

**VI-301 - BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO POR ISOBUTANOL, BIS-2-ETILHEXILFTALATO E DI-ISODECILFTALATO EM REATOR EM FASE DE LAMA****Ieda Domingues Ferreira<sup>(1)</sup>**

Doutora em Engenharia Hidráulica e Sanitária pela Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

**Dione Mari Morita**

Professora Associada do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Av. Prof. Almeida Prado, trav. 2, 83; Butantã; São Paulo – SP; Brasil; CEP: 05508-900 – email: ieda\_domingues@yahoo.com.br**RESUMO**

No presente estudo, utilizou-se a técnica da biorremediação com reator aeróbio em fase de lama (*slurry phase*), para tratar um solo industrial contaminado pelos plastificantes DEHP (Bis-2-etilhexilftalato), DIDP (Diisodecilftalato) e pelo álcool isobutílico. A preparação do solo para a biorremediação constou apenas de homogeneização manual e após sua introdução no reator, o solo recebeu o inóculo adaptado, razão de 6 gSSV kg<sup>-1</sup> solo seco, retirado da estação de tratamento de efluentes por Lodos Ativados de uma indústria de plastificantes. O reator foi monitorado durante 120 dias, sendo corrigida a umidade durante este período. A técnica de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), utilizada para verificação da diversidade genética das populações bacterianas, evidenciou que as populações foram se diferenciando ao longo do tratamento em relação àquelas presentes na lama inicial. A remoção de contaminantes foi acima de 70% ao final da biorremediação. A biodegradação dos ftalatos seguiu uma cinética de pseudo-primeira ordem e ocorreu em temperaturas consideradas baixas, entre 17 e 25°C, no entanto, as mesmas não foram restritivas para a biorremediação deste solo. A presença de um co-substrato de menor cadeia alquílica, como o álcool isobutílico, não impediu a biodegradação de compostos de cadeias complexas como os ftalatos de alto peso molecular. Após 100 dias de tratamento, foi identificado, através de cromatografia gasosa e espectrometria de massa, o 2-etil hexanol, um subproduto da biodegradação do Bis-2-etilhexilftalato e após 120 dias, os teores finais de DEHP estavam abaixo do valor de intervenção de 10mg kg<sup>-1</sup> solo seco, recomendados pela CETESB.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biorremediação, Solo contaminado, Reator em fase de lama, Ftalatos, Disruptores endócrinos.**INTRODUÇÃO**

Os ésteres de ácidos ftálicos (dialquil ou alquil aril éster do ácido 1,2 benzeno dicarboxílico), comumente chamados de ésteres ftálicos ou simplesmente ftalatos, são amplamente utilizados como plastificantes em indústrias químicas, servindo como um importante aditivo às resinas de policloreto de vinila (PVC) e a outras, como acetato de polivinila, poliuretano e resinas celulósicas. São empregados, ainda, na produção de repelentes de insetos, fibras sintéticas e cosméticos (USATSDR, 2002). Os ftalatos de alto peso molecular são considerados potencialmente carcinogênicos, teratogênicos e causadores de disfunções endócrinas (Paganetto et al., 2000; Petrovic et al., 2000).

Devido à utilização global dos plásticos e à disposição final e sem controle dos mesmos, os ftalatos têm sido detectados na água, no ar e no solo. Os ésteres dimetilftalato, dietilftalato, di-n-butilftalato, butilbenzilftalato, bis-2-etilhexilftalato e di-n-octilftalato foram considerados poluentes prioritários pela Agência de Proteção Ambiental Americana – Environmental Protection Agency (USEPA). A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental Paulista aprovou os Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo, estabelecendo como valor de intervenção 10mg kg<sup>-1</sup> solo seco industrial para o DEHP (CETESB, 2005). No Brasil, a primeira regulamentação federal específica, Resolução Conama nº 420, foi publicada em dezembro de 2009, pelo Ministério do Meio Ambiente (BRASIL, 2009). Esta resolução dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e

estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas.

A contaminação do solo e das águas subterrâneas tem sido objeto de grande preocupação nas três últimas décadas em países industrializados, como os Estados Unidos e em países da Europa. No Brasil, um diagnóstico preliminar do Ministério da Saúde, realizado entre 2001 e 2003, indicou a existência de 15.237 áreas potencialmente contaminadas no país; no entanto, um diagnóstico confirmatório, em 2004, identificou a existência de 689 áreas potenciais e efetivas com populações expostas ou sob risco de exposição a solos contaminados e em 2007, este número foi de 700 áreas (BRASIL, 2007). Esse problema ambiental torna-se mais grave em centros urbanos industriais, a exemplo dos existentes no Estado de São Paulo, onde a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), em maio de 2002, tornou pública a primeira relação de áreas contaminadas, na qual figuravam 255 sítios. A última atualização, divulgada em dezembro 2010, apontou a existência de 3675 registros na Relação de Áreas Contaminadas e Reabilitadas no Estado de São Paulo, e deste total, 17 continham ftalatos (CETESB, 2010).

