

# **AVALIAÇÃO DA POTENCIALIDADE DO USO DE BIOSURFACTANTE NA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO POR ÓLEO CRU**

**Letícia Cotia dos Santos**

Bolsista de Inic. Científica, Eng. Química, UFRJ

**Valéria Souza Millioli**

Orientadora, Eng.<sup>a</sup>. Química, M. Sc.

## **RESUMO**

*Foi avaliada neste trabalho a potencialidade do uso de um biosurfactante do tipo ramnolípido no processo de biodegradação de solo contaminado com óleo cru. Para este fim, foram conduzidos três diferentes tratamentos: 1) Adição de 1g de biosurfactante + solo contaminado; 2) Adição de 1g de biosurfactante + inóculo de fungo (*A.versicolor* 10<sup>6</sup>con/g de solo) + solo contaminado; 3) Adição de 1g de biosurfactante + inóculo da microbiota nativa (5x10<sup>10</sup>UFC/g de solo) + solo contaminado. Os ensaios foram conduzidos em kitassato utilizando 50g de solo com 50% da C/C (capacidade de campo). suplementados com nutrientes (C:P – 100:1) e com pH ajustado em*

*7,0. Estes ensaios foram encubados em estufa a 30°C durante 60 dias sendo quantificados por geração de CO<sub>2</sub> e analisados em cromatografia gasosa (CG HP 5890 Séries) com posterior determinação de óleos e graxas. Os resultados obtidos indicaram que o tratamento com biosurfactante + microbiota nativa apresentou melhor percentual de biodegradação do óleo. Ressalta-se ainda que nos ensaios em que não houve bioaumento com os microrganismos do próprio solo, o biosurfactante conduziu bons índices de biodegradação, em decorrência do aumento da solubilidade dos compostos hidrofóbicos causando maior disponibilidade destes, para ação dos microrganismos.*

## **1. INTRODUÇÃO**

A poluição causada por petróleo e seus derivados tem sido um dos principais problemas ambientais das últimas décadas. Diversas técnicas físicas, químicas e biológicas vem sendo desenvolvidas para a retirada de

petróleo derramado ou para a redução dos seus efeitos sobre o ecossistema. Dentre as tecnologias desenvolvidas, destaca-se a biorremediação que utiliza microrganismos capazes de reduzir ou eliminar os contaminantes. Esta técnica vem sendo amplamente utilizada em solos contaminados com óleo cru, cujos tratamentos podem ser *in situ* (no próprio local de contaminação), tornando o processo mais atrativo e economicamente viável ou *ex-situ* que requer a escavação e a remoção do solo para outro local, aumentando o custo do processo, porém, permitindo um melhor controle para o tratamento do solo. O solo possui, naturalmente, diversos microrganismos com atividades metabólicas variadas capazes de degradar óleo cru. Entretanto, a técnica de biorremediação em solos contaminados com óleo cru sofre limitação devido ao baixo nível de disponibilidade dos hidrocarbonetos (baixa solubilidade em água, alta fixação sobre a matriz do solo e pouca transferência dos poluentes absorvidos da fase sólida para a fase aquosa). Dessa forma, a utilização de um biossurfactante pode minimizar estes problemas e aumentar os índices de biodegradação de óleo cru (Volkering et al., 1995; Pala, 2002).

A adição de biossurfactante na técnica de biorremediação têm efeitos positivos em relação à dessorção dos COHs (compostos orgânicos hidrofóbicos) sorvidos no solo e ao aumento da solubilidade dos mesmos, principalmente, quando estes biossurfactantes são utilizados em concentrações bem acima da CMC - Concentração Micelar Crítica (Móran *et al.* 2000; Jain *et al.* 1992). Os biossurfactantes diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras (Nitschke & Pastore, 2002).

## **2. OBJETIVO**

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a biodegradação de óleo cru em solo, utilizando um biossurfactante do tipo ramnolípideo.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 O solo: local de contaminação e amostragem

O solo estudado é proveniente de Guararema (SP) onde ocorreu um vazamento em 29/12/1998. Após o derrame, o solo foi colocado em diques de armazenamento, dos quais foram retiradas as amostras para estes ensaios. As amostras foram retiradas em outubro de 2001 em 13 pontos distintos do dique de armazenamento e em três diferentes profundidades. O solo foi homogeneizado, quarteado e estocado em lotes de 5kg cada um em temperatura  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise.

