática e tornam-se capazes de degradar o substrato;

2 - Fase de crescimento exponencial: o crescimento dos micro-organismos ocorre em uma taxa constante, pois há um excesso de substrato no meio, o que possibilita crescimento máximo limitado apenas pela capacidade apresentada pelos micro-organismos em degradar o substrato;

3 - Fase estacionária: nessa fase o crescimento populacional cessa, pois o substrato se torna escasso, e o crescimento de novas células é recompensado pela morte de outras, mantendo o número de células temporariamente constante;

4 - Fase de declínio exponencial: a disponibilidade de substrato é reduzida e a taxa de mortandade dos micro-organismos excede a produção de novos micro-organismos.

Os dados respirométricos de características representativos de atividade enzimática podem ser ajustados a modelos de produção de CO_2 , tendo como base o processo de crescimento e morte de comunidades microbianas como ilustrado na Figura 4.

Para estudo da biorremediação, a utilização de modelagens matemáticas pode ser bastante útil, pois possibilita descrever diversos processos como dinâmicas populacionais, dados estatísticos, etc. A modelagem permite a melhor análise da cinética do processo, permitindo prever e otimizar o mesmo (KERNANSHANI et al., 2006).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo e coleta de solo

As amostras de solo para realização do experimento foram retiradas de um canteiro específico do Jardim Experimental da UNESP Campus de Rio Claro (22°23'47.4"S 47°32'40.0"W).

O solo deste local apresenta histórico de contaminação com derivados de petróleo para estudos de biodegradação, o que foi fundamental para o estudo de micro-organismos autóctones e avaliação de suas atividades e adaptação no local.

4.2 Método da respirometria em condições climáticas reais

Este trabalho propôs um teste com adaptações para o ensaio de respirometria em condições climáticas reais, de maiores proporções utilizando os contaminantes e a solução alcalina de KOH capaz de capturar CO₂ para posterior análise química. Como proposta inicial, o experimento foi alocado em ambiente natural vulnerável a todo intemperismo do local simulando um ambiente contaminado, diferente dos respirômetros de Bartha e Pramer (1965) que foram utilizados como referência, porém, armazenados em incubadoras e realizados em menor escala.

O trabalho visou analisar o processo da biorremediação em solo pré-disposto a recebimento dos contaminantes com adaptações em maior escala. Para isso, foram utilizados recipientes plásticos com tampa e copos descartáveis para a inserção de solo e solução alcalina de hidróxido de potássio respectivamente.

Este estudo teve como objetivo simular cenários em que ocorressem incêndios da indústria petroquímica, especificamente da combustão do óleo diesel com a utilização de espuma extintora (AFFF). Para isso, foram realizados dois ensaios piloto para estudo de concentrações tanto dos contaminantes no solo, como da capacidade de captação de CO₂ da solução de hidróxido de potássio e dos tipos de recipientes. Por fim, foi realizado o ensaio final representativo.

4.2.1 Experimentos Piloto

Para melhor avaliação da atividade microbiana no solo, decidiu-se por realizar a contaminação em dois experimentos piloto com diferentes concentrações, em duplicata para ensaios controle (C) - solo sem contaminantes; contaminados com óleo diesel (D); contaminados com AFFF (F); e co-contaminados (B) com diesel e AFFF.

O piloto 1 foi iniciado em 02 de outubro de 2015 e finalizado em 15 de dezembro de 2015, completando 11 medições (semanal). Primeiramente, foram utilizados recipientes de embalagens plásticas retangulares 20x5 (cm), seguindo dados da Tabela 3.

Tabela 3 - Concentrações de contaminantes - piloto 1.

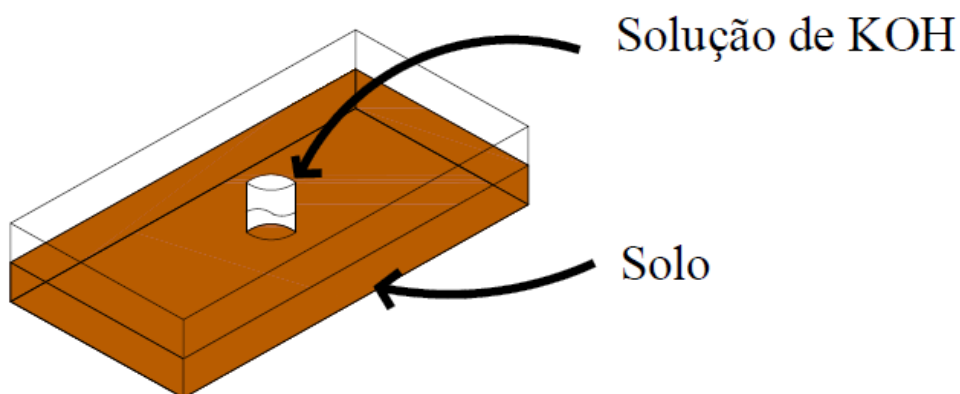
Ensaio	Solo	Óleo Diesel	AFFF
Controle (C)	100,00 g	----	----
AFFF (F)	100,00 g	----	15,00 mL
Óleo Diesel (D)	100,00 g	5,00 mL	----
Co-contaminação (B)	100,00 g	5,00 mL	15,00 mL
KOH	8,00 mL		

(Elaborado pelo autor)

De acordo com a tabela, os ensaios foram realizados em duplicata, totalizando 8 (oito) experimentos, com a utilização de solução alcalina KOH 0,20 mol/L.

A solução de KOH era realizada em laboratório, com água isenta de CO₂ e KOH da marca Dinâmica Química Contemporânea Ltda. CAS [1310-58-3] com pureza de 85% (ajustado em solução).

A água deionizada (isenta de CO₂) é preparada com o aquecimento da água destilada até seu ponto de ebulição. Nos experimentos eram utilizados 9 minutos de aquecimento no micro-ondas para 1 litro de água destilada. A Figura 5 a seguir representa a esquematização dos ensaios.

Figura 5 - Esquematização piloto 1.

(Elaborado pelo autor)

Finalizada a montagem dos experimentos, estes foram alocados durante 11 (onze) semanas no Jardim Experimental da UNESP Campus de Rio Claro para que ocorresse a biodegradação em condições climáticas locais. Semanalmente, os ensaios eram trazidos ao laboratório para medição da condutividade das soluções residuais de KOH em mS cm^{-1} , com diluição (5x) em água isenta de CO_2 (40 mL), a partir de uma solução $100 \mu\text{S cm}^{-1}$ usada para calibração do condutivímetro.

O piloto 2 foi iniciado em 10 de março de 2016 e finalizado em 05 de maio de 2016, completando 10 medições (semanal). Como no primeiro piloto, foram utilizados recipientes de embalagens plásticas retangulares 20x5 (cm) típicas para bolo, seguindo dados da Tabela 4.

Tabela 4 - Concentrações de contaminantes - piloto 2.

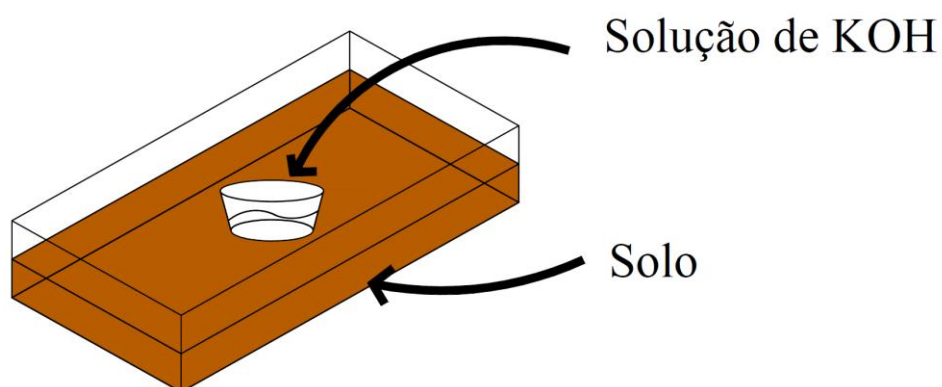
Ensaio	Solo	Óleo Diesel	AFFF
Controle (C)	100,00 g	----	----
AFFF (F)	100,00 g	----	10,00 mL
Óleo Diesel (D)	100,00 g	5,00 mL	----
Co-contaminação (B)	100,00 g	5,00 mL	10,00 mL
KOH	20,00 mL		

(Elaborado pelo autor)

Os ensaios novamente foram realizados em duplicata, totalizando 8 (oito) experimentos, porém, com a utilização de solução alcalina KOH 0,40 mol/L.

A Figura 6 representa a esquematização dos ensaios.

Figura 6 - Esquematização piloto 2.



(Elaborado pelo autor)

Novamente, os experimentos foram alocados durante 10 (dez) semanas no Jardim Experimental da UNESP Campus de Rio Claro para que ocorresse a biodegradação em condições climáticas locais. Semanalmente, os ensaios eram trazidos ao laboratório para medição da condutividade das soluções residuais de KOH em mS cm^{-1} com diluição (5x) em água isenta de CO_2 (100 mL), a partir de uma solução $100 \mu\text{S cm}^{-1}$ usada para calibração do condutivímetro.

4.2.2 Experimento Final

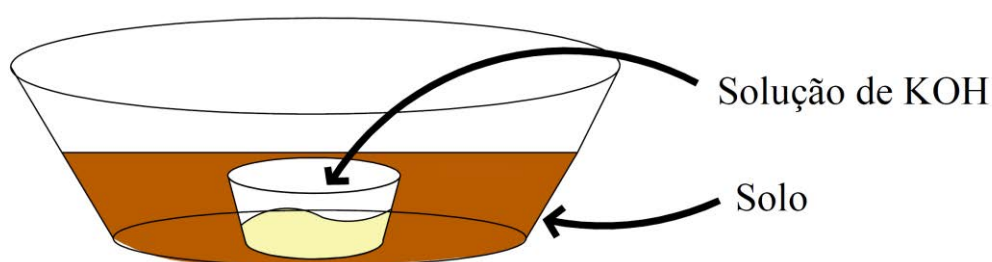
O experimento final foi realizado com base no piloto 2, seguindo as mesmas concentrações de poluentes como descrito na Tabela 5, pois este piloto apresentou resultados satisfatórios.

Tabela 5 - Concentrações de contaminantes - experimento final.

Ensaio	Solo	Óleo Diesel	AFFF
Controle (C)	100,00 g	----	----
AFFF (F)	100,00 g	----	10,00 mL
Óleo Diesel (D)	100,00 g	5,00 mL	----
Co-contaminação (B)	100,00 g	5,00 mL	10,00 mL
KOH	20,00 mL		

(Elaborado pelo autor)

Os ensaios finais foram realizados em triplicata, ou seja, 12 (doze) experimentos e também em diferentes recipientes plásticos, utilizando-se potes plásticos para que ocorresse menor perda gás carbônico liberado no processo. A Figura 7 representa a esquematização dos ensaios.

Figura 7 - Esquematização experimento final.

(Elaborado pelo autor)

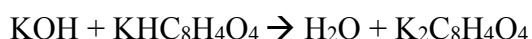
Foi iniciado em 19 de maio de 2016 e finalizado em 19 de agosto de 2016, completando 13 medições (semanal).

Os experimentos finais foram alocados durante 5 (cinco) semanas no Jardim Experimental da UNESP Campus de Rio Claro para que ocorresse a biodegradação em condições climáticas locais e durante 8 (oito) semanas na estufa em laboratório. Semanalmente, os ensaios eram trazidos ao laboratório para medição da condutividade das soluções residuais de KOH em mS cm^{-1} , com diluição (5x) em água isenta de CO_2 (100 mL), a partir de uma solução $100 \mu\text{S cm}^{-1}$ usada para calibração do condutivímetro.

4.2.3 Reta padrão de condutividade e molaridade de CO₂

Anterior a toda a coleta de dados de condutividade nos três experimentos, foi feita a padronização da solução alcalina de KOH mol/L para que fosse calculada a equação de conversão em mols de CO₂ com o menor erro possível.

Da solução preparada de KOH, titulou-se com biftalato de potássio (KHC₈H₄O₄) solução padrão com o uso de fenolftaleína, seguindo a estequiometria a seguir:



Em seguida, os dados de condutividade da solução alcalina KOH residual dos ensaios foram todos exibidos em mS cm⁻¹, enquanto que quanto menores os dados de condutividade apresentados, maiores eram os valores de CO₂ capturados. O CO₂ quando em contato com a solução, reage com o álcali e forma íons carbonato. Tradicionalmente, a quantificação de gás carbônico é feita pela titulação ácido/base seguindo proporção estequiométrica, porém, há outro método de medição. Álcalis e carbonatos de metais alcalinos são solúveis em água, onde os íons ficam dispersos e possuem a capacidade de conduzir corrente elétrica, em que a condutividade é medida pela presença desses eletrólitos, assim, por estequiometria, o método da medição por condutividade também é válido.

Para a transformação de dados e análise da biodegradação é necessário realizar uma reta padrão que nos forneça a equação de conversão de dados (Siemens para mol) seguindo a equação química:



Ao longo de um ensaio respirométrico, a solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,40 mol/L é convertida em uma solução de carbonato de potássio (K₂CO₃) 0,20 mol/L quando em contato com o CO₂, deste modo, foram feitas uma série de soluções padrão pela variação de volume das duas soluções como ilustrado na Tabela 6.

Tabela 6 - Dados para construção da reta padrão de condutividade.

KOH (ml)	K ₂ CO ₃ (ml)	H ₂ O (ml)	Condutividade mS/cm ³
20	0	100	18,81
18	2	100	17,77
16	4	100	16,67
14	6	100	15,59
12	8	100	14,49
10	10	100	13,63
8	12	100	11,86
6	14	100	10,61
4	16	100	9,49
2	18	100	8,68
0	20	100	7,31

(Elaborado pelo autor)

Com dados de condutividade das soluções padrão, foi calculada a equação de conversão conforme descrito em Resultados e Discussões.

4.3 Toxicidade dos contaminantes em sementes de alface (*Lactuca sativa*)

O estudo da toxicidade dos contaminantes no solo foi realizado em três diferentes ensaios: anterior ao processo de biodegradação; estudo do solo contaminado com AFFF em diferentes diluições e; posterior ao processo de biodegradação.

Os testes de toxicidade anteriores a biodegradação analisada pela respirometria foram realizados em quadruplicata com os solos (C), (D), (F) e (B), seguindo dados da Tabela 7.

O estudo com apenas o contaminante AFFF, anterior a respirometria, foi realizado em triplicata com cinco diluições diferentes, como apresentado na Tabela 8.

E, por fim, o terceiro teste de toxicidade foi realizado depois da análise de biodegradação em duplicata. Como os experimentos de respirometria foram realizados em triplicata, após o processo de respiração microbiana, cada um deles foi tomado como um ensaio isolado para a realização dos testes de toxicidade, como apresentado na Tabela 9.

