

Avaliação da Degradação da fração Biodisponível de Contaminante Orgânico em solo

Danielle Reichwald

Bolsista de PCI, Biológa, Unisuam

Andrea Camardella Rizzo

Orientadora, Eng. Química, D. Sc.

Claudia Cunha

Co-orientador, Eng. Química, D. Sc.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de atenuação natural monitorada (ANM) em solo contaminado com óleo cru em três diferentes concentrações (0,5%; 2,5% e 5% m/m). Para tal foram montados sistemas experimentais em caixas de polietileno de alta densidade, que foram expostos a intempéries por um período de 6 meses. Durante este tempo, foi realizado o monitoramento através de análises microbiológicas (contagem de microrganismos heterotróficos totais e degradadores de óleo), e do teor de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP) por Espectrometria no infravermelho.

1. Introdução

A contaminação de solo por óleo cru e seus derivados tem se tornado, inquestionavelmente, um problema mundial. Da fase de exploração, prospecção até a comercialização de seus derivados, alguns impactos ambientais podem ser identificados durante seu processamento (CORRÊA, 2003 apud RIZZO, 2008).

Com o aumento do uso do petróleo e seus derivados e, conseqüentemente, os impactos ambientais gerados, observa-se um aumento na utilização de bioprocessos para reverter esses passivos.

A biorremediação é um bioprocessos que utiliza microrganismos para remediar contaminantes, através de mecanismos de biodegradação naturais (biorremediação intrínseca ou atenuação natural) ou pelo aumento da biodegradação natural por adição de microrganismos (bioaumento), nutrientes, água, doadores e aceptores de elétrons (bioestímulo). Nesse processo, os microrganismos, sendo as bactérias as mais estudadas, utilizam os hidrocarbonetos, principais constituintes do petróleo, como fonte de carbono e energia alternativa para formação de biomassa (MARTINS *et al.*, 2003).

As tecnologias de biorremediação de solos podem ser aplicadas *in situ*, isto é, no próprio local onde ocorreu a contaminação (impacto), não havendo necessidade da remoção dos solos contaminados. Casos existem, entretanto, cuja remoção do material contaminado de sua origem para um local adequado, com um tratamento posterior, é exigida para evitar riscos de alastramento, com o comprometimento dos cursos de água ou lençóis

freáticos. Neste caso as tecnologias aplicadas são denominadas *ex situ* (ALEXANDER, 1999). Uma alternativa é a Atenuação Natural Monitorada cujo processo ocorre sem intervenção humana e a redução da contaminação ocorre pela biodegradação do contaminante, sua diluição simples, dispersão, volatilização ou ainda pela adsorção.

Segundo a agência ambiental norte-americana – USEPA - o termo “Atenuação natural monitorada” (ANM) refere-se ao uso dos processos de atenuação que ocorrem naturalmente no solo, dentro de um contexto de remediação monitorada e controlada de um sítio, em um período de tempo razoável, com objetivo de redução das concentrações de contaminantes, toxicidade, massa, volume até níveis adequados à proteção da saúde humana e ao meio ambiente (USEPA, 1999).

2. - Materiais e Métodos

2.1 - Solo

O solo utilizado é proveniente da região nordeste do Brasil (Estado de Sergipe). A coleta do solo foi realizada por uma equipe especializada, de forma a garantir a representatividade da mesma. Esse material logo foi colocado para secar, no pátio do Centro de Tecnologia Mineral (CETEM), a temperatura ambiente durante quatro semanas. Em seguida o solo foi desagregado em um britador de mandíbulas e logo após classificado em uma peneira de 5 mm, que corresponde a 4 mesh, para retirada de folhas, raízes e gravetos. Todo material, após a secagem e peneiramento foi homogeneizado e quarteado.

2.2 - Óleo

No desenvolvimento experimental foi utilizado o óleo cru proveniente da mesma região de origem do solo, de forma a simular uma contaminação que possa vir a ocorrer durante a exploração dos poços localizados na área (derrames acidentais de petróleo). Os teores de contaminação adotados foram de 0,5, 2,5 e 5% (m/m).

2.3 - Montagem do Sistema Experimental para Simulação do Processo de Atenuação Natural

Sistema 1

Para simular o efeito da atenuação natural monitorada foram utilizadas 7 caixas de polietileno de alta densidade, com largura de 36 cm, comprimento de 53 cm e altura de 19 cm (aproximadamente 36,25 L de volume útil).

As caixas foram furadas no fundo com um espaçamento de 3 cm entre cada furo, e colocadas sobre uma caixa coletora, para recolher qualquer líquido proveniente de chuva que possa se infiltrar pelo solo, como mostra a Figura 1 .