A biorremediação destaca-se, dentre as técnicas de descontaminação disponíveis, como uma alternativa para remover poluentes tóxicos utilizando atividade biológica natural. Por outro lado, os reatores biológicos em fase de lama destacam-se dentre as alternativas de biorremediação *ex-situ*, para tratar solos contaminados com elevados teores de poluentes hidrofóbicos e recalcitrantes, sob condições ambientais controladas (Robles-Gonzalez et al., 2008). As pesquisas envolvendo a biorremediação ainda são escassas no Brasil, assim como a sua implantação em escala real. No Estado de São Paulo, por exemplo, considerando as 1772 áreas com processo de remediação em andamento ou finalizado até dezembro de 2010, divulgadas pela CETESB, verifica-se que a técnica da biorremediação foi aplicada somente em 34 áreas. Os fatores que influem no sucesso desta técnica ainda não são bem conhecidos, sendo a proposta desta pesquisa contribuir para a determinação destes fatores em solos brasileiros contaminados com DEHP (Bis-2-etilhexilftalato) e DIDP (Di-isodecilftalato).

## MATERIAL E MÉTODOS

O solo utilizado neste estudo foi retirado de uma indústria petroquímica, produtora de plastificantes, localizada no Estado de São Paulo desde 1950, a qual produz, a partir da reação de esterificação entre anidrido ftálico e álcool, os plastificantes Bis-2-etilhexilftalato e Di-isodecilftalato.

### Coleta e caracterização do solo e inóculo:

Foram retirados 200 kg de solo, entre 1 e 2m de profundidade, sendo determinados, nas amostras em triplicatas: curva granulométrica; pH; matéria orgânica; macro e micronutrientes, utilizando os métodos da Embrapa (1999), bem como a umidade, de acordo com a Norma CETESB L6.350 (CETESB, 1990). O Fósforo Total foi determinado por espectrometria de emissão atômica com plasma induzido - ICP-AES, utilizando o equipamento Gênesis SOP. O procedimento para a determinação analítica consistiu na homogeneização prévia de 1g da amostra em almofariz de ágata, sendo adicionados 10 mL de ácido nítrico concentrado e levado a aquecimento sob refluxo a 100 °C (utilizando balão de 100 mL e condensador) durante 3 horas. Posteriormente, foram adicionados 4,0 mL de peróxido de hidrogênio (30% volume) e levado a aquecimento por 1 hora. Após resfriamento, a solução foi filtrada e coletada em balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com água ultra pura Milli-Q, sendo posteriormente levada a leitura no ICP-AES.

O inóculo utilizado na biorremediação foi retirado do tanque de areação da estação de tratamento de águas residuárias da unidade industrial de plastificantes. Foram determinados os parâmetros pH e temperatura imediatamente após a coleta; sólidos em suspensão totais e voláteis (SSV); Carbono Orgânico Total (COT); Nitrogênio Total Kjeldahl e fósforo total, conforme os procedimentos descritos no APHA, AWWA, WEF (2005).

### Biorremediação *ex-situ*:

O tratamento *ex-situ* foi conduzido utilizando-se a técnica da biorremediação com reator aeróbio em fase de lama (*slurry phase*), volume de 400 litros e mistura intermitente, garantida através de temporizador automático. A biorremediação de 100 kg do solo contaminado com ftalatos foi realizada por micro-organismos autóctones do solo e através da adição de inóculo (6 gSSV kg<sup>-1</sup> de solo seco), 100 mL de solução de 50 gKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup> e água, sendo esta última introduzida a cada 15 dias, para manter a umidade do solo em torno de 40%.

### Monitoramento da Biorremediação:

Foram monitorados, a partir de amostras coletadas a cada 15 dias, os teores de ftalatos e de álcool; pH e umidade (em triplicatas). A temperatura foi determinada dentro do reator em três diferentes pontos. A partir da retirada de amostras mensais, foram monitorados os metabólitos da biodegradação e a diversidade da população bacteriana (em triplicatas).

O pH do solo, durante a biorremediação, foi determinado utilizando a metodologia da Embrapa (1999) e a umidade, conforme a Norma CETESB L6.350 (CETESB, 1990).

Os contaminantes do solo foram extraídos segundo a metodologia EPA 3540 (USEPA, 1996) e os teores, determinados por cromatografia gasosa, de acordo com o método 8061A da EPA (USEPA, 1996). As condições cromatográficas foram: injeção de 2 µL do extrato do solo em um cromatógrafo gasoso CP-3380 da Varian; injetor no modo *splitless* (sem divisão da amostra); temperatura no injetor: 280° C, gás de arraste: Hélio, vazão 48 mL min<sup>-1</sup>; Forno: temperatura inicial 40° C durante 2 minutos, rampa de temperatura 20° C min<sup>-1</sup>, temperatura final 300° C; Coluna: RTX - 35 Restec (*cross-linked methylsilicone*), com diâmetro interno de 0,32 mm, comprimento de 30 m e espessura do filme de 1,5 µm. Gás de arraste: Hélio, vazão 7,0 mL min<sup>-1</sup>, pressão 30,30 psi (constante), velocidade média 86 cm s<sup>-1</sup>. Detector de ionização de chama (FID), temperatura 300° C, ar comprimido: 300 mL min<sup>-1</sup> e Hidrogênio: 15 mL min<sup>-1</sup>, gás make-up Nitrogênio: 30 mL min<sup>-1</sup>.

