



Revista Brasileira de Ciência do Solo

ISSN: 0100-0683

revista@sbccs.org.br

Sociedade Brasileira de Ciência do Solo  
Brasil

Domingues Ferreira, Ieda; Morita, Dione Mari

Biorremediação de solo contaminado por isobutanol, Bis-2-etil-hexilftalato e Di-isodeciftalato

Revista Brasileira de Ciência do Solo, vol. 36, núm. 2, marzo-abril, 2012, pp. 643-652

Sociedade Brasileira de Ciência do Solo

Viçosa, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180222641033>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe , Espanha e Portugal  
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

## **Comissão 3.5 - Poluição, remediação do solo e recuperação de áreas degradadas**

# **BIORREMEDIÇÃO DE SOLO CONTAMINADO POR ISOBUTANOL, BIS-2-ETIL-HEXILFTALATO E DI-ISODECILFTALATO<sup>(1)</sup>**

**Ieda Domingues Ferreira<sup>(2)</sup> & Dione Mari Morita<sup>(3)</sup>**

### **RESUMO**

Embora os ftalatos sejam um dos poluentes mais frequentemente encontrados no meio ambiente, há escassez de dados na literatura sobre biorremediação de solos tropicais contaminados por esses compostos. Por esse motivo, este estudo avaliou a biorremediação de um solo contaminado com os plastificantes DEHP (Bis-2-etilhexilftalato), DIDP (Di-isodeciltalato) e álcool isobutilico, por uma indústria no Estado de São Paulo. A biorremediação ocorreu pela utilização de microrganismos presentes no solo e pela adição de inóculo adaptado em reator em fase de lama. O reator foi monitorado durante 120 dias, sendo corrigida apenas a umidade do solo. Os resultados indicaram que a biodegradação dos ftalatos seguiu uma cinética de primeira ordem e a biorremediação ocorreu na faixa de pH entre 7,4 e 8,4 e temperaturas entre 17 e 25 °C, com eficiência de remoção de contaminantes acima de 70 %. Após 120 dias, o teor de DEHP estava abaixo de 4 mg kg<sup>-1</sup>, limite estipulado pela legislação brasileira para solo de uso residencial.

**Termos de indexação:** solo tropical, biodegradação, plastificantes, dietilhexilftalato, álcool isobutilico.

**SUMMARY: BIOREMEDIATION OF SOIL CONTAMINATED WITH ISOBUTANOL, BIS(2-ETHYLHEXYL) PHTHALATE AND DIISODECYL PHTHALATE**

*Although phthalates are among the most common pollutants found in the environment, there are little data about bioremediation of tropical soils contaminated with phthalates. For this reason, the purpose of this study was to evaluate the bioremediation of an industrially used soil contaminated with Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), diisodecyl phthalate*

---

<sup>(1)</sup> Recebido para publicação em 10 de janeiro de 2011 e aprovado em 15 de dezembro de 2011.

<sup>(2)</sup> Pesquisadora do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo – USP.  
Av. Prof. Almeida Prado, trav. 2, 83, Butantã, CEP 05508-900 São Paulo (SP), Brasil. E-mail: ieda\_domingues@yahoo.com.br

<sup>(3)</sup> Professora Livre Docente do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, Escola Politécnica, USP. E-mail: d.m.morita@usp.br

(DIDP) and isobutanol, in São Paulo State. The bioremediation was based on indigenous soil microorganisms and inoculum adapted in a slurry phase reactor. The reactor was monitored for 120 days and the moisture content adjusted. The results showed that biodegradation of phthalates followed first-order kinetics, and bioremediation occurred in a pH range of 7.4 to 8.4, at temperatures from 17 to 25 °C and the phthalate removal efficiency was above 70 %. The final DEHP concentration was below 4.0 mg kg<sup>-1</sup> dry soil, which is the threshold established by Brazilian law, for soil in residential areas.

*Index terms:* tropical soil, biodegradation, plasticizers, di-2-ethylhexyl phthalate, isobutanol.

## INTRODUÇÃO

Os ftalatos têm sido detectados em diversos meios (Fromme et al., 2002; Fernandez et al., 2007; Zeng et al., 2009), devido à ampla utilização dos produtos de plástico no mundo moderno. Esses compostos tendem a se acumular no solo e sedimentos, em razão do alto coeficiente de partição octanol-água e da baixa solubilidade em água. São considerados potencialmente carcinogênicos e teratogênicos e causam danos ao fígado, aos rins e aos órgãos reprodutivos, bem como disfunções endócrinas (Foster, 2006; Swan, 2008).

A Resolução do Conama nº 420/09 estabeleceu os valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Brasil. O valor de prevenção, correspondente à concentração que pode causar alterações no solo e na água subterrânea, para o bis-2-etyl-hexilftalato, é de 0,6 mg kg<sup>-1</sup> solo seco. Os valores de intervenção – que representam as concentrações acima das quais existem riscos potenciais à saúde humana – são de 10,0, 4,0 e 1,2 mg kg<sup>-1</sup> solo seco para os usos industrial, residencial e agrícola, respectivamente (Brasil, 2009). Em 2010, a CETESB registrou 3.675 áreas contaminadas no Estado de São Paulo; desse total, 17 possuíam ftalatos em concentrações acima dos valores de intervenção (CETESB, 2010).

