

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DO PORTO

Mestrado em Engenharia Química

Ramo Tecnologias de Protecção Ambiental



Biorremediação de solos contaminados com produtos petrolíferos

Maria Teresa de Oliveira Pinho

Novembro de 2010

Orientador: Cristina Delerue-Matos

Co-Orientador: José Tomás Albergaria

*A sabedoria suprema seria ter sonhos suficientemente grandes para não os
perder de vista enquanto se perseguem.
(William Faulkner)*

Agradecimentos

Gostaria de iniciar esta dissertação com um agradecimento às pessoas que ajudaram directa ou indirectamente na elaboração da tese de mestrado. Gostaria de agradecer em particular,

Ao Requimte (Rede de Química e Tecnologia), pela possibilidade de utilização do equipamento e assim, permitir o desenvolvimento do trabalho experimental;

À Prof^a. Dr^a. Cristina Delerue-Matos, por todo o seu apoio na orientação do trabalho, pela simpatia, pelo carinho e atenção;

À Prof^a. Dr^a. Valentina Fernandes Domingues, pela atenção e ensinamentos;

Ao Engenheiro José Tomás Albergaria, pela atenção, pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade;

Ao Engenheiro António Soares, por todo o apoio e atenção, pelos ensinamentos, pela enorme confiança e pela amizade;

Aos pesquisadores do laboratório Requimte no Instituto Superior de Engenharia do Porto, pela amizade, apoio e atenção;

Gostaria de agradecer aos amigos, por todo o apoio e compreensão que tiveram durante o desenvolvimento deste trabalho;

Finalmente, quero agradecer aos meus país e irmãos pelo apoio constante, especialmente nos momentos das alegrias e tristezas.

Resumo

O objectivo principal deste trabalho consistiu no estudo da eficiência da biorremediação de solos contaminados separadamente com benzeno, tolueno e etilbenzeno, utilizando exclusivamente os microrganismos nativos do solo. Nesse sentido foi estudada a influência de alguns parâmetros, tais como a concentração dos contaminantes no solo e o teor de matéria orgânica (MO). Outros objectivos mais específicos, tidos em conta no desenvolvimento deste tema, foram: i) o desenvolvimento de uma metodologia que permita identificar o ponto em que se pode considerar que o solo está descontaminado; ii) determinar o tempo de biorremediação de solos contaminados com esses poluentes.

O trabalho apresentado surge na sequência de um projecto que visava a remediação de solos contaminados com compostos orgânicos voláteis através da extracção de vapor (EV). Neste estudo a EV mostrou-se, em alguns solos, incapaz de atingir os limites legais para cada um dos contaminantes utilizados. No desenvolvimento deste trabalho, realizaram-se ensaios com benzeno, tolueno e etilbenzeno, utilizando os microrganismos nativos do solo, como as bactérias e os fungos, para degradar biologicamente os contaminantes remanescentes no solo após a EV. Estes ensaios envolveram solos com dois teores de MO (14 e 24%). Nos ensaios com benzeno experimentaram-se níveis de contaminação entre 70 e 120 mg kg⁻¹ no solo com teor de MO de 14%, e concentrações entre 96 e 170 mg kg⁻¹ no solo com 24% de MO. Os ensaios com tolueno foram efectuados exclusivamente no solo com teor de MO de 24%, com níveis de contaminação entre 319 e 392 mg kg⁻¹. No caso do etilbenzeno, foi testada a biorremediação no solo com um teor de MO igual a 14% com níveis de contaminação de 235 e 335 mg kg⁻¹ e no solo com teor de MO de 24% com níveis de contaminação entre 154 e 744 mg kg⁻¹.

O trabalho permitiu concluir que: i) dentro de determinados níveis de contaminação no solo, os microrganismos nativos do solo mostraram a capacidade de degradar o benzeno, tolueno e etilbenzeno (concentrações de etilbenzeno no solo acima de 154 mg kg⁻¹ tornaram-se tóxicas para os microrganismos os quais, possivelmente ficaram inibidos de degradar o contaminante); ii) os ensaios realizados com o solo com 24% de MO apresentaram tempos de biorremediação mais curtos pois, nestes solos, o número de microrganismos é superior o que aumenta a capacidade degradativa do solo; iii) o tempo de biorremediação é directamente proporcional à concentração de contaminante no solo; e iv) a técnica de biorremediação, demonstrou ser eficiente na degradação dos contaminantes e por isso, será uma boa técnica para complementar a EV.

Palavras-chave: Benzeno, biorremediação do solo, etilbenzeno, microrganismos, tolueno.

Abstract

This investigation reports the efficiency of bioremediation technology in benzene or toluene or ethylbenzene contaminated soil by the use of the native soil microorganisms. The influence of important parameters such as the level of contamination, the composition of natural soil organic matter and remediation time were studied. The main goals were: i) determination of the contaminant concentration level from which the soil is considered clean and ii) estimation of bioremediation time in soils contaminated with these pollutants.

The presented work is a complement of the project involving the remediation of soils contaminated with volatile organic compounds by soil vapor extraction (SVE), however, it was verified that this technique, in some soils, is unable to reach the legal limits for contaminated soils. Several experiments were made with soils contaminated separately with benzene, toluene and ethylbenzene, where it was used native microorganisms of soil (for example bacteria and fungus) to degrade the contaminants. These experiments involved two different compositions of soil with 14% and 24% of natural organic matter. In the case of bioremediation studies for benzene, the following ranges of benzene contamination from 70 to 120 mg kg⁻¹ for 14% of natural organic matter and from 96 to 170 mg kg⁻¹ for 24% of natural organic matter were investigated. Toluene was performed exclusively in the soil with 24% of organic matter content considering contamination levels between 319 and 392 mg kg⁻¹. For ethylbenzene, it was created a soil covering 235 and 335 mg kg⁻¹ of concentration, for 14% of organic matter content and it was used an interval of 154 and 744 mg kg⁻¹ for 24% of organic matter content.

The remediation experiments performed in soils contaminated with benzene, toluene and ethylbenzene allowed concluding that: i) the bioremediation was efficient, because the native soil microorganisms successfully degraded the benzene, toluene and ethylbenzene (ethylbenzene concentrations in soil above 154 mg kg⁻¹ became toxic to microorganisms which were inhibited to degradate the contaminant); ii) Soils tests performed with 24% organic matter have shown to be faster, because the microorganisms consortium is higher which increases the degrading capacity of the soil; iii) the time of biodegradation was proportional to the concentration of contaminant in the soil; and iv) bioremediation showed to be an efficient technology to complement SVE.

Keywords: Benzene, ethylbenzene, microorganisms, soil bioremediation, toluene.

Índice de conteúdos

Índice de figuras	xiv
Índice de tabelas	xvi
Glossário de termos	xix
1. Introdução	1
1.1. Contextualização e objectivos	3
1.2. Solo.....	5
1.2.1. Morfologia do solo.....	5
1.2.2. Estrutura do solo	9
1.3. O solo como alvo perfeito.....	12
1.4. Importância dos solos na sociedade	14
1.5. Microbiologia do solo.....	16
1.5.1. A micropopulação do solo	16
1.5.2. Distribuição de microrganismos em solos e águas subterrâneas	18
1.5.3. Crescimento celular	18
1.5.4. Factores que influenciam o crescimento e a biodegradação	20
1.6. Contaminação de solos	22
1.6.1. Principais fontes de contaminação	22
1.6.2. Transporte dos contaminantes	24
1.6.3. Classificação dos contaminantes	25
1.6.4. Degradação de hidrocarbonetos aromáticos	28
1.7. Biorremediação	29
1.7.1. Casos de derrames de petróleo que contribuíram para a contaminação dos solos.....	32
1.7.2. Factores favoráveis e desfavoráveis da biorremediação do solo.....	34
1.8. Cromatografia gasosa	35
1.8.1. Injetor	36
1.8.2. Detector de ionização de chama	37
1.8.3. Coluna capilar	38
2. Metodologia experimental	39
2.1. Reagentes.....	41
2.2. Equipamento	41
2.3. Preparação do solo	42
2.4. Procedimento na biorremediação.....	43
2.4.1. Constituição do meio mineral	43
2.4.2. Montagem experimental.....	44

2.4.3.	Autoclavagem das colunas estéreis	45
2.4.4.	Preparação de coluna estéril no Ultra-Violeta	46
2.4.5.	Método cromatográfico - curva de calibração	46
2.5.	Monitorização do processo de biorremediação	47
3.	Análise e discussão dos resultados.....	49
3.1.	Curvas de calibração.....	51
3.1.1.	Benzeno.....	51
3.1.2.	Tolueno.....	52
3.1.3.	Etilbenzeno	52
3.2.	Ensaaios em coluna.....	53
3.2.1.	Benzeno.....	54
3.2.2.	Tolueno.....	58
3.2.3.	Etilbenzeno	60
4.	Conclusão	65
5.	Sugestões futuras	69
	Referências bibliográficas	73
A.1.	Exemplo de cálculo da quantidade de terra para uma coluna de benzeno, com uma percentagem de MO igual a 14%.....	81
A.2.	Exemplo de cálculo do teor de humidade.....	82
A.3.	Exemplo de cálculo do volume de benzeno, para uma concentração de 70 mg kg ⁻¹	83
A.4.	Registo das massas de terra, de areia, a quantidade de água e o volume dos diferentes contaminantes.....	84
A.4.1.	Colunas estéreis	84
A.4.2.	Benzeno.....	85
A.4.3.	Tolueno.....	86
A.4.4.	Etilbenzeno	86
	Anexo B – Registo dos volumes, das massas e da concentração para as curvas de calibração.....	87
B.1.	Benzeno.....	88
B.2.	Tolueno.....	88
B.3.	Etilbenzeno	89
	Anexo C – Tempo de biorremediação e respectiva concentração	90
C.1.	Benzeno.....	90
C.2.	Tolueno.....	94
C.3.	Etilbenzeno	97
	Anexo D - Fichas de segurança dos contaminantes.....	101

D. 1. Benzeno.....	101
D. 2. Tolueno.....	103
D. 3. Etilbenzeno	105

Índice de figuras

Figura 1. 1. Percentagem de matéria orgânica e inorgânica no solo.	6
Figura 1. 2. Representação de um diagrama triangular.	6
Figura 1. 3. Representação da percentagem de matéria orgânica.	7
Figura 1. 4. Representação da estrutura de um solo.	11
Figura 1. 5. Solos em Portugal Continental em 2006.	12
Figura 1. 6. Erosão da costa para diferentes países europeus, em 2001.	13
Figura 1. 7. Representação da percentagem de organismos no solo.	16
Figura 1. 8. Ciclo de crescimento das bactérias.	19
Figura 1. 9. Principais fontes contaminadoras do solo na Europa.	22
Figura 1. 10. Tratamento de solos contaminados na Europa.	23
Figura 1. 11. Escoamento da água pelos poros de um solo.	24
Figura 1. 12. Esquema dos contaminantes inorgânicos e orgânicos.	25
Figura 1. 13. Derrame de petróleo a norte de Espanha.	32
Figura 1. 14. Separação dos constituintes numa coluna cromatográfica.	35
Figura 1. 15. Esquema geral de um cromatógrafo gasoso.	36
Figura 1. 16. Esquema de um injektor split e splitless.	36
Figura 1. 17. Esquema de um detector de ionização de chama.	37
Figura 1. 18. Forma das colunas capilares.	38
Figura 1. 19. Coluna capilar ou tubulares abertas com parede revestida (WCOT) e superfície recoberta (SCOT).	38
Figura 2. 1. Cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010.	41
Figura 2. 2. Balança de humidade.	42
Figura 2. 3. Coluna de aço inoxidável utilizada nos ensaios.	45
Figura 2. 4. Autoclave.	45
Figura 2. 5. Câmara de fluxos laminar com UV.	46
Figura 2. 6. Ampola de vidro usada na curva de calibração.	47
Figura 3. 1. Curva de calibração.	51
Figura 3. 2. Curva de calibração.	52
Figura 3. 3. Curva de calibração.	53
Figura 3. 4. Evolução da degradação do benzeno, no solo estéril, contaminado com 10 mg kg ⁻¹ com 14% de MO.	54
Figura 3. 5. Evolução da biorremediação do solo contaminado com benzeno.	55
Figura 3. 6. Comparação entre um ensaio estéril e um não estéril, com um nível de contaminação no solo de 100 mg kg ⁻¹	56

Figura 3. 7. Evolução da degradação do benzeno, no solo estéril, para 24% de MO.	56
Figura 3. 8. Resultados para diferentes concentrações com uma MO igual a 24%.	57
Figura 3. 9. Evolução da degradação do tolueno, no solo estéril, para 24% de MO.	58
Figura 3. 10. Monitorização da biorremediação para solos com 24% de MO, contaminados com tolueno.....	59
Figura 3. 11. Comparação entre uma coluna estéril e outra contaminada.	60
Figura 3. 12. Ensaio com solo estéril, com 14% de MO.....	61
Figura 3. 13. Monitorização da biorremediação para solos com 14% de MO	61
Figura 3. 14. Comparação entre uma coluna não-estéril e uma estéril.	62
Figura 3. 15. Ensaio com solo estéril, com 24% de MO e contaminado com 100 mg kg ⁻¹	62
Figura 3. 16. Monitorização da biorremediação para solos com 24% de MO, contaminados com etilbenzeno.	63
Figura D. 1. Principais características do benzeno	101
Figura D. 2. Riscos e medidas preventivas para o benzeno	102
Figura D. 3. Principais características do tolueno	103
Figura D. 4. Riscos e medidas preventivas para o tolueno	104
Figura D. 5. Principais características do etilbenzeno	105
Figura D. 6. Riscos e medidas preventivas para o etilbenzeno.....	106

Índice de tabelas

Tabela 1. 1. Diâmetro de partículas de materiais minerais dimensionadas de acordo com diversos autores.....	10
Tabela 1. 2. Quantidade dos diferentes organismos - número e biomassa.....	16
Tabela 1. 3. Composição das células bacterianas.....	20
Tabela 1. 4. Principais organismos que metabolizam os hidrocarbonetos aromáticos.....	31
Tabela 3. 1. Registo da concentração e o tempo de biorremediação.	57
Tabela 3. 2. Registo da concentração e o tempo de biorremediação.	59
Tabela 3. 3 Registo da concentração e o tempo de biorremediação.	64
Tabela A. 1. Registo dos valores para a construção das colunas estéreis, com uma percentagem de MO igual a 14%.	84
Tabela A. 2. Registo dos valores para a construção das colunas estéreis, com uma percentagem de MO igual a 24%.	84
Tabela A. 3. Registo dos valores para a construção das colunas dos ensaios estéreis e não estéreis.	85
Tabela A. 4. Registo dos valores para os ensaios de benzeno para diferentes níveis de concentração e 14% MO.....	85
Tabela A. 5. Registo dos valores para os ensaios de benzeno para diferentes níveis de concentração e 24% MO.....	85
Tabela A. 6. Registo dos valores para os ensaios de tolueno para diferentes níveis de concentração e 24% MO.....	86
Tabela A. 7. Registo dos valores para os ensaios de etilbenzeno para diferentes níveis de concentração e 14% MO.....	86
Tabela A. 8. Registo dos valores para os ensaios de etilbenzeno para diferentes níveis de concentração e 24% MO.....	86
Tabela B. 1. Registo da massa, concentração e área total, utilizando diferentes volumes de contaminação.....	88
Tabela B. 2. Registo da massa, concentração e área total, utilizando diferentes volumes de contaminação.....	88
Tabela B. 3. Registo da massa, concentração e área total, utilizando diferentes volumes de contaminação.....	89
Tabela C. 1. Registo do tempo e da concentração para um ensaio de solo estéril, de nível de contaminante de valor 10 mg kg ⁻¹	90

Tabela C. 2. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de benzeno com concentração inicial de 70 mg kg ⁻¹	90
Tabela C. 3. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de benzeno com concentração inicial de 90 mg kg ⁻¹	91
Tabela C. 4. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de benzeno com concentração inicial de 120 mg kg ⁻¹	91
Tabela C. 5. Registo do tempo e da concentração para o ensaio de solo estéril e não estéril com concentração inicial igual a 100 mg kg ⁻¹	92
Tabela C. 6. Registo do tempo e da concentração para um ensaio de solo estéril de nível de contaminante de valor 10 mg kg ⁻¹	92
Tabela C. 7. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de benzeno com concentração inicial de 96 mg kg ⁻¹	92
Tabela C. 8. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de benzeno com concentração inicial de 110 mg kg ⁻¹	93
Tabela C. 9. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de benzeno com concentração inicial de 135 mg kg ⁻¹	93
Tabela C. 10. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de benzeno com concentração inicial de 173 mg kg ⁻¹	93
Tabela C. 11. Registo do tempo e da concentração para um ensaio de solo estéril, de nível de contaminante de valor 100 mg kg ⁻¹	94
Tabela C. 12. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de tolueno com concentração inicial de 319 mg kg ⁻¹	94
Tabela C. 13. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de tolueno com concentração inicial de 336 mg kg ⁻¹	95
Tabela C. 14. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de tolueno com concentração inicial de 361 mg kg ⁻¹	95
Tabela C. 15. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de tolueno com concentração inicial de 392 mg kg ⁻¹	96
Tabela C. 16. Registo do tempo e da concentração para o ensaio de solo estéril e não estéril com concentração inicial igual a 319 mg kg ⁻¹	96
Tabela C. 17. Registo do tempo e da concentração para um ensaio de solo estéril de nível de contaminante de valor 100 mg kg ⁻¹	97
Tabela C. 18. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de etilbenzeno com concentração inicial de 235 mg kg ⁻¹	97
Tabela C. 19. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de etilbenzeno com concentração inicial de 335 mg kg ⁻¹	98

Tabela C. 20. Registo do tempo e da concentração para o ensaio de solo estéril e não estéril com concentração inicial igual a 100 mg kg^{-1}	98
Tabela C. 21. Registo do tempo e da concentração para um ensaio de solo estéril de nível de contaminante de valor 100 mg kg^{-1}	99
Tabela C. 22. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de etilbenzeno com concentração inicial de 154 mg kg^{-1}	99
Tabela C. 23. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de etilbenzeno com concentração inicial de 438 mg kg^{-1}	99
Tabela C. 24. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de etilbenzeno com concentração inicial de 491 mg kg^{-1}	100
Tabela C. 25. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de etilbenzeno com concentração inicial de 744 mg kg^{-1}	100

Glossário de termos

AEA - Agência Europeia do Ambiente

APA - Agência Portuguesa do Ambiente

USEPA – Agência de Protecção Ambiental Americana

BTEX - Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno, Xileno

BR - Biorremediação

BP – *British Petroleum*

C:N:P - Carbono: Azoto: Fósforo

Cgás – Concentração do contaminante na fase gasosa

GC - Cromatógrafo gasoso

USDA – Departamento da Agricultura dos Estados Unidos

LDL – Dosagem de Limite Letal

EFTA – European Free Trade Association

EV – Extracção de Vapor

FID – *Flame Ionization Detector*

PAH's - Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

INR – Instituto Nacional dos Resíduos

m_a - Massa de areia

$m_{\text{água}}$ - Massa de água

m_{am} - Massa de água e de meio mineral

m_c - Massa de contaminante por camada na coluna

m_p - Massa do contaminante

m_{cc} - Massa para a curva de calibração

m_m - Massa de meio mineral

MO – Matéria orgânica

m_s - Massa de solo

m_{oc} – Massa de solo rico em matéria orgânica pretendida nos ensaios de coluna

m_t - Massa total com solo e areia

m_{tc} – Massa total de contaminante a colocar na coluna

ρ - Massa volúmica do contaminante

$\%a_t$ – percentagem de água no solo húmico (solo mais areia)

$\%h$ - Percentagem de humidade pretendida na coluna

$\%mo_s$ - Percentagem de matéria orgânica no solo

$\%mo_t$ - Percentagem de matéria orgânica total

PESGRI – Plano Estratégico de Resíduos Industriais

p.a – Pro-análise

REA – Relatório do Estado do Ambiente

RAN – Reserva Agrícola Natural

REN – Reserva Ecológica Nacional

TM – *Trace Metals*

WCOT – Tubulares abertas com parede revestida

SCOT - Tubulares abertas com superfície recoberta

UE – União Europeia

UV – Ultra-Violeta

v_a - Volume da ampola

v_c - Volume de contaminação colocado na ampola

v_p – Volume de contaminante a colocar na coluna por camada

1. Introdução

1.1. Contextualização e objectivos

A evolução da indústria petroquímica levou à dependência da sociedade, visto que, o petróleo e os seus derivados fornecem à humanidade diversos produtos químicos como plásticos, borracha sintética e ainda combustíveis (gasóleo e gasolina).

O petróleo foi formado há milhões de anos (15 a 500 milhões), através da transformação e degradação de plantas aquáticas e animais (plâncton e outros organismos marinhos). O petróleo encontra-se no fundo do oceano, lagos e pântanos e, está impregnado em rochas de origem sedimentar [1, 2]. Este é constituído essencialmente por carbono e hidrogénio, mas ainda por quantidades mínimas de sulfatos e compostos orgânicos [3].

A exploração do petróleo acarreta graves problemas ambientais, que advêm de derrames durante o transporte, fugas em condutas e em postos de combustíveis, acabando por contaminar as águas (superficiais e subterrâneas), os solos e a atmosfera. A existência de contaminações pode levar a problemas de saúde pública e deterioração da fauna e da flora, acarretando restrições no uso dos recursos hídricos e do solo.

De modo a descontaminar os locais contaminados por hidrocarbonetos, surgiram várias tecnologias. Estas podem envolver processos físico-químicos e biológicos, sendo que, os físico-químicos são dispendiosos (equipamento e gastos energéticos), ambientalmente promovem a reestruturação do solo (causam a compactação da terra) e ainda reduzem a biodiversidade, todavia, conseguem separar os contaminantes sem destruí-los ou modificá-los quimicamente [4, 5]. As técnicas de remediação que envolvem processos biológicos, entre as quais a biorremediação, têm como principais características: a simplicidade, grande aceitação pelo público, custo reduzido e são favoráveis ao meio ambiente. A aplicação da biorremediação tornou-se mais frequente a partir dos anos 90 [5].

A biorremediação pode ser feita *in situ* (realizada no local de contaminação) ou *ex situ* (o solo contaminado é removido e tratado noutra local). Este processo consiste na degradação dos contaminantes por parte de organismos (bactérias, fungos e plantas), que utilizam os poluentes como fonte de substrato, transformando-os em substâncias inofensivas como água, dióxido de carbono e massa celular. A descontaminação dos solos faz-se principalmente por organismos aeróbios, o que faz com que o oxigénio seja um factor limitativo neste processo.

De modo a melhorar a eficiência da biorremediação, podem-se por um lado adicionar consórcios de microrganismos já adaptados ao contaminante (*bioaugmentation*) e por outro adicionar nutrientes tais como o azoto ou o fósforo (*biostimulation*).

A biorremediação tem sido usada em locais contaminados por hidrocarbonetos aromáticos (por exemplo o BTEX), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH's), pesticidas, solventes, conservantes de madeira e outros produtos orgânicos. É de salientar, que os hidrocarbonetos possuem características diferentes e na sua grande maioria possuem uma baixa solubilidade e reduzida persistência no solo, porém, o grupo BTEX (existente na gasolina e no gasóleo), é um grupo muito solúvel e móvel em água, facilitando a poluição dos recursos hídricos. Dentro do grupo BTEX, o benzeno é o composto mais tóxico e em exposições prolongadas pode provocar tumores, leucemia e danos na medula óssea [6, 7].

A eficiência da biorremediação está relacionada com o tipo de microrganismos existentes no solo e a sua adaptação ao contaminante, com a existência de produtos químicos de difícil degradação (p.e., metais pesados), com a biodisponibilidade de nutrientes, com a temperatura de operação (temperaturas baixas (<20°C) diminuem a eficiência da biodegradação), com a concentração do contaminante e com a disponibilidade do oxigénio [8, 9].

O objectivo principal deste trabalho consiste no estudo da biodegradação de contaminantes (benzeno, tolueno e etilbenzeno), utilizando microrganismos autóctones do solo, como bactérias e fungos. Nesse sentido foi estudada a influência de alguns parâmetros tais como a concentração dos contaminantes no solo, a influência do teor de humidade e do teor de matéria orgânica (MO).

Para além deste objectivo principal, foram ainda definidos vários objectivos complementares, tais como: i) o desenvolvimento de uma metodologia que permita identificar o ponto em que se pode considerar que o solo está descontaminado; ii) determinar o tempo de biorremediação de solos contaminados.

1.2. Solo

Esta secção apresenta uma descrição do solo, em particular a morfologia do solo e a estrutura do solo.

1.2.1. Morfologia do solo

O solo é considerado um recurso finito, limitado e não renovável. Segundo a Sociedade Portuguesa da Ciência do Solo, "o solo é um corpo natural, complexo e dinâmico, constituído por elementos minerais e orgânicos, caracterizado por uma vida vegetal e animal própria, sujeito à circulação do ar e da água e que funciona como receptor e redistribuidor de energia solar". Esta definição foi apresentada na Declaração de Princípios sobre o Solo Português [10].

A origem do solo consiste essencialmente na desintegração das rochas e minerais, também designada por meteorização (química e/ou física) [11]. Ou seja, a formação do solo começa pela descompressão da rocha-mãe, perto da superfície e, possivelmente de alguma meteorização mecânica (desagregação), devendo-se à penetração da água e dos gases atmosféricos.

Após a meteorização, a rocha torna-se num material incoerente ou desagregado, criando-se as condições necessárias para o desenvolvimento de vegetação cada vez mais complexa (musgos, arbustos e árvores) e para o desenvolvimento dos microrganismos [10]. Contudo, durante as primeiras etapas de formação do solo, a actividade microbiana é escassa e tal deve-se à falta de carbono e azoto. A colonização dos novos terrenos acontece essencialmente na superfície dos solos, porque a maioria dos microrganismos utilizam a luz como fonte de energia [11].

