

# **Análise comparativa de dois surfatantes aniônicos para fins de biorremediação de solo contaminado com óleo cru**

**Jamile de Almeida M. da Silva**

Bolsista de Iniciação Científica, Biologia, UFRJ.

**Valéria Souza Millioi**

Orientadora: Eng.<sup>a</sup>. Química, MSc.

## **Resumo**

O estudo proposto tem como objetivo avaliar dois surfatantes aniônicos, sendo um químico SDS (dodecil sulfato de sódio) e outro biológico JBR 210 (ramnolipídio), visando estabelecer qual seria o melhor surfatante e qual a melhor faixa de concentração a ser utilizada no processo de biorremediação de solo contaminado com óleo cru. Para este fim, foram avaliadas algumas características de ambos os surfatantes como 1) índice de emulsificação (IE); 2) atividade desidrogenásica (AD) e 3) índice de germinação (IG). Após a avaliação dessas três características, verificou-se que em baixas concentrações (0,1 a 0,6%) o JBR 210 foi melhor que SDS em relação ao IE e AD, sendo que a partir de 0,6% o SDS apresentou melhor resultado. O inverso foi verificado pela análise de IG. Tendo em vista que JBR 210 apresentou melhor resultado em duas das três características avaliadas e ainda que, baixas concentrações de surfatante confere maior economia ao processo, decidiu-se por avaliar a adição do JBR 210 ao processo de biorremediação. Dessa forma, observou-se que, entre 0,4 e 0,6% p/p de ramnolipídio, houve cerca 50% de remoção do óleo.

## **1. Introdução**

A preocupação do homem atual se volta para implementação de práticas comerciais sustentáveis, no entanto, enquanto alternativas menos impactantes não são incorporadas no cotidiano das indústrias, perceberemos muitas não conformidades que agridem o meio ambiente. Uma delas é a contaminação de petróleo em recursos hídricos ou no solo por acidentes no transporte marinho ou no rompimento de oleodutos. Já existem muitas tecnologias que procuram reduzir o impacto desse passivo no ambiente ou remover o óleo derramado no local. Dentre as tecnologias podemos citar a biorremediação como uma opção viável para tratamento de solo contaminado por petróleo. Esta tecnologia utiliza microrganismos que são capazes de metabolizar as cadeias de hidrocarbonetos, transformando-os em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O quando a mineralização é completa. Ou ainda, reduzir o tamanho dessas longas cadeias, tornando-as mais solúveis ao ataque microbiano. É importante ressaltar que a biorremediação de óleo cru depende de alguns fatores que permitem alcançar a máxima eficiência de biodegradação das moléculas derivadas ao solo. Dentre eles estão a estrutura do solo, os sais dissolvidos, a umidade, o pH, os microrganismos presentes no solo, etc.. Desta forma, o máximo de eficiência processual de biodegradabilidade dos hidrocarbonetos presentes no solo será alcançado no momento em que se otimizar o sinergismo entre estes fatores. As frações orgânicas presentes no solo, tendem a sorver as moléculas de

hidrocarbonetos. De modo que, quanto maior for a porção orgânica do solo e a exposição de óleo cru ao mesmo, maior será a sorção de hidrocarbonetos, dificultando a ação dos microrganismos e prejudicando a biodegradabilidade dos mesmos. Dessa forma, a utilização de recursos que retorne o óleo cru para sua forma solúvel e acessível à ação microbiana, auxilia enormemente o processo de biorremediação. Neste contexto, a utilização de surfatantes pode ajudar na dessorção do óleo presente no solo, além de ajudar a solubilizar compostos hidrofóbicos, tornando-os mais disponíveis para ação dos microrganismos.

## 2. Objetivo

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar dois surfatantes, sendo um químico SDS (Dodecil sulfato de sódio) e outro biológico (ramnolipídio) a fim de estabelecer uma concentração ótima a ser utilizada no processo de biorremediação de solo contaminado com óleo cru, visando maior eficiência e baixo impacto ambiental.