Os testes de toxicidade posterior ao processo de respirometria foram divididos em dois ensaios distintos: com diluição (1:5) e sem diluição. Realizou-se testes com sementes nos ensaios respirométricos (C), (D), (F) e (B), em duplicata, e como cada experimento respirométrico foi realizado em triplicata, foram realizados 24 ensaios de toxicidade.

Tabela 7 - Anterior ao processo de biodegradação.

Ensaio	Solo	Óleo Diesel	AFFF
Controle (C)	5,00 g	----	----
AFFF (F)	5,00 g	----	2,00 mL
Óleo Diesel (D)	5,00 g	1,00 mL	----
Co-contaminação (B)	5,00 g	1,00 mL	2,00 mL
Água deionizada	25,00 mL		

(Elaborado pelo autor)

Tabela 8 - Ensaio da toxicidade de AFFF anterior ao processo de biodegradação.

Ensaio	Solo	AFFF
1:1 (A)	5,00 g	2,00 mL
1:2 (B)	5,00 g	1,00 mL
1:5 (C)	5,00 g	0,40 mL
1:10 (D)	5,00 g	0,20 mL
1:100 (E)	5,00 g	0,02 mL
Água deionizada	25,00 mL	

(Elaborado pelo autor)

Tabela 9 - Posterior ao processo de biodegradação.

Ensaio	Solo	Solo+Óleo Diesel	Solo+AFFF	Solo+ Óleo Diesel+ AFFF
Controle (C)	5,00 g	----	----	----
AFFF (F)	----	----	5,00 g	----
Óleo Diesel (D)	----	5,00 g	----	----
Co-contaminação (B)	----	----	----	5,00g
Água deionizada	25,00 mL			

(Elaborado pelo autor)

Os ensaios de toxicidade foram realizados a partir de sementes de alface (*Lactuca sativa*) livres de tratamento químico anterior da marca Feltrin Sementes Ltda. (Lote: 0002601130020010 Safra:2010/2011). Nos testes, 20 sementes foram colocadas em placas de Petri com papel filtro junto com uma solução da porção sobrenadante dos lixiviados das amostras de solo, mantidas sob agitação a 150 rpm em mesa agitadora Catel por 24 horas e

submetidas posteriormente a congelamento até momento de contagem. Os frascos continham 5,0 g de solo e 25,0 mL de água deionizada. As placas por fim, foram cobertas por plástico-filme para que não ocorresse perda de umidade e foram incubadas a 22 ± 1 °C durante 120 horas. Após o tempo de incubação foram contadas as sementes germinadas, tendo medição da raiz e do hipocótilo de cada plântula, em que qualquer uma com 2 mm de radícula foi considerada germinada (Figura 8).

Figura 8 - Estruturas de medida de uma semente.



Fonte: MONTAGNOLLI (2016)

4.4 Modelagem matemática e software SIGMAPLOT

Os dados respirométricos foram ajustados a modelos de produção de CO₂, tendo como base as Equações 1 e 2 (MONTAGNOLLI, 2015).

Adaptação da equação logística de Schmidt et al. (1985) segundo a equação 01:

$$B = B_{max} / (1 + [(B_{max} - B_0) / B_0] e^{-rt}), \text{ onde}$$

B é o CO₂ Produzido;

B_{max} é a Produção máxima de CO₂;

B₀ é a Produção inicial de CO₂;

r é a Taxa máxima de produção específica para determinado óleo;

t é o Tempo.

Modelo proposto por Membré et al. (1996) para crescimento e morte de comunidades microbianas segundo a equação 02:

$$B = [((1/K1) e^{-m_1 r}) + ((1/K2) e^{m_2 t})]^{-1}, \text{ onde}$$

B é o CO₂ Produzido;

K1 é a Constante de Aumento de Produção;

K2 é a Constante de Diminuição de Produção;

m1 é a Taxa de Aumento na Produção de CO₂;

m2 é a Taxa de Diminuição na Produção de CO₂;

t é o Tempo.

O uso de ferramentas estatísticas e proposição de diferentes modelos, ajudam a determinar o qual melhor se encaixa e de que maneira os perfis de biodegradação variam no decorrer do tempo. Os dados foram analisados por ferramentas de geração de gráficos MICROSOFT EXCEL 16.0. Para a modelagem dos dados e ajuste em equações foi utilizada a plataforma SYSTAT SIGMAPLOT 10.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Biorremediação por ensaios de respirometria

5.1.1 Experimento Piloto 1

O experimento piloto 1 foi um ensaio inicial em duplicata e teve um tempo de estudo de aproximadamente dois meses e meio, em que os ensaios foram armazenados todo o tempo em um canteiro do Jardim Experimental da UNESP Campus de Rio Claro sujeitos ao clima local, que na época era quente e úmido, apenas retirados de lá para medição uma vez por semana.

Com o piloto 1, percebeu-se índices de degradação altos (soluções alcalinas em torno de $10,00 \text{ mS cm}^{-1}$, comparados a solução padrão que se aproximava de $20,00 \text{ mS cm}^{-1}$), principalmente nos solos contaminados com diesel (D), porém, pouco representativo nos ensaios F e B. Assim, concluiu-se que o óleo diesel teve grande potencial de biodegradação devido a micro-organismos autóctones do solo do canteiro do Jardim Experimental.

Além disso, supôs-se que a solução alcalina $0,20 \text{ mol/L}$ de KOH estava saturando com a alta liberação de gás carbônico em um período de uma semana, sendo necessário rever o intervalo de medições para que não se perdesse dados.

Como a espuma AFFF é considerada biodegradável pelo fabricante, acreditou-se que a concentração de contaminante utilizada ($15,00 \text{ mL}$ para $100,0 \text{ g}$ de solo) fosse alta demais e que talvez o solo poderia estar saturado, onde os micro-organismos não conseguiriam atuar efetivamente, assim, decidiu-se realizar um novo ensaio intitulado piloto 2, com concentrações menores de espuma para analisar se a microbiota local apresentaria alguma atividade, mesmo que mínima.

Ainda, devido ao alto índice de liberação de gás carbônico dos ensaios (D), decidiu-se aumentar a molaridade da solução alcalina para $0,40 \text{ mol/L}$ e seu volume para 20 mL , para que tivesse a capacidade de capturar uma maior quantidade de CO_2 , produto da biorremediação.

5.1.2 Experimento Piloto 2

O piloto 2 foi um experimento que teve um tempo de estudo de aproximadamente dois meses, em que também, os ensaios foram armazenados em tempo integral em um canteiro do Jardim Experimental na UNESP Campus de Rio Claro, estando submetidos a clima um pouco mais ameno e seco, visto ter passado por uma mudança de estações (verão para outono). Ainda

assim, com temperaturas mais baixas, os ensaios foram bastante representativos em biodegradação e liberação de CO_2 analisados indiretamente por medidas de condutividade.

Ensaio contaminado com diesel, assim como o piloto 1, obtiveram ótimos resultados, tendo a mesma concentração que o anterior (5,00 mL em 100,00 g de solo). O aumento de volume e molaridade de KOH foi crucial para que se conseguisse medir apenas uma vez por semana os dados, não ocorrendo saturação da solução residual em nenhum momento do experimento.

Ensaio contaminado com AFFF, como citado anteriormente, foram alterados para uma menor quantidade de contaminante no solo, uma vez que se pretendia verificar algum tipo de atividade microbiana (de 15,00 mL para 10,00 mL em 100,00 g de solo) no surfactante. Os resultados foram mais representativos, porém, ainda assim, ensaios (F) e (B) em praticamente todo o tempo de experimento oscilavam entre $17,00 \text{ mS cm}^{-1}$ (B) e $19,00 \text{ mS cm}^{-1}$ (F), com ajuste de solução padrão = $19,99 \text{ mS cm}^{-1}$, em que os ensaios B eram os que respiravam mais devido a presença do diesel.

Como a ação dos micro-organismos não foi significativa nos ensaios (F), decidiu-se por realizar testes de toxicidade com sementes de alface nos solos anterior e posterior ao processo de biodegradação analisado por respirometria para verificar se a espuma é prejudicial ao solo e aos micro-organismos que nele se encontram.

Devido ao ótimo índice de degradação dos ensaios (D) e parcialmente do (B), decidiu-se realizar o experimento final com as mesmas características deste piloto como ilustrado na Tabela 4.

5.1.3 Experimento Final

O experimento final teve tempo de estudo de três meses totalizando 13 medições realizadas semanalmente. Foi baseado no piloto 2, porém com a alteração para potes plásticos pois as embalagens plásticas anteriores eram muito sujeitas a ter escape de CO_2 por não serem muito bem vedadas. E também, diferente do piloto 2, os ensaios foram todos realizado em triplicata contabilizando 12 respirômetros no total.

Primeiramente, todos os ensaios foram armazenados no mesmo canteiro do Jardim Experimental, susceptíveis a todo intemperismo e clima local.

Como resultado, neste período (até a 5ª medição), os respirômetros eram trazidos ao laboratório, e realizava-se todos os procedimentos experimentais: calibração do condutivímetro com solução padrão de $100 \mu\text{S cm}^{-1}$; verificação e preparo de água deionizada e solução alcalina

0,40 mol/L de KOH; diluição das soluções residuais em cinco vezes com água de todos os ensaios e do KOH branco; medição da condutividade de todos os respirômetros; e por fim, adição de nova solução de KOH nos recipientes plásticos. Em seguida, os ensaios eram levados novamente ao Jardim.

Até a quinta semana, a grande maioria dos respirômetros não apresentou resultados significativos de degradação desde o controle (C) ao co-contaminado (B). Pensou-se que pela temperatura ser um fator decisivo em processos que envolvem atividade microbiana, e as condições climáticas na época terem apresentado grande variação e alta amplitude, isso possa ter afetado a biorremediação. Assim, a partir da 5ª medição decidiu-se armazenar os respirômetros em estufa com condições de temperatura e pressão controladas, em laboratório.

A partir da 6ª medição, uma semana depois do armazenamento dos ensaios em estufa, estes já começaram a apresentar melhores resultados apresentados a seguir na Tabela 10 como média das triplicatas comparados a resultados anteriores da 5ª medição.

Tabela 10 - Valores comparativos (Jardim x Estufa).

Medições (mS)		C	D	F	B
27/06/2016	5ª medição	17,64	14,53	18,41	16,46
04/07/2016	6ª medição	17,81	8,87	18,62	12,01

(Elaborado pelo autor)

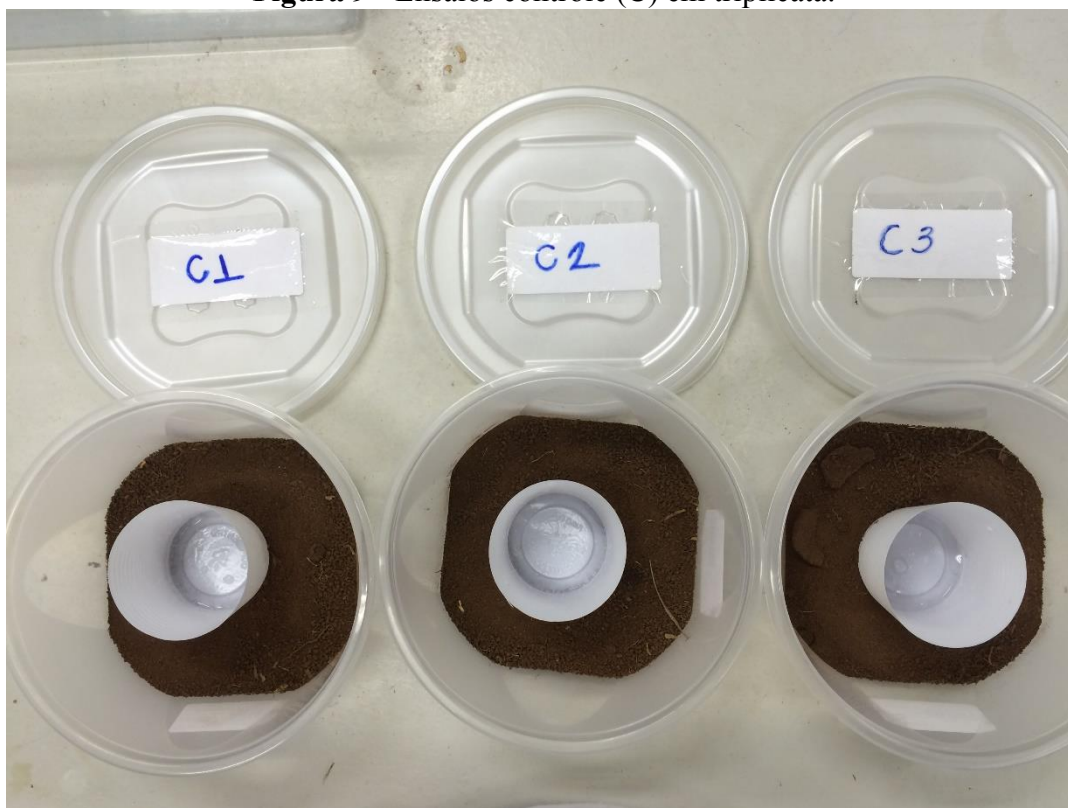
Visto que os valores de condutividade começaram a se tornar mais representativos a partir do momento que os ensaios foram alocados na estufa, pôde-se concluir que a temperatura e pressão interferem diretamente na atividade de biodegradação dos contaminantes no solo.

Da 6ª a 8ª semana teve um pico de degradação nos ensaios (D) e (B) com o maior índice de atividade microbiana e liberação de CO₂. Os ensaios (D) foram os que tiveram melhores resultados de condutividade, seguidos do (B), (C) e (F) nesta ordem.

Da 8ª a 13ª semana, houve diminuição de atividade microbiana e liberação de CO₂ em todos os respirômetros. Entretanto os valores não foram nulos. Os ensaios (C) e (F) foram os que apresentaram os menores resultados de produção de CO₂ ao longo de toda a respirometria. Não foi observado em (C) e (F) uma curva característica de biodegradação, cujo perfil típico é associado ao pico de crescimento e morte de micro-organismos. Ao invés disso, observou-se uma produção baixa e constante ao longo do tempo.

Os ensaios, após o período de estudo da biorremediação, são mostrados nas Figuras 9, 10, 11 e 12 a seguir, em que se pode verificar a presença de copo plástico no interior, onde se colocava a solução alcalina.