É de referir, que a colonização inicial de um solo está a cargo das cianobactérias e de outros microrganismos. A formação de uma camada de solo com uma espessura de cerca de 1 cm pode levar 200 a 400 anos [11, 12].

É ainda importante salientar que o solo coexiste em diferentes fases (sólida, líquida e gasosa) e, por isso é considerado um sistema anisotrópico:

- I. **Fase sólida** - É constituída principalmente por minerais e restos orgânicos (Figura 1.1) [13].

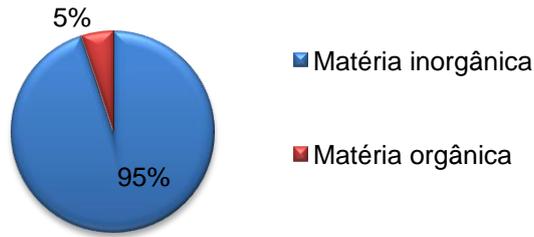


Figura 1. 1. Percentagem de matéria orgânica e inorgânica no solo.

II. Fase líquida - Essencialmente formada por água, que se infiltra ou está presa em poros e adsorvida na superfície das partículas do solo [14].

III. Fase gasosa – Representa o ar que está contido nos poros e/ou gases libertados na sequência da actividade bioquímica [10].

Relativamente ao material inorgânico existente no solo, este divide-se em três grandes grupos: areia, silte e argila. A textura do solo é definida pela quantidade de cada material juntamente com as características da rocha-mãe. Esta influencia as condições físicas do solo como o tamanho e distribuição dos poros que por consequência, afectam a disponibilidade da água, difusão dos gases e a actividade dos organismos no solo. A interacção destas condições determina a humidade óptima do solo para o crescimento e desenvolvimento dos microrganismos. Além disso a textura do solo vai afectar a disponibilidade de azoto e fósforo e, subsequentemente afecta a actividade dos microrganismos e a quantidade de matéria orgânica acumulada [15]. Por norma, utiliza-se um diagrama triangular (Figura 1.2), para classificar-se a textura de um solo [16].

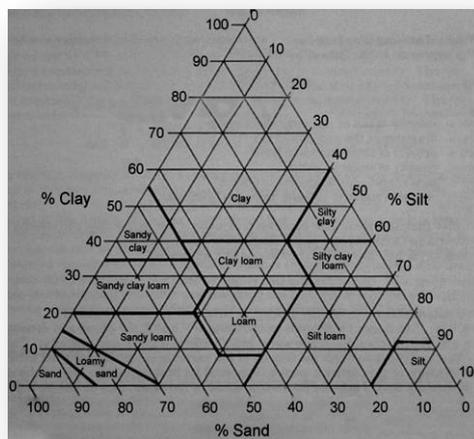


Figura 1. 2. Representação de um diagrama triangular.

Comparando os três materiais, a argila é um dos factores que mais influencia as propriedades do solo. Isto porque: tem a capacidade de reter a água, conferindo plasticidade variável ao conjunto quando húmido e tenacidade quando seco; a maioria das partículas de argila é de natureza coloidal, com uma carga superficial negativa e com forma plana; promove adesividade entre as partículas em virtude das suas propriedades de expansão/retracção; proporciona variações de volume no corpo do solo responsáveis pela abertura e fecho de fendas e outros espaços vazios, com consequências evidentes na permeabilidade à água e ao ar; do ponto de vista químico, as argilas têm facilidade em trocar iões além de que constituem, com o húmus, complexos argilo-húmicos. Sem estes complexos, as plantas teriam dificuldades em se alimentarem através das raízes [10, 11].

A quantidade da fracção argilosa vai depender da natureza da rocha-mãe e do grau de maturidade do solo. Para climas quentes e húmidos a percentagem de argila é superior a 60% e comparativamente nas regiões áridas ou de clima frio e húmido, os solos apresentam uma percentagem de argila inferior a 10% em peso [10].

Os solos arenosos têm como principais características, uma fraca capacidade de retenção de água, uma elevada permeabilidade e são geralmente bem arejadas. Os solos maioritariamente constituídos por siltes e argilas são considerados coesos, têm uma elevada capacidade de retenção de água e uma baixa permeabilidade, levando ao abaixamento da velocidade de infiltração e a um baixo arejamento [12]. A composição granulométrica e o comportamento químico vão influenciar a permeabilidade e a porosidade do solo e posteriormente, a capacidade de retenção da água [11].

A fracção orgânica do solo é constituída pelo húmus, organismos e raízes das plantas (Figura 1.3) [17]. A matéria orgânica é degradada pelos microrganismos existentes no solo, que a utilizam como alimento ou substrato microbiano. O aumento da actividade microbiana vai influenciar as propriedades do solo [13].

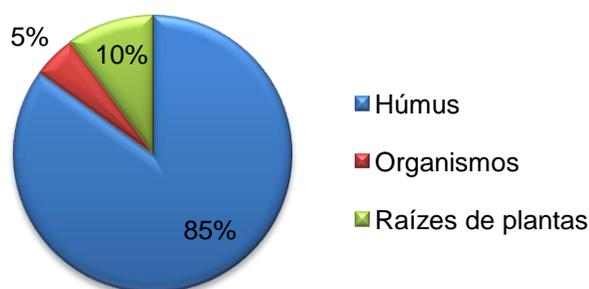


Figura 1. 3. Representação da percentagem de matéria orgânica.

O húmus é constituído essencialmente por substâncias poliméricas, tais como compostos orgânicos, polissacarídeos, aminoácidos e compostos que contêm fósforo [11] e, de um modo geral, por partículas extremamente finas. É um material amorfo, poroso, pouco denso, bom controlador do pH e uma fonte de azoto, enxofre e fósforo para as plantas, absorvente da radiação solar, influenciando o aumento da temperatura e, por consequência, a velocidade das reacções químicas e bioquímicas. Uma outra particularidade do húmus é a formação de complexos organo-minerais, mais especificamente os complexos argilo-húmicos, que são fundamentais na ligação dos microrganismos com os minerais [10].

A quantidade de matéria orgânica no solo vai influenciar a adsorção dos compostos orgânicos (por exemplo, os Compostos Orgânicos Voláteis, COVs), alterando a sua mobilidade, biodisponibilidade e a toxicidade. Quanto maior o teor de matéria orgânica, maior será a adsorção e menor o tempo de degradação dos contaminantes [18]. Os vários estudos realizados a solos e sedimentos demonstram, que a matéria orgânica é o principal factor a dominar a adsorção dos inúmeros poluentes orgânicos.

A adsorção pode ser física ou química. Relativamente à adsorção física, trata-se de um processo reversível e a ligação entre as moléculas é efectuada através de forças de atracção ou forças de Van der Waals. O contaminante, neste tipo de adsorção, não fica fixo ao local, podendo mover-se na superfície do adsorvente, condensar ou formar multicamadas. Na adsorção química comparativamente à adsorção física, trata-se de um processo que raramente é reversível e as interligações entre as moléculas são mais fortes, por conseguinte, só se vai formar uma única superfície, designada por monocamada. [19].

Na fase líquida do solo, a quantidade de água depende de vários factores, tais como o clima, o relevo e a cobertura vegetal. Ao penetrar no solo, a água transporta consigo compostos solúveis inorgânicos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cl^- , NO_3^- e HCO_3^-) e, por vezes, gases atmosféricos. O teor de água no solo pode relacionar-se com o teor de argila visto que nos climas áridos, quentes e frios, os solos praticamente não têm argila, dando lugar a solos secos e a uma escassez da actividade biológica. Já em climas quentes e húmidos, os teores de argila no solo atingem os valores mais elevados, dificultando a circulação da água, inibindo o intercâmbio dos gases e o movimento de oxigénio através do solo, levando à formação de zonas anaeróbias [10, 11].

A fase gasosa do solo pode ser designada por ar ou atmosfera do solo e é essencial à vida do solo [10]. É de salientar que existe uma relação directa entre as quantidades de água e ar contidas num volume de solo, pois o espaço poroso não sendo ocupado por água vai estar ocupado por gás [11].

Segundo Carvalho, AMG [10], a atmosfera do solo é constituída essencialmente por oxigénio (O_2) com uma concentração entre 15 e 20%, dióxido de carbono (CO_2) com concentrações entre 0,2 e 4,5%, azoto (N_2) entre 79 e 81% e vapor de água (H_2O). Todavia, estes gases resultam do equilíbrio entre a penetração de ar atmosférico nos vazios do solo, da respiração ao nível das raízes das plantas e dos microrganismos os quais provocam a libertação de CO_2 [10].

Em solos com baixo arejamento (por exemplo, solos argilosos), com um elevado teor em água e uma considerável actividade microbiana (respiração), o dióxido de carbono pode atingir 10% da fase gasosa. Alguns dos factores que influenciam a quantidade de gases no solo são:

- i. A granulometria e porosidade do solo - dois aspectos que condicionam a permeabilidade, dificultando a renovação do oxigénio;
- ii. A humidade do solo - que reduz a permeabilidade;
- iii. A matéria orgânica - que induz o aumento dos teores de dióxido de carbono;
- iv. O clima - que também controla a actividade química e a biológica, com implicações directas na razão entre O_2 e CO_2 .

Ao nível de arejamento do solo a actividade microbiana é tão importante como as condições no interior do agregado, já que os solos que são bem arejados ainda podem ter zonas microscópicas em anaerobiose. Isto é, as bactérias aeróbias, durante a colonização das zonas microscópicas, consomem o oxigénio armazenado nesses locais, proporcionando as condições vitais às bactérias anaeróbias. A transição das condições aeróbias e anaeróbias tem lugar para valores de concentração de oxigénio abaixo de 1% [11].

1.2.2. Estrutura do solo

O solo possui a capacidade de proporcionar às plantas e aos microrganismos, um suporte físico e nutrientes essenciais ao seu crescimento [11]. A “estrutura” de um solo consiste, na disposição e organização das diferentes partículas [10]:

- A organização espacial dos seus constituintes - está envolvida a forma, a natureza, a dimensão e o arranjo das partículas simples e dos agregados;
- A geometria dos vazios - tendo em conta as dimensões, formas e distribuição dos vazios.

A estrutura do solo vai afectar em grande medida as suas propriedades mecânicas, nomeadamente, o movimento dos fluidos, as infiltrações, retenções de água e arejamento.

Os solos com partículas soltas, tais como os depósitos de areia no deserto, são consideradas como partículas “carentes na estrutura” e possuidoras de uma estrutura de grão simples. Os solos com partículas extremamente unidas (p.e., a argila seca) definem-se como possuidores de uma “estrutura em massa”, enquanto os solos com uma estrutura intermédia, são designados por agregados.

Os agregados consistem em estruturas constituídas por aglomerados de partículas terrosas (esqueleto) e material aglutinador (plasma) como as argilas, os óxidos e hidróxidos de ferro e/ou de manganês, os hidróxidos de alumínio e o húmus. Relativamente aos vazios entre partículas, a caracterização estrutural distingue microporos (< 50 µm) e macroporos (> 50 µm). A estabilização dos agregados é afectada pela actividade microbiana, pelas alterações climáticas e por práticas agrícolas.

Na Tabela 1.1, registam-se os tamanhos de partículas de diferentes materiais minerais (diâmetro) para solos de diferentes tipos [10, 11].

Tabela 1. 1. Diâmetro de partículas de materiais minerais dimensionadas de acordo com diversos autores.

Material mineral	Descrição	Diâmetro (mm)		
		USDA*	A. Atterberg**	FAO-UNESCO
Gravilha	Partículas grosseiras de minerais provenientes da rocha-mãe.	1,00 – 2,00	20 a 2	>2
Areia grossa	Partículas intermédias de minerais provenientes da rocha-mãe.	0,50 – 1,00	2 a 0,2	2 a 0,05
Areia média		0,25 – 0,50	-	
Areia fina		0,10 – 0,25	0,2 a 0,02	
Areia muito fina		0,05 – 0,10	-	
Silte	Partículas finas de minerais provenientes da rocha mãe.	0,002 – 0,05	0,2 a 0,002	0,05 a 0,002
Argila	Partículas minerais microscópicas de natureza coloidal, laminadas em camadas ou placas.	<0,002	< 0,002	< 0,002

* Departamento da Agricultura dos Estados Unidos (USDA)

**Uma das escalas escolhidas pela Sociedade Internacional de Ciência do Solo

De um modo geral, o solo é constituído por três zonas/camadas: A, B e C (em alguns casos apenas A e C), distribuídos de cima para baixo, até chegar à rocha-mãe (Figura 1.4) [12].

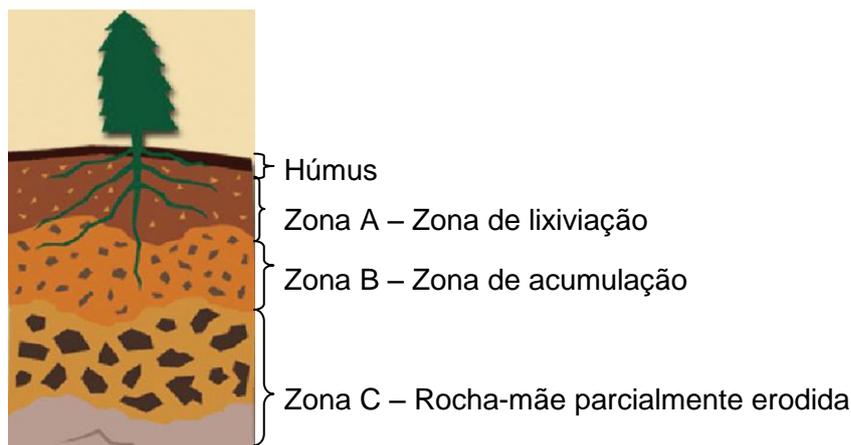


Figura 1. 4. Representação da estrutura de um solo.

A **zona A** é a mais superficial, onde ocorre lixiviação ou eluviação. Em geral, este é o nível com a tonalidade mais escura, tendo uma cor acinzentada ou negra, devido à maior concentração de húmus e matéria orgânica. É nesta zona que as plantas fixam as raízes e coexistem diversos tipos de animais, como os vermes e os microrganismos, também estão presentes alguns componentes minerais, como, a argila e algumas espécies residuais como quartzo e feldspatos. A água que se infiltra vai retirar uma parte de substâncias solubilizáveis (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Fe) e também as partículas mais finas p.e., as argilas, colóides ferruginosos e orgânicos.

A **zona B** ou subsolo é caracterizada como uma zona de precipitação. Esta camada caracteriza-se por ser pobre em matéria orgânica, possuir poucos microrganismos, ser enriquecida em argilas e, por vezes, óxidos e hidróxidos de ferro que lhe dão a tonalidade avermelhada, amarelada ou acastanhada. A existência desta zona deve-se à erosão dos minerais na própria camada e também ao transporte descendente dos materiais oriundos da zona A. Em algumas condições pode acumular-se hidróxidos de alumínio ou carbonatos [10, 11].

Seguidamente, existe a **zona C** que corresponde à transição das restantes zonas com a rocha-mãe. Esta zona marca o início da degradação da rocha-mãe, a qual se encontra parcialmente decomposta, desagregada e fragmentada.

Os solos jovens ou imaturos podem não apresentar a zona B exibindo apenas a zona A que se sobrepõe à zona C. Só com o evoluir do tempo, é que surge a zona B. Esse período vai estar associado à acumulação da argila no solo, complementando a sua estrutura e tornando-o assim num solo designado de maduro [10].

1.3. O solo como alvo perfeito

A degradação do solo tem vindo a agravar-se nas últimas décadas, derivada essencialmente da actividade do Homem. As taxas de formação e regeneração do solo são demasiado demoradas, o que acarreta consequências graves a nível global, não só ao nível social, como ambiental e económico. O aumento da população mundial aumenta a necessidade de proteger o solo como um recurso vital, especialmente para a produção de alimentos [20].

Com a evolução das condições de vida da humanidade, o solo tem vindo a ter diferentes aplicações em Portugal Continental. Segundo o relatório do estado do Ambiente, entre 2000 a 2006, os terrenos artificiais¹ aumentaram cerca de 10%, especialmente nas grandes cidades, como Lisboa e Porto e a vegetação natural decresceu 3,5%. Relativamente à agricultura, esta diminuiu cerca de 31 mil hectares em 2006 comparativamente a 2000, enquanto a floresta aumentou para 30 mil hectares. Na Figura 1.5, observam-se as diferentes aplicações do solo em Portugal Continental, sendo possível verificar que a agricultura e a floresta são as que ocupam a maior extensão no país [21].

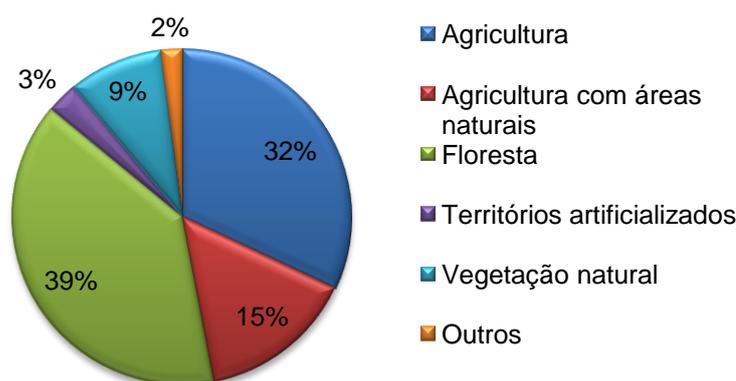


Figura 1. 5. Solos em Portugal Continental em 2006.

A erosão nos últimos 40 anos tem acarretado graves problemas ambientais sendo que um terço dos solos agrícolas mundiais deixaram de ser produtivos. Na União Europeia (UE), cerca de 77% desses solos correspondem a áreas agrícolas e silvícolas e, segundo o mapa mundial do estado da degradação do solo, verifica-se que na UE existem cerca de 52 milhões de hectares da superfície terrestre (cerca de 16%) afectados por processos de erosão, enquanto os países candidatos à UE, têm uma percentagem de 35% [20].

¹ Consiste em estruturas urbanas desde barragens, estradas, habitações, entre outros.

Outro factor que afecta Portugal Continental será a erosão costeira, visto que, um quarto do território nacional está sujeito à erosão constante e, cerca de três quartos de população vive na zona costeira [22]. De facto, a faixa mais afectada vai desde a Foz do Douro à Nazaré. Com a diminuição da costa marítima em Portugal e na UE, torna-se necessário planificar o ordenamento do território [20]. Na Figura 1.6, representa-se a percentagem de erosão costeira a nível dos vários países europeus [22].

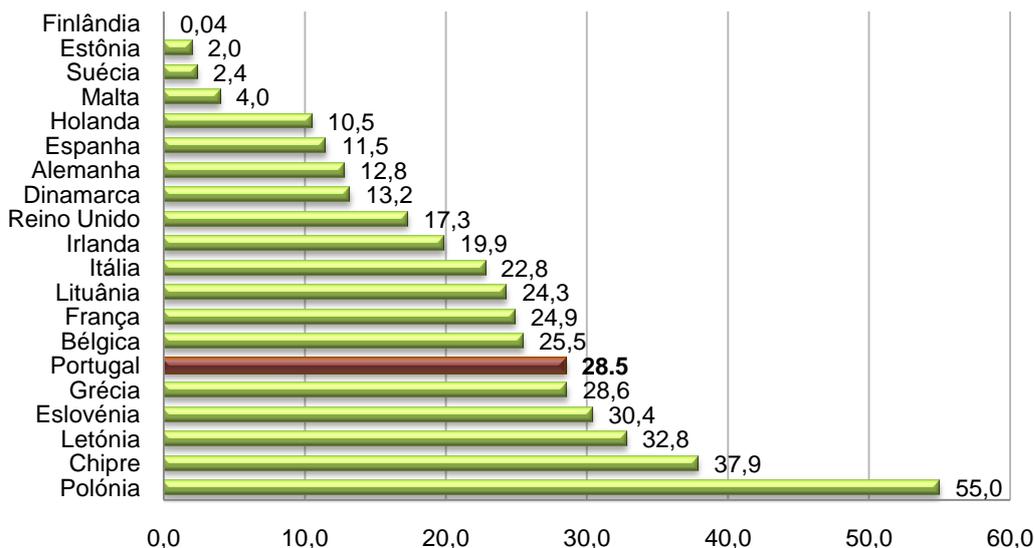


Figura 1. 6. Erosão da costa para diferentes países europeus, em 2001.

Outro problema grave na degradação do solo é a desertificação que, quando iniciada, é de difícil reversão. Este processo consiste no aumento da salinização dos solos, no aumento do escoamento superficial, na erosão, na redução da biodiversidade e numa redução da produtividade agrícola.

Verifica-se que a seca e a desertificação já afectam 1/6 da população mundial e cerca de 30% dos territórios continentais no planeta. Um terço de Portugal Continental está em risco de desertificação, sendo que 28% do território já apresenta problemas graves [22]. A desertificação em Portugal é mais evidente no Alentejo, no litoral Algarvio e no Vale do Douro.

1.4. Importância dos solos na sociedade

O solo, além do seu fenómeno geológico, tem um papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da vida, reflectindo-se no desenvolvimento da sociedade. O solo está sujeito a agressões físicas, químicas e biológicas resultantes de práticas de exploração incorrectas. Para além disso, está também sujeito à erosão natural e à destruição decorrente da urbanização (rodovias, barragens, aeroportos, etc.).

Para melhorar a qualidade do solo, têm-se desenvolvido esforços no sentido de uma melhor gestão do solo, satisfazendo as necessidades do presente sem sacrificar as gerações futuras. Os esforços têm sido aplicados na agricultura, silvicultura e pecuária, mas também preservando a beleza paisagística [10].

As preocupações ambientais, que têm aumentado ao longo dos últimos anos (20 a 30 anos), conduziram ao aparecimento de convenções, cimeiras e decretos-lei, com vista a proteger os meios naturais. Em 1992, ocorreu a cimeira do Rio, onde vários Estados decidiram criar leis para proteger o solo. A desertificação foi um dos temas debatidos e assim surgiu a Convenção Internacional para a Luta contra a Desertificação, visando a reabilitação dos solos. Mais tarde surgiram novas políticas de protecção do solo Europeu, propostas e adoptadas pela UE, pela European Free Trade Association (EFTA), pelos países candidatos à UE, pela Comissão Europeia e pela Agência Europeia do Ambiente.

Com o avançar dos anos, a UE, viu-se obrigada a criar novos planos de desenvolvimento rural, nomeadamente a definição de boas práticas agrícolas, uma vez que os terrenos estavam a ser mal explorados pela agricultura e pela silvicultura [22].

Em Portugal, ainda não foi implementada uma política concreta para a gestão de solos, mais especificamente para os solos contaminados. Contudo, surgiram já diversos decretos-lei, relativos à protecção do solo, como o Decreto-Lei nº 794/76, de 5 de Novembro, que impõe regras e definições sobre o uso e ocupação dos solos. Apesar disso, ainda não existe nenhuma estratégia específica para a gestão de zonas contaminadas, estando actualmente esta área associada à gestão nacional de resíduos.

O tema de protecção e descontaminação dos solos é regido por diferentes instrumentos legislativos [22, 23]:

- A Lei de Bases do Ambiente Português, nº 11/87, primeira série, nº 81 de 1987/4/07, define que os custos da recuperação dos solos contaminados devem estar a cargo do poluidor;
- Para protecção mais eficaz do solo, surge a Reserva Agrícola Nacional (RAN) regida pelo Decreto-lei nº 196/89, e mais tarde surge a Reserva Ecológica Nacional (REN), regida pelo Decreto-lei nº 93/90 de 19 de Março;

- O Decreto-Lei nº 516/99 define o Plano Estratégico de Resíduos Industriais Português (PESGRI'99 – nº 280, primeira série). Este foi reformulado em 2001 (PESGRI' 2001) e inclui a análise dos locais potencialmente contaminados e fontes de contaminação no país;
- O Decreto-Lei nº 198-A/2001 regulamenta a recuperação e gestão de áreas contaminadas por extracções mineiras;
- O Decreto-Lei nº 118/2006 regulamenta o uso de lamas activadas na agricultura, de modo a evitar os efeitos nocivos sobre os solos, plantas e nos seres humanos. Nesse mesmo ano, surgiu outro decreto, o Decreto-Lei nº 118/2006, que regulamenta a gestão dos resíduos, atribuindo a responsabilidade pelo licenciamento da descontaminação à gestão de resíduos;
- Em Setembro de 2007, introduziu-se o Programa de Ordenamento do Território, que tem como objectivo integrar a estratégia da UE na temática de Protecção Ambiental. O desenvolvimento de sistemas de informação sobre os recursos naturais e uma Estratégia Nacional de Gestão Integrada na Prevenção e Redução de Risco (2007 – 2013), o mapeamento do solo geoquímico, a monitorização da qualidade do solo e a implementação de uma estratégia nacional de protecção do solo são metas a atingir.

Actualmente não existe uma lei concreta para a descontaminação e recuperação dos solos em Portugal, mas, no Relatório do Estado do Ambiente (REA) de 2006, declara-se que essa lei já está em desenvolvimento. Para a formulação de um bom modelo para o país, poder-se-á recorrer a alguns exemplos como o Reino Unido e a Holanda pois estes já têm uma longa experiência neste domínio [23].

1.5. Microbiologia do solo

Esta secção apresenta o tema da microbiologia do solo, onde são considerados a micropopulação do solo, a distribuição de microrganismos em solos e águas subterrâneas, o crescimento celular e factores que influenciam o crescimento e a biodegradação.

1.5.1. A micropopulação do solo

A quantidade de microrganismos no solo é abundante e diversificada, e vai depender da profundidade, do tipo de solo, da temperatura, do regime hídrico entre outros factores ambientais. Estima-se que apenas 1% dos microrganismos do solo tenham sido identificados [24].

Os microrganismos no solo são de extrema importância, visto que são responsáveis pelo funcionamento dos ciclos biogeoquímicos, como por exemplo o do carbono, enxofre e o fósforo. A Figura 1.7 identifica as diferentes proporções de organismos no solo [17], enquanto a Tabela 1.2 apresenta o número de microrganismos por massa de solo e a biomassa microbiana em kg ha⁻¹ [24].

