

2

Revisão Bibliográfica

Neste capítulo será feita uma breve revisão bibliográfica sobre os temas de maior relevância para o desenvolvimento desta dissertação de mestrado.

2.1.

Água no Solo

Os poros do solo são compostos por quantidades variáveis de solução aquosa e por uma solução gasosa (constituindo o ar do solo). A solução aquosa, também denominada água ou solução do solo, é constituída por vários eletrólitos além de outros componentes. A solução gasosa, por sua vez, é composta principalmente por nitrogênio, oxigênio, vapor d'água e gás carbônico.

Um solo não saturado é aquele cujo espaço poroso se encontra preenchido por água e ar, formando interfaces ar-água resultantes do processo de retenção da água pela matriz do solo (Libardi, 2000).

A retenção de água no solo pode se dar de duas maneiras. Na primeira delas, a retenção se dá nos microporos dos agregados e pode ser ilustrada pelo fenômeno da capilaridade. A segunda forma de retenção é representada pelo processo de adsorção.

2.2.

Transporte de Contaminantes

A distribuição e o destino de derramamentos de combustíveis nos solos dependem do tipo de solo, da quantidade e do tipo de contaminante.

É importante conhecer o comportamento dos contaminantes e as taxas de distribuição em diferentes solos, uma vez que esta informação ajudará os responsáveis a minimizar as conseqüências de eventuais vazamentos. Em solos arenosos, há a necessidade de ações rápidas e efetivas. No entanto, os efeitos não

são tão críticos em solos argilosos, em que a distribuição se dá muito mais lentamente (Halmemies et al., 2003).

A migração de contaminantes em meios porosos é governada por diversos processos. Os processos físicos envolvem os fenômenos da advecção e da dispersão hidrodinâmica (difusão molecular e dispersão mecânica), enquanto os processos químicos e microbiológicos englobam reações que podem ocorrer entre a solução contaminada, os microrganismos e o solo. O espalhamento depende do tipo de solo e da sua geologia.

As plumas de contaminante podem ser amplamente influenciadas pela fonte de contaminação, transporte no aquífero, e eventuais perdas, que correspondem respectivamente ao carregamento de massa no aquífero, ao fluxo de água subterrânea e à biodegradação. (Weaver, 2001).

A pluma de contaminante pode se estender por liberação de massa, pela fonte de contaminação e pelo transporte no próprio aquífero. No entanto, a mesma pode ser eventualmente limitada por fenômenos tais como a biodegradação, a volatilização entre outras técnicas de remediação (Weaver, 2001).

2.3.

Biodegradação

Os Estados Unidos da América estão investindo bilhões de dólares na despoluição de solos e de águas subterrâneas e, ainda assim, as expectativas dos cidadãos com relação aos benefícios deste investimento não estão sendo satisfeitas. Estudos recentes demonstraram que, por conta das limitações das tecnologias, não há muitos locais em que as águas subterrâneas tenham sido recuperadas a uma condição de potabilidade. Apesar de as tecnologias para a descontaminação de solos chegarem mais próximas às condições exigidas, estas aumentam a exposição dos trabalhadores e dos residentes dos entornos aos contaminantes (National Research Council, 1993).

Nas últimas décadas os sistemas mais utilizados para o tratamento de águas subterrâneas foram os de bombeamento e tratamento (*pump-and-treat systems*). Estes sistemas consistem na instalação de uma série de poços na região da pluma de contaminação com a finalidade de bombear água para a superfície e realizar o tratamento da água extraída. Este método pode não só controlar a migração do

contaminante, como também remover sua massa, caso os poços estejam localizados no centro da pluma de contaminação. Como desvantagem, apresenta ainda a possibilidade de a parcela de contaminante sorvida à matriz sólida atuar como uma fonte contínua de contaminação.

As limitações das tecnologias convencionais de águas subterrâneas e os perigos representados pelos tratamentos convencionais do solo levaram às investigações de tecnologias alternativas, entre elas a utilização dos microrganismos nativos para imobilizar e/ou biodegradar os contaminantes no local da contaminação, transformando-os em dióxido de carbono, água e massa celular.

O sucesso da biodegradação em determinados locais depende não só da biodegradabilidade do contaminante como também das características químicas e geológicas da área.

2.3.1.

O Papel dos Microrganismos da Biodegradação

Vários estudos relacionados ao solo, a sedimentos e a sistemas de aquíferos mostraram que os microrganismos nativos têm a capacidade de se adaptar a uma variedade de perturbações químicas impostas por atividades humanas, utilizando e/ou degradando contaminantes de forma mais eficiente do que os microrganismos não adaptados (Chapelle, 1992).