Entre as técnicas de descontaminação de solo disponíveis, destaca-se a biorremediação. O sucesso na aplicação dessa técnica depende das condições do próprio solo, como pH, umidade e temperatura; da disponibilidade de nutrientes; da aeração; e da presença de microrganismos degradadores do contaminante. As seguintes espécies têm demonstrado capacidade de degradar ftalatos em meio aeróbio:

*Bacillus* sp NCIM 5220 (Niazi & Karegouda, 2001); *Sphigomonas* sp. DK4 e *Corynebacterium* sp. O18 (Chang et al., 2004); *Pseudomonas fluorescens* FS-1 (Feng et al., 2004); *Delftia tsuruhatensis* TBKNP-05 (Patil et al., 2006); *Firmicutes Enterococcus* sp. OM1 (Chang et al., 2007); e *Sphigomonas* sp. DEP-AD1 (Fang et al., 2007), isoladas de sistemas de tratamento de águas residuárias;

*Pseudomonas fluorescens* B-1 (Xu et al., 2005, 2007) e *R. ruber* AS (Li et al., 2005), isoladas de sedimentos;

*Acinetobacter iwoffii* (Hashizume et al., 2002), isolada de água de rio;

*Aureobacterium saperdae* B-14840; *Micrococcus kristinae* B-14845 e *Flavobacterium aquatile* B-14842 (Jackson et al., 1996); *R. luteus* e *Bacillus brevis* (Juneson et al., 2001); *Arthrobacter* sp. (Vega & Bastide, 2003); *Mycobacterium* sp. NK 301 (Nakamiya et al., 2005); *Bacillus subtilis* no. 66 (Quan et al., 2005); *R. ruber* CQ0301 (Li et al., 2006); *Corynebacterium nitrilophilus* G11; *R. ruber* G17 e *R. rhodochrous* G2, G (Chao et al., 2006; Chao & Cheng, 2007); *Gordonia polyisoprenivorans* G1 (Chao & Cheng, 2007); e *Gordonia* sp. MTCC 4818 (Chatterjee & Dutta, 2008), isoladas de solos.

A rota metabólica descrita pela maioria dos pesquisadores citados envolve a hidrólise do éster, formando o monoéster e o correspondente álcool e, posteriormente, o ácido ftálico, sendo essa etapa definida como biodegradação primária. A fase seguinte, denominada biodegradação última, resulta na completa mineralização do ácido ftálico. Sob condições aeróbias, a degradação enzimática do monoéster procede via ácido ftálico, pelo caminho 3,4 ou 4,5 di-hidroxiftalato, até o protocatecato. A clivagem do anel aromático do protocatecato pode ocorrer na posição orto, resultando na formação do piruvato e oxalacetato, ou na posição meta, resultando em β-cetoadipato, sendo posteriormente degradado a acetil CoA e succinato.

Todos os trabalhos mencionados foram desenvolvidos com culturas puras, solos sinteticamente contaminados com um ou poucos ftalatos e condições do meio controladas (pH e temperatura). No entanto, Chatterjee & Dutta (2003), Vega & Bastide (2003), Chang et al. (2004), Li et al. (2005), Chatterjee & Dutta (2008), Wu et al. (2010), entre outros, mostraram que a melhor estratégia para biodegradar compostos orgânicos complexos é utilizar culturas mistas, pois sua assimilação requer diversos genes e enzimas. Além disso, Cartwright

et al. (2000) mostraram que até a rota metabólica muda quando há outros cossubstratos no meio, como os álcoois, frequentemente encontrados em áreas contaminadas por plastificantes. Deve-se ressaltar também que o acerto do pH para o valor ótimo e o controle da temperatura podem tornar o processo de biorremediação inviável economicamente na escala real.

Raras são as pesquisas realizadas com o intuito de biorremediar solos reais contaminados com ftalatos (Di Gennaro et al., 2005; Yuan et al., 2010); a maioria dos estudos tem como escopo apenas avaliar a biodegradação desses contaminantes por organismos específicos. Os poucos trabalhos realizados com o primeiro objetivo empregaram o reator em fase de lama (Di Gennaro et al., 2005; Mohan et al., 2006; Shailaja et al., 2008), com teores de sólidos que variaram de 5 a 33 %, injeção de ar e adição de organismos adaptados (bioaumento). Segundo Vitali (2001), Nano et al. (2003); Fuller & Manning (2004); Mohan et al. (2006), Shailaja et al. (2007) e Robles-González et al. (2008), as vantagens desse processo são: a) aumento das taxas de transferência de massa dos contaminantes da fase sólida para a líquida e melhor contato entre contaminantes, nutrientes e microrganismos; b) maiores taxas de biodegradação em comparação à biorremediação *in situ*; c) menor tempo de degradação dos contaminantes; d) possibilidade de utilização de vários aceptores de elétrons; e) melhor controle e otimização das condições operacionais; f) possibilidade do bioaumento e bioestimulação; e g) aumento da dessorção dos contaminantes e da biodisponibilidade, pela possibilidade da introdução de surfatantes e solventes.

Pelas razões expostas, o presente estudo investigou a possibilidade da biorremediação de um solo industrial contaminado com plastificantes e álcool, por meio do uso de um reator em fase de lama, sem correção de pH e de temperatura, sem adição de ar e com a introdução de microrganismos adaptados.

## MATERIAL E MÉTODOS

O solo biorremediado foi retirado de uma unidade industrial de plastificantes, que ocupa uma área de 4.000 m<sup>2</sup> e é parte integrante de uma indústria petroquímica, localizada no Estado de São Paulo desde 1950 e que produz, a partir da reação de esterificação entre anidrido ftálico e álcool, os plastificantes Bis-2-etil-hexilftalato e diisodeciftalato.

A unidade industrial está assentada sobre um aterro espesso, constituído de material retirado do entorno. A análise estratigráfica em poços de monitoramento existentes detectou uma

composição variada: camadas de material pedológico (cambissolos, organossolos, gleissolos), entremeadas com alteritas do pré-cambriano e areias do terciário e quaternário.