As análises para identificação dos subprodutos da biodegradação foram realizadas por cromatógrafo GC-17A da Shimadzu, acoplado a espectrômetro de massa Shimadzu Massa GCMS-QP5050 A. Injetor: modo *split*; temperatura no injetor 280 °C; gás de arraste Hélio, vazão de 30 mL min<sup>-1</sup>; Forno: temperatura inicial 60° C durante 1 minuto, rampa de temperatura de 5 ° C min<sup>-1</sup>, temperatura final de 280° C; tempo total de 65 minutos. Coluna: ZB5 (5% *phenyl*-95% *dimethylpolysiloxane*); diâmetro interno de 0,25 mm; comprimento de 30 m e espessura do filme de 0,25 µm. Gás de arraste: Hélio, vazão 4,9 mL min<sup>-1</sup>; pressão 250kpa (constante); velocidade linear de 81 cm s<sup>-1</sup>.

A diversidade genética das populações bacterianas no solo, no inóculo e durante a biorremediação foi verificada utilizando a técnica de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). A extração do DNA genômico seguiu as instruções do fabricante do kit *FastDNA® SPIN kit for Soil* (QBiogene, USA). O DNA da comunidade microbiana total das amostras foi amplificado com os primers 968-GC (5'-gc *clamp*- AAC GCG AAG AAC CTT AC -3') e 1401r (5'- CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG- 3') em uma reação de PCR (volume final de 40 µL) contendo 100 ng de DNA, 0,2 µM de cada *primer*, 200 µL de desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 µL de tampão de reação 10X, e 2 U de Taq polimerase (Invitrogen). A estratégia de PCR *touchdown* foi utilizada com o objetivo de aumentar a especificidade da amplificação e reduzir a formação de falsos produtos de PCR. O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos e 10 ciclos *touchdown* de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 58 °C (com decréscimo de 0,5 °C por ciclo) por 30 segundos, e extensão a 72 °C por 2 minutos, seguido de 25 ciclos de 94°C por 1 minuto, 53 °C por 30 segundos, 72 °C por 2 minutos. Extensão final de 72 °C por 2 minutos. A qualidade do produto de amplificação foi verificada em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio (0,5 µg mL<sup>-1</sup>). Os produtos de PCR da comunidade total foram analisados por *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE), utilizando o Bio-RadCode™ *Universal Mutation Detection System* (Bio-Rad) e o procedimento efetuado conforme o manual do fabricante. As amostras de PCR (180 a 300 ng de DNA amplificado adicionadas a um volume de 10 µL de Tampão de amostra 2X) foram aplicadas diretamente em gel de poliacrilamida 6%, com gradiente desnaturante de uréia/formamida de 35-65% e submetidas à eletroforese a 60 °C, por 14 horas a 50 V. Em seguida, o gel foi corado com SYBR Green I (*Molecular Probes*) por 2 h no escuro, observado em luz ultravioleta e fotodocumentado utilizando o sistema EpiChemi 3 Darkroom (UVP, *Biolmaging System*).

## APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### Caracterização do solo e inóculo:

Os valores de pH em água estavam na faixa de 8,3 a 8,5 e por esta razão, o solo é classificado como mediantemente alcalino (Embrapa, 1999). Os resultados da análise granulométrica: areia grossa (8%); areia fina (37±3%); silte (15±4%) e argila (40±2%), indicam tratar-se de um solo argiloso (Embrapa, 1999) e possibilitando desta forma, a elevada adsorção dos ftalatos. Os teores de Carbono Orgânico Total, 0,56±0,03%,

embora baixos, estão dentro da faixa de valores típicos para solos tropicais. Fassbender (1975) compilou dados de teor de carbono orgânico de 91 amostras de solo do Brasil, obtidos por diferentes autores, e concluiu que deste total, 50% apresentavam valores entre 0,5 e 2,0%; somente 10% ultrapassavam 4% e 5% estavam abaixo de 0,5%. O teor de Nitrogênio Kjeldahl foi  $276 \pm 7 \text{ mg kg}^{-1}$  e Fósforo Total foi  $7 \text{ mg kg}^{-1}$ , sendo necessários a adição de fósforo para a atividade microbiana, considerando as relações Carbono:Nitrogênio:Fósforo recomendadas pela CETESB (CETESB, 1990). Os teores dos micronutrientes K, Ca e Mg, foram de  $4 \text{ mmol kg}^{-1}$ ,  $57 \text{ mmol kg}^{-1}$  e  $4 \text{ mmol kg}^{-1}$ , respectivamente.

O pré-tratamento do solo, citado como uma das limitações para utilização do reator em fase de lama, não foi utilizado neste estudo, apesar da consideração de que as frações entre 0,85 a 4,00mm devem ser removidas, uma vez que a maior parte dos poluentes está concentrada nas partículas finas do solo (Robles-González et al., 2008); no entanto, esta consideração não se aplica a compostos altamente hidrofóbicos como os ftalatos, conforme estudos realizados por Ferreira; Morita (2010). Assim, a preparação do solo para a biorremediação constou apenas de homogeneização manual, não sendo efetuada a secagem e correção do pH.