#### 3.2. Caracterização do solo

O solo estudado foi caracterizado pela UFRRJ, CETEM e CENPES obtendo-se os seguintes resultados segundo a Tabela 1, a seguir:

Tabela 1 - Caracterização do solo contaminado de Guararema:

Parâmetro	Teor(Solo)	Feita por:	Parâmetro	Teor(Solo)	Feita por:
C orgânico	46g/kg	UFRRJ	pH	5,1	UFRRJ
N	1,0 g/Kg	UFRRJ	TPH	26,26mg/g	CENPES
P	0,001g/Kg	UFRRJ	HPA's	4,37mg/g	CENPES
K	0,084g/Kg	UFRRJ	O&G	3,21 %	CENPES
Matéria Org.	8,54 %	CETEM	Capacidade Campo-C/C	38,5 %	CETEM

### 3.3. Biossurfactante

Os biossurfactantes são grupos de agentes ativos de superfície. São moléculas anfipáticas consistindo de um grupo cabeça hidrofílico (polar) e um grupo cauda hidrofóbico (não polar). A escolha do biossurfactante a ser utilizado foi feita com base em estudos anteriores (Santos *et al.* 2003). Utilizou-se 1g do biossurfactante JBR 215 (15% concentrado de ramnolipídeos - fabricado pela JENEIL) em cada ensaio.

### 3.4. Ensaio de Biodegradação:

Os ensaios de biodegradação foram conduzidos em 6 diferentes condições vistas na Tabela 2 a seguir:

**Tabela 2- Condições empregadas nos testes com biossurfactante:**

Condição	Solo (50 g)	Concentração do Biossurfactante	Correção nutrientes/pH/ Umidade	Fungos	Microbiota Nativa
1	Contaminado	2% d/d	SIM	-	-
2	Contaminado	2% p/p	SIM	SIM	-
3	Contaminado	2% p/p	SIM	-	SIM
4	Virgem	2% p/p	SIM <sup>(a)</sup>	-	-
5	Virgem	2% p/p	SIM <sup>(a)</sup>	SIM	-
6	Virgem	2% p/p	SIM <sup>(a)</sup>	-	SIM

(a) Relação nutricional: C:P = 100:1 , desprezando-se a contribuição nutricional do próprio solo

Os microrganismos são capazes de consumir os hidrocarbonetos de petróleo e os biossurfactantes, utilizando-os como fonte de carbono e de energia. Sendo assim, a geração de CO<sub>2</sub> nos ensaios de biodegradação seria tanto do biossurfactante quanto dos hidrocarbonetos presente no solo contaminado. Para minimizar este problema foram conduzidos ensaios com

solo virgem, nas mesmas condições empregadas nos experimentos com o solo contaminado, para descontar o CO<sub>2</sub> gerado pela degradação do biossurfactante.

### **3.4.1. Cálculo do percentual de biodegradação**

Muitas espécies de microrganismos do solo conseguem metabolizar hidrocarbonetos derivados do petróleo reduzindo-os a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (produtos de sua completa mineralização). Cerca de 50% da matéria orgânica é incorporada à biomassa e os outros 50% são transformados em CO<sub>2</sub>. Dessa forma, o total de contaminantes consumido pode ser quantificado, através da geração de CO<sub>2</sub>.

Os percentuais de biodegradação (PB's) do óleo cru aderido ao solo foram calculados através da seguinte fórmula:

$$PB (\%) = (C_{\text{consumido}} \times 100) / C_i$$

Onde:

$C_{\text{consumido}} = 2 \times (\text{CO}_2 \text{ acumulado do SC} - \text{CO}_2 \text{ acumulado do SV} - \text{controle})$

$C_i = \text{Concentração inicial de carbono} = 85\% \text{ da concentração inicial de TPH's.}$

SC = Solo contaminado; SV = solo virgem

### **3.4.2. Preparo das amostras**

Conduziram-se os ensaios pesando-se 50g de solo seco virgem e contaminado, em kitassato. Todas as amostras foram neutralizadas com hidróxido de cálcio (Ca(OH)<sub>2</sub>), sendo suplementadas com nutrientes seguindo a relação C:P 100:1. Adicionou-se somente fósforo ao meio na forma de fosfato de potássio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), já que em ensaios anteriores foi verificado que a adição de nitrogênio na forma de nitrato de amônio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) diminuía o percentual de biodegradação (Trindade, 2002). Em alguns experimentos houve a inoculação com fungos (*Arspergillus versicolor* 10<sup>7</sup> con/g de solo) ou com microbiota nativa (5X10<sup>9</sup> UFC/g de solo) do solo e em todos foi adicionado 1g de biossurfactante, ajustando-se a umidade para 50 % da C/C. Homogeneizou-se a mistura com um bastão e tampou-se o frasco com rolha de silicone, vedando a saída lateral (tubo de látex) com pinça de Mohr. Os frascos foram incubados com duplicata, em estufa à 30<sup>o</sup> C, durante 60 dias, sendo

retirados periodicamente para análise cromatográfica, aeração e, quando necessário, nova correção de umidade.