Todas as caixas foram preenchidas com uma camada de 3 cm de brita (correspondendo a 5,75 L), uma camada de areia de 2 cm (3,83 L) e mais uma1 camada de brita (5,75 L). Preencheu-se o volume restante

(aproximadamente 15,33 L) com solo contaminado a 0,5, 2,5 e 5% (m/m) em duplicata, e não contaminado (controle).

As caixas foram colocadas em um espaço aberto nas dependências da usina piloto do Centro de Tecnologia Mineral – CETEM, onde estão submetidas a intempéries por um período de 6 meses (Figura 1). Amostras representativas do solo foram coletadas periodicamente e armazenadas em câmara fria a 4°C para posterior quantificação dos hidrocarbonetos totais de petróleo. A quantificação dos microrganismos heterotróficos totais e hidrocarbonoclasticos foi realizada no momento da coleta.



Figura 1 : Imagem do Sistema 1 nas dependências da Usina Piloto do CETEM.

Sistema 2

Como forma de controle do Sistema 1, e também para verificar apenas os efeitos de fatores abióticos como luz, temperatura e chuva na biodisponibilidade dos contaminantes foi montado um sistema semelhante.

Foram utilizadas 6 caixas de polietileno de alta densidade, com largura de 25 cm, comprimento de 34 cm e altura de 12 cm (aproximadamente 10,20 L de volume útil).

As caixas foram furadas no fundo com um espaçamento de 3 cm entre cada furo, e colocadas sobre uma caixa coletora do mesmo tamanho, para recolher qualquer líquido proveniente de chuva que pudesse se infiltrar pelo solo.

Todas as caixas foram preenchidas com uma camada de 1,5 cm de brita, uma camada de areia de 1,5 cm e uma 1 camada de brita (1,5 cm). Preencheu-se o volume restante (aproximadamente 15,33 L) com solo contaminado a 0,5, 2,5 e 5% (m/m) em duplicata. Neste caso, o solo e a areia utilizados foram esterilizados por autoclavação 5 vezes e adicionado um agente biocida (Azida de sódio a 0,5%) periodicamente para evitar crescimento de qualquer organismo e conseqüentemente biodegradação.

Como controle, realizou-se, periodicamente, o plaqueamento de microrganismos heterotróficos totais (procedimento descrito a seguir) para se certificar da esterilidade do solo.



Figura 2 : Sistema nas dependências da Usina Piloto do CETEM.

2.4 - Metodologias para o monitoramento do processo de ANM

2.4.1 - Análises microbiológicas

A diversidade microbiana, em virtude de os microrganismos estarem intimamente agregados aos diversos processos ecológicos do solo, tem se mostrado como um importante indicador da qualidade do solo (ZILLI *et al.*, 2003). Logo, utilizou-se a quantificação de microrganismos heterotróficos totais e degradadores de óleo cru como indicativo do processo de biorremediação e de possíveis alterações da população microbiana, decorrente deste processo nas amostras do Sistema 1. Realizou-se, ademais, para controle da esterilidade do Sistema 2, a quantificação dos microrganismos heterotróficos totais periodicamente.

Quantificação de microrganismos heterotróficos totais

A quantificação de microrganismos heterotróficos totais seguiu metodologia adotada por Trindade (2002). Acrescentou-se, em erlenmeyer, 5 g de solo em 50 mL de solução salina (NaCl, 0,85%). Fez-se a agitação da suspensão em shaker por 1 hora a 25°C a 150 rpm. Após a agitação, os extratos obtidos sofreram diluições sucessivas. Posteriormente, realizou-se o plaqueamento em meio sólido orgânico (TSA modificado) pela técnica de *pour - plate*, acrescentando-se 0,1 ml das diluições em placas de petri (em duplicatas). As placas foram incubadas em estufa a 30°C por 48 horas e, em seguida, contou-se o número de unidades formadoras de colônias (resultados expressos em UFC / g de solo).

Quantificação de microrganismos degradadores de óleo cru (hidrocarbonoclasticos)

A quantificação da população microbiana degradadora de óleo cru foi realizada empregando-se a técnica do Número Mais Provável (NMP) descrita por VECCHIOLI *et al.* (1990). Acrescentou-se, em erlenmeyer, 5 g de solo em 50 mL de solução salina (NaCl, 0,85%). Fez-se a agitação da suspensão em shaker por 1 hora a 25°C a 150 rpm. Após a agitação, as amostras sofreram diluições e, em seguida, 0,1mL da diluição adequada com 1,8 mL de meio mineral foram adicionados em cavidades da placa de polietileno com 24 cavidades. Por fim, 0,1mL

de óleo cru foi acrescentado como única fonte de carbono orgânico. As placas foram então incubadas em estufa a 30° C por uma semana e, em seguida, procedeu-se à estimativa do número mais provável (NMP) por grama de solo (VECCHIOLI *et al.*, 1990).

