

BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS IMPACTADOS POR ÓLEO CRU UTILIZANDO FUNGOS FILAMENTOSOS

Rosana Candida Macedo

Bolsista de Nível Médio, Tec. Química Industrial, CEFETEQ de Nilópolis

Victor Hugo Criado Berbert

Bolsista de Nível Médio, Tec. Química Industrial, CEFETEQ de Nilópolis

Judith Liliana Solórzano Lemos

Orientadora, Eng^a Química, D. Sc.

Pedro Veltri Ormaston Trindade

Orientador, Engo Químico, M. Sc.

Andrea Camardella de Lima Rizzo

Orientadora, Eng^a Química, M. Sc.

RESUMO

A biorremediação é uma técnica que vem alcançando importância mundial, uma vez que o aumento da atividade industrial está degradando, cada vez mais, os ecossistemas naturais. O emprego de microrganismos conhecidos no tratamento de rejeitos potencialmente tóxicos, incluindo hidrocarbonetos de petróleo, é uma prática habitual em alguns países desenvolvidos. Os sistemas biológicos geralmente utilizados são microrganismos e plantas. No entanto, a biodegradação com microrganismos é a opção mais frequentemente empregada.

*Por esse motivo o presente trabalho foi realizado com o intuito de avaliar a capacidade degradadora de nove linhagens de fungos filamentosos isolados de um solo contaminado com petróleo. O ensaio realizado com adição de 10⁶ conídeos/g de solo e 50% da capacidade de campo, a 30°C, mostrou que dentre os fungos avaliados, *Aspergillus versicolor*, foi o que teve a posição de destaque, com uma eficiência de biodegradação de aproximadamente 11%, enquanto *Aspergillus niger* apresentou eficiência de 7,33%, correspondendo ao segundo melhor resultado.*

1. INTRODUÇÃO

1.1 Óleo Cru e o tratamento de áreas contaminadas pelo seu derrame

O óleo cru corresponde à fração líquida do petróleo, cuja composição é de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, compostos sulfidrilados, oxigenados e nitrogenados, e alguns metais dissolvidos em água (OLIVEIRA, 2001). De acordo com a origem do petróleo, a composição química e as propriedades físicas do óleo cru podem variar demasiadamente, e é devido a esses fatores (composição complexa e variabilidade na composição) que se encontram dificuldades para o tratamento de áreas contaminadas por tal substância.

Com base na informação de que microrganismos procariotos e eucariotos podem degradar hidrocarbonetos, realizam-se cada vez mais estudos que visam o desenvolvimento de tecnologias que se utilizam dos mesmos para descontaminação de áreas afetadas por óleo cru.

Devido à elevada diversidade de compostos presentes no petróleo, estudos de biorremediação de ambientes contaminados por este material e seus derivados, tornam-se necessários, visto que se pode encontrar moléculas de fácil e difícil biodegradação (OLIVEIRA, 2001).

1.2 O que é Biorremediação de solos?

A biorremediação surgiu como uma tecnologia alternativa de remediação de locais impactados com poluentes orgânicos e se baseia na utilização de populações microbianas que possuem a habilidade de modificar ou decompor determinados poluentes. O benefício máximo desse processo é a mineralização, obtendo como produto final CO_2 e água pela via aeróbica, assim como a formação de biomassa (da CUNHA, 1996).

Desde meados dos anos 90, as estratégias de biorremediação têm sido adotadas seriamente como uma maneira eficaz e de baixo custo para a remediação de solos contaminados por petróleo e de outros compostos orgânicos; causando, ainda, menores distúrbios na superfície a ser tratada. No entanto, esta técnica tem-se deparado com empecilhos relacionados à dificuldade de aplicação em solos impermeáveis ou que apresentem metais

pesados em sua composição e à possibilidade de se gerar produtos intermediários nocivos.

A biorremediação pode ser classificada de três modos diferentes quanto ao local de tratamento (GRUIZ e KRISTON, 1996):

≈ *In situ*: tratamento no local da contaminação.

≈ *Ex-situ ou off site*: remoção do solo contaminado para posterior tratamento em uma planta.

≈ *On site*: tratamento após escavação do solo.

