

AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DE ÓLEO CRU EM SOLO

Renata S. Raimundo

Bolsista de Inic. Científica, Química Bacharel, UFF

Andréa C. de Lima Rizzo

Orientadora, Eng^o. Química, M. Sc.

RESUMO

Neste trabalho, foi realizado um ensaio de biodegradação com o solo contaminado com óleo cru, proveniente de Guararema a fim de avaliar a disponibilidade do contaminante para os microrganismos. Tal ensaio buscou confirmar a influência do processo de

intemperização nas reduzidas eficiências de biodegradação encontradas nos testes realizados anteriormente com este solo. Este ensaio foi realizado em meio líquido, no qual a disponibilidade do óleo cru será mais favorável ao ataque microbiano.

1. INTRODUÇÃO

Desde meados dos anos 90, técnicas de biorremediação têm sido adotadas como uma maneira extremamente eficaz e de baixo custo para a remediação de compostos orgânicos em solos (Trindade, 2002). Estas técnicas se baseiam em processos microbiológicos que convertem os contaminantes em dióxido de carbono e água, pela mineralização completa, ou pela redução da toxicidade destes através da sua degradação parcial. No entanto, a eficácia destas técnicas pode ser influenciada pelo processo de intemperização pelo qual o solo contaminado passou desde a data do impacto.

A intemperização é consequência de processos biológicos, químicos e físicos. A ocorrência destes processos resulta na redução da concentração dos contaminantes no solo devido à volatilização das frações mais leves e/ou lixiviação dos compostos, afetando o tipo de contaminante que permanece no solo e a disponibilidade deste para o ataque microbiano.

A natureza do contaminante presente no solo vai interferir na extensão da degradação microbiana, por ser esta uma função do peso molecular do composto orgânico e da razão de hidrocarbonetos saturados e aromáticos. Vários autores (Trindade, 2002;Loehr *et al.* 2001) demonstraram que os microrganismos apresentam uma habilidade degradadora decrescente com o aumento da cadeia dos hidrocarbonetos, bem como com o aumento da complexidade de suas estruturas.

Outra importante consequência do processo de intemperização é a redução da disponibilidade dos contaminantes aos microrganismos (biodisponibilidade), devido a maior sorção destes pela matriz do solo, tirando-os da fase dissolvida. Este fator será mais pronunciado em solos com características argilosas, já que a grande fração de partículas finas destes interliga a interação entre a matriz e o contaminante. (Trindade, 2002)

Os resultados de eficiência de biodegradação obtidos nos testes em escala de bancada até o momento variaram na faixa de 2 a 11%, sendo considerados baixos pelo grupo de pesquisadores do CETEM, envolvidos no Projeto Biorremediação. Estes resultados refletem a dificuldade de se tratar um solo com características argilosas (classificado como areno argiloso) contaminado com óleo cru em uma concentração elevada (5,38% - 1ª remessa, 2,26% - 2ª remessa) e que passou por um processo de intemperização bastante acentuado (derramamento ocorrido há 4 anos). As características físico-químicas do solo e as características químicas do contaminante já indicavam a tendência de obtenção de valores de eficiência de biodegradação reduzidos. No entanto fazia-se necessária a identificação do principal entrave à obtenção de melhores resultados, de forma a focar os estudos posteriores para se chegar na melhor solução técnica disponível para o tratamento do solo em questão.

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a biodisponibilidade de óleo cru em um solo contaminado (Guararema, SP) afim verificar a influência do processo de intemperização nas eficiências de biodegradação dos testes realizados anteriormente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras de solo empregadas

Foram utilizadas amostras de solo contaminado, por óleo cru, provenientes de um dique de armazenamento localizado no terminal de Guararema, São Paulo. O solo contaminado foi devidamente homogeneizado e foram determinadas as características físico-químicas, inorgânicas e orgânicas mais relevantes. O resultado desta caracterização do solo, realizada em conjunto pela equipe do CETEM e pela equipe do CENPES/Petrobrás, se encontra na tabela a seguir:

Tabela 1: Principais características físico-químicas, inorgânicas e orgânicas do solo contaminado empregado

Propriedade	Valor
pH	5,1
Capacidade de Campo - CC	38,50%
TPH's	26,26g/Kg
HPA's	4,37g/Kg
Óleos e Graxas	3,21%
Matéria Orgânica	8,54%
Parafinas	23,76%
Aromáticos	23,46%
Resinas	52,78%
Distribuição Granulométrica:	
Areia total	62%
Argila total	18%
Silte	16%
N (g/kg)	1,0
P (g/kg)	0,001
K (g/kg)	0,084

Entre o derramamento de óleo (dez/1998) e a amostragem (out/2001) do solo contaminado utilizado no desenvolvimento dos experimentos descritos neste trabalho (3ª remessa), transcorreram aproximadamente 3 anos. A amostragem foi realizada garantindo a representatividade das amostras.