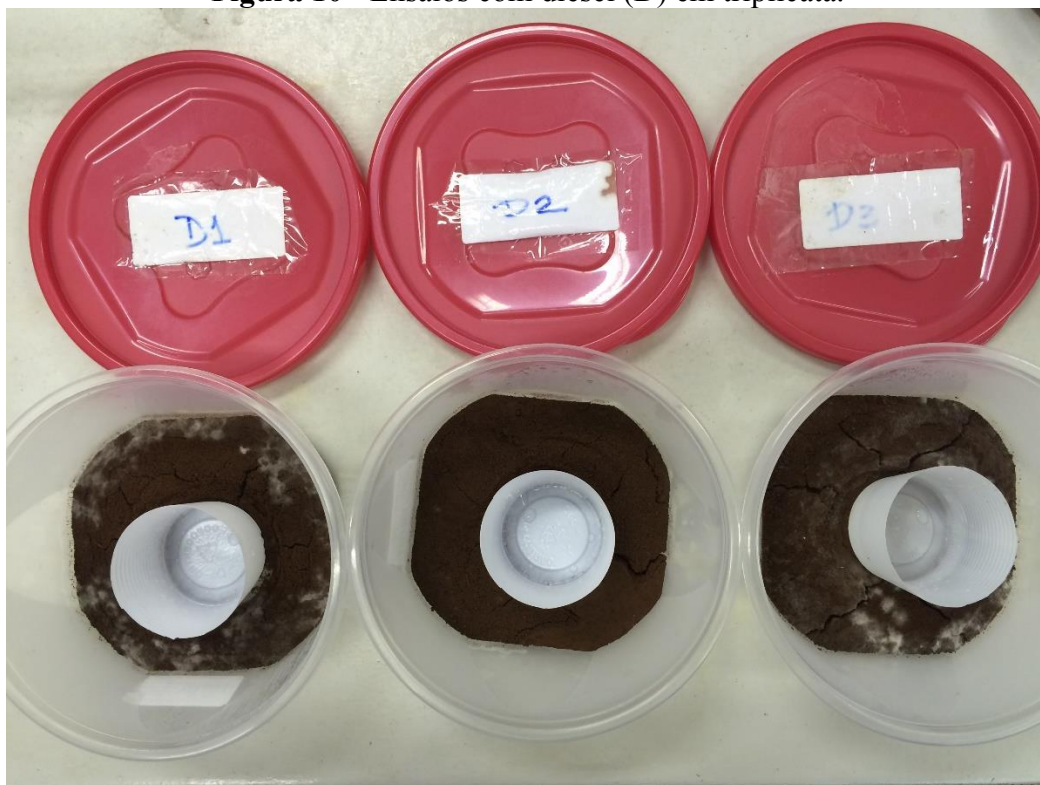
Figura 9 - Ensaios controle (C) em triplicata.



(Elaborado pelo autor)

Os ensaios controle acima, foram os que apresentaram resultados de biodegradação baixos, com pouca atividade e liberação de CO_2 , visto não ter uma presença grande de nutrientes, tendo apenas atividades endógenas no meio.

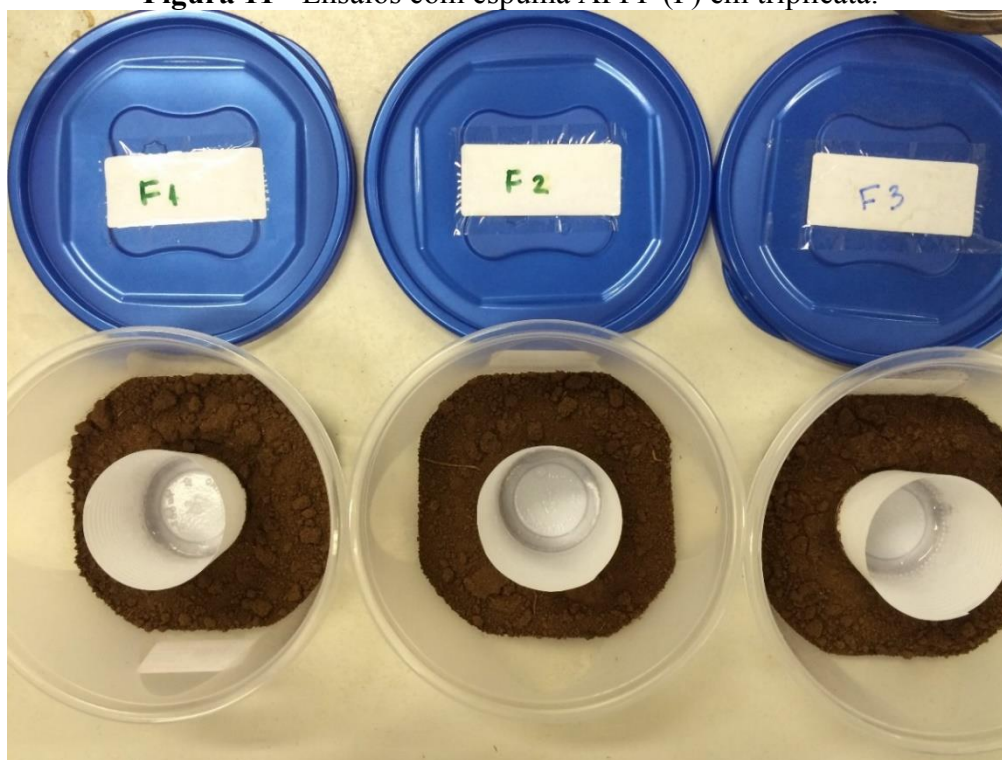
Figura 10 - Ensaio com diesel (D) em triplicata.



(Elaborado pelo autor)

Os ensaios de respirometria com óleo diesel foram os que apresentaram melhores resultados de respiração e degradação microbiana, e como pode ser observado na Figura 10, os respirômetros D1 e D3 apresentaram crescimento da microbiota visível (crescimento de fungos), justificando ser um nutriente biodegradável e ainda não tóxico pois os organismos locais conseguiram crescer neste ambiente adverso.

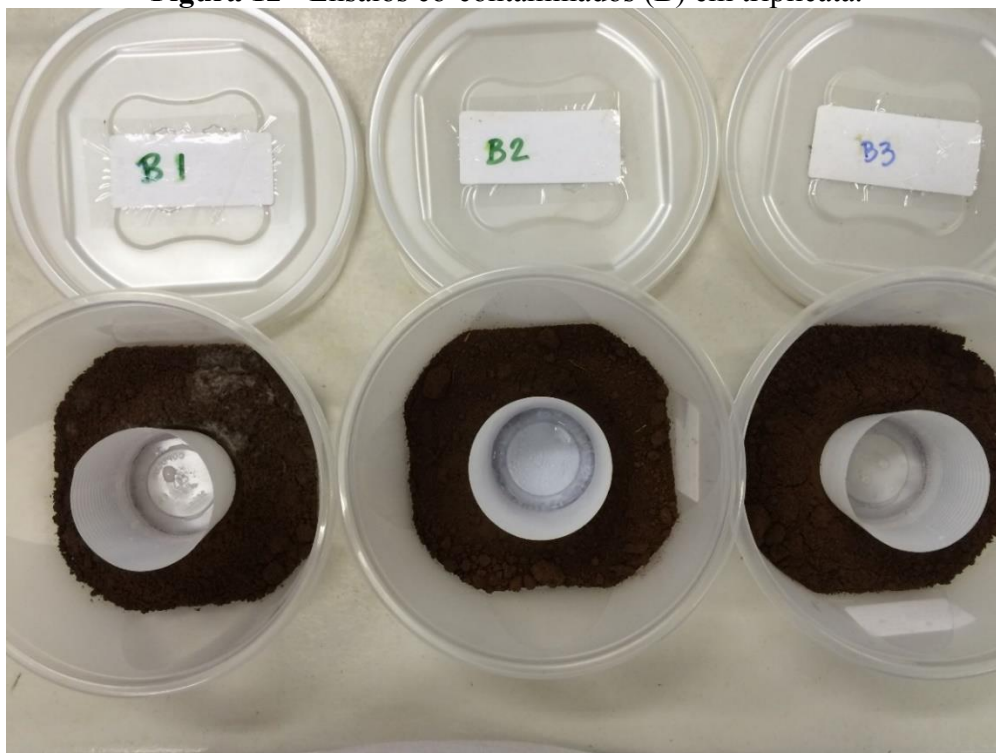
Figura 11 - Ensaio com espuma AFFF (F) em triplicata.



(Elaborado pelo autor)

Os ensaios AFFF (F) são ilustrados na Figura 11, sendo os que apresentaram menores índices de biodegradação, abaixo dos respirômetros controle (C). Seguidos deste experimento, foram realizados testes com sementes para verificar a toxicidade do contaminante.

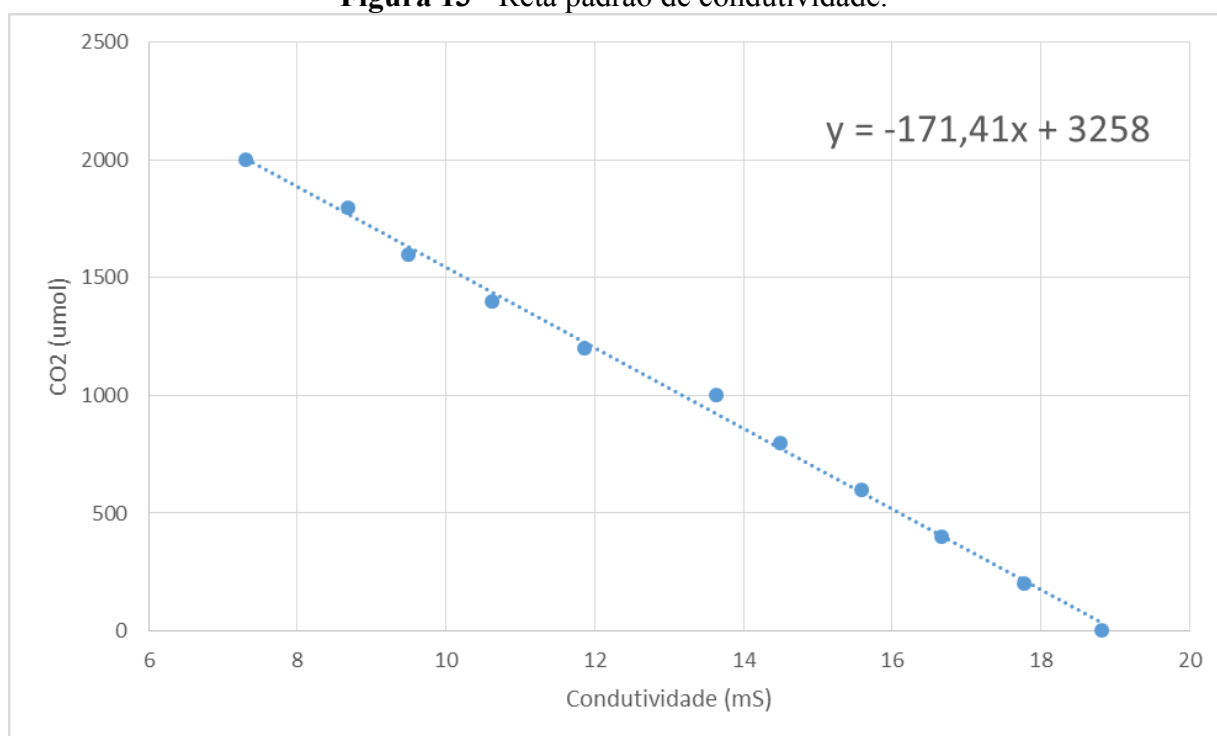
Figura 12 - Ensaios co-contaminados (B) em triplicata.



(Elaborado pelo autor)

Os ensaios (B), assim como os (D), tiveram valores representativos de degradação, e ainda, como pode ser observado na Figura 12 acima, o respirômetro B1 teve crescimento de microbiota assim como os ensaios D (crescimento de fungos), muito provavelmente devido a presença do diesel no solo, pois verificado isoladamente, a espuma AFFF tinha grandes chances de ser tóxica. Porém, mesmo com a presença deste contaminante, os organismos conseguiram se reproduzir no ambiente.

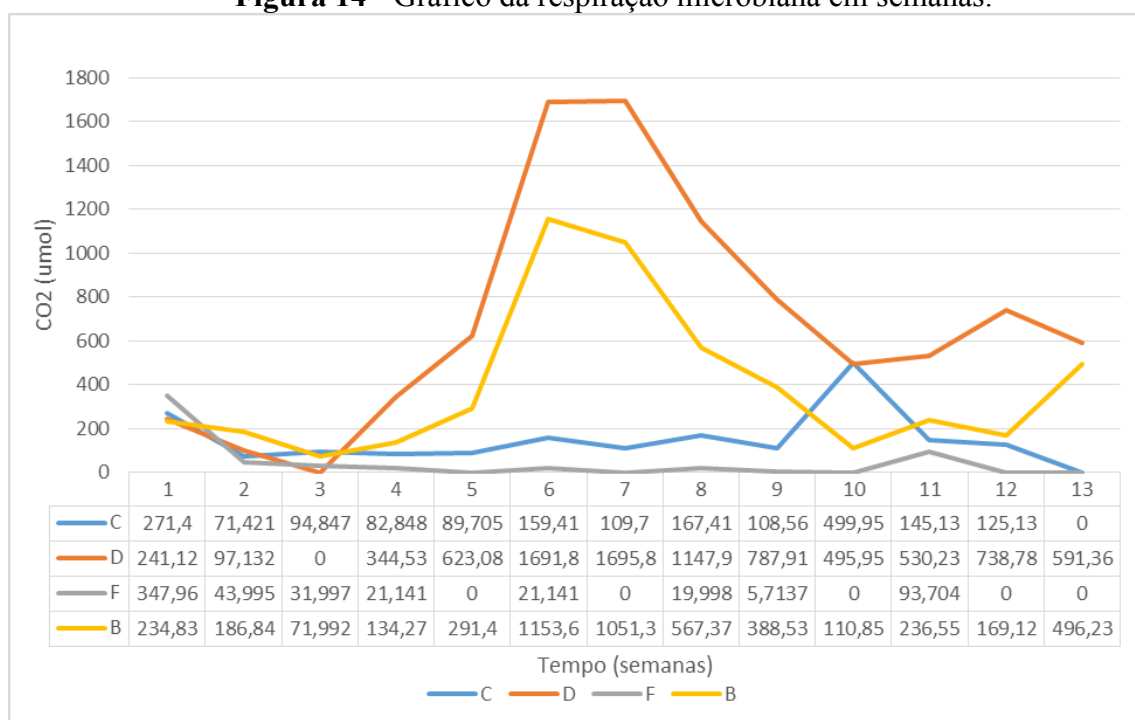
Seguindo a metodologia de padronização, com a solução padrão de KOH e solução de carbonato de potássio (K_2CO_3), foi possível determinar a reta padrão e equação de conversão de dados, conforme a Figura 13.

Figura 13 - Reta padrão de condutividade.

