

Biorremediação de solo contaminado com petróleo e metais pesados e monitoramento microbiano molecular

Natália Franco

Bolsista PCI, Microbiologista, UFRJ

Cláudia Duarte da Cunha

Orientadora, Eng. Química, D. Sc.

Andréa Camardella de Lima Rizzo

Co-orientadora, Eng. Química, D. Sc.

Resumo

A atividade industrial petroquímica é responsável por grandes despejos de poluentes orgânicos e inorgânicos no ambiente. Há muitos estudos que mostram o efeito negativo de alguns desses elementos inorgânicos na degradação dos hidrocarbonetos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do níquel na biorremediação do óleo cru em solo multicontaminado e estudar as alterações na estrutura da comunidade microbiana. Para tal, foram realizados ensaios em microcosmos utilizando um planejamento fatorial completo (2³) (Design Expert - Stat Easy®). O parâmetro resposta foi o percentual de remoção dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP), quantificados por espectrometria no infravermelho (Infracal®). Foi realizada contagem de bactérias heterotróficas totais, bactérias degradadoras de óleo cru e a técnica de PCR-DGGE utilizando diferentes marcadores. Também foi feito um aumento para escala piloto simulando um processo de biorremediação de óleo cru (5% p/p) na presença de níquel (260 mg/kg). Os resultados obtidos de remoção de TPH indicam um atraso significativo na degradação do óleo na presença do metal, nos primeiros 15 dias de tratamento. A umidade foi o fator de maior influência positiva nos experimentos por todo o período analisado (67 dias). As análises dos Géis de DGGE indicaram que todos os tratamentos se diferenciaram entre si, exceto os tratamentos contendo óleo (5%p/p) com Ni (130mg/kg) e óleo (5%p/p) com Ni (260mg/kg). Quando comparamos os marcadores moleculares entre si, a maior parte demonstrou um comportamento distinto. Com relação ao biorreator, as taxas finais de remoção foram similares às obtidas em microcosmos, porém no biorreator o valor máximo de remoção foi atingido em apenas 7 dias, refletindo a eficiência de operação atribuída ao biorreator. A capacidade de adaptação dos microrganismos, assim como sua diversidade, foi capaz de superar a influência negativa inicial da presença do metal e promover um percentual de remoção final (≈30%) bastante similar nos diferentes sistemas que continham um valor de umidade máximo.

1. Introdução

O petróleo é uma das maiores fontes de contaminação do meio ambiente, sendo uma importante fonte de poluentes orgânicos e também inorgânicos. Elementos como o vanádio, arsênio e níquel, além dos compostos orgânicos, também são constituintes do petróleo. Os resíduos gerados pela indústria do petróleo não só oferecem grandes riscos ao meio ambiente, como à saúde pública (KNOX & GILMAN, 1997).

Dados fornecidos pela USEPA (USEPA, 1996; USEPA, 2004) mostram um aumento da contaminação de metais associados a compostos orgânicos de quase 300% de 1994 à 2003. A presença de compostos orgânicos influencia na mobilidade do metal no solo (GALVEZ-CLOUTIER & DUBE, 2002), prejudicando o tratamento destes poluentes no ambiente. Compostos orgânicos com maior viscosidade afetam por exemplo as técnicas de lavagem do solo e neste caso, portanto, deve-se remover prioritariamente os poluentes orgânicos para posterior remoção dos poluentes inorgânicos (DERMONT et al., 2008).

Os efeitos tóxicos e inibitórios dos metais pesados sobre o crescimento microbiano requerem atenção, uma vez que os íons metálicos dependendo de sua natureza, concentração e disponibilidade irão interferir em atividades essenciais dos microrganismos presentes no solo, assim como no processo de degradação dos compostos orgânicos por aqueles que são capazes de degradá-los (AMOR, KENNES & VEIGA, 2001).

Há vários métodos de tratamento de solos contaminados, tanto por processos físicos e/ou químicos quanto por biológicos. A biorremediação é uma estratégia frequentemente adotada por permitir o tratamento do contaminante geralmente a um baixo custo (DOBLER, SANER & BACHOFEN, 2000). Esta pode ser definida como um processo baseado no emprego de microrganismos ou suas enzimas que sejam capazes de transformar substâncias tóxicas em substâncias menos ou não tóxicas. A biorremediação pode ser classificada como *in situ* (no local) ou *ex situ* (fora do local) e engloba diferentes técnicas, como o bioestímulo, que é a adição ou correção de nutrientes, umidade, ou gases importantes para os microrganismos presentes no solo, entre outras (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

Uma das tecnologias de tratamentos *ex situ* é a biorremediação utilizando biorreatores que possibilita uma melhor homogeneização do solo durante o tratamento assim como possibilita o controle das condições do tratamento de forma mais efetiva. Existem diferentes tipos de reatores, os horizontais, por exemplo, são reatores de fase sólida com tambores rotativos ou fixos, sendo empregados para resíduos sólidos com teor de umidade suficiente apenas para a manutenção da atividade microbiana (RIZZO, 2008).