### Coleta de solo

Foi aberta uma cova nas dimensões de 50 x 50 x 140 cm (largura x comprimento x profundidade) e coletados 110 kg de solo, entre 0,4 e 1,4 m de profundidade. Essa quantidade foi homogeneizada manualmente para a biorremediação e a caracterização do solo. As amostras relativas às determinações granulométricas e físico-químicas foram preservadas em temperatura de 4 °C, e as relativas à caracterização microbiológica, em temperatura de -15 °C. Foi segregada uma amostra de 1 kg de solo, denominada branco, mantida em temperatura ambiente em copo Griffin aberto, para verificação das perdas de contaminantes por volatilização.

### Caracterização físico-química do solo

Para caracterização granulométrica e físico-química do solo, foram utilizados os métodos descritos por Raij et al. (2001) e Embrapa (1997). Todas as determinações foram efetuadas em triplicatas. A granulometria foi obtida pelo método da pipeta. Foram avaliados o pH em água, em CaCl<sub>2</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup> e em KCl 1 mol L<sup>-1</sup>. Os teores de N total, P, Ca e Mg foram determinados mediante resina de troca iônica. A matéria orgânica foi medida pelo método Walkley-Black. O Al trocável foi determinado utilizando-se KCl 1 mol L<sup>-1</sup> como solução extratora, e a acidez potencial (H + Al) foi obtida por extração com acetato de Ca 0,5 mol L<sup>-1</sup> a pH 7,0. Os teores de SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foram determinados pelo método do ataque sulfúrico. A umidade foi medida de acordo com a norma CETESB L6.350 (CETESB, 1990), em triplicatas.

### Coleta e caracterização do inóculo utilizado na biorremediação

O inóculo utilizado na biorremediação foi retirado da estação de tratamento de águas residuárias da unidade industrial de plastificantes. As coletas das amostras para caracterização do inóculo foram efetuadas em frascos de vidros de 100 mL, sendo posteriormente preservadas em temperatura de 4 °C até a realização das determinações analíticas, em triplicatas. As amostras relativas à caracterização microbiológica foram preservadas em temperatura de -15 °C. Foram determinados o pH e a temperatura imediatamente após a coleta, sólidos em suspensão totais e voláteis (SSV), C orgânico total (COT), N total Kjehldal e P total, conforme os procedimentos descritos em APHA, AWWA e WEF (2005).

## Determinação dos teores de ftalatos e álcool no solo

Os teores de ftalatos e álcool foram determinados por cromatografia gasosa, de acordo com o método 8061A da Environmental Protection Agency (EPA) (USEPA, 1996). Foram injetados 2 µL do extrato do solo em um cromatógrafo gasoso CP-3380 da Varian, que operou nas seguintes condições:

Injetor: modo *splitless* (sem divisão da amostra), temperatura de 280 °C;

Gás de arraste: hélio, vazão de 48 mL min<sup>-1</sup>;

Forno: temperatura inicial de 40 °C, durante 2 min, rampa de temperatura de 20 °C min<sup>-1</sup>, temperatura final de 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 de 7,0 mL min<sup>-1</sup>, pressão de 30,30 psi (constante) e velocidade média de 86 cm s<sup>-1</sup>;

Detector: detector de ionização de chama (FID), temperatura de 300 °C, gases empregados (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>.

## Caracterização molecular da microbiota

Neste estudo, foi utilizada a técnica de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), para verificação da diversidade genética das populações bacterianas no solo, inóculo e durante a biorremediação.

A extração do DNA genômico seguiu as instruções do fabricante do *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 µM 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 os objetivos 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 min e 10 ciclos *touchdown* de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 58 °C (com decréscimo de 0,5 °C por ciclo) por 30 s e extensão a 72 °C por 2 min, seguido de 25 ciclos de 94 °C por 1 min, 53 °C por 30 s e 72 °C por 2 min. A extensão final foi de 72 °C por 2 min. 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 foi 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 ureia-formamida de 35-65 %, e submetidas à eletroforese a 60 °C, por 14 h 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)*.

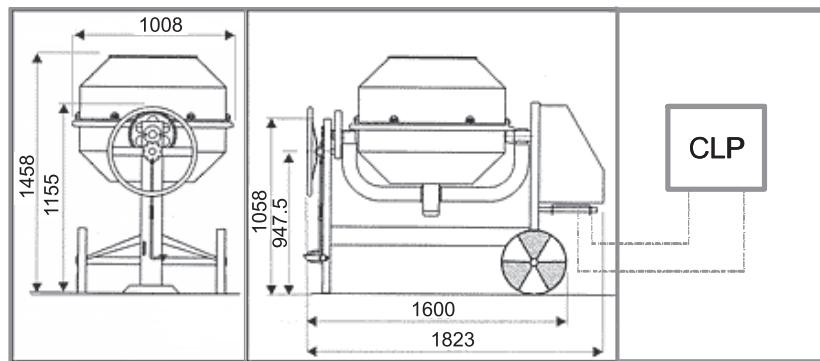
O dendrograma de similaridade foi executado utilizando o software GelCompar version 4.2 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium), sendo determinado o coeficiente de correlação de Pearson.

## Biorremediação do solo contaminado

O pré-tratamento do solo constou apenas de homogeneização manual, não sendo efetuada secagem e correção do pH. O tratamento do solo contaminado foi conduzido durante 120 dias, utilizando-se a técnica da biorremediação com reator em fase de lama (*slurry phase*). Uma vez que a intensidade de mistura é um fator crítico para esse tipo de reator e devido à característica plastificada do solo, optou-se pela utilização de uma betoneira, volume de 400 L, equipada com temporizador automático, para garantir o contato entre microrganismos, poluentes e nutrientes (Figura 1). A biorremediação de 100 kg do solo contaminado com ftalatos foi realizada por microrganismos do solo (bactérias autóctones) e por meio da adição de inóculo adaptado (bactérias alóctones) na proporção de 6 g kg<sup>-1</sup> de SSV no solo seco. Foram ainda adicionados 100 mL de solução 50 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e água, sendo esta última introduzida a cada 15 dias, para manter a umidade aproximadamente em 40 %.