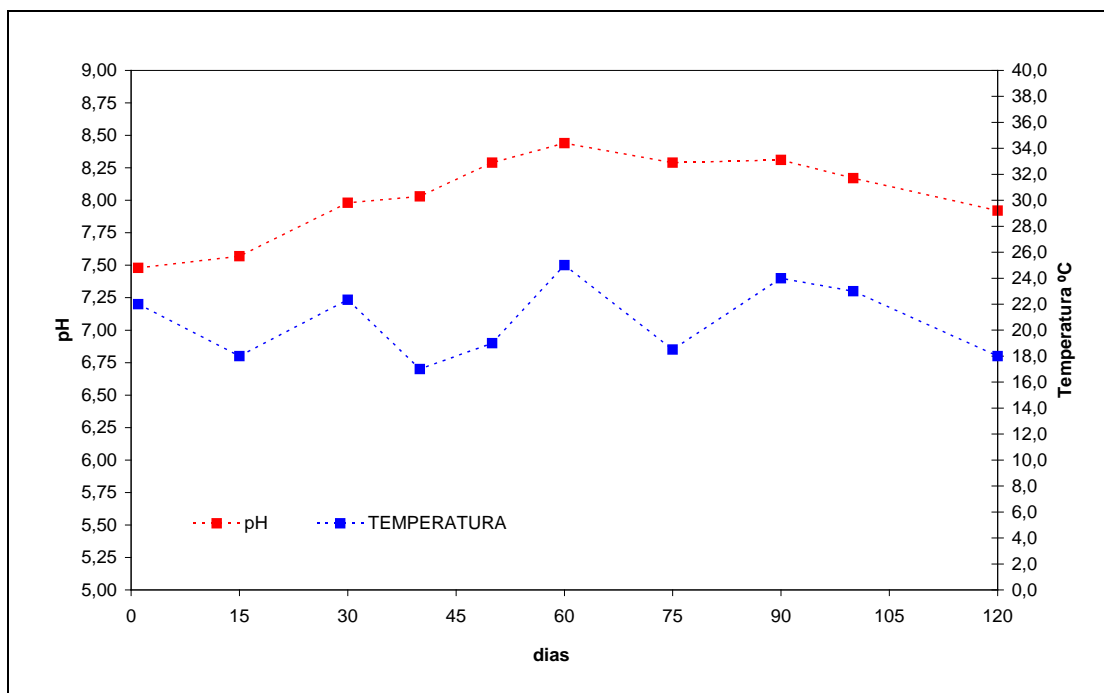
Os resultados encontrados para o inóculo foram: faixa de variação de pH 5,8 a 5,9, temperatura  $22,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , densidade  $1,0158 \pm 0,0048 \text{ g cm}^{-3}$ , Carbono Orgânico Total  $1,73 \pm 0,09 \%$ , Fósforo Total  $265 \pm 6 \text{ mg L}^{-1}$  e Nitrogênio Total Kjeldahl  $1118 \pm 30 \text{ mg L}^{-1}$ , sólidos em suspensão totais  $25737 \pm 1534 \text{ mg L}^{-1}$  e sólidos em suspensão voláteis  $23637 \pm 1457 \text{ mg L}^{-1}$ .

### Monitoramento da Biorremediação:

O valor do pH do solo no início do tratamento foi igual a 7,5 após a introdução do inóculo e, durante o tratamento, o maior valor foi de 8,4 após 60 dias (Figura 1) e de 7,9 ao final da biorremediação. A tendência ao declínio de pH durante a biodegradação de ftalatos, observada por outros autores (Juneson et al., 2001; Chang; Wang; Yuan., 2007) e justificada pela formação dos ácidos ftálicos, não foi observada nesta biorremediação *ex-situ*, possivelmente devido à capacidade de tamponamento do solo mediantemente alcalino. A faixa de pH (7,5 a 8,4) difere do valor considerado ótimo (pH 7,0) para a biodegradação de ftalatos em solos, sugerido por diferentes autores (Chang et al., 2004; Chang; Wang; Yuan, 2007; Shailaja et al., 2008; Zeng et al., 2004), no entanto, não foi necessária a correção do pH. Segundo a USEPA (1995), a maioria das bactérias desempenha melhor suas atividades na faixa de pH 5 a 9, embora diferentes espécies apresentem valores diferentes do pH ótimo para o seu crescimento.

A temperatura do solo no reator variou de 17 a  $25^{\circ}\text{C}$  durante a biorremediação, estando esta faixa abaixo do valor ( $30^{\circ}\text{C}$ ) considerado ótimo para biodegradação de ftalatos (Chang et al., 2004; Chang; Wang; Yuan, 2007). Os menores valores ocorreram 40 dias após o início do tratamento, no entanto, nesta data, não foram observadas reduções na remoção dos ftalatos. A temperatura ambiente estava 1,0 a  $5,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  acima das temperaturas do solo no reator., Conforme a USEPA (1995), a temperatura ótima de crescimento das bactérias em um determinado solo depende do clima da região, o que pode justificar os resultados encontrados no presente trabalho.