As taxas de biodegradação seriam função da adaptação dos microrganismos nativos às condições de contaminação com o tempo. Portanto, o uso de tecnologias para melhorar ou acelerar o processo de adaptação dos microrganismos nativos a determinados compostos é uma ferramenta efetiva na remediação de meios contaminados (Chapelle, 1992).

Além de se adaptarem a diferentes condições ambientais, os microrganismos têm a capacidade de ajustar seu metabolismo a novos substratos. A contaminação de um meio geralmente introduz substratos antes não disponíveis à microbiota. A população microbiana pode se adaptar a estes novos substratos através de três diferentes mecanismos: indução de enzimas específicas, seleção de capacidades metabólicas através de mudanças genéticas, e aumento no número de organismos capazes de metabolizar os novos substratos (Chapelle, 1992). Desta forma,

quando os microrganismos nativos de um determinado local são expostos a contaminantes orgânicos, há a seleção daqueles que têm a capacidade de degradá-los como substratos. A taxa através da qual podem se adaptar é determinante da redução da concentração do contaminante na água e no solo.

O tratamento biológico nada mais é do que a degradação de compostos orgânicos pela ação dos microrganismos. O grau de alteração da estrutura molecular destes compostos determina se o processo em questão constitui uma biotransformação ou uma mineralização (La Grega, 1994).

A biotransformação é a transformação do composto orgânico em compostos mais simples. A mineralização, por sua vez, refere-se à quebra completa de moléculas orgânicas em massa celular, dióxido de carbono, água e resíduos inorgânicos inertes. Portanto, a biotransformação consiste na degradação parcial do contaminante enquanto a mineralização consiste na sua degradação completa (La Grega, 1994).

É de longa data que os microrganismos vêm sendo usados sem, no entanto, o entendimento do fenômeno.

A microbiologia dos solos está diretamente relacionada com a produção agrícola. Desta forma, o entendimento do comportamento da população microbiana perante diferentes práticas impulsionou a produção agrícola no século XX. Desde então a microbiologia dos solos vem sendo estudada devido às grandes aplicações econômicas provenientes da mesma (Chapelle, 1992).

Na década de 70 atentou-se para o fato de que algumas práticas de disposição de resíduos estavam contaminando os ambientes de sub-superfície abaixo da zona de raízes. A partir daí surgiu uma grande preocupação com o impacto destas atividades na qualidade das águas subterrâneas de modo que os microbiologistas voltaram-se para este campo de estudo (Chapelle, 1992).

Gradualmente, ficou claro que os microrganismos da sub-superfície têm papel fundamental na mobilidade e no destino de muitos contaminantes (McNabb & Dunlap, 1975; Freeze & Cherry, 1979; Matthess, 1972). Assim, o entendimento das interações ecológicas entre os microrganismos da sub-superfície ganhou proporções maiores do que durante o início do século XX.

Por ser a mais próxima da zona de produção de carbono orgânico fotossintético na superfície, a zona não saturada é o ambiente de sub-superfície mais ativo e variado biologicamente (Chapelle, 1992).

A zona não saturada é habitada por bactérias, vírus, cianobactérias, fungos, algas e artrópodes microscópicos. Entretanto, as bactérias constituem os mais numerosos microrganismos neste ambiente. Por este motivo, os processos bacterianos têm o maior impacto na química da infiltração de água subterrânea (Chapelle, 1992). A abundância e a distribuição bacteriana na zona não saturada vêm sendo estudadas ao longo dos últimos 150 anos (Alexander, 1977).

Várias são as razões que tornam os processos microbianos na zona não saturada importantes. Entre elas, os processos bacterianos, tais como o consumo de oxigênio, a produção de dióxido de carbono, a nitrificação e a denitrificação, vão impactar diretamente na química da infiltração de água até o nível d'água. Compostos antrópicos (hidrocarbonetos de petróleo, herbicidas, pesticidas, entre outros) passam pela zona não saturada antes de impactar diretamente a qualidade das águas subterrâneas. Portanto, os processos bacterianos na zona não saturada vão afetar seu destino e transporte.

2.3.2.

Como os Microrganismos Degradam os Contaminantes

Os microrganismos utilizam os contaminantes orgânicos como substrato para seu próprio crescimento e sua própria reprodução, transformando-os em outros compostos. Os contaminantes orgânicos não só constituem uma fonte de carbono (um dos componentes necessários para a formação de novas células) como também fornecem elétrons, utilizados pelos microorganismos para obtenção de energia (figura 2.1).