## Monitoramento da biorremediação

Foram monitorados, a partir de amostras coletadas a cada 15 dias em triplicatas, os teores de ftalatos e álcool, determinados de acordo com o método 8061A da EPA (USEPA, 1996); e o pH e a umidade, determinados de acordo com a norma CETESB L6.350 (CETESB, 1990). A temperatura foi medida dentro do reator em três diferentes pontos, também a cada 15 dias, utilizando termômetros de vidro (escala 0–40 °C). A partir da retirada de amostras mensais, foi monitorada a diversidade da população bacteriana dentro do reator, empregado a técnica de PCR-DGGE.



**Figura 1.** Esquema do reator utilizado na biorremediação. CLP: temporizador automático ajustado para ligar reator durante 20 min; e desligar durante 40 min, 24 h por dia, durante 120 dias de biorremediação. Medidas em centímetros.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização granulométrica e físico-química do solo

Pelos resultados das análises granulométricas, constatou-se que o solo possuía  $400 \pm 20 \text{ g kg}^{-1}$  de argila,  $150 \pm 40 \text{ g kg}^{-1}$  de silte,  $80 \pm 0 \text{ g kg}^{-1}$  de areia grossa e  $370 \pm 30 \text{ g kg}^{-1}$  de areia fina, sendo classificado como argiloso (Embrapa, 1999). As relações silte/argila, consequentemente, foram baixas e menores que 0,4, indicando o alto grau de intemperismo do solo.

O pH em água variou de 8,3 a 8,5, o que qualifica esse solo como mediamente alcalino (Embrapa, 1999). Os valores de pH ( $\text{CaCl}_2$ ) variaram de 7,0 a 7,4, e o pH ( $\text{KCl}$ ) foi de 7,5. Esses valores estão abaixo dos obtidos em água ( $\text{H}_2\text{O}$ ), indicando carga líquida negativa na superfície do solo (Mekaru & Uehara, 1972) e capacidade de retenção de cátions.

Os teores de K, Ca e Mg foram de  $4,1 \pm 0,5$ ,  $57 \pm 0,6$  e  $4,0 \pm 1,2 \text{ mmol}_c \text{ kg}^{-1}$ , respectivamente. O valor encontrado para a capacidade de troca catiônica foi elevado:  $67,1 \pm 1,2 \text{ mmol}_c \text{ kg}^{-1}$ , e o valor de V estava acima de 97 %. Já os valores de Al trocável foram zero, bem como o parâmetro m ou o caráter álico do solo, que define a saturação das cargas superficiais das argilas por íons  $\text{Al}^{3+}$ .

O teor de C orgânico do solo foi de  $5,6 \pm 0,3 \text{ g kg}^{-1}$ ; embora baixo, está dentro dos valores considerados típicos para solos tropicais (Fassbender, 1975). O teor de N total foi de  $276 \pm 7 \text{ mg kg}^{-1}$ , e o de P total, de  $7 \text{ mg kg}^{-1}$ . Considerando as relações C:N de 60:1 e C:P de 300:1 recomendadas pela CETESB para a biodegradação de compostos orgânicos no solo, torna-se necessária a adição de P para manutenção da atividade dos microrganismos.

Os valores de  $k_i$  e  $k_r$ , obtidos a partir dos teores de óxidos de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ( $121 \pm 1 \text{ mg kg}^{-1}$ ),  $\text{SiO}_2$  ( $101 \pm 2 \text{ mg kg}^{-1}$ )

e  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  ( $87 \pm 1 \text{ mg kg}^{-1}$ ), foram, respectivamente, de  $1,42 \pm 0,02$  e  $0,97 \pm 0,02$ , indicando que o solo apresenta argila predominantemente caulinítica, contando ainda com a presença de gipsita.

### Caracterização do inóculo

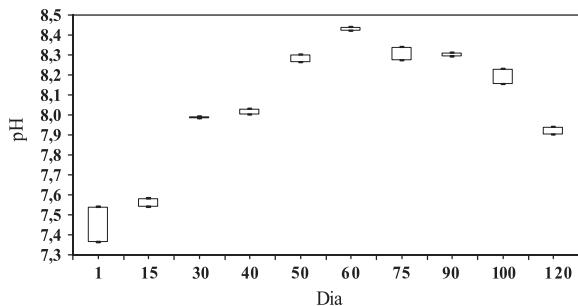
O inóculo apresentou pH 5,8 a 5,9, temperatura de  $22,0^\circ\text{C}$ , densidade de  $1,0158 \pm 0,0048 \text{ g cm}^{-3}$ , sólidos em suspensão totais de  $25.737 \pm 1.534 \text{ mg L}^{-1}$ , sólidos em suspensão voláteis de  $23.637 \pm 1.457 \text{ mg L}^{-1}$ , C orgânico total de  $1,73 \pm 0,09 \%$ , P total de  $265 \pm 6 \text{ mg L}^{-1}$  e N total Kjeldahl de  $1.118 \pm 30 \text{ mg L}^{-1}$ .

### Monitoramento da Biorremediação

#### Temperatura, pH e umidade

Os resultados do pH inicial na biorremediação variaram de 7,4 a 7,5 e estavam abaixo do valor do solo inicialmente escavado, provavelmente devido à adição do inóculo (pH 5,8 a 5,9). Após a introdução dos microrganismos do lodo, houve considerável aumento do número de bactérias no reator. Essas bactérias começaram a degradar os poluentes presentes e, após 15 dias, verificou-se aumento de pH, possivelmente devido à biodegradação dos ácidos orgânicos formados e à capacidade de tamponamento do solo. Trata-se de uma área de aterro industrial, onde o solo sofreu ação antrópica, resultando em pH alcalino. Dessa forma, os carbonatos, possivelmente presentes na amostra do solo, controlaram o pH de equilíbrio, e os maiores valores atingiram 8,4 após 60 dias (Figura 2), chegando a 7,9 ao final da biorremediação.