(Elaborado pelo autor)

A partir da reta padrão, foi tirada a média dos ensaios triplicata de todos os dados de condutividade semanais e dos dados de KOH branco. Em seguida, os dados foram convertidos seguindo a equação da Figura 13, com o ajuste da solução padrão.

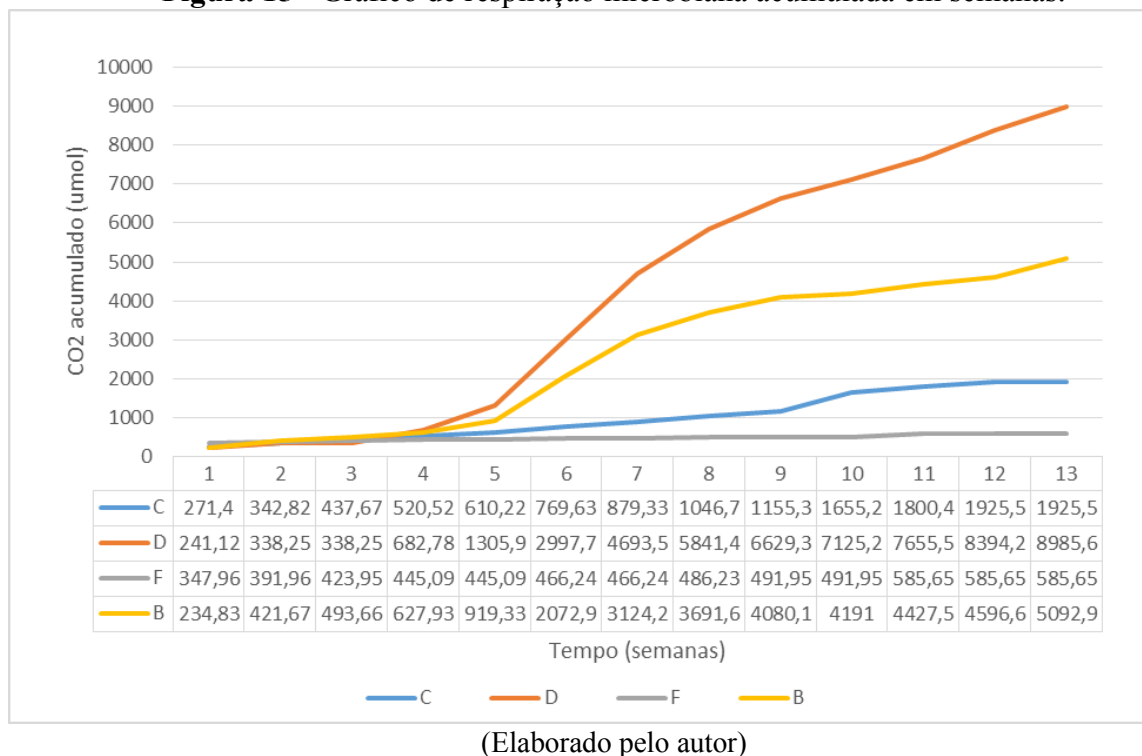
Com isso, pôde-se analisar graficamente os resultados em biodegradação semanal e acumulada (90 dias) mostrados nas Figuras 14 e 15.

Figura 14 - Gráfico da respiração microbiana em semanas.

(Elaborado pelo autor)

Analisando graficamente, os ensaios (D) e (B) apresentaram picos de degradação de 1700 e 1150 aproximadamente, respectivamente (semanas 7 e 6), tendo em seguida decaimento de produção de gás carbônico. Os ensaios controle apresentaram uma atividade constante de liberação de CO₂, não devida a degradação e sim a sua atividade endógena uma vez que não a adição de nutrientes. Por fim, os ensaios (F), com resultados de degradação mínima sem picos significativos.

A Figura 15 mostra a liberação acumulada de CO₂ no período de estudo.

Figura 15 - Gráfico de respiração microbiana acumulada em semanas.

A Figura 15 comprova os dados de biodegradação ilustrados na Figura 14, em que ensaios (D) foram os que mais respiraram, com uma liberação acumulada de CO₂ de aproximadamente 9000 μmol, seguidos dos (B) com liberação de 5000 μmol. Ensaios (F) apresentaram uma degradação total de apenas 580 μmol, dado que na quarta medição, os ensaios (D) já alcançavam.

5.2 Toxicidades dos contaminantes

Considerando os resultados de respirometria, foram realizados testes de toxicidade com os contaminantes óleo diesel e espuma extintora AFFF a partir de solução de lixiviado em 25 mL de água deionizada em proporção equivalente aos ensaios respirométricos.

5.2.1 Testes de toxicidade anteriores ao processo de respirometria

Como resultado, apenas as sementes em ensaios controle (C) e com óleo diesel (D) germinaram, tendo 100% de germinação. Os ensaios (F) e (B) não apresentaram nenhuma

atividade de crescimento de raiz e hipocótilo. As Figuras 16 e 17 são representativas do procedimento de contagem e medição de sementes.

Figura 16 - Contagem e medição de sementes do ensaio C4.



(Elaborado pelo autor)

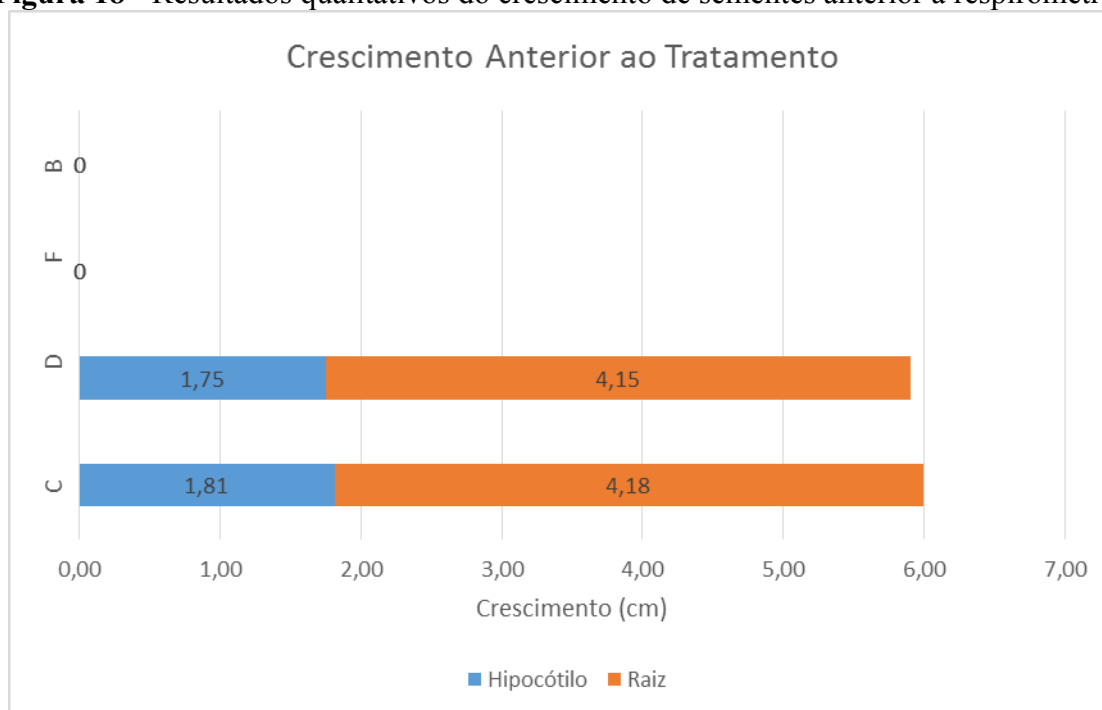
Figura 17 - Contagem e medição de sementes do ensaio D3.



(Elaborado pelo autor)

A análise qualitativa e plotagem foram feitas com as médias das medidas de raiz e de hipocótilo de cada ensaio quadruplicata, apresentadas na Figura 18.

Figura 18 - Resultados qualitativos do crescimento de sementes anterior à respirometria.



(Elaborado pelo autor)

Como pode-se verificar pelo gráfico, o crescimento e germinação de sementes de alfaca se deu apenas nos ensaios (C) e (D), com medidas aproximadas (4 cm ao total). Deste resultado conclui-se que mesmo anterior ao processo de biorremediação por respirometria, o diesel não se apresentou tóxico ao solo nas concentrações utilizadas e ainda teve resultados bastante comparativos ao solo controle, livre de contaminações recentes.

Explicando os ensaios de respirometria, os testes com sementes comprovaram um alto grau de toxicidade na espuma contaminante, tendo 0% de germinação quando em solo, isoladamente, e também com a presença do diesel, que nesta situação teve papel mais secundário. Quando o diesel foi colocado isoladamente (ensaios D), observou-se o desenvolvimento de tecido vegetal.

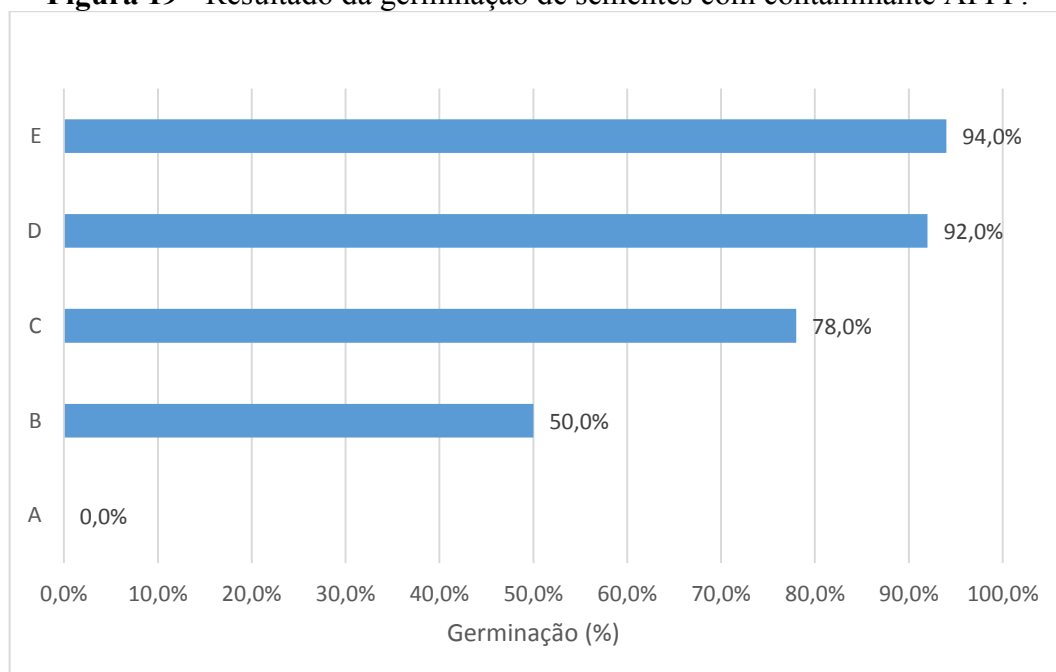
Deste modo, decidiu-se verificar qual seria o limite e ponto crítico de toxicidade da espuma realizando um ensaio com sementes apenas com ela em diferentes diluições.

5.2.2 Testes de toxicidade com a espuma extintora

A espuma extintora, como visto anteriormente, foi tóxica aos organismos teste em solo na concentração de estudo (2 mL de AFFF em 5,00 g de solo para 25,00 mL de água). Com isso, decidiu-se verificar em cinco diferentes diluições do contaminante o comportamento das sementes e a atividade de germinação anterior a respirometria.

Foram realizados os testes A, B, C, D e E conforme a Tabela 8. Em triplicata, os ensaios passaram por mesmo procedimento que os testes feitos anteriormente (item 5.3.1) apresentando os resultados de acordo com a Figura 19.

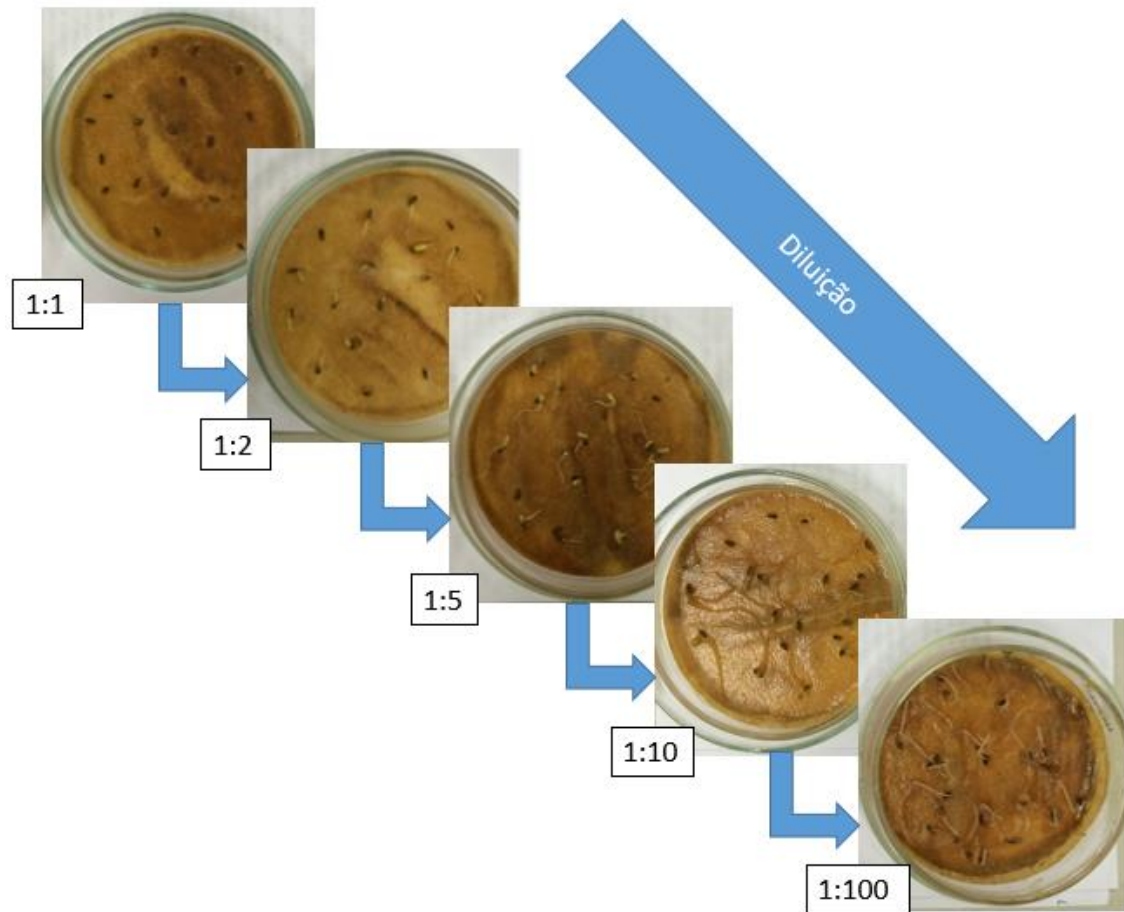
Figura 19 - Resultado da germinação de sementes com contaminante AFFF.