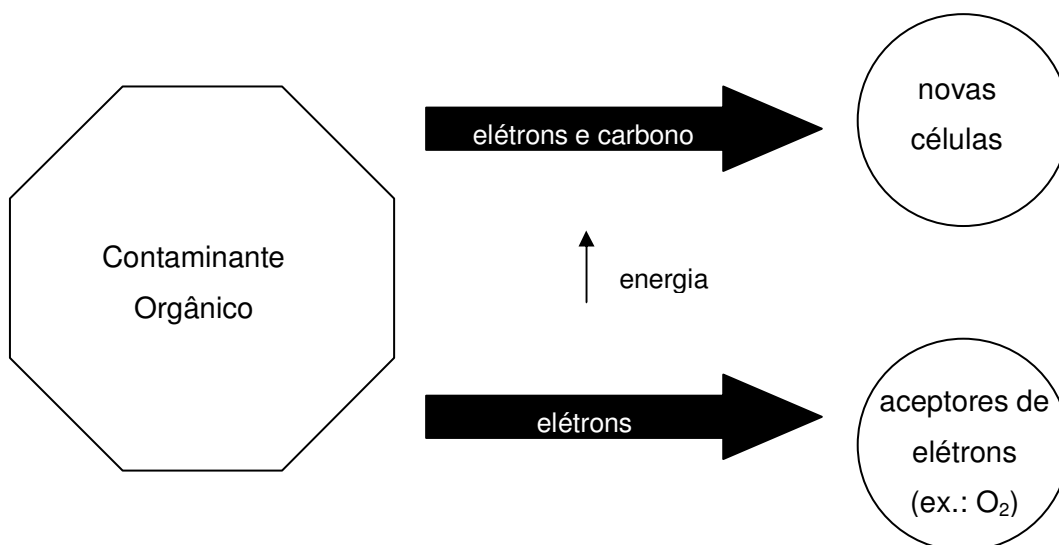


Figura 2.1 – Durante o processo de biodegradação, os microrganismos obtêm energia para sua reprodução e seu crescimento através da quebra de ligações químicas e da transferência de elétrons do contaminante para aceptores de elétrons tais como o oxigênio (National Research Council, 1993).

A degradação de qualquer molécula orgânica, inclusive de contaminantes, requer a produção e a utilização eficiente de enzimas (EPA, 1999). As enzimas nada mais são do que proteínas catalisadoras altamente específicas que aceleram as reações reduzindo a energia de ativação para uma modificação química. Na maioria dos casos, a biodegradação é meramente uma reação de oxi-redução catalisada por microrganismos que não só quebram ligações químicas como também transferem elétrons do contaminante para aceptores de elétrons.

Nas reações de oxi-redução, os compostos oxidados perdem elétrons e os compostos reduzidos, por sua vez, ganham elétrons. O processo de transferência de energia começa quando um elétron move-se de um orbital molecular para outro de mais alta energia. A molécula excitada pode retornar ao seu estado original através da transferência dos elétrons de alta energia para aceptores de elétrons (National Research Council, 1993).

Muitos microrganismos utilizam o oxigênio comoceptor de elétrons. O processo de quebra de compostos orgânicos com o auxílio do oxigênio é chamado de respiração aeróbia. Neste tipo de respiração, os microrganismos utilizam o oxigênio para oxidar parte do carbono para dióxido de carbono (CO_2), o resto do carbono é utilizado para produzir novas células. Neste processo o oxigênio é reduzido produzindo água. Portanto, os produtos da respiração aeróbia são:

dióxido de carbono, água e uma população maior de microrganismos (National Research Council, 1993).

Independentemente do mecanismo que os microrganismos utilizam para degradar os contaminantes, a composição celular típica de uma bactéria é de 50% de carbono, 14% de nitrogênio, 3% de fósforo, 2% de potássio, 1% de enxofre, 0,2% de ferro e 0,5% de cálcio, magnésio e cloro. No entanto, quando contaminantes orgânicos se encontram em grandes quantidades, pode haver um desequilíbrio na relação C:N:P de modo que se algum destes elementos essenciais para a formação de novas células estiver fora de sua concentração padrão relativa ao percentual de carbono, então a competição por nutrientes nas comunidades microbianas pode limitar não só o crescimento da população microbiana como também a remoção de contaminante (National Research Council, 1993).

Geralmente, em condições aeróbias, espera-se que haja uma queda na concentração de oxigênio quando os microrganismos estão ativos. Da mesma maneira, sob condições anaeróbias, as concentrações dos aceptores de elétrons também devem decair simultaneamente a um aumento na forma reduzida destes compostos. De uma forma, ou de outra, a concentração de carbono inorgânico deve crescer, uma vez que o carbono orgânico é oxidado. O carbono inorgânico pode assumir a forma de CO₂ gasoso, CO₂ dissolvido ou íons de bicarbonato.