Staples et al. (1997) afirmaram que a rota de biodegradação dos ftalatos começa pela hidrólise do diésteres ftálicos, com a formação do respectivo ácido e álcool. Assim, a acidificação, durante a biodegradação de ftalatos, observada por outros autores (Staples et al., 1997; Juneson et al., 2001), não foi constatada na biorremediação desse solo.



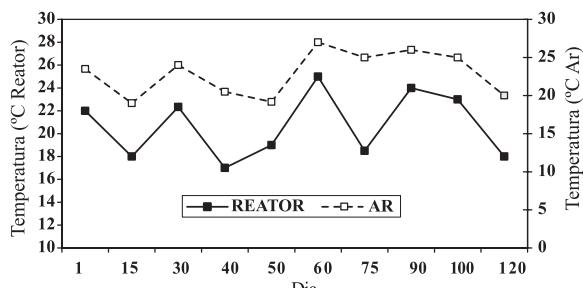
**Figura 2.** Evolução do pH do solo durante a biorremediação. Box plot: valores de pH mínimo e pH máximo das determinações em triplicatas.

O pH do solo difere daquele considerado ótimo (em torno de 7,0) para a biodegradação de ftalatos, descrito por diferentes autores (Staples et al., 1997; Zeng et al., 2004; Chang et al., 2004, 2007; Shailaja et al., 2008). No entanto, isso não impediu que os microrganismos degradassem os ftalatos nas condições naturais, o que pode ser observado na figura 4.

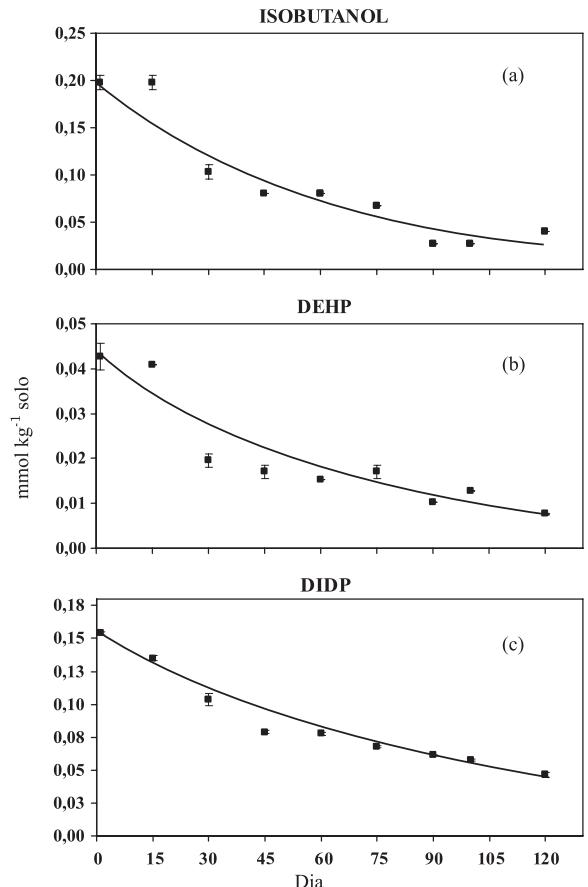
A temperatura do solo no reator variou de 17 a 25 °C durante a biorremediação (Figura 3), estando essa faixa abaixo da considerada ótima (30 °C) para biodegradação de ftalatos (Chang et al., 2004, 2007). Os menores valores ocorreram 40 dias após o início da biorremediação. Nessa data, não foram observadas reduções na remoção dos contaminantes (Figura 4). A temperatura ambiente esteve 1,0 a 5,5 °C acima da temperatura do solo no reator durante o experimento (Figura 3).

#### Degradação dos poluentes e diversidade da população microbiana no solo

Os teores iniciais de contaminantes no solo foram de  $15 \pm 1 \text{ mg kg}^{-1}$  para o isobutanol, de  $18 \pm 2 \text{ mg kg}^{-1}$  para o DEHP e de  $69 \pm 1 \text{ mg kg}^{-1}$  para o DIDP. A evolução dos teores de contaminantes durante a biorremediação é mostrada na figura 4.



**Figura 3.** Evolução da temperatura do solo e do ar durante a biorremediação.



**Figura 4.** Evolução dos teores de contaminantes durante a biorremediação (a) isobutanol; (b) DEHP; (c) DIDP. Barras representam desvio-padrão da média das triplicatas.

Os resultados (Quadro 1) indicam que a biorremediação dos ftalatos seguiu uma cinética de primeira ordem (Zeng et al., 2004). Não se observou uma fase lag para os ftalatos, ou seja, uma fase de adaptação dos microrganismos ao novo ambiente, ao contrário dos resultados encontrados por Jianlong et al. (1995). A presença do álcool isobutanol, cossubstrato de menor cadeia alquílica, não impediou a biodegradação dos ftalatos. No entanto, o álcool apresentou maior taxa cinética de degradação, embora não tenha sido totalmente removido no período (teor final de  $3 \pm 0 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Os teores de isobutanol, DEHP e DIDP na amostra Branco, após 120 dias, foram de  $15 \pm 0$ , de  $18 \pm 1$  e de  $70 \pm 1 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente, o que demonstra que a volatilização não foi o mecanismo de remoção do álcool. A plastificação do solo pode ter contribuído para evitar a perda do isobutanol, estando este composto possivelmente presente nos poros intersticiais do solo.