## 3. Materiais e Métodos

### 3.1. Caracterização do solo

No presente trabalho, utilizou-se solo da região Nordeste do Brasil. Este solo foi homogeneizado, peneirado e quarteadado, sendo caracterizados conforme os resultados apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Características do solo

Parâmetro	Teor no Solo Virgem	1. Parâmetro	Teor no Solo Virgem
N (g/kg)	0,2	Matéria orgânica (%)	4
P (g/kg)	0,1	pH	6,8
Silte*	14%	Capacidade de campo (%)	34
Areia*	75%	C orgânico (%)	2,3
Argila*	11%	Microrganismos Heterotróficos totais (UFC/g)	9,8 X10 <sup>6</sup>
Densidade Aparente (g/mL)	1,3	Microrganismos hidrocarbonoclasticos (cel/g)	2,8 X10 <sup>4</sup>

### 3.2. Surfatantes

Dois surfatantes aniônicos distintos foram usados nesse trabalho; o JBR 210 e o SDS (Dodecil Sulfato de Sódio). O primeiro mencionado, é um biossurfatante do tipo ramnolipídio e não passou por processo de purificação, possuindo apenas 10% de ramnolipídio. O SDS foi fabricado pela empresa VETEC e o JBR 210 pela empresa JENEIL Company.

#### 3.2.1. Caracterização dos surfatantes

##### 3.2.1.1. Índice de emulsificação dos surfatantes

Para verificar o índice de emulsificação trabalhou-se com soluções diferentes de surfatantes que variavam de 0,1% a 1,5 %v/v, sendo utilizada a metodologia proposta por Cooper & Goldeberg (1987).

### 3.2.1.2. Ecotoxicidade

#### 3.2.1.2.1. Verificação da atividade desidrogenásica através da adição de surfatantes

A técnica envolve a estimativa da taxa de redução de TTC (trifeniletazolium clorídrico) a TPF (trifenil formazan) nos solos após incubação a 30°C por 24h. Muitas variações destas técnicas têm sido testadas e estes testes foram baseados no método descrito por ALEF e NANNIPIERI (1995). Através desta metodologia foi possível avaliar a atividade do solo através da adição de diferentes concentrações dos surfatantes que variaram de 0,1 a 1,5% (% p/p).

#### 3.2.1.2.2. Teste de germinação com *Lactuca sativa*

O método de germinação e crescimento das raízes, sugerido por YERUSHALMI *et al.* (2003) será aplicado utilizando-se sementes de alface da espécie *Lactuca sativa*. Diferentes concentrações dos surfatantes foram adicionadas ao solo e variaram de 0,1 a 1,5% de ingrediente ativo. Uma das maneiras mais utilizadas de se caracterizar o composto segundo sua fitotoxicidade, é através do Índice de germinação (%IG), que pode ser calculado através da seguinte fórmula:

$\%IG = (\% \text{ germinação das sementes}) \times (\% \text{ crescimento das raízes}): 100;$

Onde: % Germinação de sementes =  $(\% \text{ germinação no extrato}) : (\% \text{ germinação no controle}) \times 100$

% Crescimento das raízes =  $(\text{média de crescimento no extrato}) : (\text{média de crescimento no controle}) \times 100$

### 3.3. Ensaio de biodegradação de solo mediada por adição do biossurfatante JBR 210 em biorreator

Os experimentos foram realizados em biorreatores constituídos de 20 cm de altura e 5 cm de diâmetro, sendo utilizado 15cm de leito de solo e 3cm de camada de brita, ocupando 90% do biorreator. Os ensaios foram mantidos à temperatura ambiente, empregando-se uma vazão de ar de 3L/h de ar úmido conforme estabelecido por PALA (2002) em ensaios anteriores. A Figura 1 mostra o esquema de montagem dos ensaios de biodegradação. Os ensaios foram realizados pela adição de diferentes concentrações do biossurfatantes que variaram de 0,1 a 1,5% p/p (g de biossurfatante por 100g de solo). Os nutrientes foram corrigidos através da adição de nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) e fosfato de potássio dibásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), empregando-se uma relação nutricional de C:N:P = 100:15:1, conforme estabelecido em ensaios anteriores. Os ensaios foram conduzidos em 45 dias sendo retirado amostras a cada 15 dias para determinação de Óleos e Graxas (O&G), pH e população microbiana. Durante o período experimental a umidade foi controlada através de balança termogravimétrica.

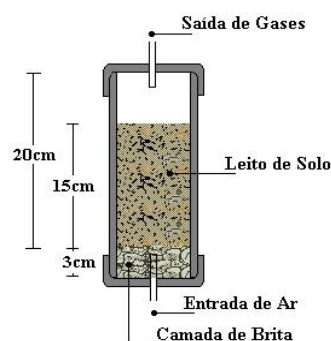


Figura 1 - Representação esquemática do biorreator aeróbico de Leito fixo.