(Elaborado pelo autor)

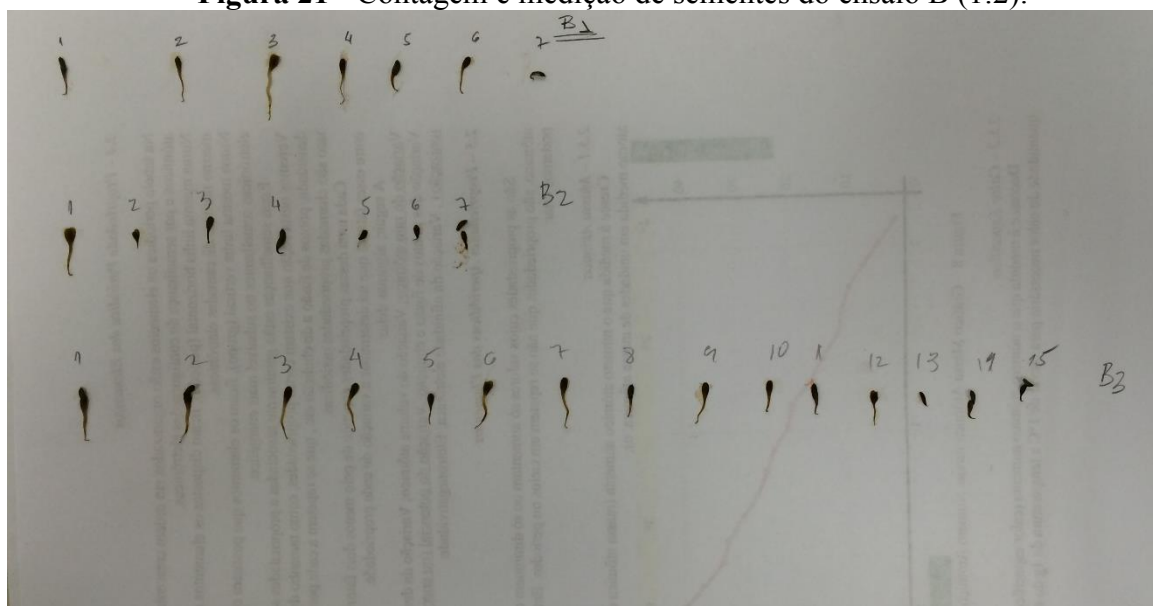
Analisando dados de germinação, têm-se resultados maiores que 50% a partir do ensaio C, sendo este considerado o índice de ponto crítico neste estudo. As Figuras 20 a 25 mostram o desenvolvimento nas placas de Petri e os resultados de germinação.

Figura 20 - Placas de Petri germinadas dos ensaios A ao E e referentes diluições.



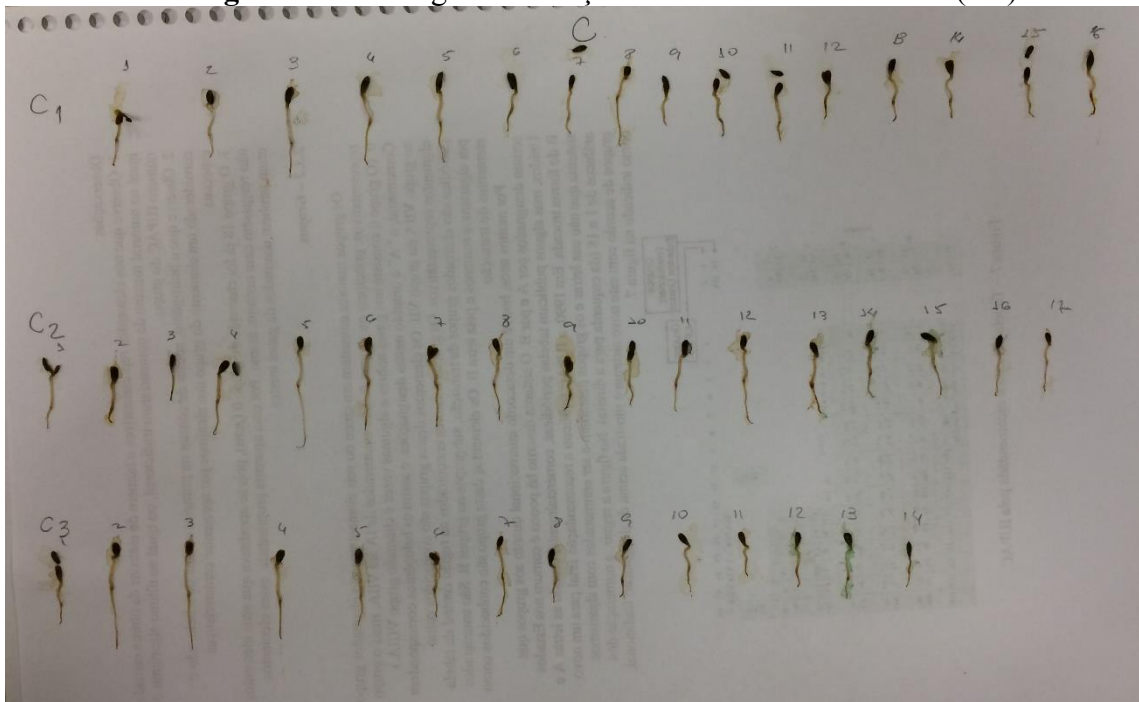
(Elaborado pelo autor)

Figura 21 - Contagem e medição de sementes do ensaio B (1:2).



(Elaborado pelo autor)

Figura 22 - Contagem e medição de sementes do ensaio C (1:5).



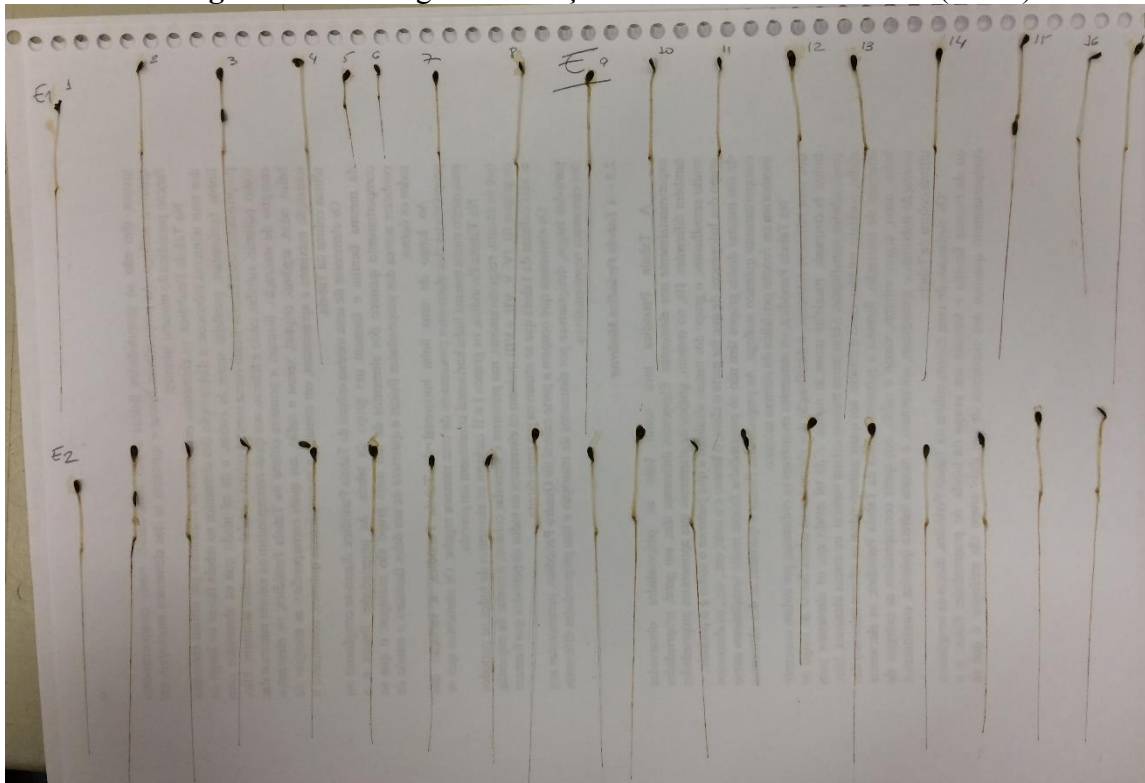
(Elaborado pelo autor)

Figura 23 - Contagem e medição de sementes do ensaio D (1:10).



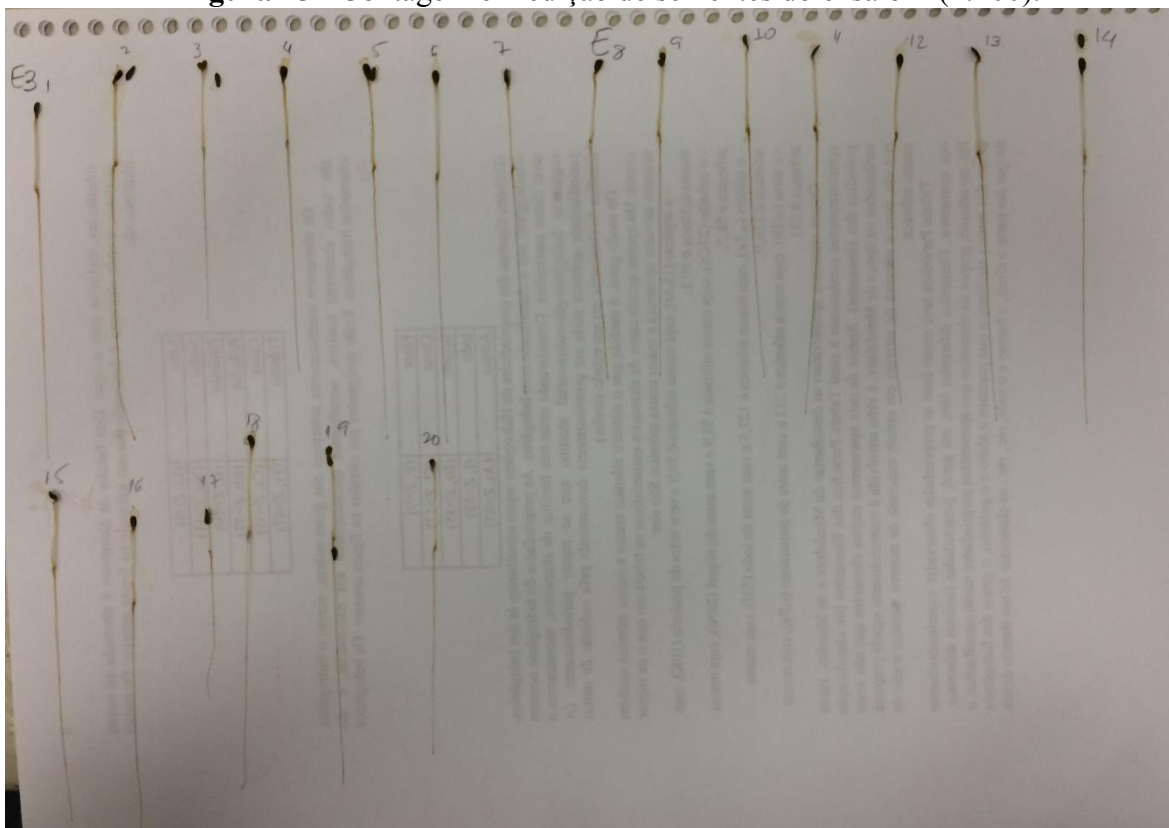
(Elaborado pelo autor)

Figura 24 - Contagem e medição de sementes do ensaio E (1:100).



(Elaborado pelo autor)

Figura 25 - Contagem e medição de sementes do ensaio E (1:100).

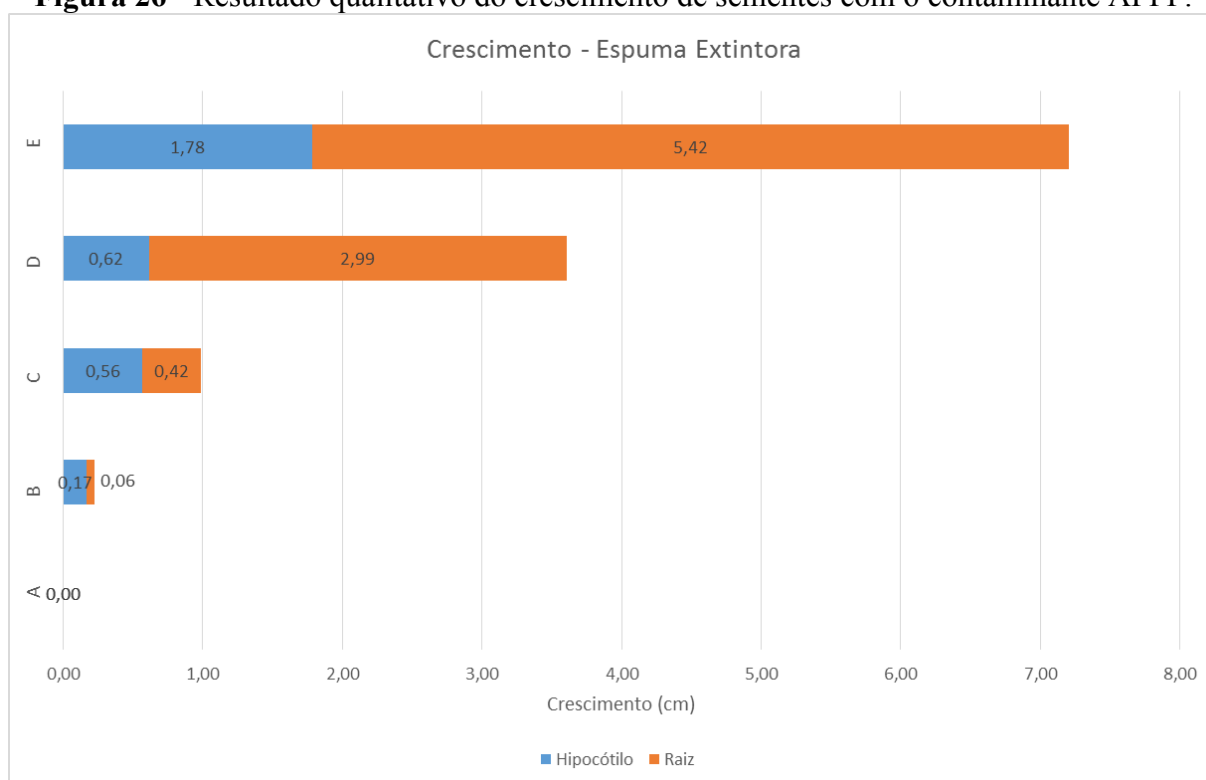


(Elaborado pelo autor)

Analisa-se que o contaminante AFFF apresenta certo nível de toxicidade, que, em determinado momento, o solo consegue se reestabelecer e permitir a germinação em ambiente desfavorável. Segundo Barbosa (2000), o contaminante é considerado tóxico quando há mortalidade de pelo menos 40% dos embriões, ou seja, o AFFF passa a não ser tóxico apenas a uma concentração de 1:5 (ensaio C) como denominado anteriormente como limítrofe.