Neste estudo, a taxa de degradação do DEHP ( $0,0077 \text{ d}^{-1}$ ) está abaixo daquelas encontradas por outros autores, como Chang et al., 2004 ( $0,3000 \text{ d}^{-1}$ ),

**Quadro 1.** Teores iniciais de contaminantes, equação cinética, constantes de biodegradação e coeficientes de determinação na biorremediação do solo

Composto	Teores iniciais	Equação cinética	k	R <sup>2</sup>
	mg kg <sup>-1</sup>		dia <sup>-1</sup>	
Isobutanol	15 ± 1	$\hat{y} = 0,1992e^{-0,0171x}$	0,0171	0,8512
DEHP	18 ± 2	$\hat{y} = 0,8176e^{-0,0077x}$	0,0077	0,8800
DIDP	69 ± 1	$\hat{y} = 0,1441e^{-0,0097x}$	0,0097	0,9626

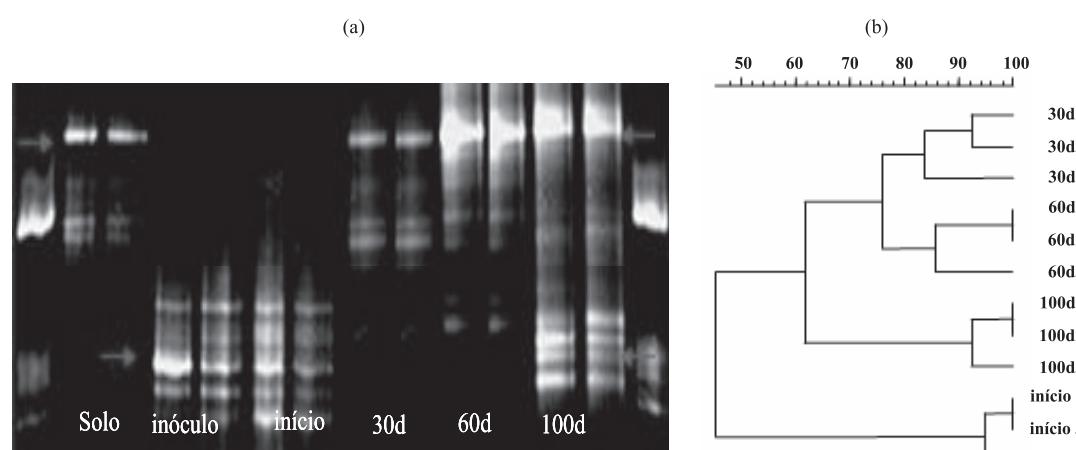
$\hat{y}$ : teor de contaminante (mmol kg<sup>-1</sup>); x: tempo (dia); k: constante de degradação (dia<sup>-1</sup>); R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação.

Chang et al., 2007 (0,1820 d<sup>-1</sup>), Shailaja et al., 2008 (0,0935 d<sup>-1</sup>) e Zeng et al., 2004 (0,0408 a 0,0723 d<sup>-1</sup>), provavelmente devido à menor temperatura.

Após 120 dias de biorremediação, o teor de DEHP foi de 3 mg kg<sup>-1</sup>, abaixo do valor de 4 mg kg<sup>-1</sup> solo recomendado pela Resolução CONAMA nº 420/2009 (Brasil, 2009) para solo residencial. Os teores finais de isobutanol e de DIDP foram de 3 e 21 ± 1 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Para esses poluentes, não foram estabelecidos limites na legislação brasileira.

O tratamento do solo em fase de lama e sob mistura permite aumento de transferência de massa, garantindo o contato microrganismo-poluente-nutriente e a dessorção dos poluentes hidrofóbicos (Robles-González et al., 2008). Nas condições do reator utilizado neste estudo, sem correção dos parâmetros pH e temperatura, as taxas de degradação dos poluentes dependeram, principalmente, da atividade dos microrganismos disponíveis no sistema, e os resultados refletiram o potencial de depuração biológica do solo. A figura 5a representa o *fingerprint* da comunidade de bactérias encontradas no reator durante os 120 dias de tratamento, e a figura 5b, o respectivo dendrograma de similaridades, com

base no coeficiente de correlação de Pearson. As amostras referentes ao início do tratamento foram consistentes e apresentaram 94 a 100 % de similaridade entre as triplicatas. Entretanto, essas amostras mostraram-se significativamente distintas das correspondentes aos demais tempos (30, 60 e 100 dias), com nível de similaridade em torno de 48 %. As análises de *fingerprint* do solo escavado, do inóculo e do solo do reator, todas em duplicatas, evidenciaram que os perfis de bandas encontradas no início da biorremediação são altamente similares àqueles do inóculo, sugerindo que as bactérias presentes no inóculo correspondem às populações dominantes no reator. Após 30 dias, os perfis de bandas apresentaram similaridade com os perfis do solo anterior ao tratamento. Nessa fase do processo, as bactérias autóctones do solo passaram a dominar a comunidade do reator, possivelmente, em função da capacidade de decompor os metabólitos provenientes da biodegradação dos poluentes pelas bactérias do inóculo. 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 àquelas presentes no início da biorremediação. Ao final do processo,



**Figura 5.** (a) *Fingerprint* da comunidade de bactérias presentes no reator durante a biorremediação e (b) dendrograma de similaridades. d: dias; 1, 2 e 3: triplicatas.

foi possível identificar bandas correspondentes às populações dominantes provenientes do solo e do inóculo (Figura 5a).

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 observadas em uma comunidade microbiana, pois um organismo pode produzir mais de uma banda, devido à multiplicidade e heterogenia de genes de RNAr. Ainda assim, é a técnica mais usada para avaliar as mudanças nas comunidades microbianas em um determinado solo (Illman & Alvarez, 2009).