1.3 Microrganismos X Biodegradação de hidrocarbonetos

A capacidade dos microrganismos de degradar compostos orgânicos é cientificamente reconhecida e vem sendo utilizada ao longo do tempo em processos de tratamento biológico de efluentes líquidos e de resíduos sólidos. Graças a essa habilidade têm sido desenvolvidos processos biotecnológicos destinados a diversas finalidades, dentre os quais destacam-se a degradação de poluentes, a lixiviação de minerais, a desobstrução de poços de petróleo e a recuperação de locais contaminados - solo, águas superficiais e subterrâneas - (de OLIVEIRA, 2002). Tais microrganismos podem ser encontrados no próprio ambiente impactado, sendo na maioria das vezes, os responsáveis pelo desaparecimento dos contaminantes.

Em um ambiente contaminado, os hidrocarbonetos são, geralmente, degradados por bactérias, havendo também a possibilidade de atuação de fungos neste processo. Porém, a contribuição de cada um varia com os fatores ambientais e as propriedades físico-químicas do solo (da CUNHA, 1996). Desta forma, os fungos consideram-se mais eficientes sob condições adversas: solos com valores extremos de pH, limitação de nutrientes e com baixo teor de umidade.

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivo estudar a viabilidade de utilização de fungos filamentosos no biotratamento de solo impactado por óleo cru,

comparando os resultados obtidos aos provenientes de uma pesquisa, anteriormente realizada, utilizando-se um consórcio microbiano formado por uma bactéria filamentosa e uma levedura na degradação do referido poluente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras de solo

O solo utilizado foi o de Guararema - SP caracterizado como uma areia argilosa, contaminado em dezembro de 1998 por um derramamento de óleo cru. As amostras de solo utilizadas no desenvolvimento dos testes foram coletadas em outubro de 2001 (3ª Remessa) e os resultados destes foram comparados com os obtidos nos experimentos realizados com o consórcio microbiano constituído por uma linhagem de *Nocardia nova* (bactéria filamentosa) e outra de *Rhodotorula glutinis var. dairensis* (levedura), nos quais foram utilizadas amostras de solo coletado em outubro de 1999 (1ª Remessa).

3.2. Microrganismos

Os ensaios de biorremediação foram realizados utilizando-se nove linhagens de fungos filamentosos, cuja identificação e meios empregados na geração de biomassa para obtenção de inóculo estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Microrganismos empregados na biorremediação do solo de Guararema e os respectivos meios de cultivo

| Linhagens | Meios |
|---------------------------------|------------------|
| <i>Aspergillus terreus</i> | Czapeck |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | Czapeck |
| <i>Aspergillus versicolor</i> | Czapeck |
| <i>Aspergillus niveus</i> | Czapeck |
| <i>Aspergillus niger</i> | Czapeck |
| <i>Penicillium corylophilum</i> | Czapeck |
| <i>Paecilomyces variotti</i> | Extrato de Malte |
| <i>Paecilomyces niveus</i> | Extrato de Malte |
| <i>Fusarium sp</i> | BDA |

Todos os fungos empregados no presente trabalho foram cultivados em tubos inclinados (tabela 1) a 30°C durante 67 dias. Os conídeos de cada linhagem foram suspensos em água destilada estéril, contados em câmara de Neubauer e, a seguir, inoculados na concentração de 10⁶ conídeos/g de solo.

3.3. Quantificação do CO₂ gerado:

O acompanhamento do processo de biodegradação foi realizado por cromatografia gasosa mediante a dosagem de CO₂, gerado pelos fungos como produto do metabolismo celular. O gás, confinado em kitasato de 250 mL, vedado com rolha de borracha no topo, e uma mangueira de látex na saída lateral, comprimida com pinça de Hofman, foi recolhido em volume de 500?L através da sucção da atmosfera interna dos frascos (*headspace*), contendo as amostras de solo. O cromatógrafo empregado nesta determinação foi o HP 5890 série II, cujas condições de análise encontram-se descritas a seguir:

Vazão da gás de arraste (He) ≈ 17.89 mL/min

Vazão da gás de referência (He) ≈ 17.89 mL/min

Temperatura do detector: 220°C

Temperatura do forno auxiliar: 74°C

Temperatura do injetor: 110°C

Coluna de aço inox (3m/3mm) recheada com Chromosorb 102

Com base no valor acumulado de CO₂, calculado no final dos experimentos e na estimativa de incorporação do contaminante à biomassa (50%), calculou-se a eficiência de biodegradação (EB) da seguinte forma:

Massa de Carbono Biodegradada Totalmente = 2 x Massa de carbono proveniente de CO₂ gerado

$$EB\% = \frac{\text{Massa de carbono biodegradada totalmente}}{\text{Massa de carbono orgânico total do solo}} \times 100$$

3.4. Condições de degradação

A degradação do solo contaminado foi realizada em kitsatos de 250mL, contendo em cada um 50g de amostra, com teor de umidade corrigido para 50% da capacidade de campo. O experimento foi realizado a 30°C por 40/42 dias sem correção de pH (pH original 5,1) e sem ajuste das condições nutricionais originalmente presentes no solo: 26.26mg/g de TPH, fonte de carbono; 1,0g/Kg de nitrogênio e 0,001g/Kg de fósforo. Baseado nesses dados pôde-se calcular a relação carbono, nitrogênio e fósforo (C:N:P), cujo resultado foi: 100:2,17:0,0022.

Os ensaios foram avaliadas de acordo com as seguintes condições:

Tabela 2. Identificação das amostras empregadas nas análises realizadas

| Identificação | Amostras |
|----------------------|---|
| 1 | Solo Virgem |
| 2 | Solo contaminado sem adição de microrganismos |
| 3 | Solo contaminado com adição do fungo <i>Aspergillus terreus</i> |
| 4 | Solo contaminado com adição do fungo <i>Aspergillus fumigatus</i> |
| 5 | Solo contaminado com adição do fungo <i>Aspergillus versicolor</i> |
| 6 | Solo contaminado com adição do fungo <i>Aspergillus niveus</i> |
| 7 | Solo contaminado com adição do fungo <i>Aspergillus niger</i> |
| 8 | Solo contaminado com adição do fungo <i>Penicillium corylophilum</i> |
| 9 | Solo contaminado com adição do fungo <i>Paecilomyces variotti</i> |
| 10 | Solo contaminado com adição do fungo <i>Paecilomyces niveus</i> |
| 11 | Solo contaminado com adição do fungo <i>Fusarium sp</i> |

3.5. Análise de matéria orgânica pelo método de ignição

A análise de matéria orgânica foi realizada através do método de ignição utilizando mufla à 1000°C por um período de 1hora, com o objetivo de corroborar os resultados obtidos por evolução de CO₂.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos valores de CO₂ acumulado para cada uma das condições estudadas calculou-se a eficiência de biodegradação, como mostram os resultados apresentados na figura 1.

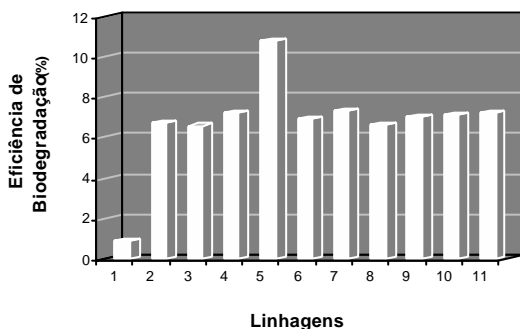


Figura 1. Eficiência de biodegradação das linhagens de fungos estudadas.

De acordo com os resultados observados na figura 1, a condição que apresentou a maior eficiência de biodegradação foi a nº 5 (10,80%), que empregava *Aspergillus versicolor* como agente de degradação. Quanto à contribuição das outras linhagens de fungos avaliadas no mesmo processo os resultados mostraram semelhança entre si, alcançando eficiências entre 6,60 e 7,33 %.

O gráfico da figura 2 representa a evolução de CO₂, obtida com a adição de *A. versicolor* ao solo contaminado e monitorada num período de 41 dias.

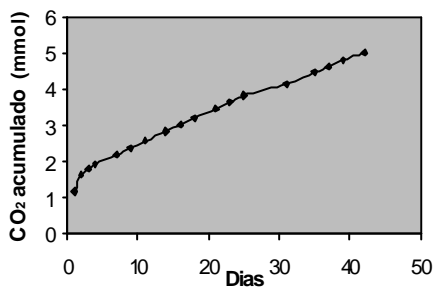


Figura 2. Produção de CO₂ por *Aspergillus versicolor*.

Com base no resultado da figura 2, observou-se uma evolução contínua e crescente de CO₂ ao longo do tratamento, indicando a possibilidade de obtenção de valores de eficiências de biodegradação superiores ao encontrado no período de 41 dias.