2.3.3.

Química da Biodegradação de Hidrocarbonetos de Petróleo

A química orgânica baseia-se no comportamento dos átomos de carbono. Os compostos mais simples são os hidrocarbonetos, constituídos de carbono e de hidrogênio. O carbono possui quatro ligações disponíveis e pode se ligar a elementos tais como: oxigênio, enxofre, fósforo, cloro, bromo, flúor e hidrogênio. As ligações podem ser simples, duplas ou triplas (Fetter, 1992).

Os hidrocarbonetos de petróleo e seus derivados são compostos químicos que ocorrem naturalmente no meio ambiente e que o homem vem explorando para uma série de propósitos. A mistura de petróleo pode ser fracionada por cromatografia nos seguintes compostos: alifáticos e aromáticos (Atlas, 1981).

Há várias estratégias para a utilização dos hidrocarbonetos de petróleo pelos microrganismos. No entanto, o que ainda precisa ser estudado são os produtos

intermediários que são gerados pelos hidrocarbonetos de petróleo, para que se possam conhecer os caminhos utilizados pela população microbiana nos ecossistemas naturais para se chegar à biodegradação.

2.3.3.1.

Biodegradação de Hidrocarbonetos Alifáticos

Os hidrocarbonetos alifáticos constituem substratos importantes para uma grande variedade de microrganismos. Os mecanismos bioquímicos envolvidos na degradação destes compostos dependem das propriedades químicas de cada hidrocarboneto específico (Chapelle, 1992).

Os carbonos dos hidrocarbonetos alifáticos podem se unir por ligações simples (alcanos), duplas (alcenos) ou triplas (alcinos). Se houver uma combinação de ligações simples e múltiplas, o composto é classificado com base na ligação múltipla (Fetter, 1992).

Os alcanos também são conhecidos como hidrocarbonetos saturados ou parafinas. A fórmula geral é C_nH_{2n+2} . Os alcanos também podem ter uma estrutura cíclica, os chamados cicloalcanos cuja fórmula é C_nH_{2n} .

A fórmula que governa os alcenos é também C_nH_{2n} . Estes também são conhecidos como hidrocarbonetos não saturados.

De acordo com ZoBell (1950) é possível enumerar algumas das generalizações a respeito da oxidação dos hidrocarbonetos alifáticos.

- ✓ n-alcanos com cadeias longas (maiores do que C_{10}) são assimilados e oxidados mais rapidamente do que os n-alcanos de cadeias de carbono curtas. Uma exceção a esta regra seria o caso da oxidação do metano.
- ✓ Os hidrocarbonetos alifáticos saturados são degradados mais facilmente do que os não saturados.
- ✓ Cadeias ramificadas de hidrocarbonetos são menos prontamente degradadas do que cadeias lineares.

2.3.3.2.

Biodegradação de Hidrocarbonetos Aromáticos

Os hidrocarbonetos aromáticos consistem em anéis de benzeno. Os anéis de benzeno contêm seis átomos de carbono em uma estrutura anelada com ligações simples e duplas alternadas. Outras moléculas podem ser formadas através da adição de outros grupos funcionais ao anel de benzeno. Quando dois ou mais anéis de benzeno se unem são constituídos os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos ou HPAs. Nestes compostos os anéis de benzeno compartilham átomos de carbono. Se um anel de benzeno é adicionado a outro grupo, este pode ser chamado de fenil. Os bifenis policlorinados ou BPCs são bastante resistentes à degradação química, térmica ou biológica e tendem a ser muito persistentes no meio ambiente (Fetter, 1992).

De todos os componentes dos hidrocarbonetos de petróleo, os aromáticos são os mais importantes do ponto de vista da mobilidade em sistemas de água subterrânea e de impactos ambientais (Chapelle, 1992).

Devido à grande solubilidade de seus compostos em água, apesar de se apresentarem em menores concentrações do que os alifáticos, os aromáticos têm um grande impacto na qualidade das águas subterrâneas (Chapelle, 1992), além de serem também conhecidos por seu caráter carcinogênico. A concentração máxima de benzeno para a potabilidade da água é de aproximadamente 0,005mg/L. Vale ressaltar que populações microbianas adaptadas têm a capacidade de degradar compostos aromáticos. Entretanto, sobram os compostos recalcitrantes e, depois de um determinado momento, não se pode fazer muito a respeito – o que constitui um problema na remediação de contaminantes orgânicos.

A estrutura química dos aromáticos é considerada muito estável e, por este motivo, leva a uma grande demanda bioquímica por parte dos microrganismos que os utilizam como fonte de carbono e de energia. No entanto, muitos microrganismos desenvolveram caminhos bioquímicos para a degradação destes compostos.