A umidade durante a biorremediação variou de 35 a 45%, sendo esta faixa satisfatória para a biodegradação aeróbia dos poluentes pelos micro-organismos autóctones e alóctones, estando dentro dos valores recomendados pela USEPA (USEPA, 1995).



**Figura 1 – Evolução do pH e da temperatura na Biorremediação**

Os teores de contaminantes presentes no solo do reator inicialmente foram de  $15 \pm 1 \text{ mg kg}^{-1}$  solo seco para o álcool isobutílico, de  $18 \pm 2 \text{ mg kg}^{-1}$  solo seco para o DEHP e de  $69 \pm 1 \text{ mg kg}^{-1}$  solo seco para o DIDP.

Os resultados obtidos (Tabela 1) indicam que a biorremediação dos ftalatos seguiu uma cinética de pseudo-primeira ordem (Zeng et al., 2004), não sendo observada a fase *lag* durante a biodegradação dos ftalatos. A presença do álcool isobutílico, co-substrato de menor cadeia alquílica, não impediu a biodegradação de compostos de cadeias mais complexas e considerados recalcitrantes como os ftalatos. Na biodegradação do álcool foi observada uma fase *lag* nos 15 dias iniciais do tratamento, no entanto, este composto apresentou maior taxa de degradação do que o DEHP e DIDP, embora não tenha sido totalmente degradado no período, com teor final de  $3 \pm 0 \text{ mg kg}^{-1}$ . A plastificação do solo pode ter contribuído para evitar a perda do álcool isobutílico por volatilização, estando este composto possivelmente presente nos poros intersticiais do solo.

Após 120 dias de biorremediação, foram obtidas remoções acima de 70% para todos os contaminantes. O teor final de DEHP foi de  $3 \text{ mg kg}^{-1}$  solo seco, estando abaixo do valor de intervenção de  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  solo seco recomendado pela CETESB para o DEHP em solo industrial. O teor final do plastificante DIDP foi de  $21 \pm 1 \text{ mg kg}^{-1}$ , no entanto, não existe limite para este poluente estipulado pela Agência de Controle da Poluição Ambiental Paulista (CETESB, 2005) ou pelo Ministério do Meio Ambiente do Brasil (BRASIL, 2009).

Neste estudo, a taxa de degradação do DEHP ( $0,0077 \text{ d}^{-1}$ ) está abaixo daquelas encontradas por outros autores (Chang et al. 2004; Chang; Wang; Yuan, 2007; Shailaja et al. 2008; Zeng et al., 2004), considerando que estas pesquisas foram desenvolvidas com solos artificialmente contaminados, em escala de laboratório, com correções dos parâmetros de monitoramento (pH e temperatura) e utilizando solos advindos de clima temperado.

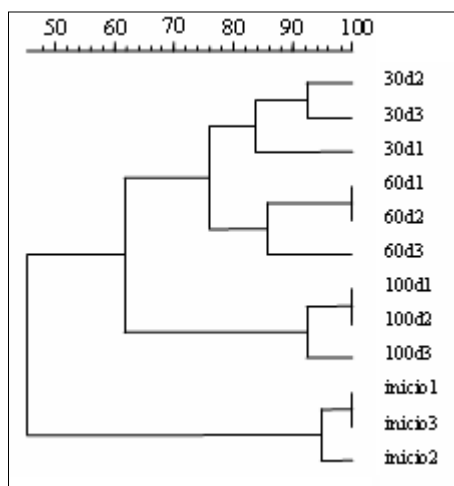
**Tabela 1 – Equação cinética de biodegradação dos contaminantes presentes no solo**

Contaminante	Equação cinética	K	$r^2$
Álcool isobutílico	$y = 0,1992e^{-0,0171x}$	0,0171	0,8512
DEHP	$y = 0,8176e^{-0,0077x}$	0,0077	0,8800
DIDP	$y = 0,1441e^{-0,0097x}$	0,0097	0,9626

Y: teor de contaminante ( $\text{mmol kg}^{-1}$ ); x: tempo (dias); k: constante de degradação ( $\text{dia}^{-1}$ );  $r^2$ : Coeficiente de determinação



O tratamento do solo em fase de lama e sob mistura permite um aumento de transferência de massa, garantindo o contato micro-organismo-poluentes-nutrientes e a dessorção dos poluentes hidrofóbicos (Robles-González et al., 2008). Nas condições do reator utilizado neste estudo, sem correção do pH e da temperatura, as taxas de degradação dos poluentes dependeram principalmente da atividade dos micro-organismos disponíveis no sistema e os resultados obtidos refletiram o potencial de depuração biológica do solo. As análises de *fingerprint* da comunidade total de bactérias presentes no reator durante 100 dias de processo, bem como o respectivo dendrograma de similaridades (Figura 2), baseado no coeficiente de correlação de Pearson, demonstraram a importância das bactérias advindas do inóculo para iniciar a biorremediação, bem como a importância das bactérias autóctones para a continuidade da mesma. No dendrograma de similaridades, as amostras referentes ao tempo inicial de tratamento (início) foram consistentes e apresentaram 94 a 100% de similaridade entre as triplicatas, entretanto, estas amostras mostraram-se significativamente distintas das correspondentes aos demais tempos de tratamento (30, 60 e 100 dias), com nível de similaridade em torno de 48%.