### **3.5. Metodologias Analíticas**

#### **3.5.1. Preparo do Inóculo**

##### **3.5.1.1. Microbiota nativa**

Foram adicionados 10g de solo contaminado em um erlenmeyer de 500mL possuindo 200mL de meio mineral contendo (em g/L): NaCl, (5); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (1); NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (1); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,(1); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, (0,2); KNO<sub>3</sub>, (3) e extrato de levedo, (0,3). Este ensaio foi incubado sob agitação de 150 rpm, à 30°C, durante 3 dias. Após este tempo, tomou-se uma alíquota de 10mL que foi transferida para meio fresco e incubada sob as mesmas condições descritas anteriormente, adicionando 5 gotas de óleo cru (aprox. 0,25%) por um período de 5 dias. Após duas transferências sucessivas foi feito um plaqueamento em meio orgânico para avaliar o número de heterotróficos totais, para posteriormente utilizar o inóculo na concentração de 5x10<sup>10</sup>UFC/g de solo.

##### **3.5.1.2. Fungos filamentosos (*Aspergillus versicolor*).**

A escolha do fungo *Aspergillus versicolor* foi feita com base em ensaios anteriores (Macedo & Berbert; 2002; Araujo, 2002). Os fungos foram cultivados em tubos inclinados (meio sólido Czapeck) a 30° C durante 6 – 7 dias, extraídos conforme metodologia descrita por Macedo & Berbert; (2002) e inoculados na concentração de 10<sup>7</sup> conídeos/g de solo.

##### **3.5.3. Quantificação do CO<sub>2</sub>**

O processo de biodegradação foi acompanhado por cromatografia gasosa mediante a dosagem de CO<sub>2</sub>. O gás confinado em kitassatos de 250mL, foi recolhido em volume de 0,5mL por sucção da atmosfera intensa dos frascos (headspace), contendo as amostras de solo analisadas. O cromatógrafo utilizado foi o HP 5890 série II com detector de condutividade térmica (DCT) e as condições gerais de análise empregadas no processo encontram-se listadas a seguir:

- Vazão do gás de arraste (He): 17.89 mL/min
- Vazão do 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

### **3.5.4. Determinação de Óleos e Graxas**

O teor de óleos e graxas (hidrocarbonetos minerais) no solo foi quantificado por gravimetria utilizando método de extração com ultrassom (Rizzo & Raimundo, 2003). O método apresentado é adequado para quantificação de lipídeos biológicos e hidrocarbonetos minerais e baseia-se na solubilidade destes constituintes num solvente orgânico (extrator).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Avaliação dos resultados dos percentuais de biodegradação (PB's)**

A Figura 1 mostra os percentuais de biodegradação do óleo cru dos três diferentes tratamentos no solo contaminado. Pode-se verificar que a inoculação com a microbiota nativa ou fungos filamentosos não proporcionou aumento significativo na biodegradação do óleo cru em relação ao ensaio que foi adicionado somente o biossurfactante ao meio. Tal constatação é importante, principalmente, no que diz respeito a praticidade desses ensaios, já que a inoculação requer um tempo maior de preparo além de tornar o processo mais difícil de ser executado.

O aumento na biodegradação através da adição do biossurfactante pode ser melhor evidenciado quando comparado com ensaios anteriores. Santos (2002) realizou ensaios de biodegradação nas mesmas condições operacionais (pH, C/C, nutrientes e temperatura) com este mesmo solo contaminado, porém sem adição do biossurfactante e observou que após 42 dias de ensaio houve degradação do óleo cru em 7,6 %. Entretanto, nos ensaios atuais, a adição do biossurfactante apresentou um percentual de

biodegradação de 14,2% no mesmo período estudado anteriormente (42 dias). Esta melhora nos percentuais de biodegradação pode ser explicada pelo aumento da solubilidade dos hidrocarbonetos, tornando-os mais acessíveis aos microrganismos.