2.3.4.

Química da Biodegradação de Asfaltenos de Petróleo

Segundo Atlas (1981), os caminhos metabólicos para a degradação de compostos asfaltenos foram por muito tempo os menos compreendidos. Estes constituem estruturas complexas de alto peso molecular muito difíceis de analisar.

2.3.5.

Fatores de Influência na Biodegradação

A biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo depende de fatores tais como as condições físicas e a natureza do contaminante, bem como sua própria concentração. As taxas em que as classes estruturais dos hidrocarbonetos se encontram, a disponibilidade do contaminante para os microrganismos e as características biológicas do sistema devem ser levadas em consideração na avaliação da efetividade da biodegradação. A eficiência dos processos está diretamente relacionada às condições ambientais do sítio contaminado (Van Hamme et al., 2003).

O gerenciamento da sub-superfície para fins de biodegradação pode envolver não só o monitoramento da atenuação natural como também o desenvolvimento de sistemas de engenharia para criar condições ótimas para a aceleração do processo. A atenuação natural de contaminantes, também conhecida como biorremediação intrínseca, é uma técnica que se utiliza da capacidade dos microrganismos de biodegradar compostos orgânicos para remediar áreas contaminadas. Esta técnica não requer intervenção humana e tem como fatores limitantes a disponibilidade de nutrientes e de oxigênio e/ou a falta de homogeneidade do meio. Em contrapartida, a implementação de biorreatores (biorremediação de engenharia) pode ser direcionada no sentido de explorar a tecnologia microbiana e otimizar as taxas de degradação dos contaminantes (Van Hamme et al., 2003).

As taxas de crescimento microbiano e de atividade enzimática têm efeito direto nas taxas de biodegradação. A persistência dos derivados de petróleo

depende não só da quantidade e da qualidade da mistura, como também das propriedades do ecossistema impactado (Atlas, 1981).

A seguir serão descritos alguns dos fatores de influência associados à degradação de contaminantes orgânicos.

- Biodegradabilidade do Substrato

A maioria dos compostos orgânicos é biodegradável. No entanto, sua biodegradabilidade depende da sua estrutura molecular. Uma substância orgânica considerada biodegradável a uma determinada concentração pode se tornar persistente em concentrações maiores através da inibição dos microorganismos. Em concentrações ainda maiores, a substância pode se tornar tóxica para esta mesma população microbiana.

- Composição Química dos Hidrocarbonetos

A qualidade dos hidrocarbonetos de uma mistura de petróleo tem influência direta na degradação dos componentes dos hidrocarbonetos individualmente (Atlas, 1981).

De acordo com Perry (1984), os hidrocarbonetos diferem quanto a susceptibilidade à ação dos microorganismos: n-alcanos > alcanos ramificados > ciclo-alcanos > aromáticos de baixo peso molecular.

As taxas de biodegradação são mais altas em compostos saturados (alifáticos) seguidas pelos aromáticos leves. Compostos polares e aromáticos de peso molecular acentuado são os que apresentam as taxas de biodegradação mais baixas. (Leahy & Colwell, 1990). De acordo com Dibble & Bartha (1979), asfaltenos e resinas representam os compostos menos susceptíveis à biodegradação.

Atlas (1975) realizou, em condições ótimas, experimentos com sete óleos, de diferentes propriedades físico-químicas, representativos de uma variedade usualmente transportada por navios para posterior refino. As análises da composição do óleo mostraram que, durante os 42 dias de ensaio, todas as classes de hidrocarbonetos estiveram sujeitas à biodegradação nas duas temperaturas testadas. Foi demonstrada uma preferência na degradação dos compostos

alifáticos, principalmente em temperaturas reduzidas. No entanto, tanto os alifáticos quanto os aromáticos foram biodegradados a 10°C e a 20°C em todos os óleos testados.

- Composição Química dos Asfaltenos

Os compostos asfaltenos constituem estruturas complexas e de elevado grau de dificuldade de análise (Atlas, 1981). Porém, de acordo com Dibble & Bartha (1979), a remoção dos compostos asfaltenos é mais efetiva em condições em que os alifáticos são menos biodegradados.

- Estado Físico dos Poluentes

No caso dos hidrocarbonetos de petróleo, o estado físico do contaminante tem efeito importante na sua biodegradação. Em concentrações baixas, os hidrocarbonetos são solúveis em água, no entanto, na maioria dos derramamentos estes se encontram em concentrações muito acima dos limites de solubilidade (Atlas, 1981).

De acordo com Van Hamme et al. (2003) a baixa solubilidade dos hidrocarbonetos de petróleo em água limita a habilidade dos microrganismos de acessar e degradar o substrato.