## CONCLUSÕES

1. O reator em fase de lama – com mistura temporizada, bioaumento e teor de sólidos acima do comumente utilizado na literatura – foi satisfatório para tratar o solo alcalino, contaminado com álcool e ftalatos (remoções acima de 70 % em 120 dias), não sendo necessária a correção do pH, a injeção de ar nem o controle da temperatura para ocorrência da biorremediação.

2. Após 120 dias de biorremediação, os teores de DEHP foram inferiores ao estipulado pela legislação brasileira para solo para uso residencial.

3. A utilização da técnica de DGGE foi satisfatória para verificar a diversidade da comunidade de bactérias no reator, indicando a importância das autóctones do solo e das alóctones advindas da adição de inóculo adaptado, na razão de 6 g kg<sup>-1</sup> de SSV no solo.

## LITERATURA CITADA

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA/ WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA), WATER ENVIRONMENTAL FEDERATION - WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21.ed. Washington, 2005.
- BRASIL. Resolução Conama nº 420 de 28 de dezembro de 2009. 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. DOU nº 249, de 30/12/2009, p.81-84.
- CARTWRIGHT, C.D.; OWEN, S.A.; THOMPSON, I.P. & BURNS, R.G. Biodegradation of diethyl phthalate in soil by a novel pathway. FEMS Microbiol. Letters, 186:27-34, 2000.
- CHANG, B.V.; WANG, T.W. & YUAN, S.Y. Biodegradation of four phthalates esters in sludge. Chemosphere, 69:1116-1123, 2007.
- CHANG, B.V.; YANG, C.M.; CHENG, C.H. & YUAN, S.Y. Biodegradation of phthalates ester by two bacteria strains. Chemosphere, 55:533-538, 2004.
- CHAO, W.L. & CHENG, C.Y. Effect of introduced phthalate-degrading bacteria on the diversity of indigenous bacterial communities during di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) degradation in a soil microcosm. Chemosphere, 67:482-488, 2007.
- CHAO, W.L.; LIN, C.M.; SHIUNG, L.I. & KUO, Y.L. Degradation of dibutyl- phthalate by soil bacteria. Chemosphere, 63:1377-1383, 2006.
- CHATTERJEE, S. & DUTTA, T.K. Metabolism of butyl benzyl phthalate by *Gordonia sp strain MTCC 4818*. Biochem. Biophys. Res. Comm., 309:36-43, 2003.
- CHATTERJEE, S. & DUTTA, T.K. Complete degradation of butyl benzyl phthalate by a defined bacterial consortium: Role of individual isolates in the assimilation pathway. Chemosphere, 70:933-941, 2008.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. Determinação da biodegradação de resíduos – método respirométrico de Bartha. Norma L6 350. São Paulo, CETESB, 1990. 15p.
- COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO – CETESB. Relação de áreas contaminadas e reabilitadas no Estado de São Paulo. Dezembro de 2010. Disponível em <[http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/areas-contaminadas/texto\\_explcativo\\_dez\\_10.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/areas-contaminadas/texto_explcativo_dez_10.pdf)>. Acesso em 02 de ago. de 2011.
- DI GENNARO, P.; COLLINA, E.; FRANZETTI, A.; LASAGNI, M.; LURIDIANA, A.; PITEA, D. & BESTETTI, G. Bioremediation of diethylhexyl phthalate contaminated soil: A feasibility study in slurry- and solid-phase reactors. Environ. Sci. Technol., 39:325-330, 2005.
- 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., 65:102-109, 1999.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de métodos de análise de solo. 2.ed. Rio de Janeiro, 1997. 212p.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema brasileiro de classificação de solos. Rio de Janeiro, 1999. 412p.
- FANG, H.H.P.; LIANG, D.W. & ZHANG, T. Aerobic degradation of diethyl phthalate by *Sphingomonas sp*. Biodes. Technol., 98:717-720, 2007.
- FASSBENDER, H.W. Química de suelos. Turrialba, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, 1975. 385p.