O ensaio conduzido com biossurfactante e inoculado com a microbiota nativa do solo apresentou maior percentual de biodegradação em relação aos outros tratamentos. Tal aumento era de se esperar, já que mais microrganismos, capazes de degradar o óleo cru, foram adicionados ao solo. Morán *et al.* (2000) estudaram a degradação de borras oleosas em ensaios feitos com a adição de um biossurfactante (surfactin) e também observaram que a degradação foi melhor na presença do biossurfactante em conjunto com o inóculo da microbiota nativa.

A inoculação com fungo *Aspergillus versicolor* ao solo não apresentou melhora no índice de biodegradação em relação ao ensaio que continha somente o biossurfactante no meio. Este resultado pode ser explicado devido aos fungos crescerem, de um modo geral, em pHs mais ácidos. Como nestes ensaios o pH do solo foi ajustado próximo a neutralidade ( $\approx 7,0$ ), isto pode ter dificultado a ação dos fungos no processo de biodegradação.

Os percentuais de biodegradação nos três tratamentos empregados no solo contaminado ficaram entre 19 - 26%. Estes índices não foram maiores provavelmente, pela presença de compostos recalcitrantes no óleo cru devido ao processo de intemperização do solo.

A Figura 2 mostra a evolução do  $\text{CO}_2$  nos experimentos realizados com solo virgem. Observa-se maior evolução de  $\text{CO}_2$ , pela ação dos microrganismos, em torno de 30 dias, indicando que o processo de degradação do biossurfactante ocorreu neste mesmo período. Por outro lado, verificou-se pela Figura 3, que no tratamento feito com o solo de Guararema, contaminado por óleo cru, o processo de evolução de  $\text{CO}_2$  continuava ao longo dos 60 dias evidenciando a possibilidade de obtenção de maiores índices de biodegradação num período de tratamento maior.

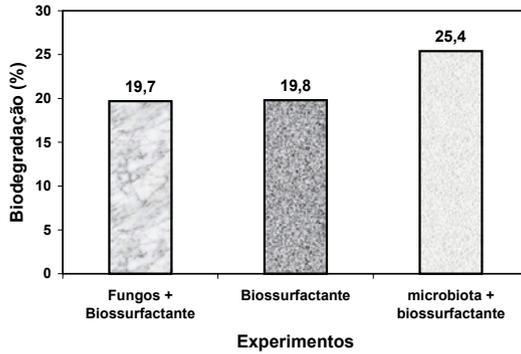


Figura 1: Percentual de biodegradação do óleo cru no solo contaminado.

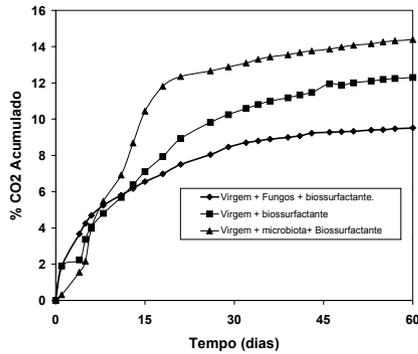


Figura 2- Evolução de CO<sub>2</sub> no solo virgem em três tratamentos distintos.

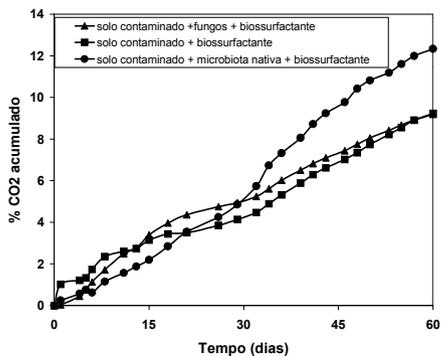
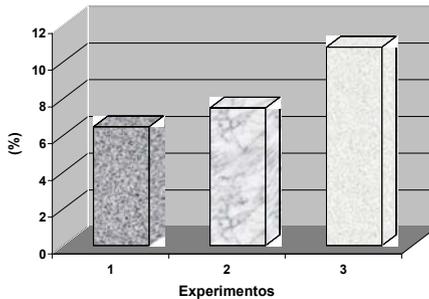


Figura 3- Evolução de CO<sub>2</sub> no solo contaminado em três tratamentos distintos, descontando a evolução do CO<sub>2</sub> obtida nos tratamentos com solo virgem.