### 3.4. Metodologias analíticas

#### 3.4.1. Determinação de óleos e graxas

A metodologia consistiu na separação de O&G a partir de uma determinada massa do solo (~ 2g). A extração foi conduzida com hexano, por 4 horas a uma velocidade de 20 ciclos por hora. Após este período, os extratos foram concentrados em rotoevaporador e, transferidos para tubos com diâmetro de 1cm, sendo o resíduo concentrado em purga de nitrogênio e banho à 45°C até a secura

## **4. Resultados e Discussão**

### 4.1. Caracterização do surfatante

#### 4.1.1. Índice de emulsificação (IE)

Os dois surfatantes analisados tiveram comportamentos diferentes, já que o biossurfatante JBR 210, por exemplo, teve sua faixa de IE estabilizada a partir de 0,2 %v/v de ingrediente ativo cujo resultado foi de 67%. O SDS apresentou-se estável entre as diluições de 0,1 a 0,6 %v/v de ingrediente ativo, conferindo um IE em torno de 30% e a partir de 0,8% o IE mostrou um salto considerável, alcançando valores superiores a 70%. Tais resultados indicam que para o JBR 210 a faixa ótima para alcançar bons índices de emulsificação está em torno de 0,2 a 1,5%v/v e para o SDS em torno de 0,8 a 1,5% v/v. Ao se analisar as diluições separadamente, observa-se que na menor concentração (0,1% v/v), o SDS foi melhor apresentando IE em torno de 30%. Na faixa entre 0,2 a 0,6 o JBR 210 foi melhor, obtendo IE de 67%. Já na faixa de 0,8 a 1,5, o SDS foi melhor obtendo um valor de IE superior a 70%. Estas faixas são importantes para verificar em qual delas há melhor possibilidade de emulsificar o óleo do solo e torna-lo mais disponível para a ação microbiana. A Figura 2 mostra os resultados do índice de emulsificação.

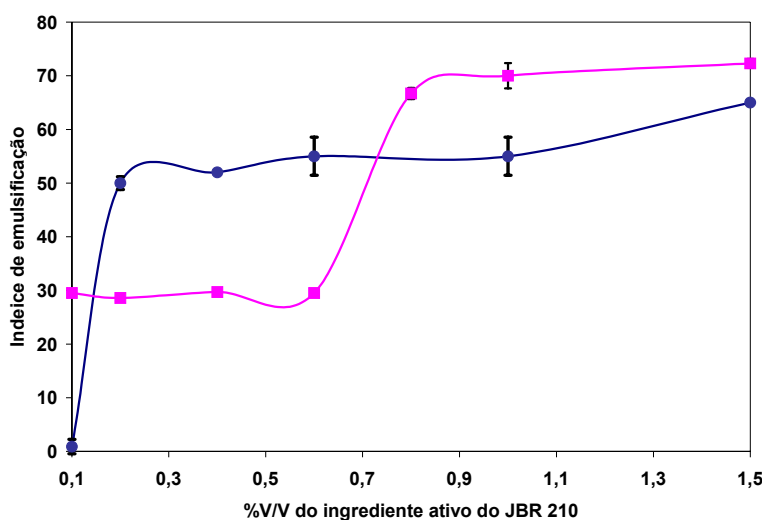


Figura 2. Índice de emulsificação do JBR 210 e SDS

#### 4.1.2. Ecotoxicidade

4.1.2.1 Verificação da atividade desidrogenase (AD) da adição de surfatantes em diferentes concentrações ao solo.

A Figura 3 mostra que os dois surfatantes apresentaram comportamentos distintos. Com relação ao JBR 210, a produção de TPF foi proporcional ao aumento em sua concentração até o limite de 0,4% (% p/p). Maiores concentrações de JBR 210 implicaram em redução na quantidade de TPF produzido. Mesmo tendo sua AD desestimulada, a crescente adição de JBR 210, não reduziu a produção de TPF para valores inferiores ao observado no solo virgem que foi de 6,5 $\mu$ g/g de solo. Isso mostra a tolerância dos microrganismos locais ao biossurfatante analisado. Por outro lado, a aplicação crescente de SDS, resultou em uma AD proporcional e linear ao aumento de surfatante. Entretanto, ao serem analisadas as faixas de concentrações em relação à massa do solo, verificou-se que entre 0,1 a 0,6%p/p o JBR 210 apresentou maior atividade que o SDS, sendo que acima deste valor (1 e 1,5%p/p) foi o SDS quem apresentou maior atividade no solo. Na concentração de 0,8%p/p a atividade foi a mesma para ambos os surfatantes.