O teste em branco baseou-se na adição de meio, seguido da adição do óleo, sem adição de inóculo.

2.4.2 - Análise da concentração de hidrocarbonetos totais do petróleo

Adicionalmente, para fins de monitoramento da concentração de óleo nos sistemas de ANM, a análise dos hidrocarbonetos totais de petróleo foi realizada através do equipamento Infracal, modelo HART-T da Wilks Enterprise. Este é um medidor portátil de OGT (óleos e graxas totais) / HTP, cuja técnica empregada é a espectrometria de infravermelho. Ele permite a quantificação após extração do óleo do solo com solvente orgânico (n-hexano PA padrão HPLC).

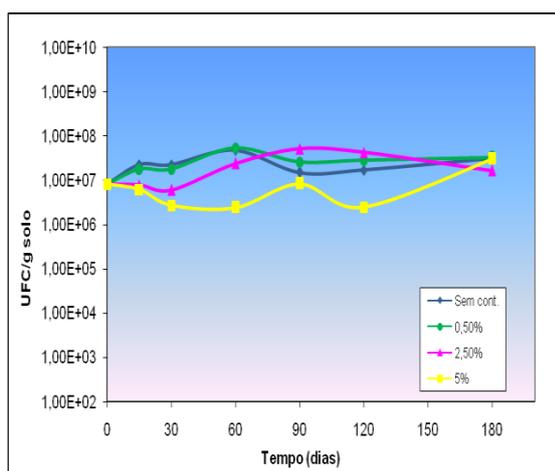
O teor de HTP nas amostras de solo, para posterior análise no infracal, foi determinado através de uma extração exaustiva com ultra-som (método convencional). Após secagem (60°C / 16 horas) e maceração, adicionou-se 2 g de sulfato de sódio anidro (VETEC) ao solo contaminado, e submeteu-se ao ultrassom por 60 minutos, utilizando n-hexano (PA, mistura de isômeros - Tedia) como solvente. Posteriormente, depositou-se o extrato em n-hexano na superfície do cristal e o solvente foi evaporado, deixando uma fina camada de óleo, que foi quantificada.

2. Resultados e Discussão

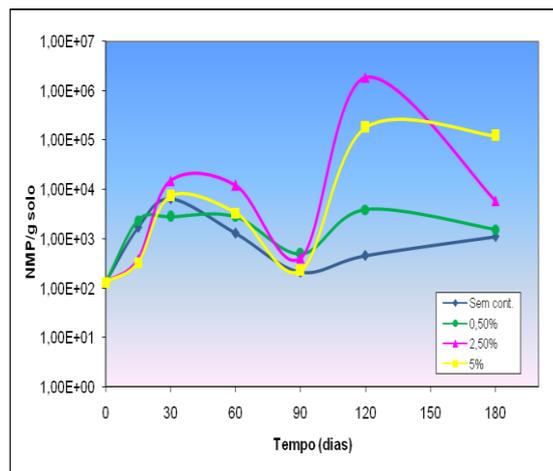
Os resultados de quantificação de Microrganismos Heterotróficos Totais estão apresentados na Figura 3 (a). Percebe-se que não houve variação significativa na população de microrganismos heterotróficos totais no tempo estudado, já que para todas as concentrações de óleo testadas, a densidade microbiana ficou em torno de 10⁷ UFC/g solo. O mesmo não aconteceu com a população de microrganismos degradadores, onde ocorreu significativa variação, principalmente entre 90 e 120 dias de ensaio. (Figura 3 (b)).

Em particular, para a condição de 2,5% de contaminação foi verificado um aumento de cerca de 2 ordens de grandeza (de 10³ para 10⁶ NMP/g solo). No entanto, para todas as concentrações, após 120 dias observa-se uma tendência a estabilização, com exceção da condição com 2,5% de óleo, onde ocorreu uma queda.

Nos seis meses de processo, foram realizadas análises também no Sistema 2 (controle abiótico) com objetivo de confirmar a eficácia do processo de esterilização adotado (autoclavações sucessivas e adição de solução de azida de sódio a 0,5%). Os resultados obtidos indicaram ausência de crescimento microbiano nesse sistema.