- FENG, Z.; CUI, K.Y.; LI, X.D.; FU, J.A. & SHENG, G.Y. Biodegradation kinetics of phthalate esters by *Pseudomonas fluorescens* FS1. *Process Biochem.*, 39:1125-1129, 2004.
- FERNANDEZ, M.P.; IKONOMOU, M.G. & BUCHANAN, I. An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters. *Sci. Total Environ.*, 373:250-269, 2007.
- FOSTER, P.M. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *Int. J. Androl.*, 29:140-147, 2006.
- FROMME, H.; KÜCHER, T.; OTTO, T.; PILZ, K.; MÜLLER, J. & WENZEL, A. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Res.*, 36:1429-1438, 2002.
- FULLER, M.E. & MANNING, J.F. Microbiological changes during bioremediation of explosives-contaminated soils in laboratory and pilot-scale bioslurry reactors. *Biores. Technol.*, 91:123-133, 2004.
- HASHIZUME, K.; NANYA, J.; TODA, C.; YASUI, T.; NAGANO, H. & KOJIMA, N. Phthalate esters detected in various water samples and biodegradation of the phthalates by microbes isolated from river water. *Biol. Pharm. Bull.*, 25:209-214, 2002.
- ILLMAN, W.A. & ALVAREZ, P.J. Performance assessment of bioremediation and natural attenuation. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 39:209-270, 2009.
- JACKSON, M.A.; LABEDA, D.P. & BECKER, L.A. Isolation for bacteria and fungi for the hydrolysis of phthalate and terephthalate esters. *J. Ind. Microbiol.*, 16:301-304, 1996.
- JIANLONG, W.; PING, L. & Yi, Q. Microbial degradation of di-n-butyl phthalate. *Chemosphere*, 31:4051-4056, 1995.
- JUNESON, C.; WARD, O.P. & SINGH, A. Biodegradation of bis (2-ethylhexyl)phthalate in a soil slurry-sequencing batch reactor. *Process. Biochem.*, 37:305-313, 2001.
- LI, J.X.; GU, J.D. & PAN, L. Transformation of dimethyl phthalate, dimethyl isophthalate and dimethyl terephthalate by *Rhodococcus rubber* Sa and modeling the processes using the modified Gompertz model. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 55:223-232, 2005.
- LI, J.; CHEN, J.A.; ZHAO, Q.; LI, X. & SHU, W.Q. Bioremediation of environmental endocrine disruptor di-n-butyl phthalate ester by *Rhodococcus ruber*. *Chemosphere*, 65:1627-1633, 2006.
- MEKARU, T. & UEHARA, G. Anion adsorption in ferruginous tropical soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 36:296-300, 1972.
- MOHAN, S.V.; SHAILAJA, S.; KRISHNA, M.R.; REDDY, K.B. & SARMA, P.N. Bioslurry phase degradation of di-ethyl phthalate (DEP) contaminated soil in periodic discontinuous mode operation: Influence of bioaugmentation and substrate partition. *Process. Biochem.*, 41:644-652, 2006.
- NAKAMIYA, K.; HASHIMOTO, S.; ITO, H.; EDMONDS, J.S.; YASUHARA, A. & MORITA, M. Microbial treatment of bis (2-ethylhexyl) phthalate in polyvinyl chloride with isolated bacteria. *J. Biosci. Bioeng.*, 99:115-119, 2005.
- NANO, G.; BORRONI, A. & ROTA, R. Combined slurry and solid-phase bioremediation of diesel contaminated soil. *J. Haz. Mat.*, 100:79-94, 2003.
- NIAZI, J.H. & KAREGOUDA, T.B. Degradation of dimethylphthalate by cells of *Bacillus* sp immobilized in calcium alginate and polyurethane foam. *J. Environ. Sci. Health, Part A*, 36:1135-1144, 2001.
- PATIL, N.K.; KUNDAPUR, R.; SHOUCHE, Y.S. & KAREGOUDAR, T.B. Degradation of a plasticizer, di-n-butylphthalate by *Delftia* sp *TBKNP-05*. *Curr. Microbiol.*, 52:225-230, 2006.
- QUAN, C.S.; LIU, Q.; TIAN, W.J.; KIKUCHI, J. & FAN, S.D. Biodegradation of an endocrine-disrupting chemical, di-2-ethylhexyl phthalate, by *Bacillus subtilis* n° 66. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 66:702-710, 2005.
- ROBLES-GONZÁLEZ, I.V.; FAVA, F. & POGGI-VARALDO, H.M. A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and sediments. *Microbiol. Cell Fact.*, 7:5, 2008. Disponível em <<http://www.microbialcellfactories.com/content/7/1/5>>. Acesso em 25 ago. de 2010.
- SHAILAJA, S.; RAMAKRISHNA, M.; MOHAN, S.V. & SARMA, P.N. Biodegradation of di-n-butyl phthalate (DnBP) in bioaugmented bioslurry phase reactor. *Biores. Technol.*, 98:1561-1566, 2007.
- SHAILAJA, 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. *Intern. Biodeter. Biodegr.*, 62:143-152, 2008.
- STAPLES, C.A.; PETERSON, D.R.; PARKERTON, T.F. & ADAMS, W.J. The environmental fate of phthalate esters: A literature review. *Chemosphere*, 35:667-749, 1997.
- SWAN, S.H. Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environ. Res.*, 108:177-184, 2008.
- U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. SW-846 MANUAL. Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods. 1996. Disponível em <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/sw846.htm>. Acesso em 23 ago. de 2007.
- RAIJ, B.van; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H. & QUAGGIO, J.A. Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. Campinas, IAC, 2001. 195p.
- VEGA, D. & BASTIDE, J. Dimethylphthalate hydrolysis by specific microbial esterase. *Chemosphere*, 51:663-668, 2003.
- VITALI, M. Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.*, 73:1163-1172, 2001.
- WU, X.; LIANG, R.; DAI, Q.; JIN, D.; WANG, Y. & CHAO, W. Complete degradation of di-n-octyl phthalate by biochemical cooperation between *Gordonia* sp. strain JDC-2 and *Arthrobacter* sp. Strain JDC-32 isolated from activated sludge. *J. Haz. Mat.*, 176:262-268, 2010.
- XU, X.R.; LI, H.B. & GU, J.D. Biodegradation of an endocrine disrupting chemical di-n-butyl phthalate ester by *Pseudomonas fluorescens* B-1. *Intern. Biodeter. Biodegr.*, 55:9-15, 2005.

- XU, X.R.; LI, H.B. & GU, J.D. Metabolism and biochemical pathway of n-butyl benzyl phthalate by *Pseudomonas fluorescens* B-1 isolated from a mangrove sediment. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 68:379-385, 2007.
- YUAN, S-Y.; HUANG, I-C. & CHANG, B.V. Biodegradation of dibutyl phthalate and di-(2-ethylhexyl)phthalate and microbial community changes in mangrove sediment. *J. Haz. Mat.*, 184:826-831, 2010.
- ZENG, F.; CUI, K.; LI, X.; FU, J. & SHENG, G. Biodegradation kinetics of phthalate ester by *Pseudomonas fluorescens* FS1. *Process. Biochem.*, 39:1125-1129, 2004.
- ZENG, F.; CUI, K.; XIE, Z.; WU, L.; LUO, D.; CHEN, L.; LIN, Y.; LIU, M. & SUN, G. Distribution of phthalate esters in urban soils of subtropical city, Guangzhou, China. *J. Haz. Mat.*, 164:1171-1178, 2009.