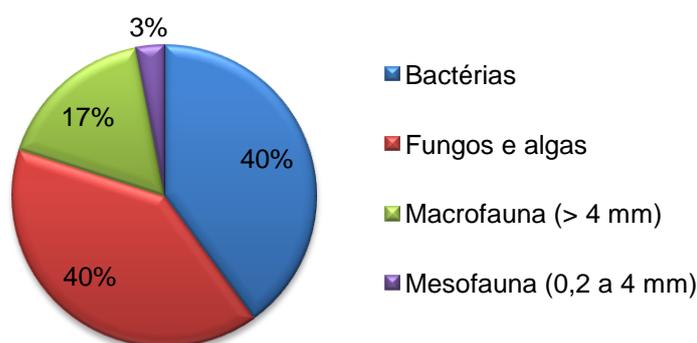


Figura 1. 7. Representação da percentagem de organismos no solo.

Tabela 1. 2. Quantidade dos diferentes organismos - número e biomassa.

Organismos	Número/g	Biomassa microbiana (kg ha ⁻¹)
<i>Bactérias</i>	10 ⁸ -10 ⁹	300-3000
<i>Actinomicetos</i>	10 ⁷ -10 ⁸	300-3000
<i>Fungos</i>	10 ⁵ -10 ⁶	500-5000
<i>Microalgas</i> (cianobactérias e algas)	10 ³ -10 ⁶	10-1500
<i>Protozoários</i>	10 ³ -10 ⁵	5-200

Existe um grande número de bactérias no solo, com variações extensivas das propriedades morfológicas, ecológicas e fisiológicas, contudo, ainda existe um vasto leque de bactérias por descobrir.

As bactérias podem ser consideradas como degradadoras primárias de compostos orgânicos no solo, possuem diferentes características nutricionais (autotróficos – produzem o seu próprio alimento; heterotróficos – consomem a matéria orgânica oriunda de outros seres vivos), têm diferentes formas (forma esférica – cocos; bastonetes – bacilos), em ambientes inadequados algumas espécies podem criar os esporos como forma de resistência, a dimensão das bactérias varia de 0,3 a 2 μm e por fim, as bactérias podem ser aeróbias, anaeróbias e anaeróbias facultativas [25, 26]. Em seguida listam-se exemplos de algumas das espécies de bactérias tipicamente encontradas nos solos: *Bacillus*, *Clostridium*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azotobacter* e *Nitrobacter* [24].

Os actinomicetos são considerados como um grupo intermédio entre as bactérias procariontes mais primitivas e os fungos eucariontes. Estes podem ser encontrados no solo, na água e em estações de tratamento de águas residuais, possuem a capacidade de produzir filamentos muito ramificados (com um diâmetro próximo de 1 μm), na sua maioria são aeróbios estritos e ainda reproduzem-se por esporos exógenos ou por fragmentação. Estes em condições adversas (grandes intervalos de pH, concentrações baixas de nutrientes, temperaturas elevadas e produtos químicos (ácidos e desinfetantes)) possuem a capacidade de criar esporos [11, 26]. Em regra, existem em grande número, decompõem substratos resistentes como, a celulose, a quitina, a linhina e têm a capacidade de síntese de alguns antibióticos. As espécies mais importantes são a *Nocardia*, a *Streptomyces* e a *Micromonospora* [24].

Os fungos possuem como principais características estruturais a existência de parede celular, ausência de mobilidade, podem ser aeróbios estritos ou anaeróbios facultativos e utilizam a matéria orgânica como fonte de carbono e energia.

Os fungos conseguem viver em meio aquático e nos solos, contudo, existem em maior número no solo, mais especificamente à superfície, sendo que, a quantidade de nutrientes no solo determina a espécie de fungo predominante [11, 25]. Comparando os fungos com as bactérias, os primeiros existem em menor quantidade e possuem uma taxa de crescimento mais lenta. Os fungos apresentam ainda a capacidade de viverem em ambientes com um baixo pH, manifestam sensibilidade à variação da humidade e capacidade de degradar com eficiência os compostos orgânicos tóxicos e substâncias complexas como a linhina, celulose ou a pectina. Algumas espécies de fungos conseguem

viver em simbiose com plantas. As espécies mais comuns são *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Trichoderma* [24, 25].

Entre os diferentes microrganismos estabelecem-se interações. As interligações são negativas quando os produtos metabólicos de alguns microrganismos são prejudiciais a outros ou existe competição para sobreviverem e crescerem. Alguns exemplos de relações de interação negativa são a predação, parasitismo e competição.

As interligações positivas – ocorrem quando um grupo beneficia das acções do outro. Por exemplo, os diferentes microrganismos podem associar-se e assim, vão ser capazes de degradar mais rapidamente e eficazmente os compostos orgânicos. Alguns exemplos de interações positivas são o comensalismo, protocooperação e o mutualismo [11].

1.5.2. Distribuição de microrganismos em solos e águas subterrâneas

Os microrganismos mais comuns são as bactérias. Estas podem crescer quer no solo quer no meio aquático, podendo mesmo ser encontradas a uma profundidade de 500 a 600 m. Como já se referiu, os diferentes grupos de organismos são influenciados por factores ambientais como o pH, a humidade, a estrutura do solo e a disponibilidade dos nutrientes.

A rizosfera é a zona de influência das raízes das plantas. É nesta região que ocorre a biodegradação de compostos como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH's) e os solventes clorados, visto que é uma zona muito rica em microrganismos devido às elevadas áreas superficiais das raízes, à presença de nutrientes orgânicos, inorgânicos e vitaminas.

Ao longo das diferentes zonas estruturais do solo a densidade, a diversidade e a actividade dos microrganismos estão inversamente relacionadas com a quantidade de argila, o pH baixo e com a concentração de metais pesados [11].

1.5.3. Crescimento celular

A taxa do crescimento celular consiste no aumento do número de microrganismos por unidade de tempo. Para aumentar o seu número, as bactérias reproduzem-se assexuadamente por divisão binária. Segundo o processo de divisão celular, seria de prever que o crescimento das bactérias fosse exponencial, o que não acontece, pois o crescimento é afectado, entre outros factores, pela concentração dos nutrientes. O crescimento dos

microorganismos está representado na Figura 1.8, onde se pode verificar a divisão da curva de crescimento em quatro fases: latência, crescimento, estacionária e morte [11].

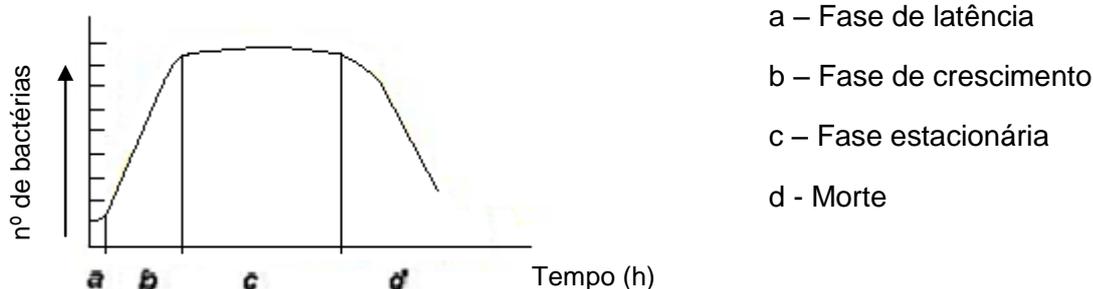


Figura 1. 8. Ciclo de crescimento das bactérias.

✓ Fase de latência

Esta fase é o período de habituação ao novo ambiente e a velocidade de crescimento é muito baixa ou quase nula. O tempo de latência deve-se à síntese de compostos bioquímicos. O período de latência pode demorar horas ou até dias, conforme o composto químico a ser degradado [11].

✓ Fase de crescimento

Esta fase surge logo após a fase de latência. Existe um aumento exponencial da população microbiana depois de um período de crescimento quase nulo. O desenvolvimento dos microorganismos depende do tipo de microorganismo e das condições de crescimento, como por exemplo a falta de nutrientes, temperatura e a acumulação de produtos tóxicos [11].

✓ Fase estacionária

Na fase estacionária, o número de bactérias não se altera com o tempo. Esta fase pode durar horas ou até mesmo dias. Neste caso, o crescimento é reduzido, contudo os microorganismos desenvolvem-se através do consumo de matéria orgânica, células mortas e células danificadas. Quando existe escassez de nutrientes, algumas bactérias podem formar esporos que permitem manter a actividade, apresentando vantagens sobre as outras espécies [11].

✓ Morte

As bactérias, nesta fase, estão sem a actividade metabólica ou já se encontram mortas, mas as células ainda viáveis vão-se alimentar das células mortas. Nesta fase ainda existem células a nascer, todavia, a diminuição do número de células e da massa celular é notória [11].

1.5.4. Factores que influenciam o crescimento e a biodegradação

Os factores ambientais vão influenciar a concentração do contaminante no solo, a natureza dos microrganismos e a taxa de degradação dos contaminantes. Os factores ambientais mais importantes são a disponibilidade de nutrientes, o pH, a temperatura, a humidade e o arejamento.

➤ **Necessidade de nutrientes**

Para o crescimento dos microrganismos, é necessário que os nutrientes estejam disponíveis para serem assimilados. Na Tabela 1.3, é possível verificar as percentagens necessárias para o desenvolvimento das bactérias [11].

Tabela 1. 3. Composição das células bacterianas.

	Elemento											
	C	O	N	H	P	S	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl	Fe
% Em peso seco	50	20	14	8	3	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,2

É de salientar que, por vezes, os nutrientes no solo inibem o crescimento dos microrganismos. Quando necessário fornece-se ao solo azoto na forma de NH₄⁺ ou ureia, ao passo que o fósforo deve ser adicionado na forma de ortofosfato [25].

➤ **pH**

Este parâmetro é de relativa importância, pois vai afectar a actividade microbiológica, ou seja, para um bom crescimento o pH deve enquadrar-se no intervalo de 6 a 8 e, para os fungos o pH óptimo deve ser inferior a 5.

O pH quando muito ácido ou básico inibe o crescimento dos microrganismos, afectando a solubilidade dos compostos de fósforo (pH≈6,5). Isto é, para um pH > 7 o fósforo reage com o cálcio formando diferentes produtos (hidroxiapatita, fosfato octocálcio) e para um pH inferior a 5,5 o fósforo reage com o alumínio e o ferro, formando fosfato de alumínio e de ferro, influenciando a sua solubilidade e disponibilidade para os microrganismos.

Caso o pH seja demasiado baixo e seja necessário aumentá-lo, é possível adicionar ao solo compostos com cálcio, como por exemplo, óxidos de cálcio, hidróxido de cálcio. Mas se o pH for básico e se for desejável diminuir-lo, então adiciona-se ácido sulfúrico ou sulfatos de alumínio [11, 27].

➤ **Temperatura**

A temperatura é um aspecto muito importante, visto que, afecta a actividade microbiológica e as taxas de biodegradação. A grande maioria dos microrganismos possui uma temperatura óptima entre os 15°C e os 35°C. Todavia, existem algumas excepções como as termófilas, que tem uma temperatura óptima entre os 45°C aos 65°C e as psicrófilas que se desenvolvem melhor a temperaturas abaixo dos 15°C. Ao decorrer da biodegradação, a actividade microbiológica pode aumentar, reflectindo-se no aumento da temperatura e da solubilidade dos contaminantes.

Caso a temperatura seja superior a 40°C, ocorre a destruição das enzimas e das proteínas, levando à destruição das bactérias. Mas se a temperatura for baixa, cerca de 0°C, dá-se a inibição das bactérias aumentando o tempo de reacção o que, em alguns casos, pode originar o surgimento de estruturas de resistência - os esporos [11].

➤ **Humidade**

A importância da humidade num solo contribui para o crescimento e manutenção das bactérias, pois possuem 90% de água na sua constituição. Se a humidade for baixa (inferior a 40%), vão criar-se zonas secas inibindo o crescimento microbiano. Mas, se a humidade for elevada (superior a 65%), inibe o intercâmbio de gases, originando zonas anaeróbias. As condições óptimas de humidade para as bactérias rondam os valores de 50 a 60% [11, 26].

➤ **Arejamento**

O arejamento é essencial para a degradação, pois vai fornecer oxigénio aos microrganismos aeróbios (processos respiratórios e metabólicos), ajudando a controlar a temperatura no processo e com a circulação do ar vai haver libertação de odores.

O arejamento não deve ser demasiado elevado, pois vai provocar a perda de humidade e o aumento da temperatura, por isso, o oxigénio deve ser superior a 2% e para a água subterrânea o oxigénio dissolvido deve estar entre 1 a 2 mg L⁻¹ [26].

➤ **Factores relativos ao substrato**

Existem diversos compostos difíceis de degradar como os polímeros sintéticos, compostos clorados e aromáticos. Uma das razões para a ineficiente degradação deve-se à dimensão dos compostos, pois estes possuem uma estrutura molecular grande, constituída por grandes cadeias de carbonos colocados linearmente, podendo ser ramificados ou com anéis, o que impossibilita a sua passagem para o interior da célula. A outra razão prende-se com o facto de os compostos não serem solúveis em água, o que dificulta o transporte do composto para a célula [11].

1.6. Contaminação de solos

Na contaminação de solos inserem-se as principais fontes de contaminação, o transporte dos contaminantes, a classificação dos contaminantes e a degradação de hidrocarbonetos aromáticos.

1.6.1. Principais fontes de contaminação

As actividades difusas (urbanas e industriais) e as fontes localizadas (actividades mineiras) contaminam os solos que permanecem poluídos por vários anos, podendo afectar os sistemas ecológicos e causar riscos na saúde pública [23, 28].

Segundo a Agência Europeia do Ambiente (AEA), estima-se que cerca de 250 mil locais estão contaminados na Europa, prevendo-se um aumento de 50% até 2050. Na Figura 1.9, mostram-se as principais indústrias poluidoras de solo na Europa [29].

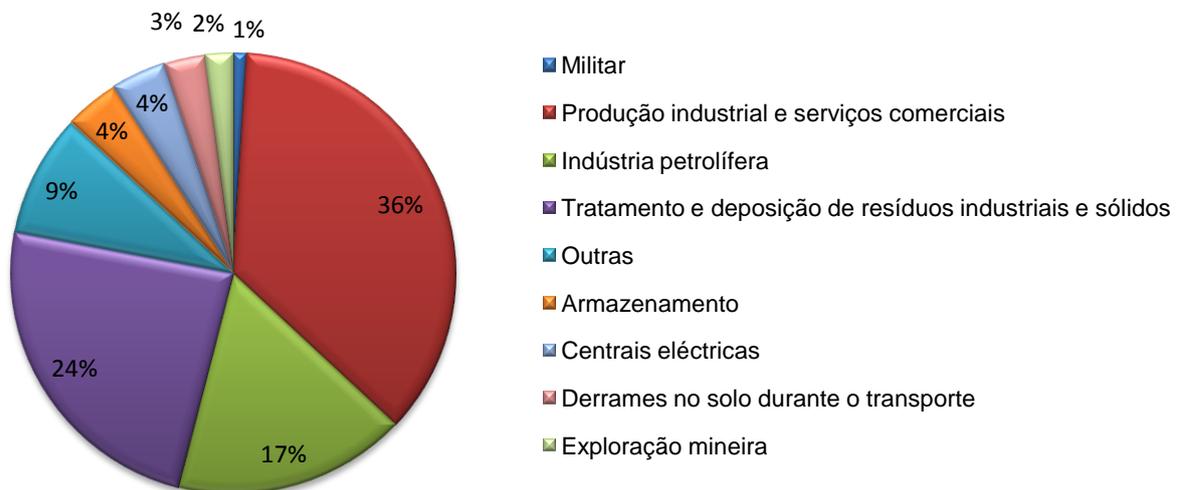


Figura 1. 9. Principais fontes contaminadoras do solo na Europa.

Ainda segundo a AEA, as perdas por manuseamento, fugas de reservatórios e acidentes no transporte, são as maiores fontes de contaminação. Os contaminantes variam de acordo com o país, contudo, são os metais pesados e os óleos minerais, que se encontram em maior quantidade nos solos europeus. Em menores quantidades, existe o grupo BTEX, PAH's, fenóis e hidrocarbonetos clorados. Nos últimos 30 anos, alguns países europeus começaram a remediar os cerca de 80 mil locais contaminados (Figura 1.10) [29].

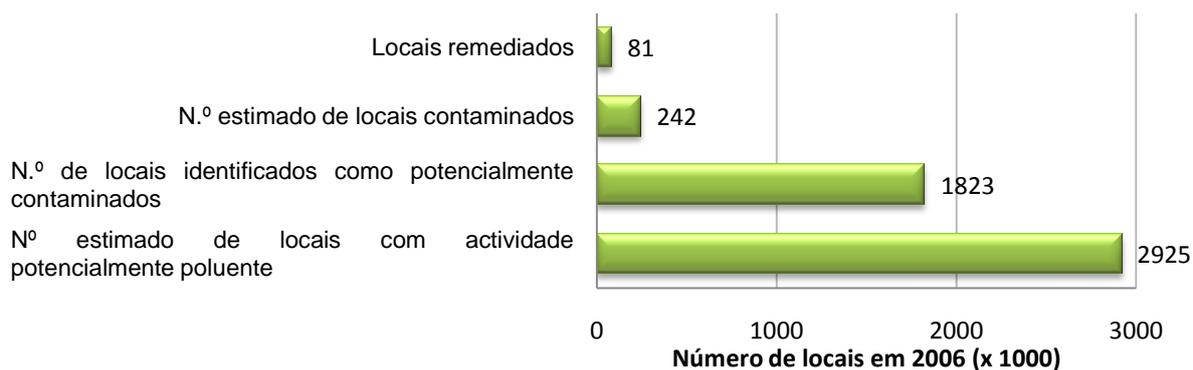


Figura 1. 10. Tratamento de solos contaminados na Europa.

Porém, ainda existem cerca de 3 milhões de locais que possuem actividades potencialmente poluidoras. Uma parte dos custos de remediação (cerca de 35%), estão assegurados pelos orçamentos públicos.

Relativamente a Portugal, o Instituto Nacional dos Resíduos (INR) identificou como as principais zonas de contaminação as áreas industriais, as lixeiras e os aterros sanitários, as regiões mineiras e as zonas agrícolas.

Segundo a Agência Portuguesa do Ambiente (APA), não há valores concretos sobre os locais contaminados e as principais fontes de contaminação, todavia é expectável que as zonas mais afectadas ocorram essencialmente no litoral (Porto, Aveiro, Setúbal e Lisboa), como consequência da localização das grandes indústrias, armazenamento de materiais perigosos, centros de abastecimento, etc.

Os primeiros grandes estudos, foram realizados a partir de 1994, em que foram estudadas acções de recuperação e reabilitação de solos contaminados, como por exemplo, a recuperação do solo que futuramente acolheu a EXPO'98 e a biorremediação de solos no Complexo Químico de Estarreja devido à libertação, durante vários anos, de pirite e lamas contendo elevados teores de mercúrio. A Quimiparque, situada no parque industrial do Barreiro, contaminou o solo com lamas oriundas das metalúrgicas especialmente ricas em zinco. Relativamente à Siderurgia Nacional, entre 1961 a 2001, produziu cerca de 1 400 mil toneladas de resíduos, encontrando-se ainda 21 mil toneladas depositadas nos solos. Os resíduos são essencialmente constituídos por poeiras e lamas metálicas de ferro, zinco e manganês [30].

1.6.2. Transporte dos contaminantes

O movimento natural dos contaminantes faz-se essencialmente através da água, por um processo designado por convecção ou transporte de massa, que corresponde ao movimento passivo dos contaminantes dissolvidos em água, no qual a taxa do movimento pode ser designada por densidade de fluxo (área de superfície por unidade de tempo) [13]. O escoamento pode ser a nível macroscópico (através do meio poroso) ou a nível microscópico, no qual a água flui nos solos entre os poros ou vazios. Na Figura 1.11, observa-se o deslocamento da água por entre os poros [31].

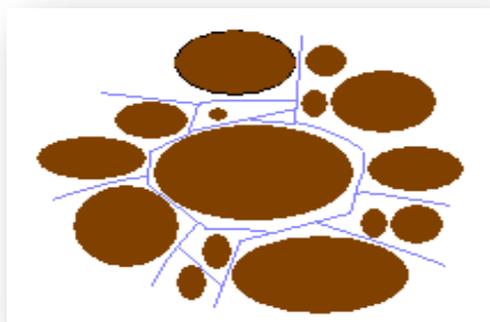


Figura 1. 11. Escoamento da água pelos poros de um solo.

A deslocação da água faz-se em todos os sentidos, rodeando as partículas sólidas. As velocidades de escoamento do fluido variam com os locais, devido à heterogeneidade do solo (p.e., devido às diferentes formas, tamanhos e orientação dos espaços abertos). Mas, a velocidade do transporte dos contaminantes vai diminuindo à medida que se aproxima da parede dos poros. É de salientar, que para solos mais irregulares (p.e., que possuem fissuras, buracos) a propagação da contaminação será maior [13]. A dispersão vai fazer com que o contaminante se desloque em várias direcções aumentando a zona de contaminação.

Os contaminantes além de se deslocarem por convecção, também se deslocam pelo seu potencial químico, passando dos locais de concentração mais elevada para os de concentração mais baixa, designando-se esse movimento por difusão molecular [31].

1.6.3. Classificação dos contaminantes

Os contaminantes podem-se dividir em inorgânicos e orgânicos. Em cada um destes grupos existem vários grupos de poluentes, de acordo com o esquema da Figura 1.12.

De entre os compostos referidos, destaca-se o grupo dos combustíveis, visto que os compostos analisados neste trabalho pertencem a esse grupo. Os combustíveis são contaminantes orgânicos não halogenados, podendo incluir vários compostos, por exemplo o benzeno, o tolueno, o etilbenzeno, o xileno e o naftaleno [32].

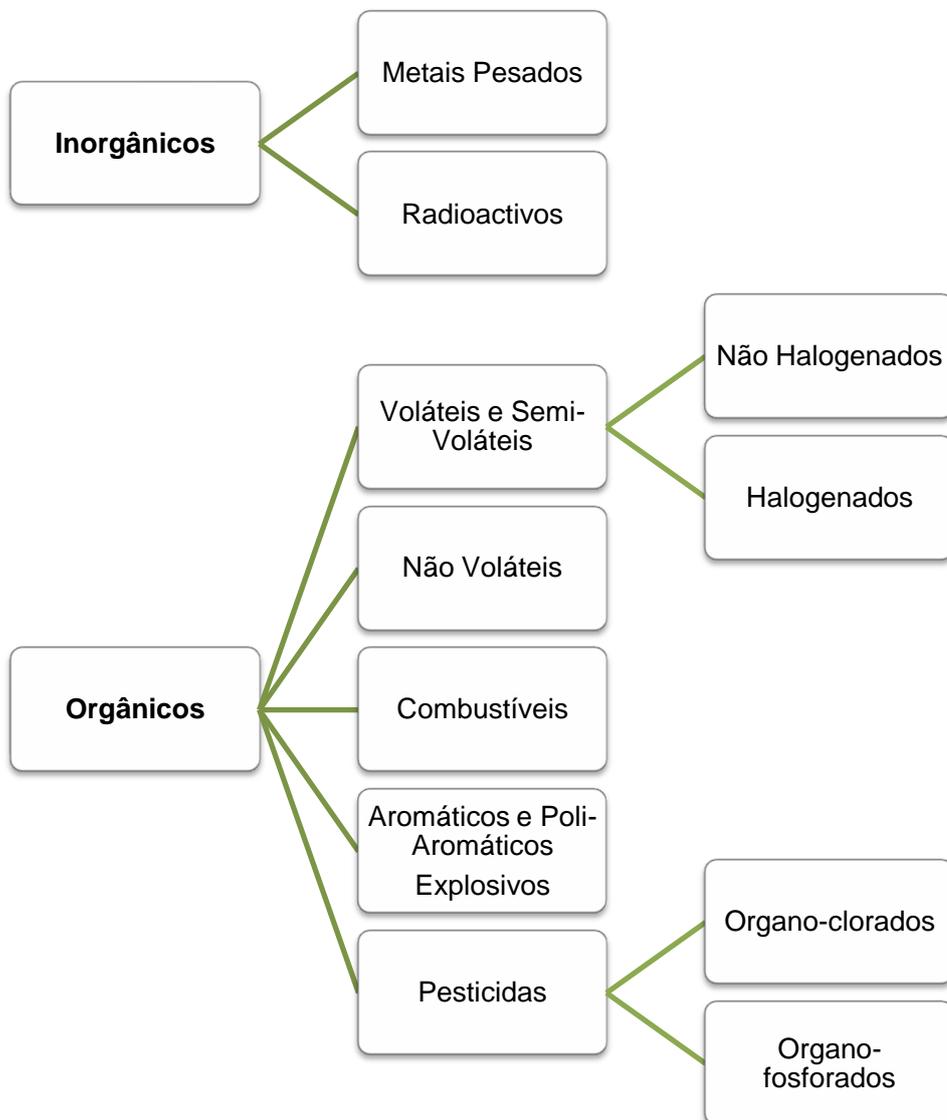


Figura 1. 12. Esquema dos contaminantes inorgânicos e orgânicos.

Os combustíveis fazem parte dos produtos petrolíferos, produzindo-se milhões de toneladas por ano no mundo [11]. A enorme quantidade de produtos petrolíferos produzida anualmente justifica-se pela grande utilidade que o petróleo tem para a sociedade, não só como fonte de energia mas por gerar diversos produtos derivados de elevada importância [33]. No entanto, a indústria petrolífera é uma das mais poluidoras, contaminando solos, águas subterrâneas e superficiais devido ao vazamento dos tanques, rupturas das tubagens, derrames durante o transporte [32]. O petróleo encontra-se entre rochas porosas designadas por arenitos e a sua formação deve-se à decomposição de plâncton, vegetação e pequenos organismos marinhos.