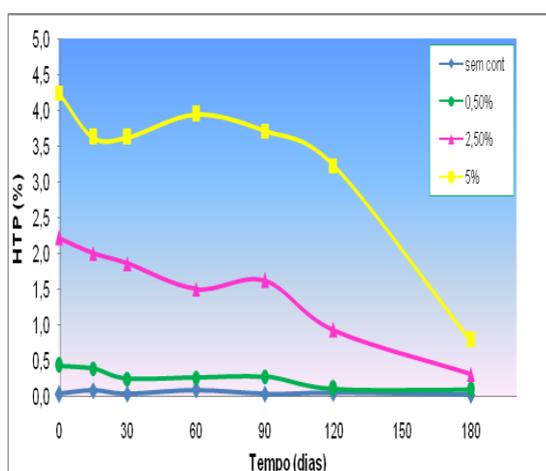
(a)



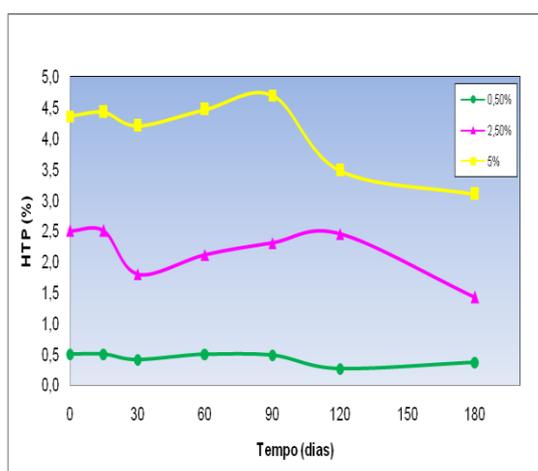
(b)

Figura 3 . Resultados da quantificação microbiana dos sistemas (a) microrganismos heterotróficos totais (b) microrganismos degradadores de óleo.

Na Figura 4 são apresentados os gráficos relativos ao acompanhamento da concentração de HTP nos sistemas 1 e 2, respectivamente.



(a)



(b)

Figura 4 . Gráfico de concentração de HTP nos sistemas ao longo de 180 dias (a) Sistema 1 (b) Sistema 2

Analisando a Figura 4, é possível verificar que a degradação dos HTP, no sistema 1, foi significativamente mais intensa nos últimos 2 meses de ensaios para todos os teores de contaminação, provavelmente devido a efetiva adaptação da microbiota nativa à presença do contaminante. Além disso, os dados correspondentes às chuvas ocorridas no período analisado mostraram que os maiores valores de remoção estavam associados aos maiores valores de pluviosidade. Nos períodos mais secos (três primeiros meses de experimento), observou-se pouca

remoção dos HTP, assim como pouca variação dos microrganismos degradadores de óleo. A partir dos 90 dias, com aumento do volume de chuvas, verificou-se um aumento dos degradadores de óleo, especialmente nos solos contaminados a 2,5% e 5%, relacionando –se com uma grande remoção dos HTP.

Para que fosse possível avaliar apenas o que foi biorremediado no Sistema 1, ou seja, quanto de óleo cru foi degradado por processos biológicos, era necessário descontar toda a fração de óleo perdida através de fatores abióticos. Portanto, montou-se um sistema semelhante (Sistema 2), sujeito aos mesmos intempéries que o Sistema 1, exceto pelo fato de que o solo foi esterilizado (e assim mantido ao longo do tempo de experimento), para que se pudesse medir somente as perdas abióticas . A partir dos resultados obtidos (e apresentados nas Figuras 4a e 4b) foi possível calcular a remoção dos HTP apenas por processo biológico (Remoção total dos HTP no Sistema 1 – Perdas abióticas no Sistema 2), descontando-se as perdas abióticas (Remoção dos HTP no Sistema 2), como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Remoção biológica dos HTP dos solos contaminados do Sistema 1 após 180 dias.

Teor de óleo no solo (%)	Remoção total (%)	Perda abiótica (%)	Remoção biológica (%)
0,5%	76,35	27,05%	49,3%
2,5%	85,54	43,04%	42,5%
5%	81,22	29,02%	52,2%

Observou-se, ao final de 180 dias, uma alta biodegradação de HTP, com remoção de 49,3% para o solo contaminado a 0,5%, 42,5% no solo de 2,5% e 52,2% no solo de 5%

Ao final do experimento de ANM, a concentração do contaminante atingiu níveis satisfatórios nos três percentuais de óleo testados: 1040 mg/kg no solo contaminado a 0,5%, 3200 mg/kg no solo contaminado a 2,5% e 7930 mg/kg no solo contaminado a 5%. Em áreas contaminadas com valores de HTP superiores a 5000 mg/kg, a legislação holandesa (CETESB, 1999) sugere implementação de ações voltadas para a remediação, pois o nível de qualidade do solo é considerado inaceitável. Com exceção do solo contaminado inicialmente a 5%, os demais percentuais alcançaram valores plausíveis de remoção.