No desenvolvimento deste trabalho o solo contaminado foi utilizado tanto como fonte de microrganismos (microbiota nativa e microrganismos degradadores isolados) quanto como fonte do extrato orgânico (contaminante).

3.2. Extração do contaminante orgânico do solo

Amostras de 5 gramas de solo contaminadas foram extraídas em ultrassom utilizando n-hexano como solvente, conforme descrito no método IT2003-001-00, registrado na biblioteca do CETEM. O extrato orgânico obtido foi primeiramente concentrado em rotoevaporador até cerca de 10 mL e em seguida concentrado a 2 mL em concentrador de amostras com purga de nitrogênio. O extrato obtido (2 mL) foi adicionado ao meio inorgânico enriquecido para ser empregado pelos microrganismos como principal fonte de carbono.

3.3. Determinação do teor inicial de óleos e graxas

A concentração inicial de óleos e graxa presente em 5g de solo contaminado foi determinada de acordo com procedimento descrito no item anterior, porém os extratos foram concentrados até a secura e o teor de OG determinado por diferença de peso (gravimetria).

3.4. Extração da microbiota nativa do solo contaminado

Adicionou-se 20 g de solo contaminado em 184 ml de meio inorgânico fortificado e fez-se a agitação da suspensão em shaker por 2 horas a 120rpm. Em seguida a suspensão foi deixada em repouso por mais 2 horas de forma a permitir a decantação do solo. Após a decantação, 46mL da suspensão sobrenadante foi distribuída nos respectivos frascos(condições com adição da microbiota nativa).

3.5. Descrição dos experimentos

Os testes de biodegradação em meio líquido foram conduzidos em kitsatos de 250 ml de capacidade com rolhas de borracha/silicone com um tubo de

látex fixado à saída lateral a qual foi vedada com uma pinça de Mohr, adotando-se um volume final de 50 ml suspensão.

Quatro condições foram testadas, em duplicata, a saber:

Condição 1: Meio inorgânico fortificado (48 ml) adicionado do extrato orgânico (2ml)

Condição 2: Meio inorgânico fortificado com microbiota nativa extraída do solo (48 ml) adicionado de extrato orgânico (2ml)

Condição 3: Meio inorgânico fortificado com microbiota nativa extraída do solo (46 ml) adicionado de extrato orgânico (2ml) e 2 ml de inóculo do pool degradador

Condição 4: Meio inorgânico fortificado (46 ml) adicionado do extrato orgânico (2ml) e 2 ml de inóculo do pool degradador

3.6. Aeração

Tendo em vista que o processo de biodegradação empregado é aeróbico, fez-se a aeração do sistema experimental com o objetivo de suprir a demanda de oxigênio requerida pelos microrganismos e de expulsar o CO₂ gerado, após o monitoramento do mesmo.

Todas as condições dos experimentos de biodegradação foram aeradas com intervalos de 48 horas, com exceção dos finais de semana, nos quais não houve aeração, e na primeira semana na qual fez-se a aeração diária das condições. A aeração foi realizada por meio da injeção de ar comprimido aos frascos por 2 minutos.

3.7. Meio inorgânico fortificado

Tanto para extração da microbiota nativa do solo contaminado, como para condução dos experimentos de biodegradação em meio líquido utilizou-se meio inorgânico líquido fortificado descrito por Vecchioli *et al.* (1990) .

3.7. Preparo e Adição do Inóculo

Para duas das condições descritas nos experimentos (condições 3 e 4), foi utilizado um inóculo de aproximadamente 10^8 UFC/ ml composto pelos dois microrganismos degradadores (*Nocardia nova* e *Rhodotorula glutinis var. dairenese*) previamente isolados e identificados por Trindade (2002). Para a obtenção do inóculo, foi realizado um crescimento dos microrganismos conforme descrito por Trindade (2002) e, após um determinado período necessário para atingir a fase exponencial (calculado pela cinética), coletaram-se alíquotas dos frascos de crescimento e fizeram-se diluições sucessivas até atingir a concentração de UFC desejada (UFC/mL). Optou-se por adicionar sempre 2mL de volume total de inóculo em cada condição dos experimentos.