O petróleo é essencialmente constituído por carbono, hidrogénio, impurezas oleofílicas e, em menores quantidades, compostos orgânicos, sulfatados, nitrogenados e oxigenados. A sua composição química varia de acordo com a sua origem e consequentemente influencia a capacidade de ataque dos microrganismos [3].

O petróleo bruto, antes de ser utilizado, é destilado para ser separado nas várias fracções. A separação faz-se atendendo à massa molecular e ao ponto de ebulição, mais especificamente a separação dos hidrocarbonetos ocorre dependendo do número de carbonos

A produção da gasolina varia para os vários países, pois vai estar de acordo com as condições operatórias, a temperatura da região, época do ano e até a altitude. Para aumentar as octanas da gasolina, são adicionados hidrocarbonetos aromáticos, sendo os aditivos mais utilizados: o benzeno, o tolueno, o etilbenzeno e o xileno (isómeros do xileno) também designados pelo grupo BTEX [34].

- **Benzeno (C₆H₆)**

O benzeno é um dos constituintes mais perigosos do grupo BTEX, isto porque, além de ser tóxico em exposições prolongadas, o benzeno danifica a medula óssea, dando origem a doenças como a leucemia e problemas ao nível do fígado. Para os seres humanos, a dosagem de limite letal (LDL) é de 0,94-38 µg mL⁻¹ [35]. O benzeno ou benzol é um líquido incolor e, quando derramado no solo, uma parte deste vai evaporar. Este composto possui um baixo coeficiente de partição com o carbono orgânico e por isso, vai ser pouco adsorvido pela matéria orgânica e consequentemente, tem uma elevada mobilidade [36]. O benzeno tem uma massa específica de 0,88 g cm⁻³ (20°C) e uma viscosidade de 0,78 mm² s⁻¹ (20°C) [37].

- **Tolueno (C₆H₅CH₃)**

O tolueno é um líquido incolor que quando ingerido (15 – 20 mL), provoca graves problemas de toxicidade, afectando o sistema nervoso central, promovendo o aparecimento de leucemia aguda e vertigens, em que a LDL para o tolueno é 110 µg mL⁻¹ [35]. O tolueno no solo apresenta um comportamento similar ao do benzeno. Este possui uma massa específica igual a 0,87 g cm⁻³ (20°C) e uma viscosidade igual a 0,7 mm² s⁻¹ (20°C) [36, 38].

- **Etilbenzeno (C₆H₅CH₂CH₃)**

O etilbenzeno é um composto tóxico e é importante para a produção do estireno. O estireno, em exposições prolongadas provoca tumores e afecta o sistemas nervoso, em que a concentração limite de estireno no sangue de 0,01 – 1,0 µg mL⁻¹ [35]. O etilbenzeno ou etilbenzol é insolúvel em água, possui uma massa específica igual a 0,87 g cm⁻³ (20°C) e uma viscosidade de 0,690 mPa s (20°C) [36, 39].

- **Xileno (C₆H₄(CH₃)₂)**

O xileno possui uma massa específica de 0,86 g cm⁻³ (20°C), uma viscosidade igual a 0,85 mm² s⁻¹ (20°C) e é insolúvel em água [36, 40]. O xileno, comparativamente ao benzeno e ao tolueno é menos tóxico, porém causa intoxicação aguda e crónica. A concentração no sangue do xileno deve ser menor que 46,5 – 250 µg mL⁻¹ [35].

O grupo BTEX é muitas vezes utilizado como indicador de contaminação do solo, visto que é um dos grupos de componentes mais solúveis em água, confirmando a existência de derrames [41]. A solubilidade do contaminante varia de acordo com a massa molecular, ou seja, se esta for pequena, o poluente vai ser mais solúvel ocorrendo a migração e a dispersão dos contaminantes no solo e em águas subterrâneas. A solubilidade implica a dissolução em fase aquosa e baixa volatilização, levando a uma melhor biodegradação. De acordo com os diferentes compostos pertencentes ao grupo BTEX, as percentagens de volatilização e adsorção variam, sendo o benzeno o mais volátil e o etilbenzeno o menos volátil [7, 36].

1.6.4. Degradação de hidrocarbonetos aromáticos

No processo de extração do petróleo ou durante o transporte de compostos petrolíferos podem ocorrer pequenos derrames. Estes casos pesam cerca de 10% na contaminação de solos e águas. As pequenas descargas (p.e., esgotos urbanos, efluentes de baixo caudal, depósito dos combustíveis, etc.) contribuem com os restantes 90% dos hidrocarbonetos totais.

Os hidrocarbonetos podem dividir-se em alcanos, cicloalcanos, aromáticos, aromáticos policíclicos (PAH's), asfaltinas e resinas. Existem variações nos hidrocarbonetos como grandes cadeias de carbonos, ramificações, combinação entre moléculas e existência de oxigénio, azoto e enxofre [11].

O derrame de petróleo no solo pode levar à estimulação dos microrganismos existentes no solo, aumentando a sua actividade no local contaminado já que 1% dos microrganismos nativos do solo tem a capacidade de degradar hidrocarbonetos [42]. A biodegradação deste tipo de compostos varia com o estado físico e a toxicidade e assim, necessitam de um consórcio de microrganismos para degradar os poluentes [11]. Algumas enzimas, mais especificamente as oxigenases, vão iniciar a degradação dos hidrocarbonetos. Como o próprio nome indica, utilizam o oxigénio como aceitador final de electrões [43] e subseqüentemente, necessitam que as condições sejam aeróbias. No caso das condições anaeróbias, os aceitadores finais serão os nitratos e sulfatos.

O BTEX faz parte dos hidrocarbonetos aromáticos. Estes são os mais estáveis, pois partilham electrões deslocalizados nas ligações π e entre os diferentes componentes da gasolina são os mais solúveis em água, móveis, voláteis e tóxicos [7, 36]. A biodegradação dos compostos ocorre em duas etapas: inicialmente ocorre a activação do anel através das oxigenases, em que as enzimas incorporam oxigénio molecular dentro do anel, também conhecido por desidroxilação do núcleo aromático e a segunda etapa será a ruptura do anel [11].

1.7. Biorremediação

A biorremediação consiste na utilização de organismos para degradar os contaminantes no meio ambiente, como os compostos orgânicos (hidrocarbonetos), em que os utiliza como fonte de alimento ou como substrato. A Agência de Protecção Ambiental Americana (USEPA) define: “biorremediação é um processo de tratamento que utiliza a ocorrência natural de microrganismos para degradar substâncias tóxicas perigosas, transformando-as em substâncias menos tóxicas ou não tóxicas” [33]. No processo de biorremediação, prevalece a oxidação dos substratos em dióxido de carbono e água, fornecendo energia e carbono para o crescimento e reprodução das células.

A degradação é incompleta quando há ausência de enzimas. Logo, o sucesso deste método está relacionado com a estrutura dos poluentes, disponibilidade de nutrientes, tipo de microrganismos e condições ambientais do local contaminado [13].

As técnicas de biorremediação aplicadas podem ser [44]:

- ✓ *Ex situ* - remove-se o solo contaminado, sendo tratado noutro local. A compostagem e o “landfarming” são exemplos de técnicas aplicadas em *ex situ*.
- ✓ *In situ* - o processo de remediação é realizado no próprio local, havendo um acréscimo da actividade microbiana, através do ajuste de pH, adição de nutrientes, controlo da humidade, arejamento e alteração da área degradada. A fitorremediação e a biorremediação reforçada exigem o tratamento *in situ*.

I. Landfarming

O “landfarming” é um tratamento biológico que funciona em condições aeróbias. Trata-se de um processo simples e de baixo custo, mas que necessita de grandes áreas e requer um especial cuidado com os lixiviados. Este método é aplicável aos hidrocarbonetos petrolíferos que se encontrem em solos, lamas ou sedimentos. A distribuição do solo contaminado deverá ter uma profundidade de meio metro.

Sendo um método aeróbio, é essencial o fornecimento de oxigénio aos microrganismos, através do arejamento forçado (p.e., tubos perfurados, colocados abaixo do solo contaminado) ou através do arejamento utilizando equipamentos móveis (p.e., tractores). Durante o período de remediação dos solos para uma melhor degradação, é necessário controlar o pH, a temperatura, a concentração dos nutrientes (fósforo e azoto), o arejamento e o teor de humidade [43, 45].

II. Compostagem

O processo de compostagem ou tratamento de solo em fase sólida, consiste na utilização de microrganismos indígenas existentes no solo. Em condições de aerobiose ou anaerobiose, os microrganismos vão degradando os contaminantes orgânicos, PAH's e baixas concentrações de explosivos.

Neste tipo de processo, é necessário adicionar lascas de madeira, restos vegetais, resíduos de animais, proporcionando aos microrganismos “agentes de volume” (criando espaços vazios, para circulação do ar e libertação de calor) e alterações orgânicas (razões ótimas de C:N igual a 25:1).

A eficiência do tratamento de solos por compostagem é afectada pelo arejamento, teor de humidade, temperatura e concentração de nutrientes. O processo pode funcionar de várias formas, tais como: **pilha estática arejada** (os resíduos são colocados em pilha e são arejados através de ventiladores ou bombas de vácuo); **pilhas revolvidas (windrow)** (o composto é colocado em pilhas, e é arejado periodicamente através de equipamentos móveis - tractores) e por **agitação mecânica de compostagem** (o arejamento e a mistura são realizados num reactor fechado) [46].

III. Fitorremediação

No método de fitorremediação utilizam-se plantas para remediar, transferir e destruir os contaminantes no solo. Algumas espécies de plantas têm a capacidade de acumular por exemplo, os metais pesados nas raízes ou nas folhas e, quando estas encontram-se saturadas são removidas dos locais contaminados. A fitorremediação pode ser aplicada a diversos contaminantes como os metais, pesticidas, solventes, PAH's, entre outros.

Os efeitos da fitorremediação resultam de quatro etapas: **a biodegradação da rizosfera reforçada**, que sucede junto das raízes das plantas, visto que estas libertam para o solo substâncias naturais, importantes para o desenvolvimento dos microrganismos; Na **fito-acumulação** as raízes vão absorver os contaminantes transportando-os para as folhas com a subsequente acumulação nessa zona; Na **fito-degradação**, o contaminante é degradado por enzimas, como as oxigenases, existentes nos tecidos das plantas. Finalmente na **fito-estabilização**, a planta tem a capacidade de imobilizar os contaminantes, através da produção de substâncias químicas [47, 48].

IV. Biorremediação estimulada (*Enhanced Bioremediation*)

A biorremediação estimulada é também conhecida por *biostimulation* e/ou *bioaugmentation*. É aplicada na remediação de solos e águas contaminadas com hidrocarbonetos petrolíferos, pesticidas ou compostos orgânicos.

Neste método de descontaminação dos solos é possível utilizar os microrganismos indígenas ou inoculados (quando as populações existentes do solo foram reduzidas devido à toxicidade do contaminante ou à inexistência de microrganismos no local), que vão transformar os contaminantes em produtos finais inofensivos, por exemplo, dióxido de carbono, água e massa celular.

A utilização de microrganismos geneticamente modificados ou desenvolvidos em laboratório promove uma degradação mais rápida dos contaminantes comparativamente aos microrganismos indígenas. A eficiência da biorremediação pode ser melhorada com a adição de oxigênio, de nutrientes (azoto e/ou fósforo), os quais são adicionados na superfície do solo, de modo a otimizar a razão C:N:P [43, 49].

A biorremediação reforçada pode realizar-se em condições aeróbias e/ou anaeróbias. No entanto, nas condições aeróbias, a biodegradação mais rápida que a biodegradação em condições anaeróbias [7].

Na Tabela 1.4, registam-se os principais organismos (bactérias e fungos) que podem ser utilizados na biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos [43].

Tabela 1. 4. Principais organismos que metabolizam os hidrocarbonetos aromáticos.

Organismos	
Bactérias	<i>Pseudomonas; Aeromonas; Flavobacteria; Nocardia; Acinetobacter; Mycobacteria;</i> Entre outros.
Fungos	<i>Chytridomycetes; Oomycetes; Zygomycota; Ascomycota; Basidiomycota;</i> <i>Deuteromycota.</i>

1.7.1. Casos de derrames de petróleo que contribuíram para a contaminação dos solos

Na história da exploração do petróleo existiram e ainda hoje existem grandes acidentes (Figura 1.13), que implicaram grandes esforços no salvamento de animais, na avaliação e remediação de solos e águas contaminadas. De seguida anotam-se alguns exemplos de catástrofes no mundo provocados por derrame de petróleo [50, 51]:

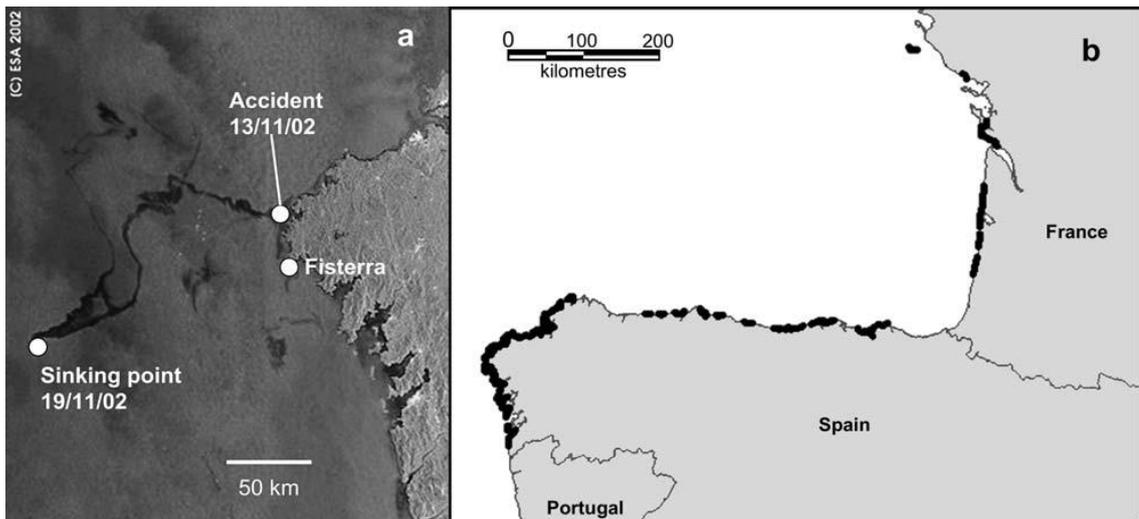


Figura 1. 13. Derrame de petróleo a norte de Espanha.

- Em 1967, com o naufrágio de um petroleiro ao largo da Cornualha (Reino Unido), em que se perderam cerca de 60 mil toneladas de crude, propagando-se ao longo de 161 km;
- No Golfo Pérsico, em 1983, um petroleiro embateu contra uma plataforma, libertando, ao longo de vários meses, cerca de 363 milhões de litros de crude;
- O petroleiro *Exxon Valdez* em Prince William Sound, no Alasca, em 1989, derramou 30 mil toneladas de crude num perímetro de 1770 km;
- Em 1991, no Golfo Pérsico, as tropas iraquianas incendiaram diversos poços e derramaram milhões de barris no mar. Nesse mesmo ano, na costa mexicana, ocorreu uma explosão numa plataforma libertando 636 milhões de petróleo. O derrame foi controlado ao fim de 9 meses;
- No norte da Rússia, em 1994, ocorreu uma ruptura num oleoduto, havendo um derrame de crude nos campos de Usinsk e nos rios Usa e Kolva que se estima que tenha envolvido entre 200 mil a 300 mil ton de crude;
- Ao largo da Galiza, em 2002, afundou-se um petroleiro designado por Prestige, contendo 77 mil toneladas de fuel óleo, e, em apenas 24h, a mancha de crude dispersou-se por 37 km;

- Em 2010, em Port Arthur, Texas, duas embarcações colidiram, libertando 1700 toneladas de crude;
- Em Abril de 2010, ao largo da costa da Louisiana (Mississippi) ocorreu uma explosão numa plataforma petrolífera que provocou um derrame constante de crude. Segundo um documento interno da *British Petroleum* (BP), divulgado no dia 20 de Junho, estima-se que a taxa de descarga tenha sido de 100 mil barris por dia, muito acima da estimativa inicial do governo dos Estados Unidos que era de 60 mil barris por dia.
- Relativamente a Portugal existiram dois derrames mais relevantes: 1) em 1990 na zona de Porto Santo, com o derramamento de 30 mil toneladas de crude e 2) em 1989 na costa de Sines (S. Torpes e Porto Covo), com aproximadamente 5 mil toneladas de hidrocarbonetos.

Qualquer dos acidentes referidos provocaram situações de grande poluição ambiental, tendo sido decretada para quase todos os casos o estado de calamidade. De uma forma ou de outra, para além das grandes superfícies de águas contaminadas, o efeito fez-se sentir também nos solos.

Quando ocorre derrame de petróleo, no geral utiliza-se a remoção manual, o uso de barreiras mecânicas para a contenção do petróleo (quando ocorre no oceano), a limpeza da água contaminada com surfactantes microbiológicos (como por exemplo, no petroleiro *Exxon Valdez* com a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*) e através de água pressionada a alta temperatura, de forma a remover o petróleo da costa. Na remediação dos locais contaminados é utilizada normalmente a biorremediação com técnicas como a compostagem, vermicompostagem, fitorremediação (por exemplo, no Golfo Pérsico, utilizaram as manguezais, pois estas são tolerantes à água salgada) e a atenuação natural usando as cianobactérias [52-55].

1.7.2. Factores favoráveis e desfavoráveis da biorremediação do solo

A biorremediação dos solos tem vantagens e desvantagens. Listam-se de seguida os factores a favoráveis e desfavoráveis desta técnica.

Factores favoráveis

Existem diversas vantagens que colocam este método na vanguarda, como [8, 23, 56]:

- É possível utilizar diferentes tipos de organismos (bactérias, fungos);
- Pode ser realizado no próprio local de contaminação;
- Simplicidade de manutenção e de baixo custo;
- Possibilidade da destruição completa dos contaminantes;
- Possui a capacidade de degradar quase todos os tipos de contaminantes (resíduos permanentes e hidrocarbonetos);
- Pode ser associado a tratamentos físico-químicos, de modo a aumentar a eficiência da biodegradação;
- Começa a ter uma maior aceitação no público do que alguns processos existentes, como, por exemplo, a incineração.

Factores desfavoráveis [8, 13, 57]:

- Temperaturas baixas podem inibir o metabolismo, prejudicando a eficiência do processo;
- Inexistência de microrganismos adequados aos contaminantes;
- Possibilidade do sistema entrar em anaerobiose, caso o processo se prolongue no tempo;
- A biorremediação é imprevisível, por se tratar de sistemas biológicos e qualquer variação (ao nível do pH, da temperatura e da concentração de nutrientes) vai afectar a biorremediação;
- Processos *in situ* além de serem lentos, também podem ser difíceis de monitorizar e em *ex situ* requerem grandes áreas;
- Baixas concentrações de nutrientes;
- Menor velocidade de remediação, comparativamente a outros processos físico-químicos (por exemplo: extracção de vapor e oxidação química).

1.8. Cromatografia gasosa

Neste ponto apresentam-se de uma forma sucinta os principais conceitos associados à cromatografia gasosa por ter sido a técnica analítica usada neste trabalho.

A cromatografia é um método físico de separação usado em análises químicas, para a identificação, purificação e separação dos diversos compostos presentes numa amostra [58, 59]. O processo consiste no transporte de uma amostra numa fase móvel, em que a fase móvel pode ser gasosa ou líquida. A fase móvel é obrigada a passar numa fase estacionária imiscível (sólido poroso ou filme fino líquido), que se encontra numa coluna ou numa superfície sólida, ocorrendo a separação do analito. As amostras que são fortemente retidas na fase estacionária, conseqüentemente, irão mover-se mais devagar ocorrendo a separação dos constituintes [58]. O tempo de percurso na coluna vai nos permitir determinar a afinidade da fase estacionária, ajudando a caracterização e identificação dos vários compostos [60]. Na Figura 1.14, é possível observar a separação da mistura.

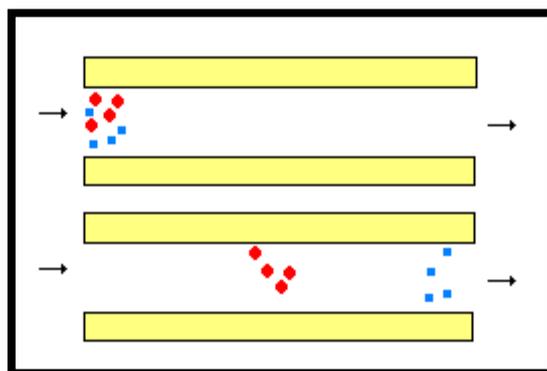


Figura 1. 14. Separação dos constituintes numa coluna cromatográfica.

A cromatografia gasosa é uma técnica muito utilizada em análises químicas, pois possui um elevado poder de resolução, tem uma capacidade de detecção da ordem dos nano ou picogramas (10^{-9} a 10^{-12} g) e permite a análise de uma quantidade muito pequena de amostra. Para a aplicação desta técnica, a amostra deve ser volátil e termicamente estável. Um cromatógrafo é constituído por um injector, uma coluna normalmente situada num forno e por um detector. A amostra é injectada e vaporizada no topo da coluna e arrastada até ao detector pela fase móvel. Para a análise do contaminante no trabalho utilizou-se a cromatografia gás - sólido (Figura 1.15) [61].

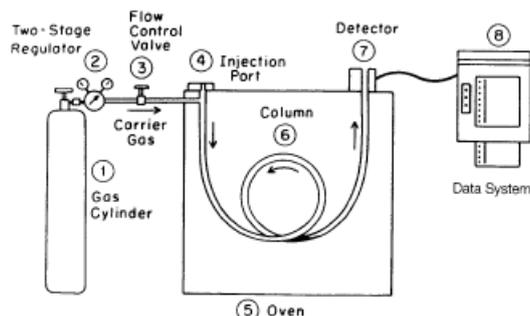


Figura 1. 15. Esquema geral de um cromatógrafo gasoso.

Os gases de arrasto são utilizados no transporte do analito, desde a coluna cromatográfica até ao detector. Os gases devem ser quimicamente inertes e dependem do tipo de detector. Os gases de arrasto mais utilizados são o hélio, hidrogénio e o azoto.

A pressão à saída dos cilindros do gás é regulada por válvulas e medidores de fluxo, sendo que a pressão de entrada no cromatógrafo gasoso varia de 10 a 50 psi [58].

1.8.1. Injector

No injetor ocorre a injeção (Figura 1.16) da amostra, a qual é feita no topo da coluna, com o auxílio de uma microseringa. A amostra, ao ser injectada na coluna passa para uma câmara aquecida transformando-se em vapor, sendo posteriormente transportada através da coluna por um gás de arraste inerte. O volume de injeção (varia de alguns microlitros a alguns mililitros) vai depender da coluna, do detector, da concentração do analito na amostra e do estado físico da amostra [58].

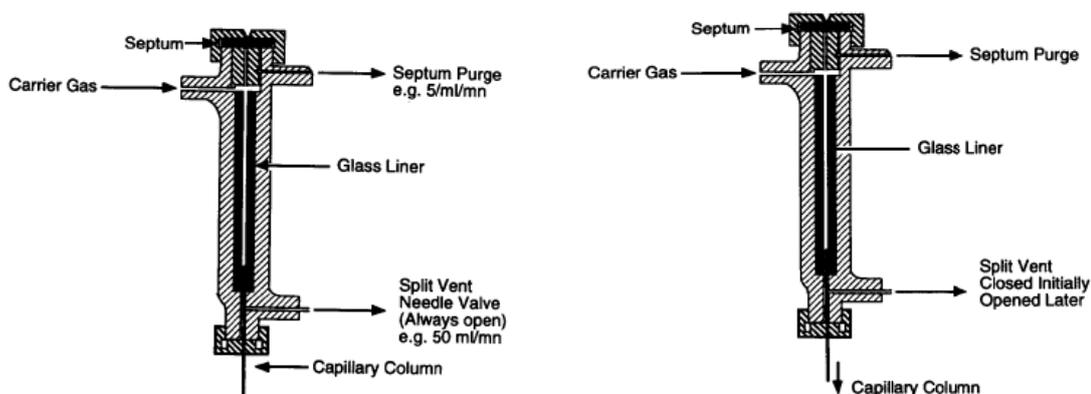


Figura 1. 16. Esquema de um injetor split e splitless.

Existem dois tipos de injectores: “split” – a amostra é rapidamente vaporizada e só uma pequena fracção vai entrar na coluna (1% - 2%), é uma técnica simples e é indicado para concentrações elevadas; “splitless” - todo o volume de amostra vai ser analisado. Este

injector é mais utilizado no caso de amostras com concentração baixa e possui uma maior sensibilidade para separar os diferentes compostos [61].

1.8.2. Detector de ionização de chama

O detector de ionização de chama (Figura 1.17), também designado por *Flame Ionization Detector* - FID, é constituído por chama de hidrogénio (H₂) /Ar e um prato colector. É usado em análise de amostras orgânicas (metano, etano e acetileno), possui uma elevada sensibilidade ($\approx 10^{-13} \text{ g s}^{-1}$), um grande intervalo de respostas lineares ($\approx 10^7$), baixo nível de ruído, é resistente e de fácil utilização. Tem o inconveniente de destruir a amostra e não é sensível a todos os compostos (como por exemplo, H₂O, CO₂, SO₂ e NO_x) [58].