A degradação biológica atingiu valores entre 42,5% a 52,2% após 180 dias com as concentrações de 0,5%; 2,5% e 5% m/m mostrando que os microrganismos agem de forma efetiva na remoção do óleo. Sabe-se que o processo de ANM está associado a períodos longos de degradação e que para locais de baixa contaminação ou que não necessitam de intervenção imediata, a ANM torna-se uma ótima medida de remediação.

A análise através do aparelho Infracal forneceu dados em relação à quantificação dos HTP, porém não indicou quais tipos de hidrocarbonetos foram degradados e que ainda remanescem no solo. Apesar do foco do trabalho ter sido os hidrocarbonetos totais, é muito importante que estudos futuros sejam realizados para se identificar hidrocarbonetos específicos (como os HPA's) que permaneceram na fração residual, para fins de critérios legais e avaliação de risco ambiental em função da toxicidade que estas substâncias podem oferecer.

3. Conclusão

- Tanto os resultados da quantificação microbiana, bem como os de remoção dos HTP no Sistema 1, pareceram estar associados aos valores de pluviosidade. Nos períodos mais secos (três primeiros meses de experimento), observou-se pouca remoção dos HTP, assim como pouca variação na concentração dos microrganismos degradadores de óleo.
- Com aumento do volume de chuvas, verificou-se um aumento da densidade dos degradadores de óleo, especialmente nos solos contaminados a 2,5% e 5%, relacionando - se com uma grande remoção dos HTP.
- Através dos sistemas experimentais de ANM montados, foi possível mensurar quanto foi removido biologicamente no Sistema 1, que corresponde, em tese, à fração biodisponível ao longo de 6 meses de tratamento, bem como foi possível o cálculo das perdas abióticas.
- Ao final de 180 dias de experimento, houve uma alta biodegradação dos HTP, com remoção de 49,3% para o solo contaminado a 0,5%, 42,5% no solo a 2,5% e 52,2% no solo a 5%, demonstrando que os microrganismos nativos são capazes de biodegradar de forma satisfatória o contaminante.

4. Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por tudo, a meu filho Allan, ao CETEM, ao CNPq pela bolsa concedida, aos orientadores Andréa Rizzo e Ronaldo Santos, a Claudia Cunha, aos meus amigos que mesmo longe estiveram perto: Natália Franco, Maria Clara, Elton dos Santos, a Claudia Affonso, Bianca Azevedo, Isaias Junior, Regina Carrisso, Cristina Sissinno, Fábio Gonçalves, Grace, Jorginho, Ricardo, Débora Monteiro, Bianca Marinho entre outros amigos do Cetem.

5. Referências Bibliográficas

MARTINS, A.; DINARDI, A.L.; FORMAGI, V.M.; LOPES, T.A.; BARROS, R.M.; CONEGLIAN, C.M.R.; BRITO, N.N.; SOBRINHO, G.D.; TONSO, S.; PELEGRINI, R. (2003) **Biorremediação**. III Fórum de Estudos Contábeis, Faculdades Integradas Claretianas, Rio Claro, SP. Disponível em: www.ceset.unicamp.br/lte/artigos/3fec2401. Pesquisado em 16/08/2010.

NASCIMENTO, R.; ZIOLLI, R. L.; ARARUN, J. T.; PIRES, C. S.; SILVA, T. B. Avaliação do desempenho analítico do método de determinação de TPH (Total Petroleum Hydrocarbon) por detecção no infravermelho. **Eclética Química**, v.33, no.1, p.35-42, 2008.

RIZZO, A. C. L.. (2008) **Desenvolvimento de Biorreator não convencional para o tratamento de solos contaminados por petróleo**, 2008.188 p. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil.

VECCHIOLI, G.L.; DEL PANNO, M.T.; PAINCEIRA, M.T. Use of selected autochthonous soil bacteria to enhance degradation of hydrocarbons in soil. *Environmental Pollution*, 1990, vol. 67 , p. 249-258.

USEPA – U. S. Environmental Protection Agency (2004). **How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers. (EPA 510-B-94-003, EPA 510-B-95-007, and EPA 510-R-04-002)**. Disponível em: <http://www.epa.gov/oust/pubs/tums.htm>. Pesquisado em: outubro de 2010.