Destaca-se ainda que, a ausência da fase lag no processo de degradação evidencia uma prévia adaptação, tanto de *A. versicolor* quanto da microbiota nativa às condições pré existentes na amostra de solo contaminado, bem como às estabelecidas para o ensaio.

Na figura 3 estão apresentados os resultados de eficiência de remoção de matéria orgânica, obtidos através da análise de matéria orgânica por ignição das amostras iniciais e finais.

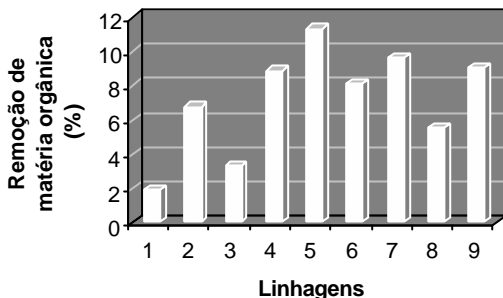


Figura 3. Eficiência de remoção de matéria orgânica.

A partir da análise da figura 3 verificou-se que o perfil dos resultados de remoção de matéria orgânica seguiu a mesma tendência dos obtidos através das análises cromatográficas, com decaimento mais acentuado nas condições 3 e 8. Além disto, foi possível comprovar que a condição 5, contendo o fungo filamentososo *A. versicolor* foi a que apresentou a maior remoção de matéria orgânica (11,37%), reforçando, desta maneira, os resultados anteriores.

Em trabalho prévio desenvolvido pela equipe empregando-se o consórcio microbiano (*Nocardia nova* e *Rhodotorula glutinis var. dairensis*) no tamanho de inóculo de 10^8 UFC/g de solo, em amostra de solo da 1ª remessa (TPH = 53.8mg/g de solo), com correções de umidade para 50% da capacidade de campo, pH ajustado em 7,0 e relação nutricional (C:N:P) de 100:1,25:1, obteve-se uma eficiência de biodegradação de 7,39%.

Comparando-se o resultado do consórcio com o obtido no presente trabalho, pode-se evidenciar que *A. versicolor* apresentou um potencial em eficiência de biodegradação 46% maior do que o do referido consórcio. No entanto, destaca-se que a presença de concentrações elevadas de contaminante, como era o caso da 1ª remessa de solo, onde o consórcio microbiano foi cultivado, pode ter favorecido a inibição da capacidade degradadora dos mesmos. Desta forma, recomenda-se que tanto os fungos quanto o consórcio sejam avaliados em uma mesma remessa de solo.

Por outro lado, vale ressaltar que embora as eficiências de biodegradação sejam ainda incipientes, o solo empregado neste experimento era um solo exposto a intempérie e submetido à degradação natural. Isto indica a recalcitrância à qual foram submetidas tanto a microbiota nativa quanto a composta pelos fungos filamentosos adicionados aos solos. Os resultados obtidos das dosagens de TPH nos solos contaminados, referentes à 1º e 3º remessas, recebidos com aproximadamente 3 anos de diferença, corroboram a degradação sofrida pela segunda amostra ao longo desse tempo, correspondendo praticamente à metade da concentração inicial.

5. CONCLUSÕES

Dentre as linhagens de fungos submetidas a teste de degradação de óleo cru, *A. versicolor* apresentou a maior eficiência de biodegradação (10,8%) e de remoção de matéria orgânica (11,37%).

A partir do resultado comparativo entre as eficiências de biodegradação do fungo filamentoso e do consórcio microbiano, constituído de bactéria filamentosa e levedura (7,39%), conclui-se também que *A. versicolor* pode ser apontado como um degradador em potencial dos hidrocarbonetos contaminantes presentes no solo impactado.

BIBLIOGRAFIA

da CUNHA, C. D. (1996). "Avaliação da Biodegradação de Gasolina em Solo". Tese M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 97p.

de OLIVEIRA, M. C. D. (2002) Em: <http://www.cetesb.gov.br>. Site acessado em março de 2002.

GRUIZ, K.; KRINSTON, E. (1996). In situ bioremediation of hydrocarbons in soil. *Journal of soil Contamination*, v.4, n.5, p. digital.

OLIVEIRA, F. J. S. (2001). "Biorremediação de Solo Arenoso Contaminado por Óleo Cru". Tese M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 110 p.