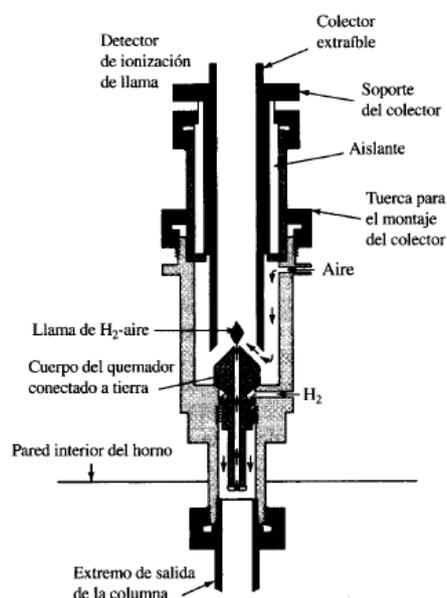


Figura 1. 17. Esquema de um detector de ionização de chama.

Num queimador, a amostra vai ser misturada com hidrogénio e ar, que entram posteriormente em ignição eléctrica. A grande parte dos compostos orgânicos é aquecida a altas temperaturas numa chama H₂/Ar, produzindo iões e electrões que conduzem a electricidade pela chama. Os iões são recolhidos num eléctrodo negativo, produzindo um sinal eléctrico de $\approx 10^{-12} \text{ A}$ [58].

1.8.3. Coluna capilar

A coluna (Figura 1.18) [61] está instalada no interior de um forno, cuja temperatura é monitorizada. A temperatura do forno não deve ser influenciada pelo restante equipamento, sendo desejável que a temperatura se mantenha constante e seja obtida rapidamente [60].

As colunas são tubos abertos ou capilares, feitos de sílica purificada possuindo na sua constituição pequenas quantidades de óxidos metálicos. De modo a aumentar a sua resistência, as colunas capilares são recobertas por poliamidas. As principais características das colunas são a elevada resistência, a flexibilidade, o proporcionarem uma melhor separação, permitirem análises mais rápidas, o possuírem um diâmetro reduzido (320 a 260 μm) e o facto de requererem volumes pequenos de amostras ($\approx 10^{-3}$ μL).

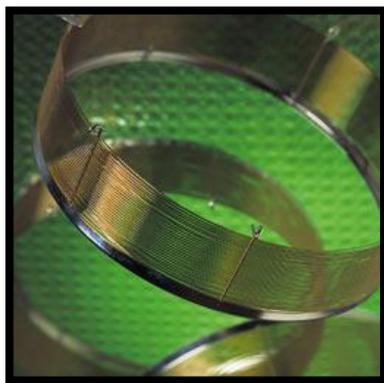


Figura 1. 18. Forma das colunas capilares.

As colunas capilares podem dividir-se em dois grandes grupos: tubulares abertas com parede revestida (WCOT) ou com superfície recoberta (SCOT), tal como apresentado na Figura 1.19.

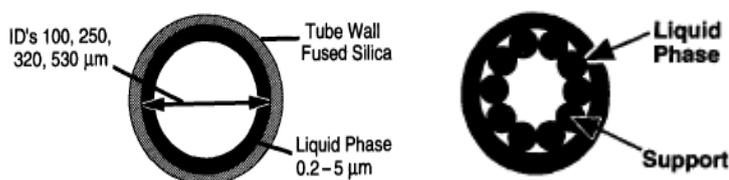


Figura 1. 19. Coluna capilar ou tubulares abertas com parede revestida (WCOT) e superfície recoberta (SCOT).

As colunas de parede revestida são tubos capilares recobertos com a fase estacionária, enquanto a fase estacionária das colunas SCOT é uma fina camada de poliamidas (≈ 30 μm), possuindo uma maior capacidade na retenção das amostras, mas têm uma menor eficiência, relativamente às colunas WCOT [58].

2. Metodologia experimental

2.1. Reagentes

Os contaminantes utilizados foram o benzeno pro-análise (p.a.) da Riedel de Haën, o tolueno e o etilbenzeno ambos p.a. e fornecidos pela Merck. O meio mineral foi obtido através da solução de minE base (constituída por $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ p.a (Fluka), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ p.a Merck e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ p.a (Merck)), solução tampão fosfato (K_2HPO_4 (Merck) e KH_2PO_4 (Fluka)), ácido láctico (Merck), leveduras (Liofilm Diagnostici) e água desionizada, o meio mineral foi preparada de acordo com Kelly *et al.* [63]. A solução de TM (*Trace Metals*), utilizada no meio mineral, teve como reagentes o $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ p.a (Sigma – Aldrich); NaOH p.a (Panreac); EDTA (Fluka); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ p.a (Merck); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ Ultra (Fluka); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ p.a (Sigma – Aldrich); $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ p.a (Merck) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pa (MONTPLET & ESTEBAN) e $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck).

2.2. Equipamento

Usou-se um cromatógrafo gasoso (Shimadzu GC-2010) (Figura 2.1) equipado com um detector de ionização de chama e uma coluna TRB 35 NF-2670 (30 m x 0,53 mm x 3 μm). Fixou-se a temperatura do injector e do detector para 250 °C e usou-se um programa isotérmico em que a temperatura da coluna foi fixada em 200 °C.



Figura 2. 1. Cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010.

Os caudais dos gases de combustão, ar e hidrogénio, foram de 400 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ e 40 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$, respectivamente. Relativamente ao gás de arrasto, o hélio, foi de 30 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$. A aquisição e tratamento de dados obtidos nas análises cromatográficas foram realizados com o software GCAnalysis. Na medição de 500 μL de amostra foi utilizada uma seringa (Borosilicatglass, ILS Germany) de volume total 2500 μL . A quantificação dos contaminantes foi realizada pelo método de calibração directa.

A estufa usada na secagem do solo e da areia era da marca Selecta, modelo P e permitiu trabalhar na gama dos 55 °C aos 105 °C.

O teor de humidade dos solos foi determinado numa balança de determinação de humidade da marca Kern, modelo MLS 50-3 IR (Figura 2.2).



Figura 2. 2. Balança de humidade.

Para a esterilização do solo húmico e do meio mineral, utilizou-se uma autoclave de marca Uniclave, modelo 88.

O solo estéril foi manuseado numa câmara de fluxo laminar com lâmpada ultravioleta, da marca TELSTAR, modelo BIO – II – A.

2.3. Preparação do solo

A biorremediação foi realizada em dois solos húmicos com teores de matéria orgânica (MO) de 14% e 24% (estes teores advêm do trabalho realizado anteriormente – extracção de vapor, EV) [64]. Para preparar estes solos foi necessário recolher um solo arenoso isento de MO e um solo rico em MO (este último tinha um teor inicial de MO 42%). O teor de MO foi determinado pelo método de oxidação química [64]. Da mistura dos dois solos prepararam-se os solos com os teores de MO desejados.

O solo arenoso (areia) foi recolhido a 1 m de profundidade em diferentes locais de uma praia nos arredores do Porto. O solo rico em MO foi recolhido numa área florestal, na zona de São Mamede de Coronado, Vila do Conde, a uma profundidade de 5 cm. As amostras foram armazenadas em recipientes fechados, de forma a evitar a perda das propriedades originais.

A preparação dos solos arenosos envolveu três passos:

- (a) Lavagem do solo com água desionizada - Repetiu-se até que a água de lavagem fosse límpida (a lavagem vai permitir a remoção de possíveis vestígios de MO);
- (b) Secagem da areia - A areia foi colocada em tabuleiros, não excedendo 10 cm de altura, e mantida à temperatura ambiente durante cinco dias; foi revolvida todos os dias. De seguida foi colocada na estufa a 105 °C durante 24h;
- (c) Peneiramento da areia - Foi realizado com um crivo de 2 mm, desprezando o restante.

A preparação dos solos húmicos envolveu as seguintes quatro etapas:

- (a) Secagem do solo rico em MO numa estufa a 55 °C durante 48h;
- (b) Peneiramento do solo num crivo de dois milímetros, rejeitando-se o de granulometria superior;
- (c) Mistura das quantidades correctas de solo arenoso e húmico para induzir os teores de MO desejados (14 e 24%);
- (d) Adição de água a fim de induzir o teor de humidade desejado (20%); tinha como objectivo auxiliar o desenvolvimento dos microrganismos sendo que a percentagem foi escolhida com base na literatura [65]. Posteriormente, adicionou-se 15 mL de meio mineral de forma a auxiliar o crescimento e o desenvolvimento dos microrganismos [63].

O ajuste da humidade foi realizado após a determinação do teor de humidade do solo. De acordo com o teor obtido na balança, calculou-se a quantidade de água a adicionar de modo a atingir o valor desejado (20%).

2.4. Procedimento na biorremediação

2.4.1. Constituição do meio mineral

O meio mineral foi preparado da seguinte forma:

- **Preparação de uma solução de MinE base (250 mL)**

Efectuou-se a pesagem de 0,625 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,063 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 6,25 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ num gobelé, solubilizando os três componentes em água desionizada. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 250 mL, e adicionou-se água desionizada até perfazer o balão.

- **Preparação de uma solução tampão fosfato (500 mL)**

Efectuou-se a pesagem de 6,0 g de K_2HPO_4 e 3,0 g de KH_2PO_4 , num gobelé. Posteriormente adicionou-se 400 mL de água desionizada e ajustou-se o pH com uma solução de NaOH para os valores de 6,8 a 7,0. No final, perpez-se o volume até 500 mL com água desionizada.

- **Preparação da solução TM (*Trace Metals*)**

Inicialmente pesou-se numa balança analítica 9 g de NaOH e 50 g de EDTA e posteriormente, dissolveram-se em água desionizada até um volume de 400 mL. De seguida, em 20 a 30 mL de água desionizada dissolveu-se individualmente os seguintes compostos: 11 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 7,34 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 2,5 g de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 0,5 g de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,5 g de $(NH_4)_6MoO_{24} \cdot 4H_2O$, 5 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e 0,2 g de $CuSO_4 \cdot 7H_2O$. Num balão volumétrico de 1 L, colocaram-se as várias soluções preparadas e posteriormente, completou-se o volume com água desionizada.

- **Preparação de 400 mL de meio de cultura**

Numa proveta adicionou-se um volume de MinE base igual a 8 mL, 0,2 % de lactato (800 μ L) e ainda 800 μ L de TM (*Trace Metals*). Pesou-se 0,4 g de extracto de levedura, adicionando-se à proveta juntamente com a água desionizada até um volume de 360 mL. Num frasco à parte, colocou-se 40 mL de solução tampão fosfato e levaram-se os dois recipientes à autoclave durante 15 minutos, a 130 °C. Deixou-se arrefecer e depois adicionou-se a solução tampão de fosfato à restante solução, obtendo-se um volume final de 400 mL.

2.4.2. Montagem experimental

Para prevenir possíveis contaminações químicas de experiências anteriores, as colunas foram previamente lavadas com água desionizada e colocadas de seguida na estufa a 80°C, durante 15 minutos. No caso dos ensaios estéreis, de forma a evitar contaminações biológicas de ensaios anteriores, as colunas foram lavadas com lixívia e seguidamente passadas por água desionizada, sendo posteriormente colocadas na estufa.

Os ensaios de biorremediação consistiram na introdução do solo preparado (areia e solo), água e meio mineral numa coluna de aço inoxidável com um diâmetro interno de 12 cm e uma altura de 38 cm (Figura 2.3), possui quatro orifícios onde se retirou as amostras para a análise e a tampa da coluna é segura através de cinco parafusos. Salienta-se que no Anexo A, página 87, encontram-se expostos os cálculos auxiliares para a preparação dos ensaios em colunas.



Figura 2. 3. Coluna de aço inoxidável utilizada nos ensaios.

A massa de solo introduzida no solo foi de 1500 g e a quantidade de contaminante foi a necessária para induzir o nível de contaminação desejado (as concentrações usadas nas contaminações das colunas encontram-se no Anexos A, página 90). A introdução quer do solo quer do contaminante foi efectuada em quatro fases de modo a que a contaminação fosse mais homogénea e facilitasse o estabelecimento do equilíbrio.

2.4.3. Autoclavagem das colunas estéreis

O solo preparado contendo já a água e o meio mineral foi dividido em quatro frascos de 500 mL e colocado no autoclave, Figura 2.4, durante 20 min, a 130°C, de modo, a eliminar os microrganismo existente no solo húmico.



Figura 2. 4. Autoclave.

2.4.4. Preparação de coluna estéril no Ultra-Violeta

Na sequência do trabalho anterior, preparou-se a coluna com solo estéril numa câmara de fluxo laminar com uma lâmpada ultra-violeta (UV) (Figura 2.5).



Figura 2. 5. Câmara de fluxos laminar com UV.

No interior da mesma introduziram-se todos os materiais (coluna, frascos com o solo húmico, vial com o contaminante, a ponta da micropipeta e a micropipeta) a utilizar neste tipo de ensaio. Inicialmente a câmara esteve sob radiação UV durante 30 minutos para destruir os microrganismos. Posteriormente, procedeu-se à colocação do solo húmico e do contaminante, do mesmo modo que os ensaios anteriores.

2.4.5. Método cromatográfico - curva de calibração

Como foi referido o método analítico usado para o controlo dos contaminantes foi a cromatografia gasosa. A quantificação foi efectuada usando o método da curva de calibração na gama de concentrações entre 0,7 e 35 mg L⁻¹ para o benzeno e o tolueno e entre 0,7 a 21 mg L⁻¹ para o etilbenzeno, de modo a cobrir a gama de concentrações obtidas nas várias monitorizações no processo de biorremediação. Salienta-se que no Anexo B, página 93, encontram-se expostos os volumes e as respectivas concentrações dos contaminantes usados nas curvas de calibração.

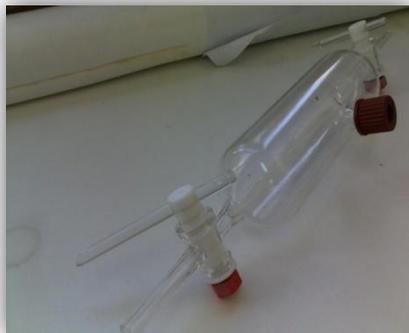


Figura 2. 6. Ampola de vidro usada na curva de calibração.

Cada padrão foi preparado através da injeção de um determinado volume do poluente numa ampola de vidro (Figura 2.7) com um volume de 249,3 mL, este valor foi determinado através do enchimento da ampola com água. Entre ensaios, a ampola foi devidamente limpa por passagem de ar (durante aproximadamente 5 min).

2.5. Monitorização do processo de biorremediação

A monitorização dos diversos ensaios de biorremediação realizou-se após um período de estabilização de 24 h. A monitorização começou por ser feita com uma periodicidade de 24 h passando mais tarde e atendendo à cinética do processo a 48 h. Em cada amostragem foram recolhidos 500 μ L de fase gasosa do solo para cada ponto de amostragem (Figura 2.3). O volume da fase gasosa também foi de 500 μ L e usado para traçar a curva de calibração.

Com o software GCAnalysis retirou-se a área do pico e posteriormente, com o auxílio da equação da recta obtida na curva de calibração, calculou-se a concentração para os diferentes contaminantes. O valor assumido para cada ensaio apresentado nos resultados corresponde à média aritmética das quatro amostras retiradas da coluna.

3. Análise e discussão dos resultados

Neste capítulo apresentam-se as curvas de calibração realizadas para os três compostos e os resultados dos vários ensaios de biorremediação feitos em coluna com solo contaminado separadamente com benzeno, tolueno e etilbenzeno.

3.1. Curvas de calibração

Na monitorização da degradação dos vários contaminantes, foi necessário construir curvas de calibração que permitissem a quantificação da concentração dos contaminantes e deste modo, monitorizar o processo de biorremediação. Para a preparação dos padrões, injectaram-se diversos volumes de composto numa ampola de vidro com um volume de 249,3 mL. Os volumes usados para cada padrão e as respectivas concentrações obtidas estão apresentados no Anexo B na página 93. A concentração desse padrão é calculada a partir da seguinte equação:

$$C_{\text{gás}} = \frac{V_c \times \rho}{V_a} \quad \text{equação (3.1)}$$

Em que: $C_{\text{gás}}$ - Concentração do contaminante na fase gasosa; ρ - Massa volúmica do contaminante; v_c - Volume de contaminante colocado na ampola; v_a - Volume da ampola.

3.1.1. Benzeno

Neste parágrafo, apresenta-se a curva de calibração do benzeno (Figura 3.1).

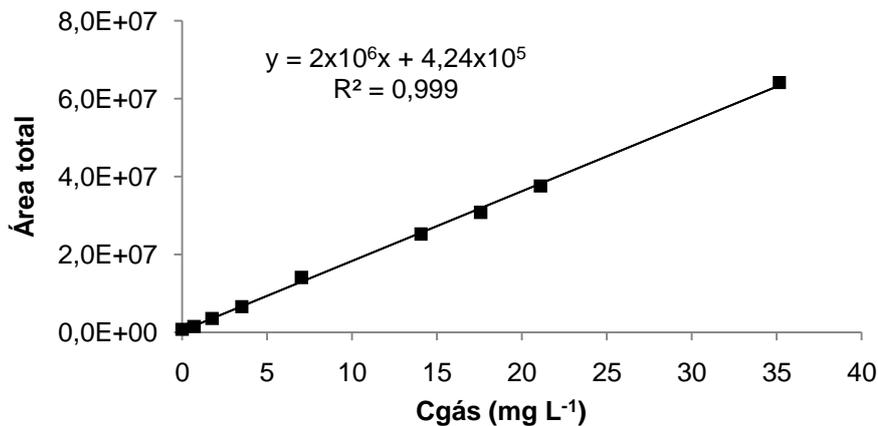


Figura 3. 1. Curva de calibração para o benzeno.

A curva de calibração utilizada para monitorizar as concentrações de benzeno na biorremediação abrangiu concentrações entre 0,7 e 35,2 mg L⁻¹, apresentando um coeficiente de correlação de 0,999 o que demonstra a boa linearidade conseguida.

3.1.2. Tolueno

Neste parágrafo, apresenta-se a curva de calibração do tolueno (Figura 3.2).

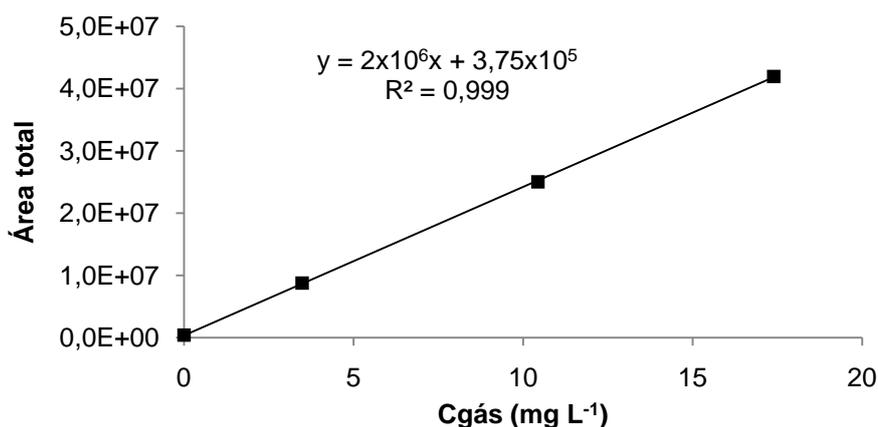


Figura 3. 2. Curva de calibração para o tolueno.

A curva de calibração foi usada para monitorizar as concentrações de tolueno no processo de biorremediação do solo. As concentrações do tolueno dos padrões abrangeram valores entre 3,48 e 17,4 mg L⁻¹ e a curva apresentou um coeficiente de correlação igual a 0,999, demonstrando uma boa linearidade.

3.1.3. Etilbenzeno

Relativamente ao etilbenzeno, apresenta-se a curva de calibração na gama de concentração entre 1,7 e 20,9 mg L⁻¹ (Figura 3.3).

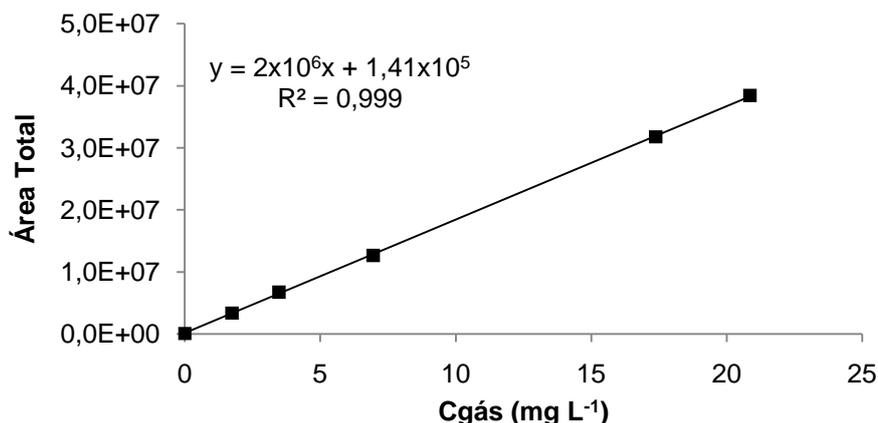


Figura 3. 3. Curva de calibração para o etilbenzeno.

A análise da curva de calibração permite afirmar que existiu uma boa linearidade sendo o coeficiente de correlação de 0,999.

3.2. Ensaios em coluna

Como foi referido anteriormente, o trabalho consistiu no estudo da biodegradação de solos contaminados separadamente com benzeno, tolueno ou etilbenzeno, utilizando os microrganismos nativos do solo. Foram experimentados solos com dois teores de MO, 14% e 24% e, para garantir boas condições de degradação no solo, ajustou-se o teor de humidade do solo a 20% e adicionou-se a cada coluna de solo 15 mL de meio mineral MinE para facilitar o desenvolvimento dos microrganismos [63].

A biorremediação (BR) foi aplicada aos solos que após tratamento por extracção de vapor (EV) [64] não atingiam os objectivos necessários ao cumprimento da lei espanhola [66]. Isto é, inicialmente utilizou-se a EV para extrair o contaminante até ao limite legal imposto pela legislação. Todas as concentrações que não alcançaram esse valor passavam para um segundo tratamento, a biorremediação. Portanto, as concentrações iniciais usadas na biorremediação correspondem às concentrações finais obtidas na EV. Este procedimento realizou-se para os três contaminantes.

A escolha da legislação espanhola deve-se ao facto de em Portugal não existir nenhuma lei sobre descontaminação de solos. De acordo com a legislação espanhola, o solo é considerado descontaminado quando a concentração de benzeno no solo é igual ou inferior a 10 mg kg⁻¹ e igual ou inferior a 100 mg kg⁻¹ para o tolueno e o etilbenzeno. Os tempos de biorremediação e as respectivas concentrações obtidas estão apresentados no Anexo C, página 96. Salienta-se ainda que cada ponto representado nos ensaios corresponde à média das concentrações obtidas nos quatro pontos de amostragem da coluna.

3.2.1. Benzeno

Nas situações em que, após a EV, os níveis de contaminação eram acima dos valores legais, foi estipulado que para valores: a) superiores a 20 mg kg^{-1} , o solo passaria para um segundo tratamento, a biorremediação; b) abaixo de 10 mg kg^{-1} o solo estava descontaminado e c) entre 10 e 20 mg kg^{-1} , atendendo à proximidade do valor legal, a EV poderia ser prosseguida até se atingir o valor legislado.

Antes de iniciar os ensaios de biorremediação foi realizado um ensaio com um solo estéril contaminado com 10 mg kg^{-1} de benzeno. O objectivo deste ensaio foi o de identificar a concentração do contaminante na fase gasosa do solo (C_{gas}) em equilíbrio com um solo que apresenta um nível de contaminação idêntico ao limite legal. Na Figura 3.4, observa-se a evolução da concentração de benzeno na fase gasosa do solo ao longo do processo de biorremediação num ensaio de solo estéril.

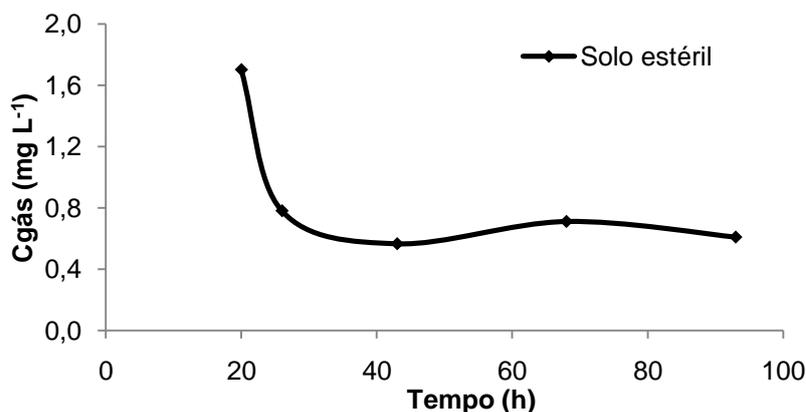


Figura 3. 4. Evolução da degradação do benzeno, no solo estéril, contaminado com 10 mg kg^{-1} com 14% de MO.

Com base na Figura 3.4, verifica-se que nas primeiras 40 h ocorre uma diminuição da concentração de benzeno na fase gasosa. Posteriormente, verifica-se que o sistema atingiu o equilíbrio, sendo que a concentração final de benzeno na fase gasosa do solo era igual a $0,6 \text{ mg L}^{-1}$. Este valor serviu de indicativo do final da biorremediação para os ensaios com 14% de MO, ou seja, quando aquele valor foi atingido na monitorização do processo de biorremediação, o solo foi considerado descontaminado.

A Figura 3.5 apresenta a monitorização do processo de biorremediação do solo com 14% de MO utilizando concentrações numa gama de 70 a 120 mg kg^{-1} . Salienta-se que estes níveis de concentração advêm do processo de EV, ou seja, as concentrações que não alcançaram os limites impostos pela legislação foram usadas na biorremediação, como concentrações iniciais. A linha paralela ao eixo dos xx indica a concentração do

contaminante ($0,6 \text{ mg L}^{-1}$), para o qual, o solo é considerado descontaminado, baseado na Figura 3.4.