O grau de espalhamento determina a superfície de contato disponível para a ação dos microrganismos biodegradadores. Este parâmetro é reduzido em locais onde as temperaturas são muito baixas por conta da viscosidade do óleo (Atlas, 1981).

Microrganismos degradadores de hidrocarbonetos de petróleo podem ser encontrados na superfície de uma gota de óleo, no entanto, o crescimento não parece ocorrer em gotas de óleo que não estejam envoltas por água (Atlas, 1981). A disponibilidade de áreas de contato maiores pode aumentar a biodegradação.

A adição de surfactantes pode acelerar a biodegradação. A dispersão de hidrocarbonetos sob a forma de emulsões *oil-in-water* aumenta a superfície de contato do óleo e, como consequência, a sua disponibilidade ao ataque microbiano (Leahy & Colwell, 1979). No entanto, em alguns casos, o uso de surfactantes pode resultar em um impacto ainda maior do que a própria contaminação por

hidrocarbonetos de petróleo, uma vez que estes podem conter elementos químicos que inibem a ação dos microrganismos (Atlas, 1981).

Grandes quantidades de mousse (*water-in-oil*) geram condições desfavoráveis e podem inibir a biodegradação, uma vez que a razão entre superfície e volume é muito baixa (Leahy & Colwell, 1990).

Ao serem expostos às intempéries do meio ambiente natural, os hidrocarbonetos de petróleo podem formar agregados também conhecidos como “bolas de piche” conferindo grande resistência à biodegradação devido à sua limitada superfície de contato (Atlas, 1981 e Dibble & Bartha, 1979).

- Doadores e Aceptores de Elétrons

Os microrganismos produzem energia através da transferência de elétrons entre aceptores e doadores. Estas reações podem ser aeróbias, utilizando o oxigênio comoceptor de elétrons, ou anaeróbias, utilizando, por sua vez, o nitrato, o sulfato e o dióxido de carbono como aceptores de elétrons. Muitos contaminantes orgânicos podem ser utilizados como substratos primários para o metabolismo microbiano. Neste caso, o contaminante atua como doador de elétrons e como fonte de carbono para as células microbianas. Portanto, algumas reações de degradação produzem energia e carbono, resultando no crescimento microbiano (Alvarez-Cohen, 1993). Alguns contaminantes funcionam ainda como aceptores de elétrons.

- Oxigênio

De acordo com Atlas (1981) há discordâncias a respeito da real necessidade de oxigênio na biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo. No entanto, a possibilidade de o contaminante ser degradado por processos anaeróbios não deve ser descartada. Acredita-se que compostos tais como o nitrato e o sulfato funcionem como aceptores de elétrons alternativos durante a respiração anaeróbia.

Contraditoriamente, em estudos conduzidos por Ward et al. (1980), os hidrocarbonetos de petróleo foram considerados imunes aos ataques microbianos em condições anaeróbias, tendo sido, portanto, preservados no ambiente.

Entretanto, apesar de alguns estudos sugerirem a ineficiência de processos anaeróbios na biodegradação de contaminantes orgânicos, são considerados processos de grande importância na atualidade.

Por conta da baixa solubilidade do oxigênio em água, a maior limitação cinética da biodegradação por processos aeróbios é a disponibilidade de oxigênio, especialmente no caso de compostos como hidrocarbonetos de petróleo que possuem alta demanda biológica de oxigênio (Alvarez-Cohen, 1993).

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

A utilização de técnicas como *air sparging* na água e bioventilação no solo pode contribuir para a aceleração e a efetividade do processo de biodegradação. Porém, como quaisquer técnicas de remediação, apresentam desvantagens dependendo do ambiente em que a área contaminada estiver inserida. Deve-se, portanto, avaliar as condições de campo antes de instalar o sistema de remediação em questão.

- Umidade

A biodegradação requer a manutenção de uma determinada umidade, basicamente por dois motivos: o crescimento celular – o tecido celular é constituído por 75 a 80% de água; o meio de movimento para os microorganismos aos substratos, ou vice-versa, para o caso de espécies não móveis.

A biodegradação em solos pode ocorrer em teores de umidade abaixo da saturação. Acredita-se que o teor de umidade mínimo para que solos contaminados sejam biodegradados corresponde a um grau de saturação de 40% (La Grega, 1994).

Segundo Dibble & Bartha (1979) a biodegradação aeróbia de contaminantes orgânicos em solos é ótima quando a capacidade de retenção de água varia entre 50 e 70%. A inibição quando este valor encontra-se abaixo da faixa desejada deve-se a uma atividade inadequada. O mesmo ocorre quando a capacidade de retenção apresenta valores acima de 70%, no entanto, a inibição neste caso está diretamente relacionada com a aeração do solo.

A biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo pode ser limitada pela água disponível para o crescimento e o metabolismo dos microrganismos do solo (Leahy & Colwell, 1990).

- Temperatura

A temperatura influencia profundamente todos os processos biológicos e pode ter um efeito significativo na biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo (Leahy & Colwell, 1990; ZoBell, 1946; La Grega, 1994).

De acordo com Dettmer (2002), os processos microbianos são muito dependentes das características do meio no qual os microrganismos estão inseridos. A variação periódica de temperatura no subsolo determinará os tipos de microrganismos selecionados naquele ambiente, sendo importante ressaltar que temperaturas específicas dentro desta variação afetam sensivelmente os processos microbiológicos.

A atividade celular (em especial as enzimas) aumenta consideravelmente com a temperatura até que seja atingido um valor ótimo. Uma temperatura acima da temperatura ótima pode retardar consideravelmente o crescimento celular, desativando as enzimas e reduzindo a capacidade reprodutiva das células. A exposição contínua a temperaturas elevadas pode desnaturar os lipídios da membrana e resultar na morte da célula. Ao contrário das altas temperaturas, temperaturas muito baixas não são letais. Neste caso, as células ficam “adormecidas”. A atividade celular decai por conta da atividade enzimática reduzida e da perda da fluidez das membranas celulares, restringindo o transporte de moléculas de substrato. Um decréscimo repentino na temperatura causa um impacto muito maior do que um decréscimo gradual para a mesma temperatura, já que permite que a população microbiana se aclimate concomitantemente ao mesmo (La Grega, 1994).

De acordo com Atlas & Bartha (1972) os efeitos da temperatura podem variar de acordo com a composição dos hidrocarbonetos da mistura de petróleo. Quando sujeita a baixas temperaturas, a viscosidade do óleo aumenta e não só a volatilização de cadeias curtas tóxicas de alcanos é reduzida como também a sua solubilidade em água, retardando o processo de biodegradação.

Tanto o clima quanto as estações do ano podem ser responsáveis por uma seleção de populações microbianas distintas adaptadas às temperaturas ambientes (Leahy & Colwell, 1990).

Segundo ZoBell (1969) a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo pode ser em torno de uma ordem de grandeza maior a 25°C do que a 5°C.

Leahy & Colwell (1990) não observaram em seus experimentos variação na atividade biodegradadora dos microrganismos do solo em temperaturas acima de 20°C.

Atlas (1975) analisou a biodegradabilidade de sete tipos de óleos cru e pôde comprovar a dependência da biodegradação na composição e na temperatura de incubação. Os ensaios de biodegradação ocorreram a temperaturas de 10 e 20°C e a mineralização dos óleos foi monitorada através das emissões de dióxido de carbono. A combinação das perdas abióticas e das perdas por biodegradação resultou na remoção de até 80% dos óleos menos densos e de até 50% dos óleos mais pesados. As perdas por biodegradação a 10°C foram menores do que as perdas a 20°C, os óleos mais densos seguiram a mesma tendência e apresentaram as menores perdas.

- pH

Ao contrário dos ecossistemas aquáticos, o pH dos solos pode ser bastante variável (Leahy & Colwell, 1990). A maioria das bactérias e fungos favorece um pH neutro, sendo os fungos mais tolerantes a pHs ácidos.

A atividade enzimática depende do pH. A quantidade de determinada enzima em estado ativo varia com mudanças no pH, sendo o valor máximo obtido com pH ótimo. Da mesma maneira, o crescimento de bactérias está diretamente relacionado com o pH. A maioria das bactérias cresce em uma faixa de valores relativamente estreita, em torno de um pH neutro (La Grega, 1994). Valores extremos de pH costumam ter um efeito negativo na habilidade dos microrganismos de biodegradar hidrocarbonetos (Leahy & Colwell, 1990). A atividade microbiana pode alterar o pH externo. Como exemplos desta situação podem ser citadas a fermentação anaeróbia e a nitrificação (La Grega, 1994).

De acordo com Dibble & Bartha (1979) o aumento do pH de solos contaminados através da adição de CaCO_3 teve um efeito positivo na

biodegradação de borra oleosa. Após alguns testes, um pH de 7,8 resultou nas maiores taxas de produção de CO₂, dando evidências de que o processo de biodegradação é efetivo.