**Figura 2 – Dendrograma de similaridades entre as bandas de DGGE durante a biorremediação  
d: dias; 1, 2 e 3 : triplicatas**

As análises de *fingerprint* (Figura 3) do solo escavado, inóculo e do solo do reator, todas em duplicatas, evidenciaram que os perfis de bandas encontradas no início da biorremediação são altamente similares com aquelas do inóculo, sugerindo que as bactérias presentes no mesmo correspondem às populações dominantes no reator. Após 30 dias, os perfis de bandas apresentaram similaridade com os perfis do solo inicialmente escavado. Isto demonstra que, provavelmente, nesta fase do processo, as bactérias autóctones do solo passaram a dominar a comunidade do reator, possivelmente, em função de sua adaptação aos teores de contaminantes presentes e eventual capacidade de degradação dos mesmos, com a redução média de 53% no teor de DEHP. Os perfis de bandas das amostras de 60 e 100 dias de processo indicaram que as populações foram se diferenciando ao longo do tratamento em relação às presentes no início da biorremediação. Os resultados das análises de cromatografia gasosa e espectrometria de massa indicaram, após 100 dias de tratamento, a presença de um pico relativo a um novo composto no solo, não presente no cromatograma inicial do tratamento (Figura 4). Utilizando as bibliotecas NIST 107; NIST 21; SHIMADZU 1607 e WILEY 229 do espectrômetro de massa, este pico foi identificado como o 2-etilhexanol ou isooctanol. Shailaja et al. (2008), em estudo recente, chegaram à conclusão que este era um dos subprodutos da biodegradação do Bis-2-etilhexilftalato, em meio aeróbio, utilizando reator em fase de lama.

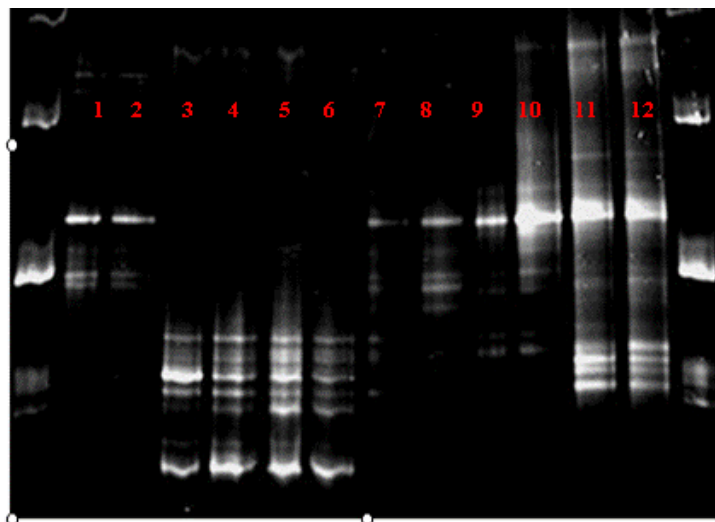


Figura 3 – Análises de *fingerprint* na biorremediação: 1-2 : solo; 3-4 inóculo; 5-6 solo início reator; 7-8 solo 30 dias reator; 9-10 solo 60 dias reator; 11-12 solo 100 dias reator