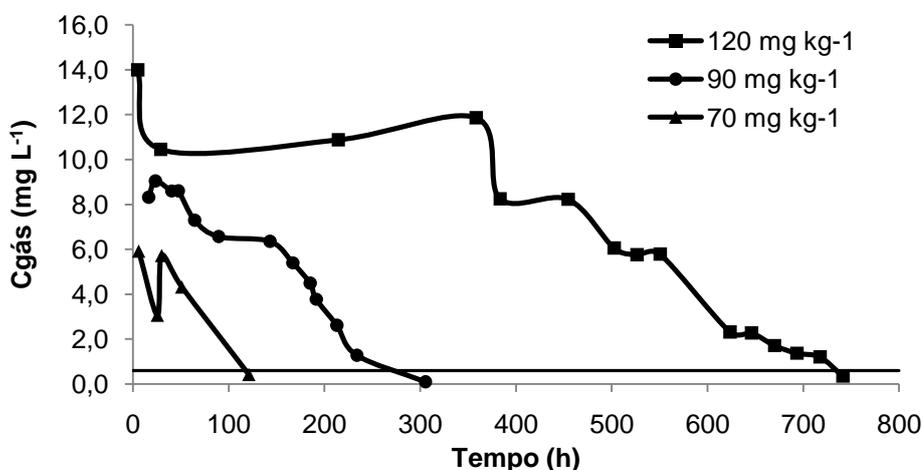


Figura 3. 5. Evolução da biorremediação do solo contaminado com benzeno.

Deste ensaio pode-se concluir que os microrganismos possuem a capacidade de degradar o benzeno e que o tempo de biorremediação é directamente proporcional ao nível de contaminação no solo. Ainda na Figura 3.5, observa-se que a concentração do benzeno na fase gasosa nas primeiras 30 h sofreu oscilações, devido à distribuição do contaminante nas diferentes fases do solo (gasosa, aquosa e sólida).

A Figura 3.6 representa a monitorização de um ensaio realizado para um solo estéril e um solo não estéril, com um nível de contaminação igual a 100 mg kg^{-1} e um teor de MO igual a 14%.

Com base na Figura 3.6, verifica-se que no ensaio com solo não estéril ocorre um decréscimo gradual e contínuo da concentração do contaminante, confirmando que a degradação do benzeno é efectuada pela acção dos microrganismos indígenas no solo. No entanto, no solo estéril a concentração do benzeno na fase gasosa do solo sofreu pequenas oscilações da concentração ao longo do tempo, mantendo-se aproximadamente igual a 12 mg L^{-1} . Nos dois ensaios verifica-se que nas primeiras 40 h, a concentração do benzeno sofreu oscilações, devido à sua distribuição pelas diferentes fases do solo (gasosa, aquosa e sólida).

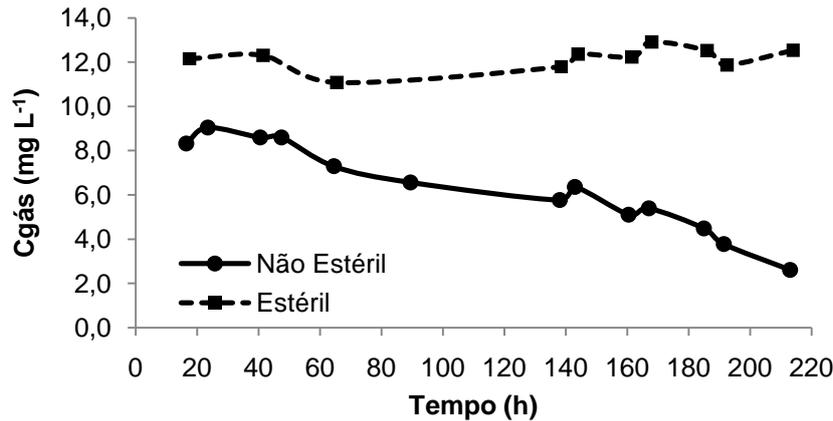


Figura 3. 6. Comparação entre um ensaio estéril e um não estéril, com um nível de contaminação no solo de 100 mg kg^{-1} .

Na Figura 3.7, está representado um ensaio com solo estéril com 24% de MO e um nível de contaminação igual a 10 mg kg^{-1} de benzeno. Este ensaio tinha como objectivo identificar a concentração do contaminante na fase gasosa do solo (C_{gas}) que está em equilíbrio com o solo que apresenta um nível de contaminação idêntico ao limite legal. Esta C_{gas} foi utilizada para indicar o momento em que, o benzeno atingiu o valor legal no solo.

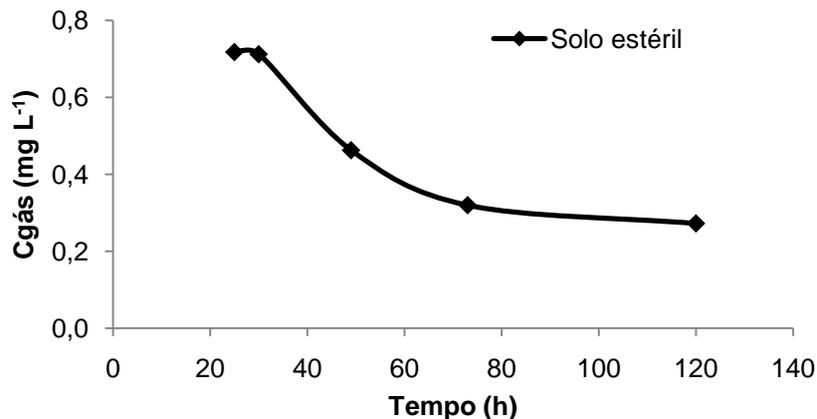


Figura 3. 7. Evolução da degradação do benzeno, no solo estéril, para 24% de MO.

A Figura 3.7 ilustra a monitorização de um ensaio estéril, em que ocorrem pequenas variações da concentração de benzeno na fase gasosa do solo. Este facto, deve-se à adsorção do contaminante no solo. Contudo, a partir das 120 h considerou-se que o sistema estabilizou, assumindo esse valor como o indicativo do final dos ensaios de biorremediação ($0,3 \text{ mg L}^{-1}$).

Na Figura 3.8, apresenta-se a monitorização da remediação de um solo com um teor de MO igual a 24% e com níveis de concentração entre os 96 e 173 mg kg^{-1} . Estes níveis de

concentração advém do processo de EV, isto é, utilizou-se as concentrações finais da EV que não chegaram aos limites impostos pela lei no processo de biorremediação. A linha paralela ao eixo dos xx, indica a concentração do contaminante ($0,3 \text{ mg L}^{-1}$), para o qual o solo é considerado descontaminado (Figura 3.7).

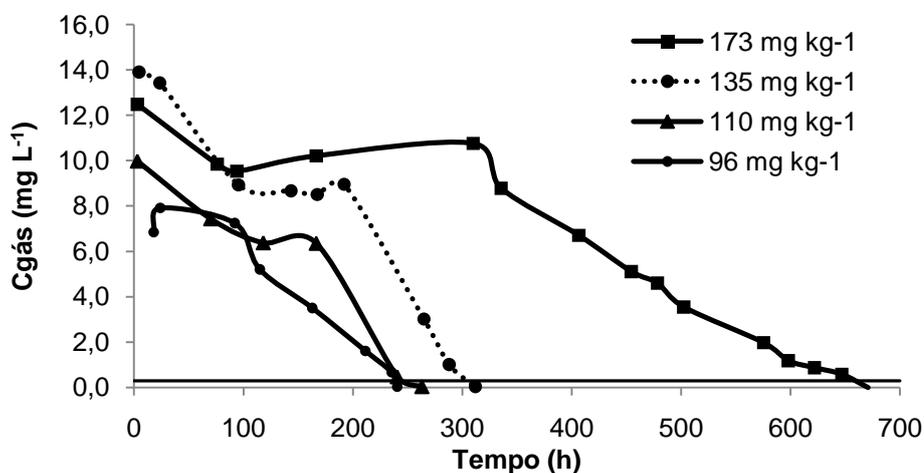


Figura 3. 8. Resultados para diferentes concentrações com uma MO igual a 24%.

Analisando a Figura 3.8, verifica-se que ocorre um decréscimo gradual e contínuo dos níveis de benzeno na fase gasosa do solo confirmando a sua biorremediação. Este facto, provou que os microrganismos são capazes de degradar o benzeno e que o tempo de biorremediação é directamente proporcional à concentração do contaminante.

Na análise da Tabela 3.1, apresenta-se o tempo de biorremediação para os diferentes teores de matéria orgânica e os respectivos níveis de contaminação do benzeno.

Tabela 3. 1. Registo da concentração e o tempo de biorremediação.

Matéria Orgânica (%)	Nível de contaminação (mg kg^{-1})	Tempo de biorremediação (h)
14	70	121
	90	306
	120	742
24	96	241
	110	263
	135	312
	173	671

Através da Tabela 3.1, verifica-se que o tempo de biorremediação aumenta com o nível de contaminação do benzeno. Comparativamente ao teor de MO de 14 e 24%,

nomeadamente para os intervalos de concentração de 90-96 e 120-135 mg kg⁻¹, verifica-se que o tempo de biorremediação é inversamente proporcional ao teor de matéria orgânica, visto que, um solo com maior quantidade de MO apresenta uma maior comunidade de microrganismos, logo uma maior capacidade degradativa.

3.2.2. Tolueno

Com base nos ensaios anteriormente realizados com a EV [64], verificou-se que somente em solos com 24% de MO não foi possível atingir os níveis de contaminação admissíveis por lei (100 mg kg⁻¹), isto porque, para o teor de MO igual a 14% a EV removeu o contaminante até ao valor imposto por lei. Já para o teor 24% de MO, o contaminante não foi removido e por isso, utilizou-se essas concentrações finais no processo de biorremediação.

A Figura 3.9, representa um ensaio com solo estéril contaminado com 100 mg kg⁻¹, para 24% de MO, de modo a encontrar o valor da concentração de tolueno na fase gasosa do solo, que está em equilíbrio com o valor correspondente ao limite legal e que possa posteriormente ser usado como indicativo do momento em que, o solo se encontra descontaminado.

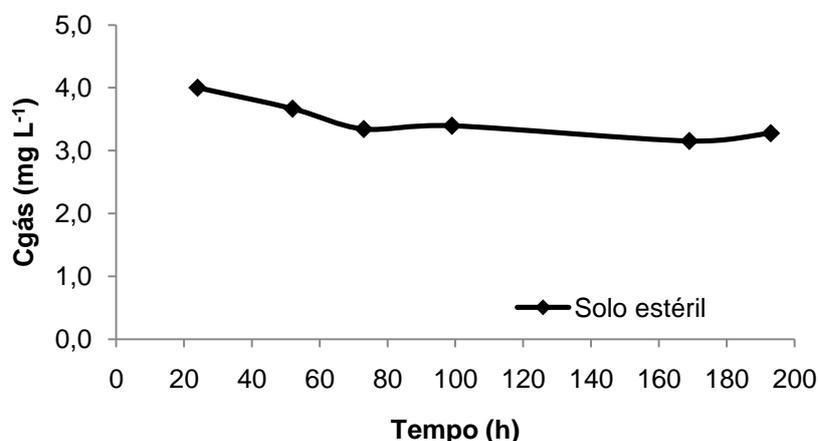


Figura 3. 9. Evolução da degradação do tolueno, no solo estéril, para 24% de MO.

A Figura 3.9 mostra que a partir das 80 h o sistema atingiu o equilíbrio, assumindo o valor obtido da concentração de tolueno na fase gasosa do solo, como o indicativo do final da biorremediação (3,3 mg L⁻¹).

Na Figura 3.10, apresenta-se a monitorização da biorremediação de solos utilizando quatro níveis de contaminação 319, 336, 361 e 392 mg kg⁻¹, em que a linha paralela ao eixo dos xx representa a concentração do contaminante (3,3 mg L⁻¹) para o qual, o solo é considerado descontaminado. Estes níveis de concentração advém do processo de EV, isto é, utilizou-se as concentrações finais da EV que não chegaram aos limites impostos pela lei.

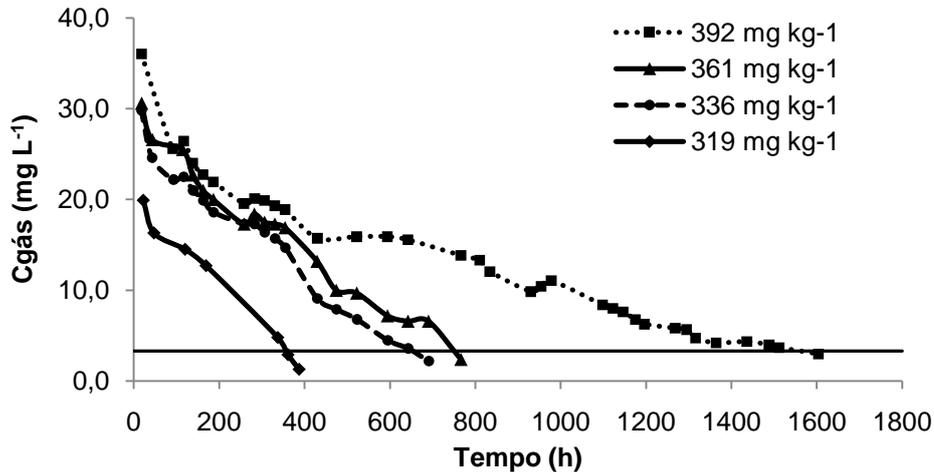


Figura 3. 10. Monitorização da biorremediação para solos com 24% de MO, contaminados com tolueno.

Na Figura 3.10, estão apresentados os valores da biorremediação. A partir sensivelmente das 150-200 h, ocorre um decréscimo gradual e contínuo dos níveis de tolueno confirmando a biorremediação do contaminante, podendo-se concluir que: a) os microrganismos possuem a capacidade de degradar o tolueno e b) o tempo de biodegradação é directamente proporcional ao nível de contaminação.

Na Tabela 3.2 regista-se para os quatro níveis de contaminação de tolueno no solo e o tempo total de biorremediação.

Tabela 3. 2. Registo da concentração e o tempo de biorremediação.

Matéria Orgânica (%)	Nível de contaminação (mg kg ⁻¹)	Tempo de biorremediação (h)
24	319	387
	361	691
	336	766
	392	1604

Na análise da Tabela 3.2, verifica-se que o tempo de biorremediação aumenta com o nível de concentração do tolueno, demonstrando a capacidade de degradação por parte dos microrganismos. Concluindo-se que, como no caso dos ensaios com tolueno, o tempo de biorremediação é directamente proporcional ao nível de contaminação presente no solo.

A Figura 3.11 apresenta a comparação entre o ensaio realizado com solo estéril e um solo não estéril, contaminados com uma concentração inicial de 319 mg kg^{-1} de tolueno com um teor de MO igual a 24%.

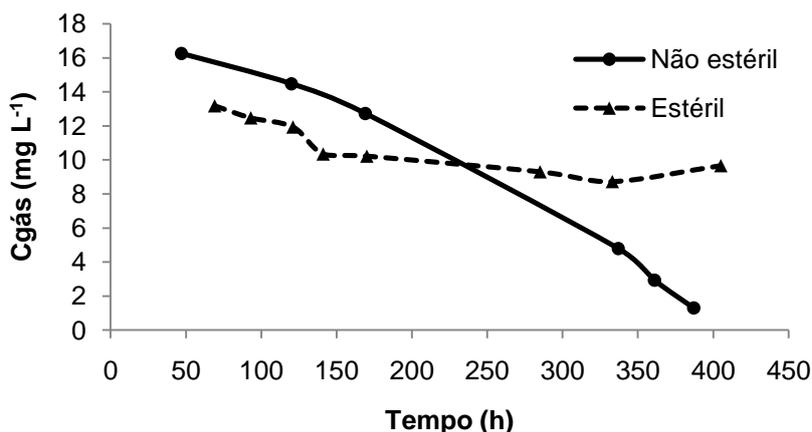


Figura 3. 11. Comparação entre uma coluna estéril e outra contaminada.

Na análise da Figura 3.11, verifica-se que no ensaio não estéril ao contrário do solo estéril, ocorreu um decréscimo na concentração do contaminante, confirmando a degradação do contaminante por acção dos microrganismos indígenas no solo. Este tipo de teste demonstra que a biorremediação é realizada especialmente pelos microrganismos (bactérias e fungos).

3.2.3. Etilbenzeno

No caso do etilbenzeno, a biorremediação foi realizada em solos com teores de MO de 14 e 24% e níveis de contaminação acima dos 150 mg kg^{-1} . Como no caso do etilbenzeno, o limite legal é de 100 mg kg^{-1} (baseado na lei espanhola) e, seguindo o mesmo critério, abaixo daquele limite considerou-se que o solo estava descontaminado, nos casos da concentração entre 100 e 150 mg kg^{-1} o prosseguimento do processo de EV torna-se uma solução mais prática e sem necessidade de alterar a tecnologia. Nos casos onde o nível de contaminação fosse superior a 150 mg kg^{-1} aplicou-se a biorremediação.

A Figura 3.12 representa um ensaio com solo estéril contaminado com 100 mg kg^{-1} , para 14% de MO. Neste tipo de ensaio, pretendeu-se, como nos casos anteriores, identificar a concentração do contaminante na fase gasosa do solo (C_{gas}) que está em equilíbrio com o solo que apresenta um nível de contaminação idêntico ao limite legal.

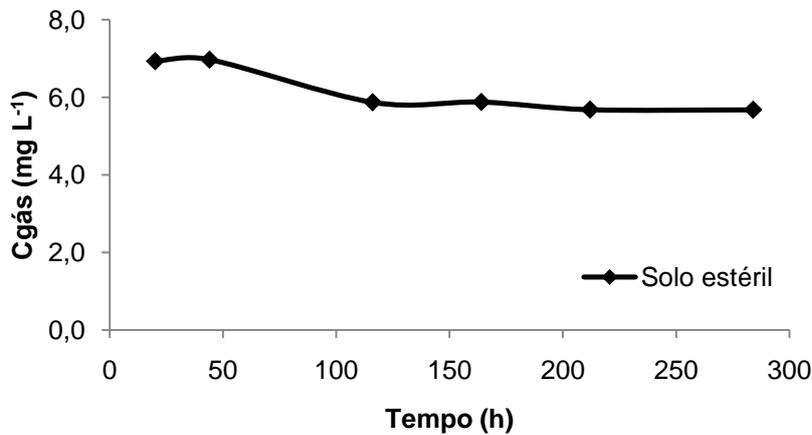


Figura 3. 12. Ensaio com solo estéril, com 14% de MO.

A Figura 3.12 representa a monitorização de um ensaio estéril. A partir das 200 h considerou-se que o sistema atingiu o equilíbrio, assumindo esse valor da concentração de etilbenzeno na fase gasosa do solo como o valor ($5,7 \text{ mg L}^{-1}$) indicativo do final da biorremediação.

Após o ensaio com solo estéril, procedeu-se a ensaios de biorremediação no solo com o teor de MO de 14% apresentando dois níveis de contaminação: 235 mg kg^{-1} e 335 mg kg^{-1} . Na Figura 3.13, apresenta-se a monitorização da biorremediação de solos, em que a linha paralela ao eixo dos xx representa a concentração do contaminante ($5,7 \text{ mg L}^{-1}$), para o qual, o solo é considerado descontaminado.

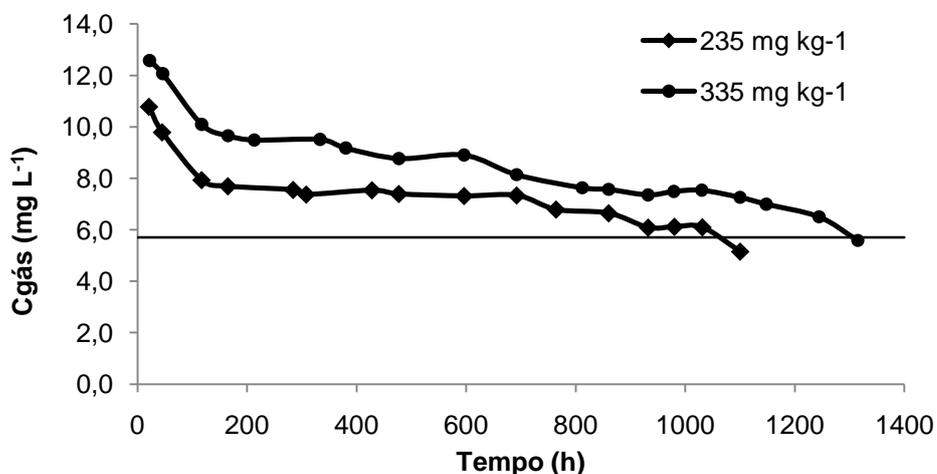


Figura 3. 13. Monitorização da biorremediação para solos com 14% de MO

Da análise da Figura 3.13 é possível concluir que os microrganismos possuem a capacidade de degradar o etilbenzeno e o tempo de biodegradação está directamente proporcional à concentração do contaminante.

A Figura 3.14 representa a monitorização de um ensaio estéril com um não estéril, para um nível de concentração igual a 100 mg kg^{-1} e um teor de MO igual a 14%.

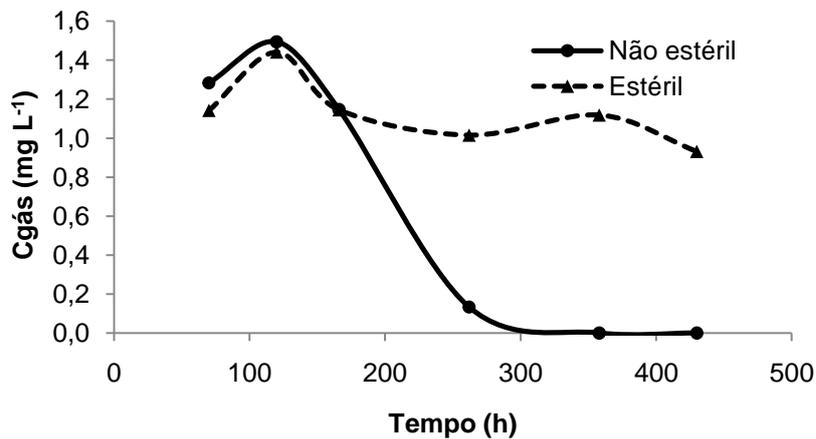


Figura 3. 14. Comparação entre uma coluna não-estéril e uma estéril.

Na Figura 3.14, verifica-se que ocorre um decréscimo da concentração do contaminante no ensaio com solo não estéril, confirmando que a degradação foi realizada por acção dos microrganismos autóctones no solo. No solo estéril a concentração de etilbenzeno na fase gasosa do solo sofre apenas pequenas oscilações da concentração.

A Figura 3.15 mostra os resultados obtidos no ensaio com solo estéril contaminado com 100 mg kg^{-1} , para 24% de MO. Este ensaio, pretende indicar o valor limite legal da concentração do contaminante no solo, quando este atinge o equilíbrio.

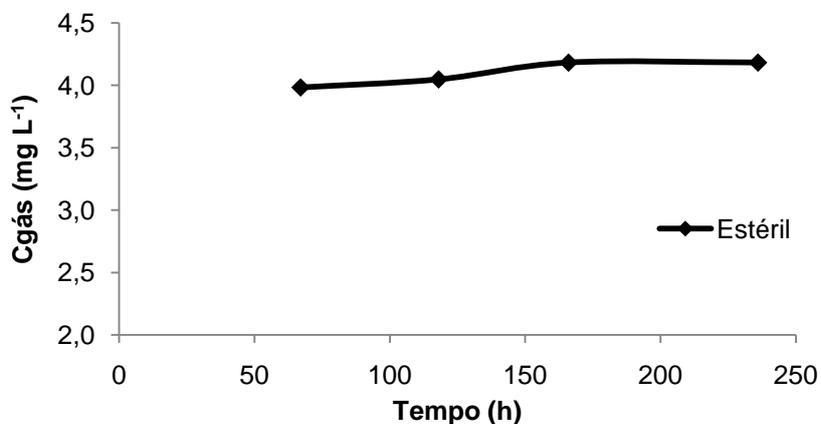


Figura 3. 15. Ensaio com solo estéril, com 24% de MO e contaminado com 100 mg kg^{-1} .

Ao fim de 150 h a concentração do contaminante na fase gasosa do solo estabilizou no valor de $4,2 \text{ mg L}^{-1}$. De acordo com o procedimento seguido nos testes anteriores, este foi considerado como valor indicativo para o final da biorremediação.

Para o etilbenzeno, realizou-se a monitorização da biorremediação do solo com 24% de MO contaminado com quatro níveis de contaminação $154, 438, 591$ e 744 mg kg^{-1} , estas concentrações advém do processo de EV [64]. Na Figura 3.16, apresenta-se a monitorização da biorremediação de solos, em que a linha paralela ao eixo dos xx representa a concentração do contaminante ($4,2 \text{ mg L}^{-1}$), para o qual, o solo é considerado descontaminado.

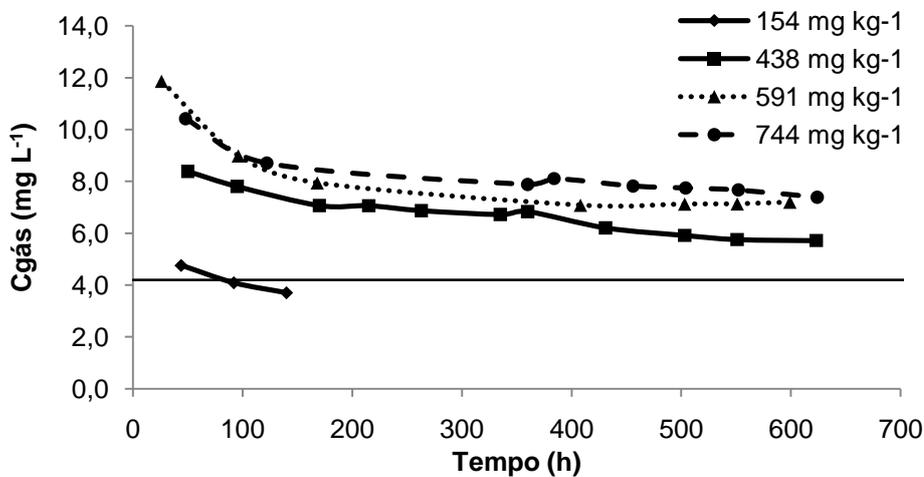


Figura 3. 16. Monitorização da biorremediação para solos com 24% de MO, contaminados com etilbenzeno.