- Disponibilidade de Nutrientes

A massa celular contém carbono e uma série de outros elementos. O metabolismo requer estes elementos como nutrientes da mesma maneira que requer carbono inorgânico como substrato. O fósforo e o nitrogênio são considerados macronutrientes por serem necessários em maiores quantidades do que outros elementos na síntese celular (La Grega, 1994). As quantidades de nitrogênio e de fósforo necessárias para converter cadeias de carbono em biomassa podem ser calculadas através das proporções C:N e C:P encontradas no material celular (Dibble & Bartha, 1979). Porém é importante ressaltar que os resultados obtidos podem induzir ao erro, já que nem sempre os nutrientes estão disponíveis para os microrganismos do solo.

As limitações na biodegradação de hidrocarbonetos em um derramamento de petróleo devido a um “desequilíbrio nutricional” entre o carbono fornecido e as concentrações de nitrogênio e fósforo necessárias para o crescimento microbiano (Dibble & Bartha, 1979) foram motivo de vários estudos na literatura. As taxas de reabastecimento de nutrientes são geralmente inadequadas para suportar a rápida biodegradação de óleo, principalmente caso este se encontre em concentrações elevadas. A adição de fertilizantes que contenham nitrogênio e fósforo é uma das ferramentas a ser utilizada no intuito de estimular a degradação de hidrocarbonetos de petróleo pelos microrganismos do solo (Atlas, 1981).

Dibble & Bartha (1979) obtiveram as maiores taxas de biodegradação de óleo em solos cuja relação C/N era de 60:1 e a relação de C/P era de 800:1.

Os micronutrientes necessários ao metabolismo incluem: enxofre, potássio, cálcio, magnésio, ferro, entre outros. Para que o movimento dos íons através da parede da membrana celular seja possível, os micronutrientes devem ter uma concentração mínima na água de 1 a 100 mg/L (La Grega, 1994).

De acordo com Sarkar et al. (2005), estatisticamente não foram encontradas diferenças significativas entre a bioestimulação (através da adição de nutrientes) e

a atenuação natural em solos que apresentam alta concentração de microrganismos nativos.

- Monitoramento

De acordo com Alvarez-Cohen (1993) o monitoramento das águas subterrâneas e dos aquíferos é essencial para avaliar o progresso da biorremediação *in situ*. Os fatores geralmente analisados a partir de amostras do sítio contaminado incluem a concentração de contaminante, o número de microrganismos, a concentração de aceptores e doadores de elétrons, a demanda de oxigênio, os produtos da degradação, o pH, e a concentração de alguns íons de importância.

2.4.

Técnicas para Verificar a Ocorrência da Biorremediação *in Situ*

Para que se possa afirmar que a biorremediação está ocorrendo deve haver evidências de que os microrganismos estão envolvidos no processo de degradação do contaminante, ou seja, deve-se ter a certeza de que o contaminante não volatilizou, migrou, foi adsorvido ao solo ou sofreu mudanças por reações químicas abióticas.

O Comitê de Biorremediação *In Situ* (National Research Council, 1993) recomenda o uso de uma estratégia que se baseia em três informações para verificar a ocorrência da biorremediação. São elas:

- ✓ Perda de contaminante.
- ✓ Estudos de laboratório mostrando que os microrganismos presentes nas amostras dos sítios de contaminação têm o potencial para transformar os contaminantes sob condições de campo esperadas.
- ✓ Um ou mais dados mostrando que o potencial de biodegradação está realmente acontecendo no campo.

Há duas maneiras de demonstrar que os microrganismos estão degradando ativamente o contaminante: medidas de amostras de campo e ensaios de campo.

Uma terceira, a modelagem, fornece um melhor entendimento do destino dos contaminantes no campo. No entanto, nenhuma das técnicas supracitadas pode, isoladamente, demonstrar com elevado grau de certeza que a biodegradação é a causa principal na redução da concentração de contaminantes. Uma estratégia efetiva, geralmente, combina o uso de várias técnicas.

2.5.

A Problemática do Óleo

As maiores fontes de contaminação dos solos e das águas subterrâneas são constituídas pelos contaminantes orgânicos, dentre os quais os hidrocarbonetos derivados de petróleo são produtos freqüentemente detectados.

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos e outros compostos orgânicos cujo refino gera volumes consideráveis de resíduos oleosos de composição variável de acordo com sua origem, estocagem e histórico de tratamento.

Os óleos minerais, utilizados como lubrificantes, são originários do petróleo cru e beneficiados através de seu refino, constituindo óleos potencialmente poluentes cujas propriedades e qualidades dependem da procedência e da viscosidade do petróleo cru. Podem ser distinguidos três tipos de óleos minerais: parafínico, naftênico e misto.

Os estudos de óleos minerais são de fundamental importância para o entendimento não só da mobilidade e do transporte através de meios porosos, como também da susceptibilidade aos processos bióticos de degradação em um sítio de contaminação.