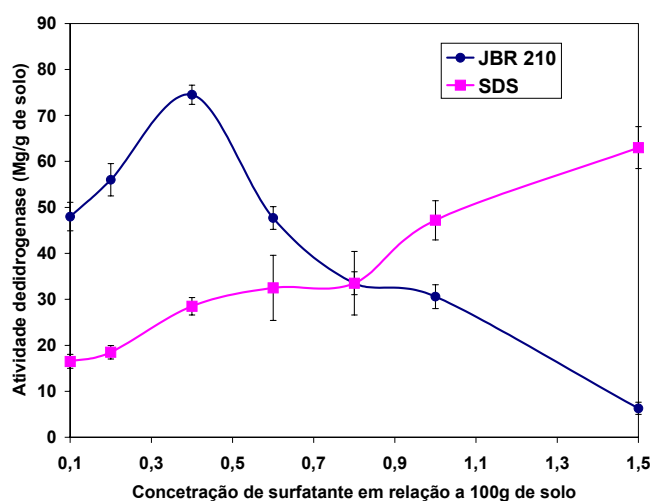


Figura 3: Atividade desidrogenase do JBR 210 e SDS

#### 4.2.2. Teste de germinação com *Lactuca sativa*

As germinações foram feitas em diferentes concentrações de ambos os surfatantes. A Figura 4 mostra o comportamento dos surfatantes quanto ao índice de germinação.

Segundo análise feita, percebeu-se que nas concentrações entre 0,1 a 0,6 %p/p, o SDS apresenta IG superior ao JBR 210 e embora o uso de SDS pareça menos impactante a biota local, ocorre uma inversão na média de crescimento do eixo hipocótilo-radícula a partir de 0,8 %p/p, de modo que o JBR 210 passa a ter as maiores médias de crescimento. Percebe-se ainda, que o JBR 210 tendeu a uma constância nas diluições a partir de 1,0% p/p e o SDS a partir de 0,8 % p/p. Vale a pena salvaguardar que na concentração de 0,1% houve incremento no índice de germinação. Isso pode ter ocorrido por erro procedimental ou pela possibilidade de que baixas concentrações desses surfatantes contribuam para aumentar a fertilidade do solo e consequentemente, o

índice de germinação da *L. sativa*. Todavia, ressalta-se que exceto nesta concentração de 0,1%p/p, a adição das demais concentrações foram inibitórias à germinação da *L. sativa*.

Após a caracterização dos surfatantes verificou-se que dependendo da concentração avaliada, ambos podem ser eficientes quanto ao IE, IG e AD. Em baixas concentrações (0,1 a 0,6%), por exemplo, o JBR 210 apresentou melhores resultados que o SDS em relação ao IE e AD, sendo que acima de 0,6 % o SDS revelou-se melhor. Entretanto, para o IG o SDS foi melhor na menor faixa de concentração (0,1 a 0,6%) e o JBR 210 para as concentrações acima de 0,6%. A adição de surfatante ao processo de biorremediação melhora a taxa de biodegradação do óleo cru aderido ao solo, contudo, entende-se que altas concentrações de surfatantes podem onerar o processo e, neste contexto, optou-se por avaliar o surfatante JBR 210, já que em menores concentrações (0,1 a 06%) este se mostrou eficaz em duas das três características avaliadas.

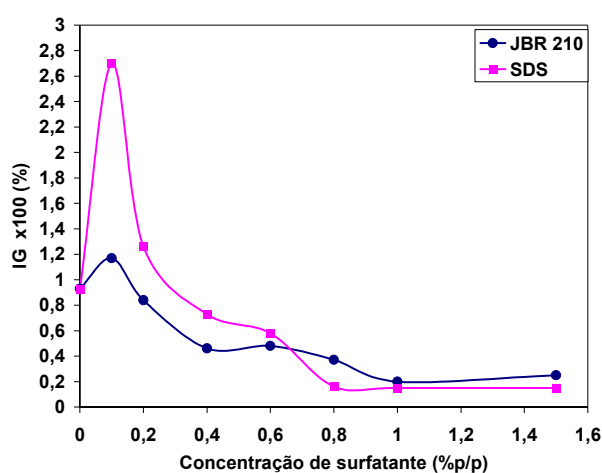


Figura 4. Índice de germinação (IG) de solo com diferentes concentrações de surfatantes em relação a massa do solo