Na Figura 26 pode-se analisar o crescimento em centímetros das sementes germinadas caracterizadas pela raiz e hipocótilo.

Figura 26 - Resultado qualitativo do crescimento de sementes com o contaminante AFFF.



(Elaborado pelo autor)

5.2.3 Testes de toxicidade posteriores ao processo de respirometria

5.2.3.1 Testes com diluição (1:5)

Para este ensaio, decidiu-se verificar se a espuma extintora AFFF apresentou algum sinal de biodegradação, mesmo que pouco significativo, que diminuísse sua toxicidade anterior. Deste modo, todos os respirômetros tiveram seu solo diluído em uma proporção 1:5 para os testes, como verificado anteriormente.

Como resultado verifica-se a Tabela 11:

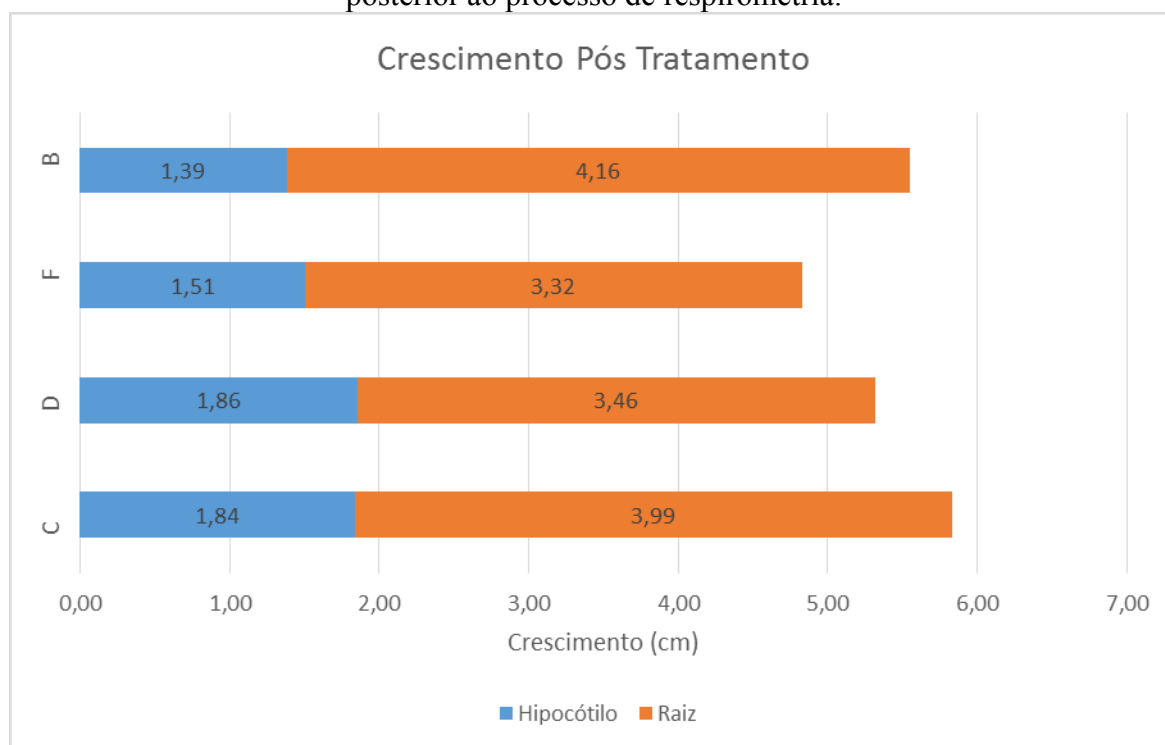
Tabela 11 - Germinação dos ensaios de respirometria em porcentagem (%).

GERMINAÇÃO (%)	
C1	100
C2	100
C3	100
D1	100
D2	98
D3	100
F1	100
F2	98
F3	100
B1	98
B2	90
B3	98

(Elaborado pelo autor)

Por índices de germinação já se sabia que o solo não se apresentava tóxico nos ensaios controle (C) e nos ensaios com óleo diesel (D), tendo apenas a confirmação. Sobre os ensaios (F) e (B), pode-se analisar que com a diluição de 1:5 a toxicidade é mínima, tendo praticamente 100% de germinação em todos os ensaios referentes. É apresentado na Figura 27 o crescimento de raiz e hipocótilo neste teste de toxicidade.

Figura 27- Resultado qualitativo do crescimento de sementes em concentração diluída posterior ao processo de respirometria.



(Elaborado pelo autor)

Com esses resultados, pode-se comparar o crescimento dos ensaios C (1:5) da espuma extintora do item 5.2.2 com os resultados posterior ao tratamento apresentados acima. Anteriormente, em concentração diluída, as sementes em contato com lixiviado AFFF (1:5) apresentavam uma germinação e crescimento aproximado de 1 cm, enquanto que, depois da biodegradação, obteve-se valores próximos de 5 cm. Ou seja, ocorreu um grau de biodegradação que justificou a diferença do tamanho de sementes, porém, quase que imperceptível em ensaios de respirometria.

5.2.3.2 Testes sem diluição

Em testes com diluição obteve-se altas taxas de germinação em relação ao AFFF. Assim, decidiu-se realizar também testes sem diluição para verificar se nas concentrações originais, mesmo com pouca degradação, a toxicidade do AFFF diminuiria.

Como resultado, verifica-se na Tabela 12 os dados de germinação.

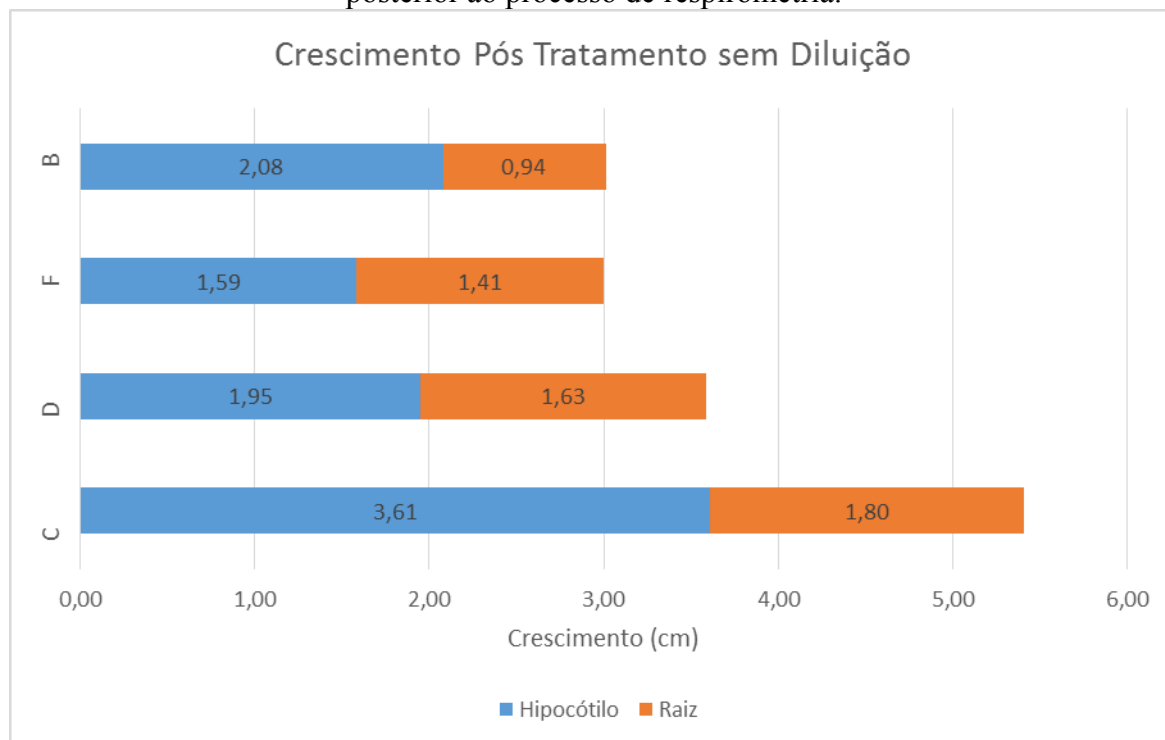
Tabela 12 - Germinação dos ensaios de respirometria em porcentagem (%).

GERMINAÇÃO (%)	
C1	98
C2	98
C3	100
D1	98
D2	100
D3	98
F1	93
F2	95
F3	98
B1	67
B2	62
B3	95

(Elaborado pelo autor)

Sobre os ensaios (F) pôde-se analisar que em concentrações originais, a toxicidade se torna mínima, tendo praticamente 100% de germinação em todos os ensaios referentes. Assim, pôde-se concluir que considerando as concentrações 1:1, o processo de biorremediação se tornou efetivo em relação a diminuir a toxicidade do contaminante, porém, não representativo em degradação significativa. Dos ensaios (B), a germinação foi baixa em dois dos respirômetros, indo em contrapartida com resultados de biodegradação, visto que com os dois contaminantes isolados (diesel e espuma) o solo apresentou ser um ambiente favorável ao crescimento de uma microbiota. Como visto na tabela acima, a germinação destes ensaios (B) foi de aproximadamente 75% em média, não tóxico ao meio ambiente, porém, com atividades de crescimento menores. É apresentado na Figura 28 o crescimento de raiz e hipocótilo neste teste de toxicidade.

Figura 28 - Resultado qualitativo do crescimento de sementes em concentração original posterior ao processo de respirometria.



(Elaborado pelo autor)

Com estes resultados, pode-se comparar o crescimento das sementes anterior e posterior ao processo de biorremediação e verificar que, os ensaios (F) e (B) que antes se apresentavam tóxicos, depois do processo tiveram germinação comparativa a contaminantes não-tóxicos ao solo (acima de 60%) e um crescimento aproximado de 3 cm.

5.3 Degradação de contaminantes comparado a modelagem de crescimento microbiano

Os padrões de distribuição de dados de produção de CO₂ dentro dos 90 dias de estudo permitiu a análise e adaptações de modelos matemáticos referentes ao processo de biodegradação medida pelos ensaios de respirometria, permitindo analisar parâmetros da cinética deste processo.

Os ensaios (D) e (B) foram susceptíveis a modelagem, em que ocorreu um crescimento e pico de liberação de CO₂ e posteriormente um decaimento em ambos os ensaios.

Foi possível prever o comportamento cinético esperado de cada ensaio nas suas respectivas taxas de produção semanal de CO₂ durante o processo de biodegradação. O valor da taxa máxima de biodegradação (BR_{max}) consiste no pico máximo da curva, e seu tempo de

pico é obtido pelo modelo. A seguir, pode-se verificar a adaptação ao modelo nos ensaios respirométricos (D) e (B) em produção semanal nas Figuras 29 e 30.

Figura 29 - Modelo matemático de liberação de CO₂ dos ensaios (D).

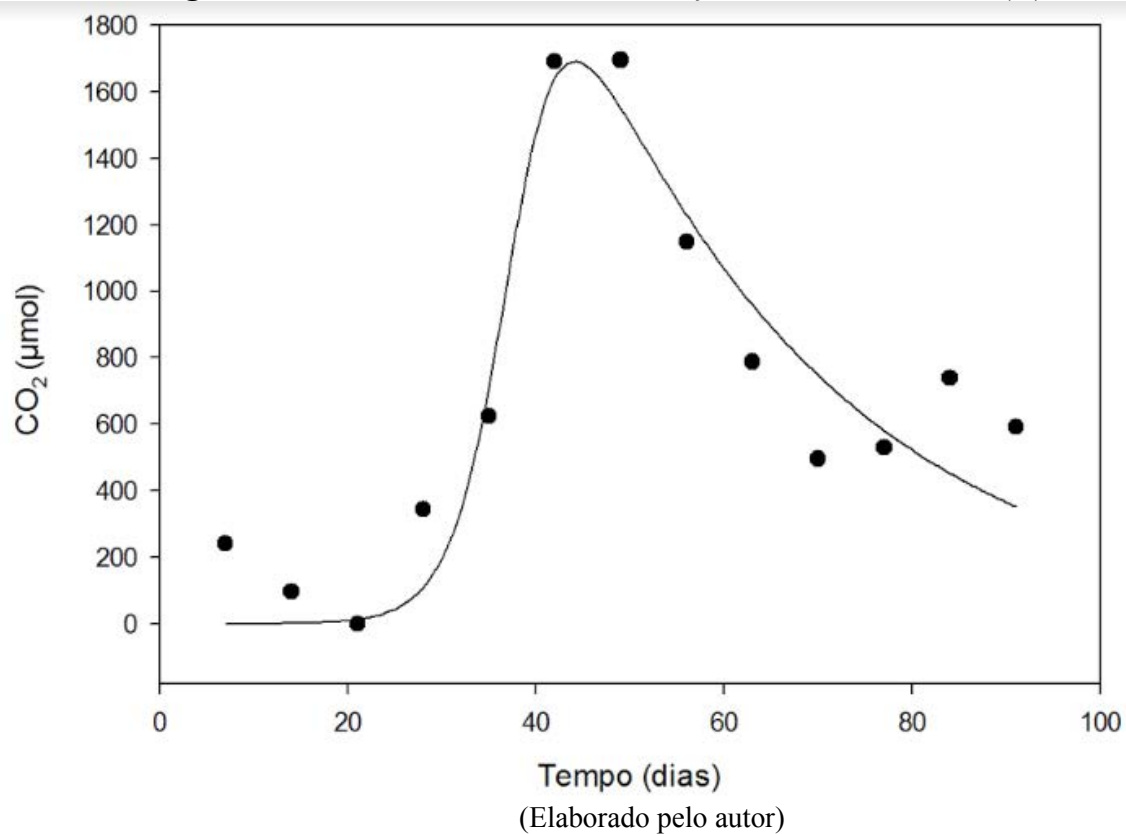
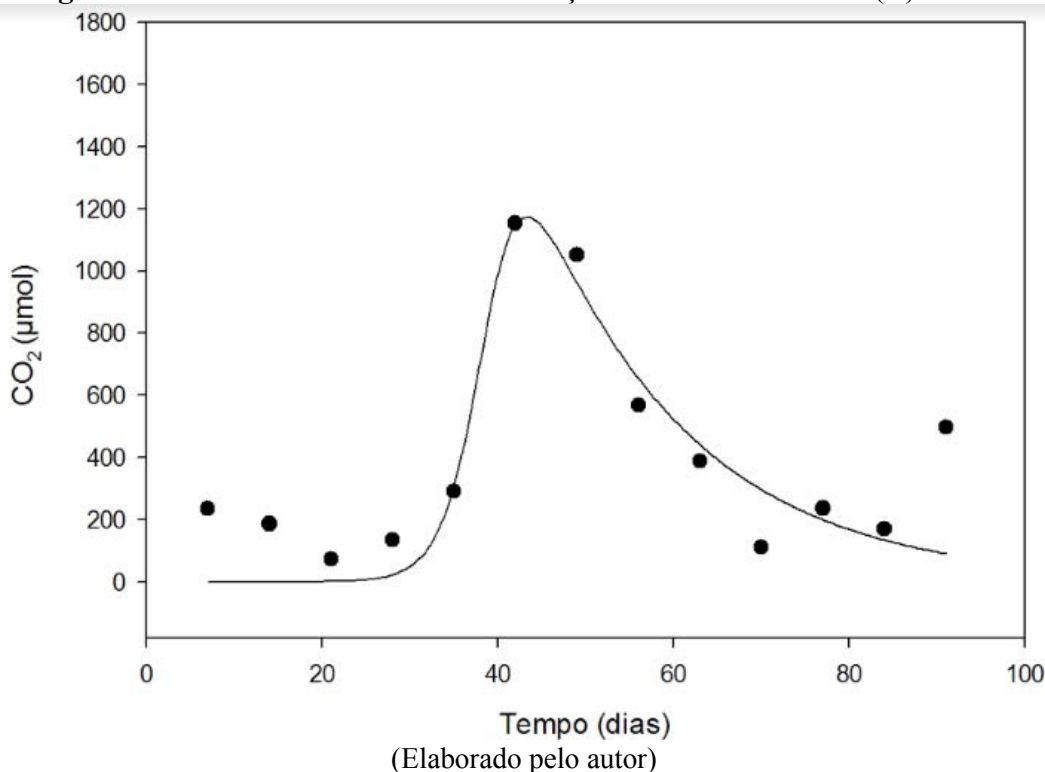