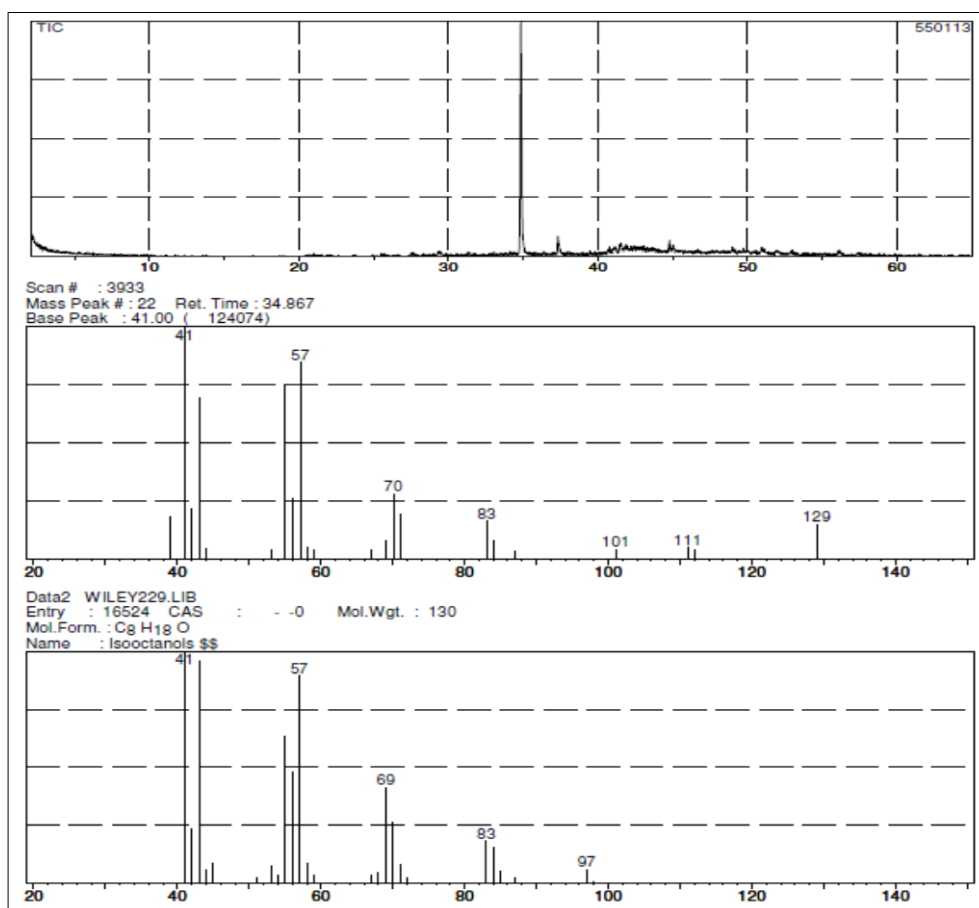


Figura 4 – Cromatograma do solo após 100 dias de biorremediação e respectivos espectros de massa do pico correspondente ao tempo de retenção de 34,867 min.

Técnicas moleculares têm sido empregadas para caracterizar os ácidos nucleicos dos micro-organismos presentes na comunidade microbiana de amostras ambientais. Elas têm a vantagem de ser técnicas diretas, as quais refletem a distribuição da comunidade microbiana nas condições *in situ*, pois as amostras são congeladas imediatamente após a coleta. São capazes de representar de maneira mais precisa a diversidade microbiana presente no ambiente, incluindo os micro-organismos que não são prontamente cultiváveis, mas que

podem ser responsáveis pelas atividades de biodegradação dos poluentes de interesse (Brockman, 1995). Técnicas baseadas em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), como a amplificação de fragmentos do gene RNAr 16S e a posterior desnaturação destes fragmentos utilizando a eletroforese DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) têm sido aplicadas para avaliar a diversidade de amostras ambientais e monitorar as alterações nas comunidades microbianas ao longo do tempo (Muyzer & Smalla, 1998).

No gel de DGGE, o número, a posição exata e a intensidade das bandas dão uma estimativa indireta da riqueza e abundância relativa dos ribotipos (perfis de bandas de fragmentos de DNAr 16S) dominantes em uma amostra, possibilitando comparar diferentes comunidades. Eichner et al. (1999) afirmaram que as bandas de DGGE não necessariamente representam o número e a abundância das espécies presentes em uma comunidade microbiana, pois um organismo pode produzir mais de uma banda devido à multiplicidade e heterogenia de genes de RNAr. Ainda assim, a técnica oferece grande sensibilidade, eficiência e capacidade de representar razoavelmente as variações em uma comunidade microbiana em um determinado sistema (Kaewpipat & Grady, 2002), o que a torna uma excelente ferramenta para monitoramento da dinâmica de populações microbianas.

## CONCLUSÕES

O desenvolvimento dessa pesquisa de biorremediação de solo contaminado por ftalatos e álcool permitiu chegar às seguintes conclusões:

- A adição de inóculo adaptado, proveniente do conteúdo do tanque de aeração do sistema de lodos ativados da indústria de plastificantes, na razão de 6 gSSV kg<sup>-1</sup> solo seco, foi satisfatória para a biorremediação;
- Não foi necessária a correção do pH inicial do solo ou durante a biorremediação (7,5 a 8,4), mesmo estando esta faixa de valores acima do pH (7,0) recomendado para a biodegradação dos ftalatos;
- A biodegradação dos ftalatos ocorreu em temperaturas entre 17 e 25°C, mesmo estando esta faixa abaixo daquela considerada ótima (30°C) pela literatura;
- A biodegradação dos ftalatos seguiu uma cinética de pseudo-primeira ordem, não sendo identificada fase lag;
- A presença do álcool isobutílico não impediu a biodegradação dos ftalatos, apresentando, no entanto, uma taxa de degradação maior;
- A utilização da técnica de DGGE permitiu verificar a diversidade da comunidade total de bactérias durante a biorremediação e indicou que as bactérias presentes no inóculo foram dominantes no início do processo, alterando-se a dominância para as bactérias provenientes do solo após 30 dias, ocorrendo, no entanto, uma diferenciação maior da comunidade bacteriana presente no reator após 60 e 100 dias, sendo, ao final do experimento, composta por populações dominantes advindas do solo e inóculo com remoções acima de 70% para os contaminantes;
- Após 100 dias de biorremediação, utilizando a técnica do reator aeróbio em fase de lama (*slurry phase*), foi identificado o 2-etilhexanol como subproduto da biodegradação do DEHP.