A Figura 3.16, ilustra a monitorização da biorremediação efectuada nos vários ensaios com solo contendo 24% de MO e no qual se verifica que os microrganismos nativos do solo são incapazes de biodegradar o etilbenzeno, para concentrações superiores a 154 mg kg^{-1} . Concluindo-se assim que os níveis de concentração usados neste ensaio eram bastante elevados, originando um ambiente tóxico que porventura levou à inibição da degradação do etilbenzeno.

Na Tabela 3.3 registam-se os resultados para os quatro níveis de contaminação do etilbenzeno no solo e o tempo total de biorremediação.

Tabela 3. 3 Registo da concentração e o tempo de biorremediação.

Matéria Orgânica (%)	Nível de contaminação (mg kg⁻¹)	Tempo de biorremediação (h)
14	235	1100
	335	1315
24	154	140
	438	NA
	591	NA
	744	NA

NA – Limite legal não atingido

Com base na Tabela 3.3, verifica-se que para o teor de MO igual a 14% o tempo de biorremediação aumenta com o nível de concentração do etilbenzeno. No entanto, para o teor de MO igual a 24% o ensaio de biorremediação não foi terminado, devido ao nível de concentração de etilbenzeno elevado, causando possivelmente a inibição dos microrganismos.

4. Conclusão

Na análise dos ensaios de biorremediação efectuados em solos com um teor de MO de 14% e 24% contaminados com benzeno, tolueno ou etilbenzeno, pode-se concluir que:

- Os microrganismos autóctones são capazes de degradar as diferentes concentrações dos contaminantes. Porém, no caso do solo com um teor de MO igual a 24% e contaminado com concentrações de etilbenzeno acima de 154 mg kg^{-1} , o ambiente torna-se tóxico para os microrganismos e, possivelmente levou à inibição da degradação dos contaminantes;

- O tempo de biodegradação é directamente proporcional à concentração da contaminação do solo;

- Comparando os solos com teores de humidade de 14% e 24% contaminados com benzeno, conclui-se que nos solos com maior teor de MO a biorremediação é mais eficiente, devido provavelmente a um maior número de microrganismos no solo;

- A biorremediação é um método eficiente no tratamento de solos contaminados separadamente com benzeno, tolueno ou etilbenzeno, todavia a biorremediação é um processo lento e para concentrações elevadas a eficiência da biorremediação decresce.

5. Sugestões futuras

No presente trabalho de biorremediação de solos comprovou a aplicabilidade do processo na degradação dos hidrocarbonetos aromáticos (BTEX). Assim, de forma a aprimorar e complementar o trabalho, sugerem-se algumas propostas, tais como:

- O processo de biorremediação poderia ser melhorado através do arejamento do solo.
- Antes da execução do trabalho deveriam analisar-se alguns parâmetros, tais como: pH , concentração de nutrientes no solo (azoto e fósforo) – visto que influenciam decisivamente o desenvolvimento dos microrganismos.
- Verificar quais as espécies predominantes de microrganismos nativos do solo e a sua quantidade.
- A biorremediação foi eficiente na degradação dos hidrocarbonetos aromáticos. Porém, este mesmo método poderia ser aplicado no tratamento de solos contaminados por outros contaminantes. Pesticidas, metais pesados ou ainda hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH's) são hipóteses interessantes.
- No trabalho em causa, utilizaram-se microrganismos nativos do solo. Todavia, em trabalhos futuros, poderiam ser aplicadas bactérias específicas do contaminante ou mesmo fungos. Posteriormente, seria interessante comparar os vários microrganismos e verificar qual das espécies seria mais eficiente na degradação dos contaminantes.

Referências bibliográficas

- [1] Pedrozzo, MFM, Barbosa, EM, Corseuil, HX, Schneider, MR et Linhares, MM, 2002. *Ecotoxicologia e Avaliação de Risco do Petróleo*. Salvador: Centro de Recursos Ambientais. Série Cadernos de Referência Ambiental, v.12, 246pp.
- [2] Fonseca, MRM, 1996. *Química: Química Orgânica*. São Paulo: FTD, 368pp.
- [3] Speight, JG, 2007. *The Chemistry and Technology of Petroleum*. 4ªEdição, Tayler & Francis Group, Estados Unidos da America, 954pp.
- [4] Alexander, M, 1994. *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press, 302pp.
- [5] Alexander, M, 1977. *Introduction to Soil Microbiology*. Ed. Jonh Wiley, New York, 2a ed., pp. 423-437.
- [6] Mazzeo, DEC, Levy, CE, Angelis, DF and Morales, MAM, 2010. BTEX Biodegradation by Bacteria from Effluents of Petroleum Refinery. *Science of the Total Environment*, 408 (2010): 4334 – 4340.
- [7] Junfeng, D, Xiang, L and Zhifeng, HU, 2008. Anaerobic BTEX Degradation in Soil Bioaugmented with Mixed Consortia Under Nitrate Reducing Conditions. *Journal of Environmental Sciences*, 20 (2008): 585-592.
- [8] Boopathy, R, 2000. Factors Limiting Bioremediation Technologies. *Bioresource Technology*, 74 (2000): 63-67.
- [9] Zhong, YS, Jun, JH, Zhi, W, Xia, HR, Jun, JY, Mei, LX and Peng, YS, 2009. Bioremediation of Oil Spills in Cold Environments: A Review. *Pedosphere*, 19 (3): 371 – 381.
- [10] Carvalho, AMG, 2003. *Geologia Sedimentar*. 1ªEdição, Âncora editora, Volume I, Lisboa, 444pp.
- [11] Eweis, JB, Ergas, SJ, Chang, DPY et Schoroeder, E, 1999. *Principios de Biorrecuperación*. 1º Edição, WCB/McGraw – Hill, Madrid, 327pp.
- [12] Grande, TG, Augusto, PA, Monteiro, P, Estevez, AM and Barbosa, D, 2010. Remediation of Soils Contaminated with Pesticides: A Review. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 90 (2010): 438-467.
- [13] Peper, IL, Gerba, CP et Brusseau, ML, 1996. *Pollution Science*. Academic Press, Canada, 397pp.

- [14] Curi, N et Gomes, JBV, 2006. *Fase Líquida do Solo nos Estudos Ambientais*. 1ª Edição, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Aracaju, SE, 39pp.
- [15] Galantini, JA, Senesi, N, Brunetti, G and Rosell, R, 2004. Influence of Texture on Organic Matter Distribution and Quality and Nitrogen and Sulphur Status in Semiarid Pampean Grassland Soils of Argentina. *Geoderma*, 123 (2004): 143-152.
- [16] Zhai, Y, Thomassonb, JA, Boggess, JE and Sui, R, 2006. Soil Texture Classification with Artificial Neural Networks Operating on Remote Sensing Data. *Computers and Electronics in Agriculture*, 54 (2006): 53–68.
- [17] Odum, EP, 2001. *Fundamentos de Ecologia*. 6º Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 927pp.
- [18] Alvim-Ferraz, MCM, Albergaria, JT and Delerue-Matos, C, 2006. Soil Remediation Time to Achieve Clean-Up Goals II: Influence of Natural Organic Matter and Water Contents. *Chemosphere*, 64(5): 817-825.
- [19] Sawey, CN, Mccarty, PL et Parkin, GF, 2003. *Chemistry for Environmental Engineers and Science*. 5º Edition, McGraw-Hill Companies, Inc., New York, 742pp.
- [20] Comissão das Comunidades Europeias, 2002. Comunicação da Comissão ao Conselho, ao Parlamento Europeu, ao Comité Económico e Social e ao Comité Das Regiões. Bruxelas, 38pp.
- [21] Vilão, R, Venâncio, C, Sousa, A, Liberal, P, Ribeiro, R et Venâncio, R, 2009. *Relatório do Estado do Ambiente 2008*. Agência Portuguesa do Ambiente. Amadora. 181pp.
- [22] Instituto do ambiente, 2005. *Relatório do Estado do Ambiente 2003*. Instituto do Ambiente. Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território. Amadora. 242pp.
- [23] Rodrigues, SM, Pereira, ME, Silva, EF, Hursthouse, AS and Duarte, AC, 2008. A review of regulatory decisions for environmental protection: Part II - The case-study of contaminated land management in Portugal. *Environment International*, 35 (2009): 214-225.
- [24] Ferreira, WFC et Sousa, JCF, 1998. *Microbiologia*. Lidel – Edições Técnicas, Lda., Volume I, Lisboa, 342pp.
- [25] METCALF & EDDY, 2003. *Wasterwater Engineering, Treatment and Reuse*. McGraw-Hill Higher Education, Inc., New York. 1819pp.

- [26] Bitton, G, 1999. *Wasterwater Microbiology*. 2^o Edição, Wiley-Liss, Inc., Canada. 578pp.
- [27] Whitney DA, 1988. Phosphorus Facts – Soil, Plant, and Fertilizer. Cooperative Extension Service. Manhattan, Kansas, 8pp.
- [28] Rodrigues, SM, Pereira, ME, Silva, EF, Hursthouse, AS and Duarte, AC, 2008. A Review of Regulatory Decisions for Environmental Protection: Part I — Challenges in the Implementation of National Soil Policies. *Environment International*, 35 (2009): 202-213.
- [29] European Environment Agency, 2007. *Europe's Environment – The Fourth Assessment*. European Communities, Copenhagen, 411pp.
- [30] Vilão, R, Venâncio, C, Couto, MB, Liberal, P, Ribeiro, R, Noronha, G, Silva, FN, Gervásio, I, Castro, H et Fonseca, CC, 2008. *Relatório do Estado do Ambiente 2007*. 281pp.
- [31] Environmental Protection Agency, 2000. *Engineered Approaches to in Situ Bioremediation of Chlorinated Solvents: Fundamentals and field Applications*. Washington, 144pp.
- [32] Sarkar, D, Ferguson, M, Datta, R and Birnbaum, S, 2005. Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons in Contaminated Soils: Comparison of Biosolids Addition, Carbon Supplementation, and Monitored Natural Attenuation. *Environmental Pollution*, 136 (2005): 187-195.
- [33] MARIANO, JB, 2005. *Impactos Ambientais do Refino de Petróleo*. 1^a Edição, Interciência, Rio de Janeiro, 228pp.
- [34] Wright, GJ et Gallun, RA, 2008. *Fundamentals of Oil & Gas Accounting*. 5^a Edition, PennWell Corporation, Tulsa, Oklahoma, 770pp.
- [35] Suzuki, O et Watanabe, K, 2005. *Drugs and Poisons in Humans – A Handbook of Practical Analysis*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Japan, 653pp.
- [36] Finotti, AR and Caicedo, NOL, 2001. Contaminações Subterrâneas com Combustíveis Derivados de Petróleo: Toxicidade e a Legislação Brasileira. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, 6 (2): 29-46.
- [37] Merck KGaA. "Benzene." 24 de Setembro, 2010. <http://www.merck.com/> (acedido em 27 de Setembro de 2010).

- [38] Merck KGaA. "Toluene." 24 de Setembro, 2010. <http://www.merck.com/> (acedido em 27 de Setembro de 2010).
- [39] Merck KGaA. "Etilbenzene." 24 de Setembro, 2010. <http://www.merck.com/> (acedido em 27 de Setembro de 2010).
- [40] Merck KGaA. "Xylene." 2010. <http://www.merck.com/> (acedido em 29 de Novembro de 2010).
- [41] Boldú, FXP, Ballerstedt, H, Gerritse, J and Grotenhuis, JTC, 2003. Bioremediation of BTEX Hydrocarbons: Effect of Soil Inoculation with the Toluene-Growing Fungus *Cladophialophora* Sp. Strain T1. Kluwer Academic Publishers, 15 (2003): 59-65.
- [42] Atlas, RM, 1991. Microbial Hydrocarbon Degradation: Bioremediation of Spills. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 52 (1991): 149-156.
- [43] Crowford, RL et Crowford, DL, 1996. *Bioremediation: Principles and Applications*. Série nº3, Cambridge University Press, New York, 406pp.
- [44] Environmental Response Division, 1998. *Fundamental Principles of Bioremediation – An Aid to the Development of Bioremediation Proposals*. Environmental Response Division, United States of America, 33pp.
- [45] Jorgensen, KS, Puustinen, J and Sourtti, AM, 2000. *Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon Contaminated Soil by Composting in Biopiles*. Environmental Pollution, 107 (2000): 245-254.
- [46] Bitton, G, 2005. *Wastewater Microbiology*. 3ª Edition, John Wiley & Sons, Inc., Canada. 765pp.
- [47] Moreno, FN et Corseuil, HX, 2001. *Fitorremediação de Aquíferos Contaminados por Gasolina*. Engenharia sanitária e ambiental, Vol.6, Número 1, 7pp.
- [48] McCutcheon, SC et Shnoor, JL, 2003. *Phytoremediation – Transformation and Control of Contaminants*. Wiley-Interscience, Inc., New Jersey, 989pp.
- [49] Vogel, TM, 1996. *Bioaugmentation as a Soil Bioremediation Approach*. Biotechnology, 7 (1996): 311-316.
- [50] Publico. "Derrames petrolíferos." 2010. <http://www.publico.pt/> (acedido em 11 de Dezembro de 2010).

- [51] Huz, R, Lastra, M, Junoy, J, Castellanos, C and Viéitez, JM, 2005. Biological Impacts of Oil Pollution and Cleaning in the Intertidal Zone of Exposed Sandy Beaches: Preliminary Study of the “Prestige” Oil Spill. *Coastal And Shelf Science*, 65 (2005): 19-29.
- [52] Poonian, C, 2003. *The Effects of the 1991 Gulf War on the Marine and Coastal Environment of the Arabian Gulf: Impact, Recovery and Future Prospects*. MSc Aquatic Resource Management, King’s College, London, 44p.
- [53] HARVEY, S, 1990. *Enhanced Removal of Exxon Valdez Spilled Oil from Alaskan Gravel by a Microbial Surfactant*. *Nature Biotechnology*, 8 (1990): 228 – 230.
- [54] Pinto, MH, Martins, RG and Costa, JAV, 2009. Avaliação Cinética da Produção de Biosurfatantes Bacterianos. *Química Nova*, 32 (8): 2014-2108.
- [55] Gil, JM, Gracia, LMN, Sobrino, EG, Guimaraes, AC, Navarro, SH, Báscones, MS and Sánchez, MCR, 2008. Composting and Vermicomposting Experiences in the Treatment and Bioconversion of Asphaltens from the *Prestige* Oil Spill. *Bioresource Technology*, 99 (2008): 1821–1829.
- [56] Bento, FM, Camargo, FAO, Okeke, BC and Frankenberger, WT, 2005. Comparative Bioremediation of Soils Contaminated with Diesel Oil by Natural Attenuation, Biostimulation and Bioaugmentation. *Bioresource Technology*, 96 (9): 1040-1055.
- [57] Romantschuk, M, Sarand, I, Petänen, T, Peltola, R, Vihanne, MJ, Koivula, T, Yrjälä, K and Haahtela, K, 2000. Means to Improve the Effect of in Situ Bioremediation of Contaminated Soil: An Overview of Novel Approaches. *Environmental Pollution*, 197 (2000): 179-185.
- [58] Skoog, DA, Holler, FJ et Nieman, TA, 2001. *Principios de Análisis Instrumental*. 5ª Edição, McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U., Madrid, 1024pp.
- [59] Degani, AL, Cass, QB et Vieira, PC, 1998. *Cromatografia – Um breve ensaio*. *Química Nova Na Escola*, 7 (1998): 21-25.
- [60] VOGEL, AI, 2002. *Análise Química Quantitativa*. 6ª Edição. LTC – Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro, 462pp.
- [61] McNair, HM et Miller, JM, 1997. *Basic Gas Chromatography*. John Wiley & Sons, INC., Canada, 194p.
- [62] Valco Instruments Co.Inc. “PRODUCTS FOR GC – Capillary Columns from VICI Metronics.” 2010. <http://www.vici.com/columns/columns.php> (acedido em 1 de Dezembro de 2010).

[63] Kelly, DP, Baker, SC, Trickett, J, Davey, M and Murrell, JC, 1994. Methanesulphonate Utilization by a Novel Methylophilic Bacterium Involves an Unusual Monooxygenase. *Microbiology*, 140 (1994): 1419–1426.

[64] Albergaria, T, 2010. *Previsão do Tempo de Remediação de Solos Contaminados Usando a Extração de Vapor*. Tese de doutoramento em Engenharia Ambiental. Faculdade de Engenharia do Porto, 232pp.

[65] Fan, S and Scow, KM, 1993. Biodegradation of Trichloroethylene and Toluene by Indigenous Microbial Populations in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (6): 1911-1918.

[66] Ministerio de la Presidencia. “Real Decreto 9/2005, De 14 De Enero, Por El Que Se Establece La Relación De Actividades Potencialmente Contaminantes Del Suelo Y Los Criterios Y Estándares Para La Declaración De Suelos Contaminados”. 10pp.

Anexos

Anexos A - Preparação das colunas

No presente Anexo A, são apresentados os principais cálculos para a constituição dos ensaios em coluna. Para a sua preparação, foi necessário ter em atenção alguns aspectos como a MO do solo, a quantidade de solo húmico a colocar na coluna, o volume de água a adicionar, entre outros factores. Salienta-se que os cálculos a seguir descritos foram exemplificados para 14% de MO, utilizando o benzeno como contaminante. Os cálculos realizados para os restantes contaminantes são idênticos.

A.1. Exemplo de cálculo da quantidade de terra para uma coluna de benzeno, com uma percentagem de MO igual a 14%

$$m_t \times \%mo_t = mo_c \Leftrightarrow 1500 \times 0,14 = 210 \text{ g} \quad \text{equação (A.1)}$$

$$m_s = \frac{mo_c}{\%mo_s} = \frac{210}{0,42} = 500 \text{ g} \quad \text{equação (A.2)}$$

$$m_a = m_t - m_s = 1500 - 500 = 1000 \text{ g} \quad \text{equação (A.3)}$$

Sendo que: m_a - Massa de areia; mo_c – Massa de solo rico em matéria orgânica pretendida nos ensaios de coluna; m_s - Massa de solo; m_t - Massa total com solo e areia; $\%mo_t$ - Percentagem de matéria orgânica total; $\%mo_s$ - Percentagem de matéria orgânica no solo.

A.2. Exemplo de cálculo do teor de humidade

Observações

O cálculo do teor da humidade, para os três contaminantes, foi considerado a partir da literatura. A percentagem de humidade óptima estipulada é 20%. Após um período na estufa, mediu-se a percentagem de água no solo através de uma balança de humidades (Kern, modelo MLS 50-3 IR) e, posteriormente, calculou-se a quantidade de água necessária a adicionar, para obter os desejados 20%, como se pode observar nos próximos cálculos.

- Por exemplo, para um teor de humidade no solo igual a 18% (obtido na balança de humidades) e MO igual a 24%, calcula-se o volume de água a adicionar ao solo.

$$m_{\text{água}} = m_s \times \text{teor de humidade no solo} \Leftrightarrow m_{\text{água}} = 857 \times 0,18 = 154,3 \text{ g} \quad \text{equação (A.4)}$$

$$\%a_t = \frac{m_{\text{água}}}{m_t} \times 100 = \frac{154,3}{1500} \times 100 = 10,28\% \quad \text{equação (A.5)}$$

$$\% \text{pretendida} = 20 - 10,28 = 9,72\% \text{ de H}_2\text{O} \quad \text{equação (A.6)}$$

$$\%h = \frac{m_{\text{am}}}{m_t + m_{\text{am}}} \Leftrightarrow 0,0972 = \frac{m_{\text{am}}}{1500 + m_{\text{am}}} \Leftrightarrow 0,0972 \times (1500 + m_{\text{am}}) = m_{\text{am}} \Leftrightarrow \text{equação (A.7)}$$

$$\Leftrightarrow 145,8 + 0,0972 \times m_{\text{am}} = m_{\text{am}} \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow 145,8 = m_{\text{am}} - 0,0972 m_{\text{am}} \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow m_{\text{am}} = \frac{145,8}{1 - 0,0972} = \frac{161,5}{1,000} = 161,5 \text{ mL}_{\text{am}}$$

$$m_{\text{água}} = m_{\text{am}} - m_m = 161,5 - 15 = 146,5 \text{ mL}_{\text{água}} \quad \text{equação (A.8)}$$

Sendo que: $m_{\text{água}}$ - Massa de água; m_s - Massa de solo; $\%h$ - Percentagem de humidade pretendida na coluna; m_t - Massa total com solo e areia; m_{am} - Massa de água e de meio mineral; m_m - Massa de meio mineral; $\%a_t$ - percentagem de água no solo húmico (solo mais areia).

A.3. Exemplo de cálculo do volume de benzeno, para uma concentração de 70 mg kg⁻¹

1

- Quantidade total de contaminante, a colocar na coluna

Considerando que: 70 mg kg⁻¹ está para 1 kg de solo

$$m_{t_c} = \frac{m_p \times m_t}{1} \Leftrightarrow m = \frac{70 \times 1500 \times 10^{-3}}{1} \Leftrightarrow m = 105 \text{ mg} \quad \text{equação (A.9)}$$

A adição do contaminante foi realizada em quatro zonas da coluna, de modo a que a dispersão fosse homogénea. A massa total de benzeno foi dividida pelas quatro zonas, de igual modo.

$$m_c = \frac{m_{t_c}}{4} = \frac{105}{4} = 26,3 \text{ mg} \quad \text{equação (A.10)}$$

- Volume a colocar em cada zona da coluna:

$$v_p = \frac{m_c}{\rho} = \frac{26,3 \times 10^{-3}}{0,8765} = 0,0299 \text{ mL} \approx 30,0 \text{ }\mu\text{L} \quad \text{equação (A.11)}$$

Sendo que: m_p - Massa do contaminante; m_c - Massa de contaminante por camada na coluna; m_t - Massa total com solo e areia; m_{t_c} - Massa total de contaminante a colocar na coluna; ρ - Massa volúmica do contaminante; v_p - Volume de contaminante a colocar na coluna por camada.

A.4. Registo das massas de terra, de areia, a quantidade de água e o volume dos diferentes contaminantes

Nas Tabelas (A.1 a A.8), estão registadas as quantidades de solo e areia colocadas na coluna, a massa de água a adicionar e o volume de contaminante, variando a percentagem de MO (14% e 24%) e a concentração do contaminante. Inicialmente expõe-se os dados relativos dos ensaios estéreis (Tabelas A.1 e A.2). A Tabela A.3 apresenta os valores utilizados na construção das colunas para os ensaios de comparação entre o solo estéril e não estéril e as seguintes referem-se aos ensaios com os três contaminantes, em diferentes níveis de contaminação.

A.4.1. Colunas estéreis

Nas Tabelas A.1 e A.2, estão registados os principais valores para as colunas estéreis, com um teor de MO de 14 e 24% nos três contaminantes. Através do processo de EV foi possível a remoção completa de tolueno para 14% de MO, sendo apenas realizado o ensaio estéril com 24% de MO. Para o benzeno e o etilbenzeno foram realizados os dois ensaios estéreis, com os dados abaixo indicados. A Tabela A.3 apresenta os valores usados na construção das colunas nos ensaios da comparação entre o solo estéril e não estéril.

Tabela A. 1. Registo dos valores para a construção das colunas estéreis, com uma percentagem de MO igual a 14%.

Contaminante	Cgás (mg kg ⁻¹)	Quantidade de solo (g)	Quantidade de areia (g)	Volume de água (mL)	Volume do contaminante por camada (µL)
Benzeno	10	500	1000	360	4,3
Tolueno	-	-	-	-	-
Etilbenzeno	100	500	1000	173	43,3

Tabela A. 2. Registo dos valores para a construção das colunas estéreis, com uma percentagem de MO igual a 24%.

Contaminante	Cgás (mg kg ⁻¹)	Quantidade de solo (g)	Quantidade de areia (g)	Volume de água (mL)	Volume do contaminante por camada (µL)
Benzeno	10			360	4,3
Tolueno	100	857	643	135	43,3
Etilbenzeno	100			147	43,3

Tabela A. 3. Registo dos valores para a construção das colunas dos ensaios estéreis e não estéreis.

Teor de matéria orgânica (%)	Contaminante	Cgás (mg kg ⁻¹)	Quantidade de solo (g)	Quantidade de areia (g)	Volume de água (mL)	Volume do contaminante por camada (µL)
14	Benzeno	100	500	1000	360	42,8
	Etilbenzeno	100			173	43,3
24	Tolueno	319	857	643	135	138,0

A.4.2. Benzeno

Os ensaios com benzeno foram realizados com os mesmos teores de MO que os utilizados nos ensaios estéreis. Os resultados estão registados nas Tabelas A.4 e A.5.

Tabela A. 4. Registo dos valores para os ensaios de benzeno para diferentes níveis de concentração e 14% MO.

Cgás (mg kg ⁻¹)	Quantidade de solo (g)	Quantidade de areia (g)	Volume de água (mL)	Volume do contaminante por camada (µL)
70	500	1000	360	30,0
90				38,5
120				51,3

Tabela A. 5. Registo dos valores para os ensaios de benzeno para diferentes níveis de concentração e 24% MO.

Cgás (mg kg ⁻¹)	Quantidade de solo (g)	Quantidade de areia (g)	Volume de água (mL)	Volume do contaminante por camada (µL)
96	857	643	360	41,0
110				47,1
135				57,8
173				74,0

A.4.3. Tolueno

Os ensaios com tolueno foram realizados apenas com 24% MO e estão registados na Tabela A.6.

Tabela A. 6. Registo dos valores para os ensaios de tolueno para diferentes níveis de concentração e 24% MO.