Figura 30 - Modelo matemático de liberação de CO₂ dos ensaios (B).

A modelagem, analisada pelo software SIGMAPLOT 10 consegue fornecer o valor de taxa de pico máxima de um ensaio e em que momento. Os ensaios (D) obtiveram BRmax = 1687,99 μmol CO₂ no tempo 44,16 dias enquanto que os ensaios (B) obtiveram BRmax = 1174,98 μmol CO₂ no tempo 43,12 dias.

Pode-se observar pelos dois modelos que a degradação do óleo diesel é possível e se apresenta crescente em um primeiro momento e em seguida, depois de aproximadamente 44 dias, a respiração começa a diminuir, tendo como resultados finais o encerramento do processo, apresentando apenas atividades endógenas.

A espuma se apresentou como inibidora no processo de degradação do ensaio (B), observado um menor pico de degradação que o ensaio (D), já isolada, a AFFF não apresentou resultados significativos, tendo ainda menores índices de degradação que o solo controle (C).

Os ensaios (C) e (F) não obtiveram ajustes em produção semanal adequados que pudessem ser modelados. Em outras palavras, o conjunto de dados dos ensaios (C) e (F) não apresentou perfil de crescimento e declínio no intervalo de tempo estudado.

Em produção acumulada, puderam ser gerados gráficos de todos os ensaios em software (Figuras 31 a 34), comparáveis aos apresentados em 5.2.3.

Figura 31- Ensaios (C) de produção de CO₂ acumulado.

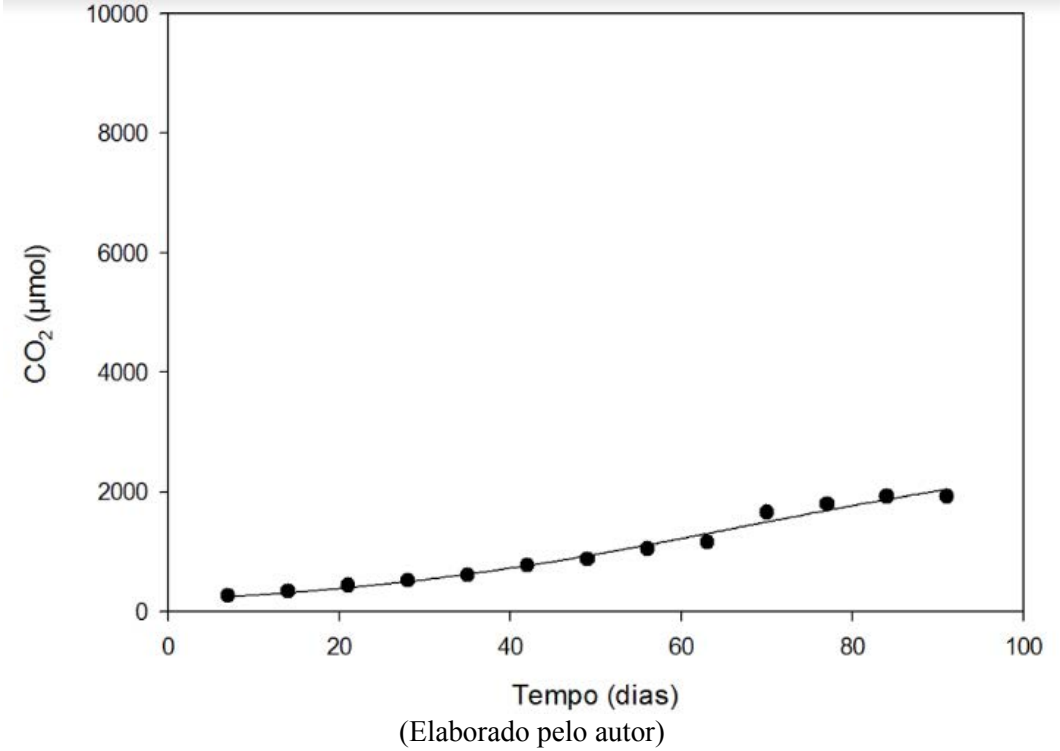


Figura 32 - Ensaios (D) de produção de CO₂ acumulado.

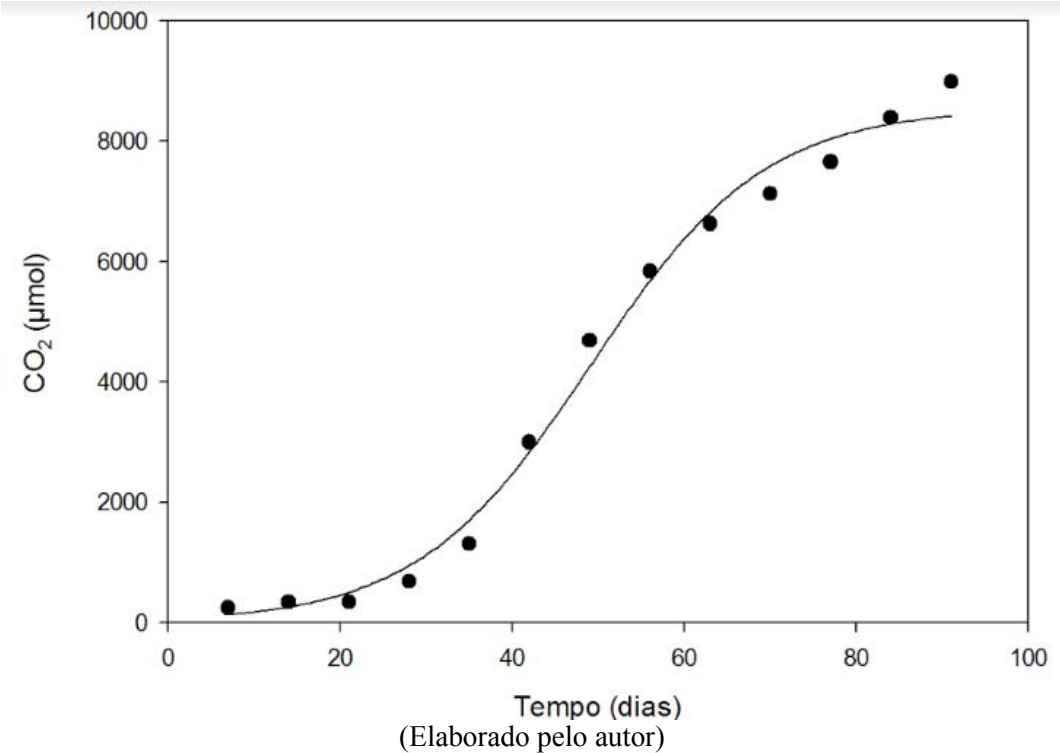
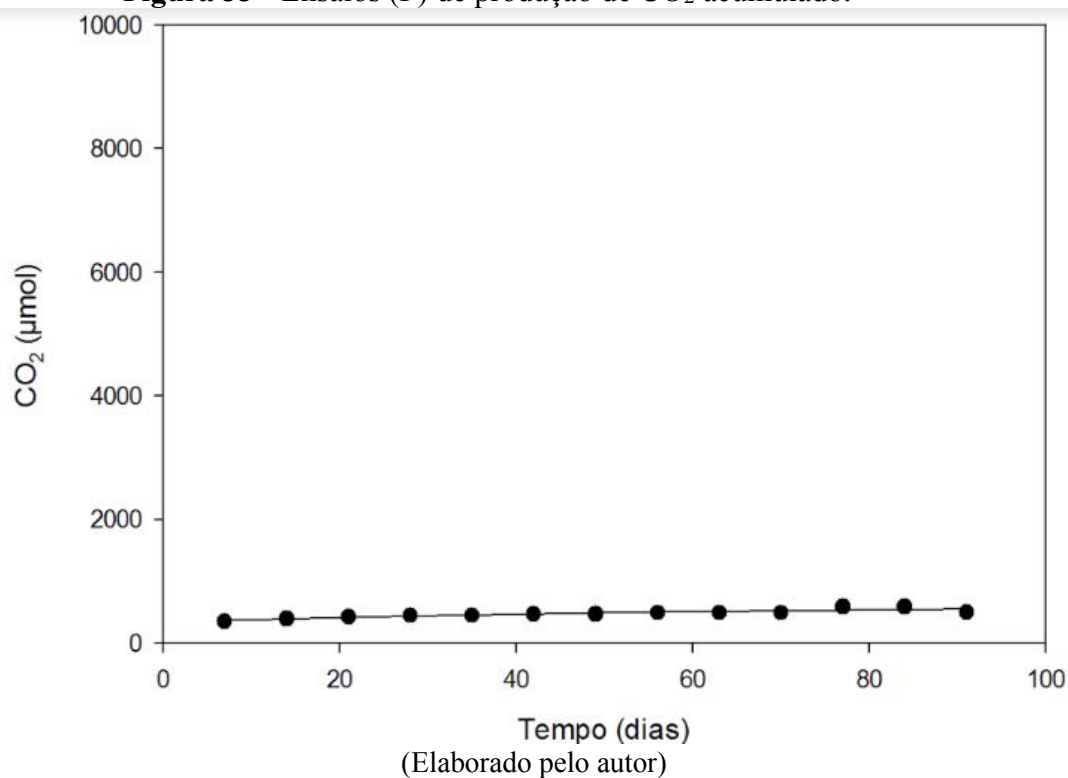
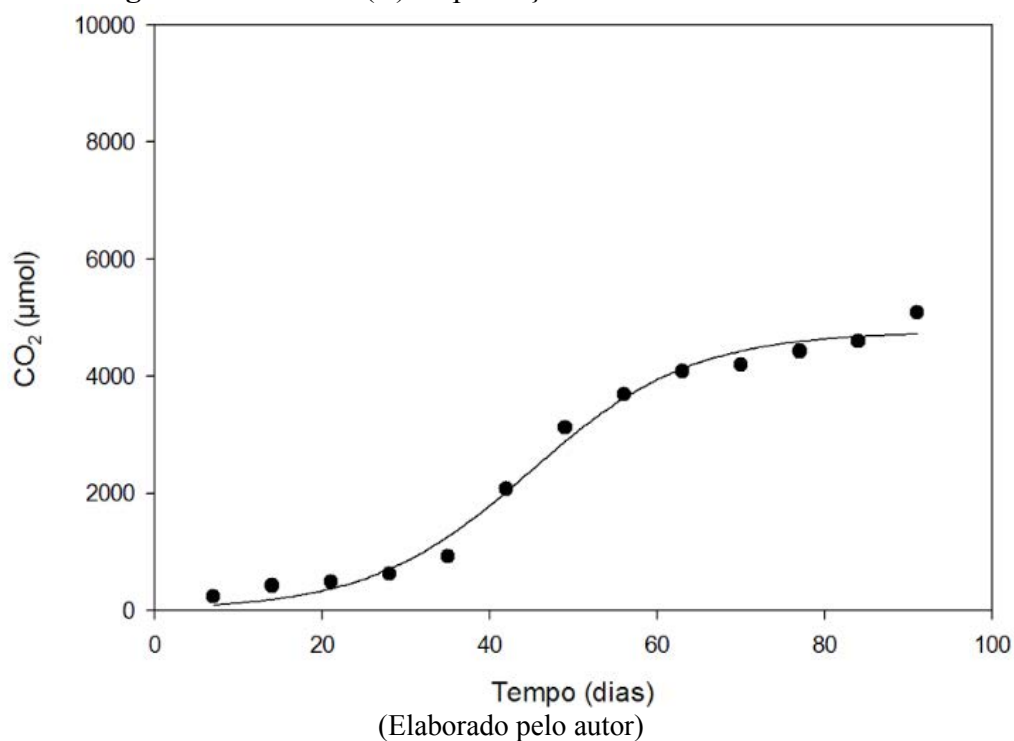


Figura 33 - Ensaios (F) de produção de CO₂ acumulado.**Figura 34** - Ensaios (B) de produção de CO₂ acumulado.