## AGRADECIMENTO

Este trabalho recebeu auxílio da FAPESP (Fundação de Amparo À Pesquisa no Estado de São Paulo).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA), WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA), WATER ENVIRONMENTAL FEDERATION (WEF). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington: APHA-WEF, 2005.
2. BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. RESOLUÇÃO nº 420, DE 28 DE DEZEMBRO DE 2009 Disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>. Acesso em 10 maio, 2011.
3. BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação em Saúde. *Saúde Brasil 2007 : uma análise da situação de saúde*. Ministério da Saúde: Brasília, 2007, 36p.
4. BROCKMAN, F.J. *Nucleic-acid-based methods for monitoring the performance of in situ bioremediation*. Mol. Ecol. v.4, p.45-58, 1995
5. CHANG, B.V.; YANG, C.M.; CHENG, C.H.; YUAN, S.Y. *Biodegradation of phthalates ester by two bacteria strains*. Chemosphere, v. 55, p. 533-538, 2004.



6. CHANG, B.V., WANG, T.W., YUAN, S.Y. *Biodegradation of four phthalates esters in sludge*. *Chemosphere*, v.69, p.1116-1123, 2007.
7. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). Decisão de Diretoria nº 195-2005-E. Dispõe sobre a aprovação dos Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo em substituição aos Valores Orientadores de 2001, e dá outras providências. São Paulo, 2005. Disponível em [http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/relatorios/tabela\\_valores\\_2005.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/relatorios/tabela_valores_2005.pdf). Acesso em 10 maio, 2011.
8. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). Determinação da biodegradação de resíduos – método respirométrico de Bartha. Norma L6 350. São Paulo: CETESB, 1990. 15p.
9. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). Relação de Áreas Contaminadas e Reabilitadas. 2010. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas/relacoes-de-areas-contaminadas/15-publicacoes>. Acesso em 01 maio, 2011.
10. EICHNER, C.A.; ERB, R.W.; TIMMIS, K.N.; WAGNER-DÖBLER, I. *Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community*. *Appl. Environ. Microbiol.* v.65, p.102-109, 1999.
11. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Embrapa solos; Embrapa Informática Agropecuária. *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*. Brasília: Embrapa comunicação para transferência de tecnologia, 1999. 370p.
12. FASSBENDER, H.W. Química de suelos. Instituto interamericano de ciencias agrícolas de la OEA. Turrialba, 1975. 385p.
13. FERREIRA, I. D., MORITA, D. M. *Biodegradação de Alcoóis, Ftalatos e Adipatos em um Solo Tropical Contaminado*. *Quim. Nova*, v.33, n.8, 1686-1691, 2010.
14. JUNESON, C.; WARD, O.P.; SINGH, A. *Biodegradation of bis(2-ethylhexyl)phthalate in a soil slurry-sequencing batch reactor*. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 305-313, 2001.
15. KAEWPIPAT, K.; GRADY, C.L.P. *Microbial Population dynamics in laboratory-scale activated sludge reactors*. *Water Science and Technology*, v.46, n.1-2, p.19-27, 2002.
16. MUYZER, G. & SMALLA, K. *Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology*. *J. Gen. Mol. Microbiol.*, v.73, p. 127-141, 1998
17. PAGANETO, G. O., CAMPI, F., VARANI, K. *Endocrine-disrupting agents on health human tissues*. *Pharmacol.Toxicol.*, 86: 24-29, 2000
18. PEARSON, K. *On the Coefficient of Radical Likelihood*. *Biometrika*, v. 18, p.105-117, 1926.
19. PETROVIC, M. & BARCELO, D. *Determination of anionic and non ionic surfactants, their degradation products, and endocrine-disrupting compounds in sewage sludge by liquid chromatography/mass spectrometry*. *Anal. Chem.*, 72: 4560-4567, 2000.
20. ROBLES-GONZÁLEZ, I.V., FAVA, F., POGGI-VARALDO, H. M. *A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and sediments*. *Microb. Cell Fact.*, 7: 5, 2008. Disponível em <http://www.microbialcellfactories.com/content/7/1/5>. Acesso em 10 maio, 2011.
21. SHAILJA, S., MOHAN, S. V., KRISHNA, M. R., SARMA, P. N. *Degradation of di-ethylhexyl phthalate (DEHP) in bioslurry phase reactor and identification of metabolites by HPLC and MS*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62, 143-152, 2008.
22. U. S. Department of Health and Human Services – Agency for Toxic Substances and Disease Registry (USATSDR). *Toxicological profile for di(2-ethylhexyl)phthalate*, 2002
23. U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). SW-846 MANUAL. Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods. Washington: EPA, 1996. Disponível em <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/sw846.htm>. Acesso em 10 maio, 2011.
24. U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). MANUAL. Bioventing Principles and practice. vI: Bioventing Principles. EPA/540/R-95/534a. Washington, 1995
25. ZENG, F. CUI, K.; LI, X.; FU, J.; SHENG, G. *Biodegradation kinetics of phthalate ester by Pseudomonas fluorescence FS1*. *Process Biochem.*, 39: 1125-1129, 2004