#### 4.2. Verificação da Degradação do Óleo por O&G

O método utilizado determina o teor de hidrocarbonetos minerais presentes no solo. Toma-se, então, possível avaliar a quantidade de hidrocarbonetos degradada ao se observar a quantidade de hidrocarbonetos presentes antes e após o tratamento do solo contaminado.

A Figura 4 mostra os resultados da quantificação de óleos e graxas no solo contaminado. Observa-se, a partir destes resultados, que o experimento no qual o biossurfactante foi utilizado em conjunto com a microbiota nativa do solo, apresentou um maior percentual de remoção de óleos e graxas, confirmando o que foi visto na quantificação feita a partir da evolução de CO<sub>2</sub>.



**Figura 4 – Resultados da remoção de óleos e graxas no solo contaminado em três tratamentos distintos. Tratamentos: 1- biossurfactante; 2- biossurfactante + fungos; 3- biossurfactante + microbiota nativa.**

## **5. CONCLUSÕES**

- Realizaram-se três diferentes tratamentos e os resultados obtidos, através da quantificação por evolução de CO<sub>2</sub> e por determinação de óleos e graxas, mostraram que o biossurfactante utilizado em conjunto com a microbiota nativa (bioaumento) apresentou bons percentuais de remoção de óleo (hidrocarbonetos).
- No tratamento em que só o biossurfactante foi utilizado, verificou-se um bom percentual de biodegradação (19,8%) confirmando que este, aumentou a disponibilidade dos hidrocarbonetos para ação dos microrganismos.
- Os índices de biodegradação foram obtidos entre 19 - 26 % e tais índices baixos são explicados pelo excesso de compostos recalcitrantes em consequência do processo de intemperização do solo.
- Observou-se que, no tratamento feito com o solo contaminado por óleo cru, o processo de evolução de CO<sub>2</sub> continuava ao longo dos 60 dias, evidenciando a possibilidade de obtenção de melhores resultados em tratamentos com períodos maiores.

- Faz-se necessário estudos em laboratório com a intenção de minimizar o impacto das substâncias recalcitrantes ao ambiente e criar melhores condições para atividade dos microrganismos presentes no solo utilizando-se surfactantes.

## **6. BIBLIOGRAFIA**

- ARAUJO, F.S.M, de. (2002). "Isolamento e identificação de fungos degradadores de petróleo". Trabalho apresentado na X jornada de Iniciação científica - Centro de Tecnologia Mineral, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Judith Liliana. S. Lemos.
- NITSCHKE, M. PASTORE,G.M.(2002). "Biossurfactantes: propriedades e aplicações". Química Nova, vol. 25, No. 5, pp. 772-776.
- MACEDO, R.C.; BERBERT, V.H.C. (2002). "Biorremediação de solos impactados por óleo cru utilizando fungos filamentosos". Trabalho apresentado na X jornada de Iniciação científica - Centro de Tecnologia Mineral, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientadores: Judith Liliana. S. Lemos, Pedro V. Trindade e Andrea C. de L. Rizzo.
- OU, Z.Q. (2000). "Separate and combine environmental behaviour of surfatants and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)" In: <http://tumb1.biblio.tu-muenchen.de/publ/diss/ww/2000/ou.pdf>. Acessado em março 2002.
- JAIN. D.K.; LEE, H.; TREVORS, J.T. (1992). "Effect the addition of Pseudomonas aeruginosa UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of select hydrocarbons in soil". Journal Ind. Microbiol. 10: 87-93.
- 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).
- RIZZO,A.C.L.; RAIMUNDO,R. (2003). "Determinação de óleos e graxas, em solo, por gravimetria empregando método de extração com ultrassom". IT2003-001-00 – Instrução de Trabalho elaborada para o CETEM.
- SANTOS,L.C. dos. (2002). "Utilização de surfatantes aniônicos em solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo". 2002. Trabalho apresentado na X jornada de Iniciação científica - Centro de Tecnologia Mineral, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Valéria Souza Millioi.
- SANTOS,L.C.dos; RIBEIRO,V.M.; MILLIOLI,V.S.(2003). "Efeito da adição de surfactantes na biorremediação de solo contaminado com óleo cru utilizando-se reator de lama". Apresentado na 26ª Reunião Anual do SBQ (Sociedade

Brasileira de química). resumo. Poços de Caldas - MG – Brasil de 26 a 29 de maio de 2003.

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.

VOLKERING, F., BREURE, A.M., van ANDEL, J.G. and RULKENS, W.H. (1995). "Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons". Appl. Environ. Microbiol. vol. 61 pp. 1699-1705.