Cgás (mg kg ⁻¹)	Quantidade de solo (g)	Quantidade de areia (g)	Volume de água (mL)	Volume do contaminante por camada (µL)
319				138,0
336	857	643	135	145,3
361				156,2
392				169,6

A.4.4. Etilbenzeno

O etilbenzeno foi o último contaminante a ser estudado. Estes ensaios foram realizados com os mesmos teores de MO aos utilizados nos ensaios estéreis. Os resultados estão registados na Tabela A.7 e A.8.

Tabela A. 7. Registo dos valores para os ensaios de etilbenzeno para diferentes níveis de concentração e 14% MO.

Cgás (mg kg ⁻¹)	Quantidade de solo (g)	Quantidade de areia (g)	Volume de água (mL)	Volume do contaminante por camada (µL)
235				101,7
335	500	1000	173	145,0
379				164,0

Tabela A. 8. Registo dos valores para os ensaios de etilbenzeno para diferentes níveis de concentração e 24% MO.

Cgás (mg kg ⁻¹)	Quantidade de solo (g)	Quantidade de areia (g)	Volume de água (mL)	Volume do contaminante por camada (µL)
154			126	66,7
438	857	643	178	189,6
591			101	255,8
744			178	322,0

Anexo B – Registo dos volumes, das massas e da concentração para as curvas de calibração

No presente Anexo B, apresentam-se os exemplos de cálculos para a massa e para a concentração do benzeno utilizando um volume de contaminante de 0,2 μL . Salienta-se que esta mesma metodologia foi seguida nos restantes ensaios, para o tolueno e o etilbenzeno. Ainda no presente Anexo B, apresentam-se os registos dos volumes, da massa de contaminantes, da área total e da concentração do contaminante.

Para a realização dos cálculos, utilizou-se um volume de injeção no cromatógrafo de 0,5 mL e um volume da ampola de 249,3 mL. A área total foi obtida através do software associado ao cromatógrafo e os volumes de contaminação para a curva de calibração, foram determinados de modo a que a concentração do contaminante se situasse dentro da gama de estudo pretendida.

- *Exemplo de cálculo da massa (g), para o volume de contaminante igual a 0,2 μL*

Sabendo que: 0,2 μL = 2×10^{-4} mL

$$m_{\text{CC}} = v_c \times \rho \Leftrightarrow m_{\text{CC}} = 2 \times 10^{-4} \times 0,8765 = 1,75 \times 10^{-4} \text{g} \quad \text{equação (B.1)}$$

- *Cálculo da concentração do contaminante (mg L^{-1}), num volume de 0,2 μL*

$$C_{\text{gás}} = \frac{m_{\text{CC}}}{V_a} \Leftrightarrow C_c = \frac{1,75 \times 10^{-4} \text{ g}}{249,3 \text{ ml}} \times \frac{1 \text{ ml}}{10^{-3} \text{ L}} \times \left(\frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right) = 0,70 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \quad \text{equação (B.2)}$$

Em que: $C_{\text{gás}}$ - Concentração do contaminante na fase gasosa; ρ - Massa volúmica do contaminante; v_c - Volume de contaminante colocado na ampola; v_a - Volume da ampola.

B.1. Benzeno

No subcapítulo do benzeno, apresenta-se registado na Tabela B.1 o volume de contaminação, a massa de contaminante, a concentração e a área total no cromatógrafo.

Tabela B. 1. Registo da massa, concentração e área total, utilizando diferentes volumes de contaminação.

Volume de contaminação (μL)	Massa (g)	Cgás (mg L^{-1})	Área Total
Branco	0	0	$7,80 \times 10^5$
0,2	$1,75 \times 10^{-4}$	0,7	$1,52 \times 10^6$
0,5	$4,38 \times 10^{-4}$	1,8	$3,56 \times 10^6$
1	$8,77 \times 10^{-4}$	3,5	$6,61 \times 10^6$
2	$1,75 \times 10^{-3}$	7,0	$1,41 \times 10^7$
4	$3,51 \times 10^{-3}$	14,1	$2,53 \times 10^7$
5	$4,38 \times 10^{-3}$	17,6	$3,08 \times 10^7$
6	$5,26 \times 10^{-3}$	21,1	$3,76 \times 10^7$
10	$8,77 \times 10^{-3}$	35,2	$6,41 \times 10^7$

B.2. Tolueno

No tolueno apresenta-se registado na Tabela B.2 o volume de contaminação, a massa de contaminante, a concentração e a área total.

Tabela B. 2. Registo da massa, concentração e área total, utilizando diferentes volumes de contaminação.

Volume de contaminação (μL)	Massa (g)	Cgás (mg L^{-1})	Área Total
Branco	0	0	$3,92 \times 10^5$
1	$8,67 \times 10^{-4}$	3,48	$8,77 \times 10^6$
3	$2,60 \times 10^{-3}$	10,4	$2,50 \times 10^7$
5	$4,33 \times 10^{-3}$	17,4	$4,20 \times 10^7$

B.3. Etilbenzeno

No etilbenzeno, apresenta-se registado na Tabela B.3 o volume de contaminação, a massa de contaminante, a concentração e a área total.

Tabela B. 3. Registo da massa, concentração e área total, utilizando diferentes volumes de contaminação.

Volume de contaminação (µL)	Massa (g)	Cgás (mg L⁻¹)	Área Total
Branco	0	0	6,16 x10 ⁴
0,5	4,33 x10 ⁻⁴	1,7	3,36 x10 ⁶
1	8,67 x10 ⁻⁴	3,5	6,74 x10 ⁶
2	1,73 x10 ⁻³	7,0	1,27 x10 ⁷
5	4,33 x10 ⁻³	17,4	3,18 x10 ⁷
6	5,20 x10 ⁻³	20,9	3,84 x10 ⁷

Anexo C – Tempo de biorremediação e respectiva concentração

No Anexo C vem referenciado o tempo e a concentração para os três contaminantes (benzeno, tolueno e etilbenzeno).

C.1. Benzeno

O primeiro contaminante a ser analisado foi o benzeno, sendo registado o tempo de biorremediação e a concentração para os vários ensaios. A Tabela C.1 corresponde ao ensaio de solo estéril contaminado com uma concentração inicial de 10 mg kg^{-1} e utilizando como teor de MO um valor igual a 14%. Na Tabela C.2, Tabela C.3 e Tabela C.4, encontram-se registados o tempo e a concentração de benzeno para um teor de MO igual a 14% e níveis de contaminação igual a 70, 90 e 120 mg kg^{-1} , respectivamente. A Tabela C.5 apresenta os ensaios de solo estéril e não estéril, com uma percentagem de MO de 14% e uma concentração inicial de contaminante de 100 mg kg^{-1} (usada nos dois ensaios). A Tabela C.6 apresenta o ensaio de solo estéril para um teor de MO igual a 24%, contaminado com uma concentração inicial de 10 mg kg^{-1} . Relativamente às Tabelas C.7, C.8, C.9 e C.10, estas referem-se aos ensaios com um teor de MO de 24% e níveis de contaminação iguais a 96, 110, 135 e 173 mg kg^{-1} , respectivamente.

Tabela C. 1. Registo do tempo e da concentração para um ensaio de solo estéril, de nível de contaminante de valor 10 mg kg^{-1} .

Tempo (h)	Cgás (mg L^{-1})
20	1,7
26	0,8
43	0,6
49	0,5
68	0,7
93	0,6

Tabela C. 2. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de benzeno com concentração inicial de 70 mg kg^{-1} .

Tempo (h)	Cgás (mg L^{-1})
6	5,9
26	3,1
30	5,7
121	0,4

Tabela C. 3. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de benzeno com concentração inicial de 90 mg kg⁻¹.

Tempo (h)	Cgás (mg L ⁻¹)
17	8,3
24	9,0
41	8,6
48	8,6
65	7,3
90	6,6
143	6,4
167	5,4
185	4,5
192	3,8
213	2,6
234	1,3
306	-0,1

Tabela C. 4. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de benzeno com concentração inicial de 120 mg kg⁻¹.

Tempo (h)	Cgás (mg L ⁻¹)
5	14,0
29	10,5
215	10,9
334	14,1
359	11,9
384	8,3
455	8,2
503	6,1
527	5,8
551	5,8
624	2,3
646	2,3
670	1,7
694	1,4
718	1,2
742	0,3

Tabela C. 5. Registo do tempo e da concentração para o ensaio de solo estéril e não estéril com concentração inicial igual a 100 mg kg^{-1} .

Estéril		Não estéril	
Tempo (h)	Cgás (mg L^{-1})	Tempo (h)	Cgás (mg L^{-1})
18	12,2	17	8,3
42	12,3	24	9,0
66	11,1	41	8,6
139	11,8	48	8,6
144	12,4	65	7,3
162	12,2	90	6,6
168	12,9	138	5,8
186	12,5	143	6,4
193	11,9	161	5,1
214	12,5	167	5,4
		185	4,5
		192	3,8
		213	2,6
		234	1,3

Tabela C. 6. Registo do tempo e da concentração para um ensaio de solo estéril de nível de contaminante de valor 10 mg kg^{-1} .

Tempo (h)	Cgás (mg L^{-1})
25	0,7
30	0,7
49	0,5
73	0,3
120	0,3
25	0,7

Tabela C. 7. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de benzeno com concentração inicial de 96 mg kg^{-1} .

Tempo (h)	Cgás (mg L^{-1})
18	6,8
24	7,9
92	7,2
115	5,2
163	3,5
212	1,6
236	0,7
241	0,0

Tabela C. 8. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de benzeno com concentração inicial de 110 mg kg⁻¹.

Tempo (h)	Cgás (mg L ⁻¹)
3	10,0
70	7,4
118	6,4
167	6,4
241	0,5
263	0,0

Tabela C. 9. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de benzeno com concentração inicial de 135 mg kg⁻¹.

Tempo (h)	Cgás (mg L ⁻¹)
5	13,9
24	13,4
96	8,9
144	8,7
168	8,5
192	9,0
265	3,0
288	1,0
312	0,0

Tabela C. 10. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de benzeno com concentração inicial de 173 mg kg⁻¹.

Tempo (h)	Cgás (mg L ⁻¹)
3	12,5
76	9,8
94	9,5
167	10,2
310	10,8
336	8,8
407	6,7
455	5,1
479	4,6
503	3,5
576	2,0
598	1,2
622	0,9
647	0,6
671	0,0

C.2. Tolueno

O tolueno foi o segundo contaminante a ser analisado. De seguida apresentam-se os registos do tempo de biorremediação e da concentração final nos vários ensaios. A Tabela C.11 apresenta os valores relativos ao ensaio de solo estéril com uma percentagem de MO de 24% e uma concentração inicial de 100 mg kg^{-1} . Na Tabela C.12, Tabela C.13, Tabela C.14 e Tabela C.15, estão registados os tempos e concentrações para os ensaios em que se usou teores de MO igual a 24% e níveis de contaminação iguais a 319, 336, 361 e 392 mg kg^{-1} , respectivamente. A Tabela C.16 refere-se aos ensaios de solo estéril e não estéril, com uma percentagem de MO de 24%, no qual a concentração inicial do contaminante foi 319 mg kg^{-1} para os dois ensaios.

Tabela C. 11. Registo do tempo e da concentração para um ensaio de solo estéril, de nível de contaminante de valor 100 mg kg^{-1} .

Tempo (h)	Cgás (mg L^{-1})
24	4,0
52	3,7
73	3,3
99	3,4
169	3,2
193	3,3

Tabela C. 12. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de tolueno com concentração inicial de 319 mg kg^{-1} .

Tempo (h)	Cgás (mg L^{-1})
22	19,9
47	16,3
120	14,5
169	12,7
337	4,8
361	2,9
387	1,3

Tabela C. 13. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de tolueno com concentração inicial de 336 mg kg⁻¹.

Tempo (h)	Cgás (mg L ⁻¹)
18	29,8
43	24,6
93	22,2
117	22,5
139	21,0
163	19,9
187	18,6
259	17,3
283	17,3
307	16,4
331	15,7
355	14,7
430	9,1
475	7,9
523	6,8
595	4,5
643	3,6
691	2,2

Tabela C. 14. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de tolueno com concentração inicial de 361 mg kg⁻¹.

Tempo (h)	Cgás (mg L ⁻¹)
18	30,6
43	26,6
114	25,5
138	22,7
162	21,0
186	20,0
258	17,3
282	18,4
306	17,5
330	17,3
354	16,9
429	13,2
474	10,0
522	9,7
594	7,2
642	6,6
690	6,6
766	2,4

Tabela C. 15. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de tolueno com concentração inicial de 392 mg kg⁻¹.

Tempo (h)	Cgás (mg L ⁻¹)
18	36,0
91	25,6
117	26,4
138	24,0
162	22,7
186	21,9
258	19,6
283	20,1
306	19,9
330	19,3
354	18,9
430	15,7
522	15,9
594	15,9
642	15,6
766	13,4
810	13,3
834	12,1
930	9,9
954	10,4
978	11,1
1098	8,4
1122	8,0
1146	7,6
1175	6,8
1196	6,3
1268	5,8
1295	5,7
1316	4,7
1364	4,2
1436	4,3
1488	4,0
1512	3,7
1604	3,0

Tabela C. 16. Registo do tempo e da concentração para o ensaio de solo estéril e não estéril com concentração inicial igual a 319 mg kg⁻¹.

Estéril		Não estéril	
Tempo (h)	Cgás (mg L ⁻¹)	Tempo (h)	Cgás (mg L ⁻¹)
69	13,2	47	16,3
93	12,5	120	14,5
121	11,9	144	15,5
141	10,3	169	12,7
170	10,2	337	4,8
285	9,3	361	2,9
333	8,7	387	1,3
405	9,7		
432	10,0		
454	10,3		

C.3. Etilbenzeno

A Tabela C.17 corresponde ao ensaio de solo estéril contaminado com uma concentração inicial de 100 mg kg^{-1} de etilbenzeno, com um teor de MO igual a 14%. Na Tabela C.18 e Tabela C.19, encontram-se registados os tempos e as concentrações do etilbenzeno para os ensaios com uma percentagem de MO igual a 14% e níveis de contaminação igual a 235 mg kg^{-1} e 335 mg kg^{-1} , respectivamente. Na Tabela C.20 apresentam-se os ensaios do solo estéril e não estéril, para uma percentagem de MO de 14%, em que a concentração inicial do contaminante para os dois ensaios foi de 100 mg kg^{-1} . A Tabela C.21 refere-se a um ensaio com solo estéril para uma concentração inicial de 100 mg kg^{-1} em etilbenzeno e um teor de MO igual a 24%. Da Tabela C.22 à C.25, encontram-se os valores para os ensaios correspondentes a um teor de MO de 24% e níveis de contaminação igual a 154, 438, 591, 744 mg kg^{-1} , respectivamente.

Tabela C. 17. Registo do tempo e da concentração para um ensaio de solo estéril de nível de contaminante de valor 100 mg kg^{-1} .

Tempo (h)	Cgás (mg L^{-1})
20	6,9
44	7,0
116	5,9
164	5,9
212	5,7
284	5,7

Tabela C. 18. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de etilbenzeno com concentração inicial de 235 mg kg^{-1} .

Tempo (h)	Cgás (mg L^{-1})
21	10,8
45	9,8
117	7,9
165	7,7
284	7,6
308	7,4
428	7,5
477	7,4
596	7,3
692	7,3
764	6,8
860	6,6
932	6,1
980	6,1
1031	6,1
1100	5,2

Tabela C. 19. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de etilbenzeno com concentração inicial de 335 mg kg⁻¹.

Tempo (h)	Cgás (mg L ⁻¹)
22	12,6
46	12,1
117	10,1
165	9,7
213	9,5
333	9,5
380	9,2
477	8,8
596	8,9
692	8,1
812	7,6
860	7,6
932	7,4
979	7,5
1030	7,5
1100	7,3
1148	7,0
1244	6,5
1315	5,6

Tabela C. 20. Registo do tempo e da concentração para o ensaio de solo estéril e não estéril com concentração inicial igual a 100 mg kg⁻¹.

Tempo (h)	Cgás da coluna estéril (mg L ⁻¹)	Cgás da coluna não estéril (mg L ⁻¹)
70	1,1	1,3
120	1,4	1,5
166	1,1	1,2
262	1,0	0,13
358	1,1	0,00
430	0,93	0,00

Tabela C. 21. Registo do tempo e da concentração para um ensaio de solo estéril de nível de contaminante de valor 100 mg kg^{-1} .

Tempo (h)	Cgás (mg L^{-1})
67	4,0
118	4,0
166	4,2
236	4,2

Tabela C. 22. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de etilbenzeno com concentração inicial de 154 mg kg^{-1} .

Tempo (h)	Cgás (mg L^{-1})
44	4,8
92	4,1
140	3,7

Tabela C. 23. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de etilbenzeno com concentração inicial de 438 mg kg^{-1} .

Tempo (h)	Cgás (mg L^{-1})
50	8,4
95	7,8
170	7,1
215	7,1
263	6,9
335	6,7
360	6,8
431	6,2
503	5,9
551	5,8
623	5,7

Tabela C. 24. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de etilbenzeno com concentração inicial de 491 mg kg⁻¹.

Tempo (h)	Cgás (mg L ⁻¹)
26	11,9
96	9,0
168	7,9
408	7,1
503	7,1
551	7,1
599	7,2

Tabela C. 25. Registo do tempo e da concentração final, num ensaio de etilbenzeno com concentração inicial de 744 mg kg⁻¹.

Tempo (h)	Cgás (mg L ⁻¹)
48	10,4
122	8,7
360	7,9
384	8,1
456	7,8
504	7,7
552	7,7
624	7,4

Anexo D - Fichas de segurança dos contaminantes

No presente Anexo D, estão representadas as principais características, riscos e medidas preventivas para os três contaminantes.

D. 1. Benzeno



101792 Benzene

for gas chromatography SupraSolv®

For general questions please contact our
Customer Service:

Merck KGaA
Frankfurter Str. 250
64293 Darmstadt
Germany
Phone: +49 6151 72-0
Fax: +49 6151 72 2000

27 September 2010

Product number	Packaging	Size	Price
1017921000	Glass bottle	1 l	price on request

Prices are subject to change without notice.

Accessories

963389	Adapter with S40 thread, with level sensor for emptying Merck solvents in bottles
964204	Display and alarm device for bottle level sensor

Product information

Hill Formula	C ₆ H ₆
HS Code	2902 20 00
EC number	200-753-7
Molar mass	78.11 g/mol
EC index number	601-020-00-8
CAS number	71-43-2

Chemical and physical data

Ignition temperature	555 °C
Solubility	1.8 g/l (20 °C)
Melting point	5.5 °C
Molar mass	78.11 g/mol
Density	0.88 g/cm ³ (20 °C)
Boiling point	80.1 °C
Vapor pressure	101 hPa (20 °C)
Explosion limit	1.4 - 8.0 %(V)
Flash point	-11 °C
Viscosity kinematic	0.78 mm ² /s (20 °C)

Figura D. 1. Principais características do benzeno [37].

Safety information according to GHS	
Hazard Statement(s)	H225: Highly flammable liquid and vapour. H350: May cause cancer. H340: May cause genetic defects. H372: Causes damage to organs through prolonged or repeated exposure. H304: May be fatal if swallowed and enters airways. H319: Causes serious eye irritation. H315: Causes skin irritation.
Precautionary Statement(s)	P201: Obtain special instructions before use. P210: Keep away from heat/sparks/open flames/hot surfaces. - No smoking. P308 + P313: IF exposed or concerned: Get medical advice/ attention. P301 + P310: IF SWALLOWED: Immediately call a POISON CENTER or doctor/ physician. P331: Do NOT induce vomiting. P305 + P351 + P338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. P302 + P352: IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
Signal Word	Danger
Hazard Pictogram(s)	
RTECS	CY1400000
Storage class	3 Flammable Liquids
WGK	WGK 3 highly water endangering
Disposal	9 Carcinogenic compounds and flammable compounds labelled "Highly toxic" or "Toxic": container F. Alkyl sulfates are carcinogenic; Take particular care to avoid inhalation and skin contact. To neutralize alkyl sulfates, add dropwise (from a dropping funnel) to concentrated ice-cool Ammonia solution (Cat.No. 105426) with vigorous stirring. Before placing in container D, check the pH with pH Universal indicator strips (Cat.No. 109535).
Safety information	
R Phrase	R 45-46-11-36/38-48/23/24/25-65 May cause cancer.May cause heritable genetic damage.Highly flammable.Irritating to eyes and skin.Also toxic: danger of serious damage to health by prolonged exposure through inhalation, in contact with skin and if swallowed.Also harmful: may cause lung damage if swallowed.
S Phrase	S 53-45 Avoid exposure - obtain special instructions before use.In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).
Categories of danger	carcinogenic, mutagenic, highly flammable, irritant, toxic
Hazard Symbol	 Flammable  Toxic

Figura D. 2. Riscos e medidas preventivas para o benzeno [37].

D. 2. Tolueno



108389 Toluene

for gas chromatography SupraSolv®

For general questions please contact our
Customer Service:

Merck KGaA
Frankfurter Str. 250
64293 Darmstadt
Germany
Phone: +49 6151 72-0
Fax: +49 6151 72 2000

27 September 2010

Product number	Packaging	Size	Price
1083891000	Glass bottle	1 l	price on request
1083892500	Glass bottle	2.5 l	price on request
1083899010	Barrel stainl. st.	10 l	price on request

Prices are subject to change without notice.

Accessories

108803	Drum key for opening and closing containers with 2" and 3/4" screw caps
963389	Adapter with S40 thread, with level sensor for emptying Merck solvents in bottles
964204	Display and alarm device for bottle level sensor
112647	Antistatic device for earthing metal containers when dispensing and filling with flammable solvents

[▶ Show all](#)

Product information

Synonyms	Toluene, Methylbenzene
Hill Formula	C_7H_8
Chemical formula	$C_6H_5CH_3$
HS Code	2902 30 00
EC number	203-625-9
Molar mass	92.14 g/mol
EC index number	601-021-00-3
CAS number	108-88-3

Chemical and physical data

Ignition temperature	535 °C
Solubility	0.52 g/l (20 °C)
Melting point	-95 °C
Molar mass	92.14 g/mol

Figura D. 3. Principais características do tolueno [38].

Density	0.87 g/cm ³ (20 °C)
pH value	(H ₂ O) not applicable
Boiling point	110.6 °C
Vapor pressure	29 hPa (20 °C)
Explosion limit	1.2 - 8 %(V)
Flash point	7 °C
Refractive index	1.4968 (20 °C)
Viscosity kinematic	0.7 mm ² /s (20 °C)

Safety information according to GHS

Hazard Statement(s)	H225: Highly flammable liquid and vapour. H304: May be fatal if swallowed and enters airways. H361: Suspected of damaging fertility or the unborn child. H373: May cause damage to organs through prolonged or repeated exposure. H315: Causes skin irritation. H336: May cause drowsiness or dizziness.
Precautionary Statement(s)	P210: Keep away from heat/sparks/open flames/hot surfaces. - No smoking. P301 + P310: IF SWALLOWED: Immediately call a POISON CENTER or doctor/ physician. P331: Do NOT induce vomiting. P302 + P352: IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
Signal Word	Danger
Hazard Pictogram(s)	
RTECS	XS5250000
Storage class	3 Flammable Liquids
WGK	WGK 2 water endangering
Disposal	1 Strongly contaminated halogen-free organic solvents: container A.

Safety information

R Phrase	R 11-38-48/20-63-65-67 Highly flammable.Irritating to skin.Harmful: danger of serious damage to health by prolonged exposure through inhalation.Possible risk of harm to the unborn child.Harmful: may cause lung damage if swallowed.Vapours may cause drowsiness and dizziness.
S Phrase	S 36/37-46-62 Wear suitable protective clothing and gloves.If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label.If swallowed, do not induce vomiting: seek medical advice immediately and show this container or label.
Categories of danger	highly flammable, irritant, harmful, toxic for reproduction
Hazard Symbol	 Flammable  Harmful

Figura D. 4. Riscos e medidas preventivas para o tolueno [38].

D. 3. Etilbenzeno



109635 Ethylbenzene

reference substance for gas chromatography

For general questions please contact our
Customer Service:

Merck KGaA
Frankfurter Str. 250
64293 Darmstadt
Germany
Phone: +49 6151 72-0
Fax: +49 6151 72 2000

27 September 2010

Product number	Packaging	Size	Price
1096350005	Glass bottle	5 ml	price on request

Prices are subject to change without notice.

Product information

Hill Formula	C_8H_{10}
Chemical formula	$C_6H_5C_2H_5$
HS Code	2902 60 00
EC number	202-849-4
Molar mass	106.16 g/mol
EC index number	601-023-00-4
CAS number	100-41-4

Chemical and physical data

Ignition temperature	430 °C
Solubility	0.2 g/l (20 °C)
Saturation concentration (air)	40 g/m ³ (20 °C) Air
Melting point	-95 °C
Molar mass	106.16 g/mol
Density	0.87 g/cm ³ (20 °C)
Boiling point	136 °C (1013 hPa)
Vapor pressure	9.5 hPa (20 °C)
Explosion limit	1.0 - 7.8 %(V)
Flash point	15 °C

Safety information according to GHS

Hazard Statement(s)	H225: Highly flammable liquid and vapour. H332: Harmful if inhaled.
---------------------	--

Figura D. 5. Principais características do etilbenzeno [39].

Precautionary Statement(s)	P210: Keep away from heat.
Signal Word	Danger
Hazard Pictogram(s)	
Storage class	3 Flammable Liquids
WGK	WGK 1 slightly water endangering
Disposal	3 Relatively unreactive organic reagents should be collected in container A. If halogenated, they should be collected in container B. For solid residues use container C.

Safety information

R Phrase	R 11-20 Highly flammable.Harmful by inhalation.
S Phrase	S 16-24/25-29 Keep away from sources of ignition - No smoking.Avoid contact with skin and eyes.Do not empty into drains.
Categories of danger	highly flammable, harmful
Hazard Symbol	 Flammable  Harmful

Figura D. 6. Riscos e medidas preventivas para o etilbenzeno [39].