#### 4.2.3. Avaliação da biodegradação do óleo cru em solo em diferentes concentrações do JBR 210

A Figura 5 mostra os resultados da quantificação de óleos e graxas nos ensaios de biodegradação onde foram adicionadas diferentes concentrações do biossurfatante, comparando-se ainda com o ensaio controle (sem biossurfatante). Verificou-se que após 45 dias de tratamento, as condições que apresentaram maior percentual de remoção do óleo foram às condições 0,4 e 0,6 % de biossurfatante com cerca de 50% de remoção de óleos e graxas. Contudo, a condição com 0,4% de biossurfatante apresentou uma tendência a se obter maior índice de biodegradação num período superior a 45 dias de tratamento. Observa-se ainda, que exceto os tratamentos com adição de 1,0 e 1,5% de biossurfatante, todos os outros tratamentos apresentaram remoção de óleo superior ao controle. Os testes de atividade desidrogenásica demonstraram que as concentrações entre 1 e 1,5% p/p diminuíam a atividade do solo e eram inibitórias para a germinação da *L. sativa*, tendo em vista que apresentaram apenas 20% de capacidade de germinação. De fato, a concentração com 1,5% de biossurfatante contribuiu para que houvesse inibição da taxa de biodegradação do óleo.

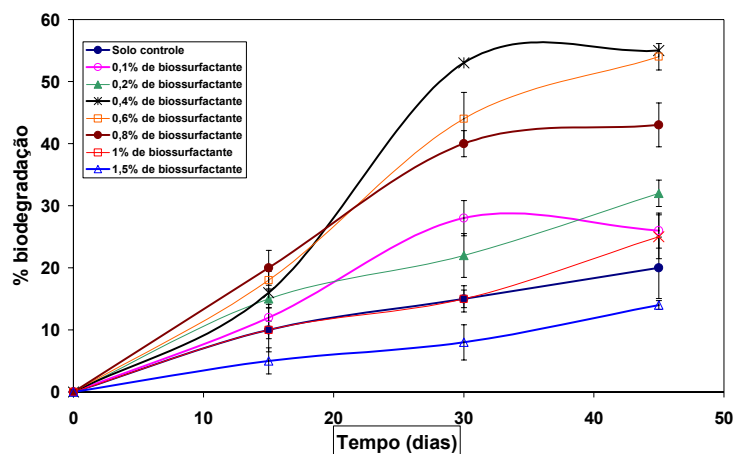


Figura 5: Biodegradação do óleo cru ao longo dos 45 dias em diferentes concentrações de biossurfactante, além do controle.

## 5. Conclusões

Com o presente estudo pode-se concluir que os resultados da atividade desidrogenásica e do índice de emulsificação apontaram o JBR 210 como melhor surfatante na faixa entre 0,1 a 0,6% p/p e acima de 0,6% o SDS apresentou-se com maior atividade e maior capacidade emulsificante. O inverso foi observado nos resultados de índice de germinação já que o SDS apresentou maior capacidade germinativa na faixa de concentração entre 0,1 a 0,6% e o JBR acima de 0,6% p/p. Entretanto, os dois surfatantes, mostraram-se tóxicos após a adição da concentração de 0,1 % p/p. Os ensaios de biodegradabilidade indicaram que foi possível obter maior percentual de biodegradação através da adição do biossurfactante nas concentrações entre 0,4 e 0,6 % p/p.

## 6. Agradecimentos

Nossos sinceros agradecimentos ao CETEM, CNPq, ANP e a Petrobrás pelo apoio financeiro, técnico e científico de todos.

## 7. Bibliografia

ALEF, K. & NANAPIERE, P. **Methods unapplied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press. 576p. 1995.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G surface-active agents two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 224-229.1987.

PALA, D.M. (2002). **Estudo da biorremediação de solo impactado por óleo cru**. Orientadores: Geraldo Lippel Sant'Anna Jr. e Denize Dias de Carvalho Freire. Rio de Janeiro: COPPE/UFRJ. 114p. Dissertação (Mestrado em ciências).

YERUSHALMI, L. ROCHELEAU, S. CIMPOIA, R. SARRAZIN, M. SUNAHARA, G. PEISAJOVICH, A. LECLAIR, G. GUIOT, S.R. Enhanced biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated soil. **Bioremediation Journal**, vol 7, pp. 37 51, 2003.