3.9. Análise Cromatográfica do CO₂ Produzido:

Com o auxílio de uma seringa apropriada para análises cromatográficas gasosas, foram injetadas no Cromatógrafo a Gás HP 5890 série II, amostras de 0,5mL das atmosferas internas dos kitsatos (*headspaces*) referentes às condições analisadas. Uma vez que as respostas cromatográficas são dadas em % de área de integração, fez-se necessária a construção de curvas de calibração relacionando estas porcentagens de área com o número de μ moles de CO₂ produzidos. As condições gerais empregadas durante os experimentos encontram-se listadas a seguir:

Vazão do Gás de Arraste (He): 17,5 mL / min

Vazão do gás de Referência (He): 29,0 mL / min

Temperatura do Forno: 105 °C

Temperatura do Injetor: 110°C

Temperatura do Detetor de Condutividade Térmica (TCD): 220°C

Coluna de Aço Inox (3m x 3mm) Recheada com Chromosorb 102

Com o valor acumulado da porcentagem de CO₂ gerado ao final dos experimentos, calculou-se, através das curvas de calibração, o número de μ moles totais de CO₂ gerado. Além disso, baseado na estimativa de incorporação do contaminante à biomassa (aproximadamente 50%), calculou-se a eficiência de biodegradação (EB%) da seguinte forma:

Massa de Carbono Biodegradada Totalmente = 2 x Massa de Carbono proveniente do CO₂ Gerado

$$EB\% = \frac{\text{Massa de Carbono Biodegradada Totalmente}}{\text{Massa de Carbono Orgânico Total do Solo}} \times 100$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do teste de biodisponibilidade foram avaliados pela resposta do processo microbiológico relacionado a metabolização dos hidrocarbonetos, através da quantificação do CO₂ produzido.

O monitoramento de CO₂ por cromatografia gasosa permitiu a avaliação dos respectivos perfis de geração durante o período de execução do experimento conforme apresentado na Figura 1 abaixo.

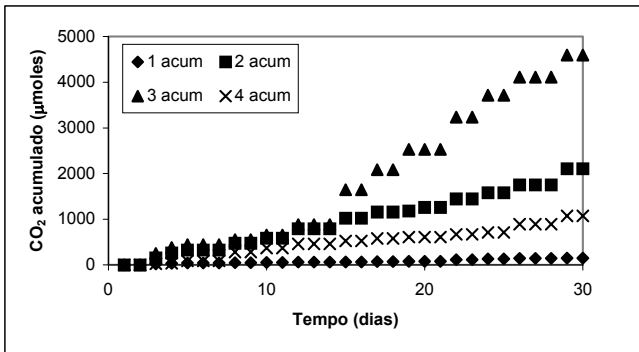


Figura 1: Perfis de geração de CO₂

Pela análise da figura 1, observa-se que até os primeiros 15 dias de teste o comportamento das condições 2, 3 e 4 foi bastante semelhante, indicando a presença de um período inicial de adaptação do consórcio microbiano nativo do solo contaminado e/ou do consórcio degradador adicionado.

À partir do 15º dia a evolução de CO₂ nas condições 2 e 3 foram maiores do que na condição 4. Isto pode ter ocorrido devido a uma maior adaptação dos microrganismos degradadores presentes no solo contaminado, tendo em

vista a longa exposição do poluente à microbiota nativa. Com isso, os microrganismos hábeis para degradar os compostos mais recalcitrantes estão presentes no consórcio microbiano extraído do solo.

Estes fenômenos podem também ser observados na Figura 2 a seguir, onde estão apresentadas as eficiências de biodegradação calculadas a partir do valor acumulado de CO₂ gerado ao final dos experimentos.

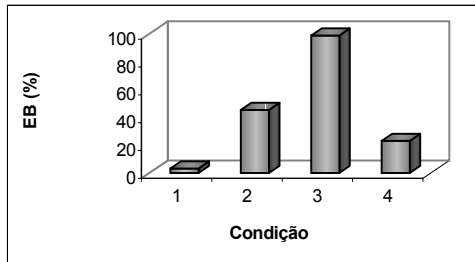


Figura 2: Solo Contaminado de Guararema (3ª remessa) – Teste de Biodisponibilidade

Observou-se que em 30 dias de experimento em meio líquido, apenas a microbiota nativa já era capaz de degradar 45% do óleo contaminante (condição 2). Já o consórcio microbiano inoculado (condição 4), foi capaz de degradar 19% deste óleo.