Nos modelos de produção acumulada de CO₂, assim, como os de produção semanal, podem ser verificadas suas maiores taxas, que nesse caso, se apresentam como Bmax, isto é,

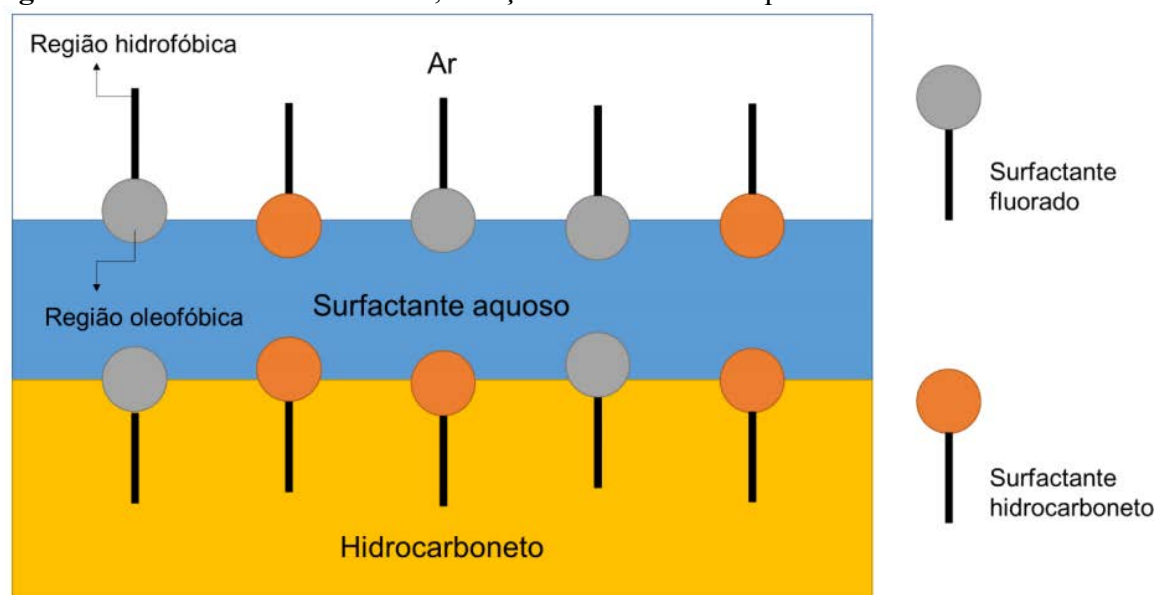
máximo de CO₂ produzido a partir do substrato inoculado estatisticamente a partir dos valores obtidos no período de 90 dias.

Os respirômetros (D) obtiveram liberação de 8551,84 µmol de CO₂ no total, seguidos dos (B) com valores de 4757,38 µmol, do (C) com 2832,86 µmol e por último, com menor taxa de CO₂ liberado, do (F) com 588,90 µmol CO₂.

Ao contrário do que era esperado devido a estrutura surfactante da AFFF, obteve-se resultados de respirometria com espuma sendo fator determinante e inibidor no processo de biodegradação, porém, com resultados potenciais de abrir novos questionamentos sobre a sua biodegradabilidade e toxicidade no solo e no meio ambiente.

Valores mais altos de CO₂ produzido durante a biodegradação eram esperados quando os dois contaminantes (óleo diesel e AFFF) fossem combinados, uma vez que o AFFF tem propriedades surfactantes. Assim, a espuma poderia criar maiores superfícies de contato no diesel com o meio de solo aquoso interagindo o meio hidrofóbico da molécula com os micro-organismos presentes em meio hidrofílico como observado na Figura 35.

Figura 35 - Fases da mistura de ar, solução de surfactante aquosa e hidrocarbonetos.



Fonte: MONTAGNOLLI (2015)

Já no caso de contaminação apenas de um dos contaminantes, maiores valores de degradação do óleo diesel eram esperados, já que ele poderia ser melhor quebrado do que o AFFF devido a ligações C-F extremamente rígidas na parte hidrofóbica da molécula da espuma, o que diminui a sua biodegradabilidade.

Em relação a experimentos isolados, foram alcançados os resultados esperados, sendo o óleo diesel o contaminante que teve maiores índices de biodegradação, porém, não foi previsto que a espuma não teria atividades microbianas significativas.

Resultados de respirometria puderam ser reafirmados pelos testes com sementes, verificando que a espuma não conseguiria realizar seu papel de surfactante e de contaminante biodegradável pois sua toxicidade era extremamente alta antes do processo de respiração microbiana. Porém, como um ponto positivo, estes mesmos testes com sementes revelaram que após os ensaios respirométricos, a toxicidade da espuma diminuiu, podendo ser observada uma germinação alta.

Deste modo, este trabalho obteve resultados distintos do esperado de acordo com a estrutura da espuma extintora, porém, pôde-se estudar melhor sua ação no solo e como inibidora.

6 CONCLUSÃO

A biorremediação, como citado anteriormente, propõe um tratamento de contaminantes de baixo custo. Com essa pesquisa foi possível encontrar novas conclusões sobre os contaminantes diesel e espuma extintora.

No caso de incêndio simulado nesta pesquisa, os ensaios respirométricos desenvolvidos verificaram como o meio ambiente, no caso o solo, reagiria à entrada destes contaminantes (óleo diesel e espuma AFFF) e se conseguiria se reestabelecer com a degradação dos mesmos pelos micro-organismos locais.

A realização do estudo em condições climáticas reais nos ensaios piloto teve resultados satisfatórios, entretanto, observou-se que, na época de inverno, as grandes diferenças de temperatura não permitem a obtenção de resultados significativos. Deste modo, pode-se concluir que a temperatura é um fator crucial no processo de biodegradação, isto é, na atividade enzimática dos micro-organismos. Ainda, a técnica de respirometria de Bartha e Pramer proposta não é adequada para estudo de degradação com grandes variações climáticas, pois a alta sensibilidade do método, associada à variabilidade nas taxas de respiração detectaram que as contaminações em lugares mais frios podem ser inibitórias, se isolarmos o fator da sazonalidade.

Com os testes de sementes anteriores ao processo de respirometria, verificou-se que existe realmente um grau de toxicidade nas espumas extintoras AFFF, indo em contrapartida com o que é apresentado pelos fabricantes e fornecedores de ser não-tóxica e biodegradável. Porém, após o tratamento de biorremediação a partir de ensaios respirométricos, pelos testes verificou-se que ocorreu a germinação em ensaios (F) e (B), concluindo que a biodegradação ocorreu, mesmo que pouco significativa e que também diminui a toxicidade da espuma.

O diesel, entretanto, se apresentou como um contaminante de fácil degradação com grande atividade microbiana durante os 90 dias de estudo. Os ensaios respirométricos (D) e (B) puderam ser ajustados a uma modelagem de crescimento e morte de micro-organismos, a que se compara a respiração e concentração de nutrientes no solo.

Vale ressaltar também que o solo utilizado já apresentava histórico de contaminação com derivados de petróleo, e nele pode ter ocorrido uma seleção natural em que os micro-organismos mais adaptados sobreviveram. Com isso, pode-se afirmar que esse método pode ser aplicado em diferentes tipos de solo contaminado, porém, testes e ensaios laboratoriais são essenciais para analisar a cinética de degradação do local e caso seja necessário, inocular micro-organismos adaptados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANP, **Agência Nacional de Petróleo**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>> Acesso em: agosto 2016

AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade da água na agricultura**. Campina Grande: UFPB, 1999.

BARBOSA, R.M. **Avaliação do impacto de lodos de estação de tratamento de água à biota aquática através de estudos ecotoxicológicos**. 2000, 200p. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo. São Carlos, 2000.

BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Science**, v. 100, n. 1, p. 68-70, 1965.

BAKER, K. H. e HERSON, D. S. **Bioremediation**. McGraw-Hill, Inc, Environmental Microbiology Associates, Inc. Harrisburg, Pennsylvania, 1994. 375p.

BERNARDES, R. S.; SOARES, S. R. A. **Fundamentos da Respirometria no controle de poluição da água e do solo**. Editora Universidade de Brasília: Finatec, Brasília, DF, 2005. 164p.

BOBERT, M.; PERSSON, H.; PERSSON, B. Foam Concentrates: Viscosity and Flow Characteristics. **Fire Technology**, v. 33, n. 4, p. 336–355, 1997.

CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Solos – Determinação da Biodegradação de Resíduos – Método Respirométrico de Bartha. Norma técnica L6.350**. São Paulo, 15f,1990.

COSTA, M. R., **Uso da Respirometria para Avaliação da Biodegradação Aeróbia de Lixiviado de Resíduos Sólidos Urbanos em Latossolo Vermelho-Escuro**. 2009. 125p. Dissertação (mestrado). Departamento de Engenharia Civil e Ambiental. Faculdade de Tecnologia – Universidade de Brasília. Brasília/DF

COSTA FILHO, G. F., **Biodegradação de Óleos Derivados do Petróleo e de Origem Vegetal Estimulada por Biossurfactantes em Meio Aquoso e Monitoramento de sua Toxicidade**. 2011. 69p. Trabalho de Conclusão de Curso (Trabalho de Conclusão de Curso em Ecologia). Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Rio Claro/SP

CORDAZZO, J. **Modelagem e simulação numérica do derramamento de gasolina acrescida de álcool em águas subterrâneas**. Dissertação (mestrado). Departamento de Engenharia Mecânica), UFSC – Florianópolis, SC, 2000.

CORSEUIL, H. X.; ALVAREZ, P. J. J. Natural bioremediation perspective for BTXcontaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol. **Wat. Sci. Tech.**, v. 34, p.311-318, 1996.

DOLFING, J. Energetics of anaerobic degradation pathways of chlorinated aliphatic compounds. **Microbial Ecology**, v. 40, n. 1. p. 2–7, 2000.

DOMINGUES, R. F. **Estudo da biodegradação de óleo lubrificante automotivo**. 2007. 128 p. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Rio Claro/SP

FERREIRA, E. D. S., **Aplicação da respirometria na caracterização do esgoto doméstico afluente a uma ETE por processo de lodos ativados**. 2002. 140p. Dissertação (mestrado). Universidade de Brasília. Brasília/DF

FETTER, C. W. **Contaminant Hydrogeology**. New York: Macmillan, 1993.

FETZNER, S. Bacterial dehalogenation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 6, p. 633–657, 1998.

FIGUEREDO, R. C. R.; RIBEIRO, F. A. L.; SABADINI, E. Ciências de Espumas – Aplicação na Extinção de Incêndios. **Química Nova**, v. 22, n. 1, 1999.

GALLEGO, J. L.; LOREDO, J.; LLAMAS, J. F.; VASQUEZ, F.; SANCHEZ, J. Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. **Biodegradation**, v.12, p. 325-335, 2001

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

ISTOK, J.; FIELD, J.; DOLAN, M.; LEE, J. H. Monitoring Bioaugmentation with Single-Well Push-Pull Tests in Sediment. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n.3, p. 1085–1092, 2010.

KATAOKA, A. P. A. G. **Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microorganismos isolados de “landfarming”**. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Unesp – Rio Claro, 2001.

KERNANSHANI, A.; KARARNANEV, D.; MARGARITIS, A. Kinetic modeling of the biodegradation of the aqueous p-xylene in the immobilized soil bioreactor. **Engineering Journal**, v. 27, n. 3, p. 204–211, 2006.

KULKAMP, M. S., **Atenuação natural de hidrocarbonetos de petróleo em um aquífero contaminado com derramamento simultâneo de óleo diesel e etanol**. 2003. 134p. Dissertação (mestrado). Programa de Pós- Graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina/SC

MANCINI, T. M., **Métodos de caracterização de áreas potencialmente contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo**. 2002. Monografia. (Trabalho de Conclusão de Curso em Geologia). Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Rio Claro/SP.

MARIANO, A. P., **Avaliação Do Potencial de Biorremediação de Solos e de Águas Subterrâneas Contaminados com Óleo Diesel**. 2006. 162p. Tese (doutorado). Instituto de Geociências e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Rio Claro/SP.

MELLO, G. S. L., **Avaliação da viabilidade da utilização do teste respirométrico de Bartha para determinar a biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos polinucleares em solo tropical: caso do Fenantreno**. 2005. 191p. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo. São Paulo/SP

MEMBRÉ, J. M.; THURETTE J.; CATTEAU, M. Modeling the growth, survival and death of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 82, n. 1, p.345-350, 1996.

MOREIRA, F. M. S. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. 2ª edição. Lavras: Editora UFLA, 2006

MONTAGNOLLI, R. N. **Biodegradação de Derivados de Petróleo com a aplicação de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis***. 2011. 249 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Rio Claro/SP

MONTAGNOLLI, R. N. **Incêndios de petróleo e petroquímicos: Biorremediação de áreas afetadas**. 2015. 267 p. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Rio Claro/SP

MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Screening the toxicity and biodegradability of petroleum hydrocarbons by a rapid colorimetric method. **Arch Environ Contam Toxicol**, p. 12, 2014.

NADIM, F.; HOAG, G. E.; LIU, S.; CARLEY, R. J.; ZACK, P. Detection and remediation of soil and aquifer systems contaminated with petroleum products: an overview. **J. of Petrol. Sci. and Eng.**, v.26, p. 169-178, 1999.

NAVARRETE, A.A. **Algas na desintoxicação do solo de landfarming de refinaria de petróleo**. 2006. 100p. Monografia. (Trabalho de Conclusão de Curso). Universidade Estadual Paulista. Rio Claro/SP

NFPA (National Fire Protection Association). Fire Protection Handbook, 17th ed. **Quincy: NFPA**, 1991.

NUVOLARI, A. **Aplicação de lodo de esgotos municipais no solo: ensaios de respirometria para avaliar a estabilidade do lodo**. 1996. 158p. Dissertação (mestrado). Faculdade de Engenharia Civil. Universidade Estadual de Campinas. Campinas/SP

RÉGIS, G. **Tratamento eletrolítico das águas residuárias de uma indústria produtora de antioxidante de borracha visando sua biodegradação**. 2000. 117p. Dissertação. (mestrado). Universidade Estadual Paulista. Rio Claro/SP

REICHARDT, K e TIMM, L. C. **Solo, planta e atmosfera: conceitos, processos e aplicações**. Editora Manole Ltda., Barueri, SP, 478p. 2004

SCHMIDT, S. K.; SIMKINS, S.; ALEXANDER, M. Models for the kinetics of biodegradation of organic compounds not supporting growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 2, p.323-331, 1985.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. USEPA. **Assessing UST corrective action technologies: early screenig of clean-up technologies for the saturated zone**. EPA/600/2-90/027. p.124, 1990.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. USEPA. Office of Compliance. Office of Enforcement and Compliance Assurance. **Profile of the petroleum refining industry**. Washington, 1995.

VON SPERLING, M., **Princípios Básicos do Tratamento de Esgotos - Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias** – Vol. 2, 1996. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 211p.

WHITACRE, D. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. 5th ed. **New York: Springer Science & Business Media**, 2008.

YOUNG, L. Y. Anaerobic degradation of aromatic compounds. Em: **Microbial degradation of aromatic compounds**. GIBSON, D. T. (ed.). Marcel-Dekker-Inc., New York, pp. 487-523, 1984.