A condição que apresentou maior eficiência de biodegradação foi a condição 3, onde foi empregada microbiota nativa do solo e o inoculo do consórcio degradador. Nesta condição, o efeito sinérgico destes microrganismos foi preponderante para a obtenção do valor elevado de 98% de degradação do óleo contaminante, maior até do que a soma dos resultados obtidos na condição 2 e 4.

Cabe destacar que o menor resultado obtido nos testes em meio líquido (19%, condição 4) foi ainda assim maior do que os resultados de eficiência de biodegradação que vêm sendo obtidos pelo grupo de pesquisa nos testes utilizando solo com teor reduzido de umidade (50% CC), os quais variam de 2 a 11%. Esta diferença verificada nos resultados dos testes em meio líquido e em meio semi-sólido indicam que, possivelmente, o principal fator que

interfere na obtenção de resultados de eficiência de biodegradação mais elevados em meio semi-sólido é a forte interação entre o contaminante e a matriz do solo, reduzindo assim a biodisponibilidade do primeiro. Esta forte interação está associada ao processo acentuado de intemperização pelo qual o solo contaminado passou.

Outra forma de avaliar os resultados do teste seria através da determinação do teor de óleos e graxas inicial e final de cada condição. Determinou-se para o solo contaminado o teor de óleos e graxas inicial de 3,10% que forneceu o extrato orgânico para o desenvolvimento do teste. No entanto, para as amostras finais do testes ocorreu uma grande dificuldade de adaptação do método IT2003-001-00 para a determinação de óleos e graxas. A dificuldade apresentada resultou da formação de uma terceira fase entre a fase orgânica (extrato+solvente) e a fase aquosa (meio inorgânico+população microbiana), a qual retia parte do extrato remanescente, levando a resultados inconclusivos.

Pelas características apresentadas pela fase intermediária formada, acreditava-se que esta era formada por um biosurfactante produzido pelos microrganismos durante a degradação dos hidrocarbonetos, estimulada pelo meio inorgânico líquido. Para esta confirmação, foi realizado um teste qualitativo, descrito por Banat (1995) no qual gotejou-se uma amostra da fase onde suspeitava-se ter o biosurfactante e de um biosurfactante comercial em uma camada fina de óleo cru. A emulsificação do óleo verificada para as amostras das condições 2, 3 e 4 é um indicativo da presença do biosurfactante pois o “halo” formado (Figura 3) é semelhante ao formado após o gotejamento do biosurfactante comercial JBR 215 (fornecido pela Jeneil).



Figura 3: Registro fotográfico do resultado do teste qualitativo para confirmação da presença de biosurfactante

5. CONCLUSÕES

- ❖ Tendo em vista que neste teste foi observada a passível degradação do óleo obtida tanto pela microbiota nativa quanto pelo consórcio microbiano inoculado, em meio líquido, identificou-se como principal entrave da biodegradação do óleo cru presente no solo a forte interação entre a matriz argilosa e o contaminante, decorrente do processo de intemperização sofrido pelo resíduo.
- ❖ Deve-se continuar testando a estratégia de bioaugmentação do solo contaminado, pois os resultados obtidos no presente trabalho para a condição 3, indicam que o efeito sinérgico da microbiota nativa do solo e o inóculo do consórcio degradador foi preponderante.
- ❖ Outras estratégias visando aumentar a biodisponibilidade do óleo contaminante deverão continuar a serem testadas, como por exemplo o uso de biosurfatantes.

6. BIBLIOGRAFIA

- BANAT, I.M. (1995) "Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review". *Bioresource Technology*, **51**, 1-12.
- BOGNOLO, G. (1999) "Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons". *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **152**, 41-52.
- CERVANTES-GONZALEZ, E.; ROJAS-AVELIZAPA, L.I.; CRUZ CAMARILLO, R. E ROJAS-AVELIZAPA, N.G. (2001) "Degradation of aromatic and asphaltenic fractions in liquid culture from na aged soil". *Contaminated Soil Sediment and Water*, december, 33-37.
- LOEHR, R.C.; McMILLEN, S.J. E WEBSTER, M.T. (2001) "Predictions of biotreatability and actual results: soils with petroleum hydrocarbons". *Practice periodical of hazardous, toxic, and radioactive waste management*, abril, 78-87.
- TRINDADE, P.V.O. (2002). "Avaliação das técnicas de bioaugmentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo". *Tese M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química*, Rio de Janeiro, Brasil, 127p.
- VECCHIOLI, G.L.; DEL PANNO, M.T.. E PAINCEIRA, M.T. (1990) "Use of Selected Autochthonous soil Bacteria to Enhance Degradation of Hydrocarbons in Soil". *Environmental Pollution*, **67**, 249-258.