A caracterização completa das comunidades microbianas do solo é difícil de ser realizada, uma vez que este ambiente possui uma enorme diversidade genotípica e fenotípica, heterogeneidade, e inacessibilidade. Porém, com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, associadas ao conhecimento em bioinformática, tornou-se possível essa caracterização, revelando os grupos atuantes, muitos destes até então desconhecidos (FRANCO et al., 2006).

A utilização de técnicas moleculares permite, portanto, um conhecimento mais aprofundado dos grupos microbianos presentes, após a seleção natural imposta por condições extremas, como a presença de substâncias poluentes e de suas formas distintas de tratamento. Do ponto de vista técnico, estes métodos são viáveis porque são rápidos e sensíveis para identificar e monitorar a população microbiana presente e atuante no processo de biorremediação (CUNHA 2004; WATANABE & HAMAMURA, 2003).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do níquel na degradação do óleo cru durante o processo de biorremediação de um solo multicontaminado, assim como avaliar seus efeitos nos perfis das comunidades microbianas dominantes deste solo sob os diferentes parâmetros estudados.

2. Materiais e Métodos

Em uma primeira etapa, os experimentos foram realizados em microcosmos contendo solo multicontaminado com óleo cru e níquel (Figura 1A), utilizando o planejamento fatorial completo (2^3) (Design Expert - Stat Easy®) como ferramenta para análise estatística dos resultados das influências de 3 parâmetros: teor de umidade (45 a 70% da CRA), concentração de níquel (130 a 260 mg/Kg) e concentração de óleo cru (0,5 a 5% p/p). O parâmetro resposta utilizado foi o percentual de remoção dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP), quantificados por espectrometria no infravermelho (Infracal®), em 4 diferentes tempos de coleta (7, 15, 36 e 67 dias). Como controle, foi realizado o mesmo conjunto de experimentos contendo biocida, para identificar o nível de degradação do óleo pela atividade biológica. Para o monitoramento das comunidades microbianas do solo foi realizada contagem de bactérias heterotróficas totais por plaqueamento *Spread plate*, bactérias degradadoras de óleo cru pela técnica de NMP (número mais provável) e a técnica de PCR-DGGE utilizando marcadores para Bacteria, Actinobacteria, α e γ -proteobacteria. Em uma segunda etapa, foi feito um aumento para escala piloto em um reator com capacidade de 8 kg de solo (Figura 1B), no qual foi simulado um processo de biorremediação de óleo cru (5% p/p) na presença de níquel (260 mg/kg). Para as análises não paramétricas dos dados foi utilizado o software Statistica (7.1).



Figura 1. **Sistemas usados nos experimentos.**A) Sistemas em microcosmo. B) Bioreator de capacidade de 8Kg.

3. Resultados e Discussão

3.1. Remoção de HTP

As análises de quantificação por espectrometria no infravermelho dos níveis de HTP nos diferentes sistemas de tratamentos foram realizadas e convertidas para porcentagem de remoção com o objetivo de melhor expressar os resultados (Tabela 1).

Tabela 1. **Valores de remoção do óleo cru nos sistemas gerados a partir da análise fatorial.** Onde pela simbologia óleo= 0,5% p/p; ÓLEO= 5%p/p; ni= 130mg/kg; NI= 260mg/kg; água= 45% da CRA; ÁGUA= 70% da CRA.

EXPERIMENTO	7 dias		15 dias		36 dias		67 dias	
	Óleo no solo (mg/g)	Remoção (%)	Óleo no solo (mg/g)	Remoção (%)	Óleo no solo (mg/g)	Remoção (%)	Óleo no solo (mg/g)	Remoção (%)
óleo - ni - água	5,87 ±0,00	0,00	4,82 ±0,07	4,76	3,70 ±0,30	26,88	2,83 ±0,40	44,04
ÓLEO - ni - água	55,91 ±3,03	0,00	52,34 ±1,21	0,00	51,06 ±4,65	0,00	44,20 ±3,84	12,70
óleo - NI - água	5,58 ±0,40	0,00	5,63 ±0,40	0,00	4,46 ±0,17	11,82	2,26 ±0,09	55,33
ÓLEO - NI - água	56,20 ±3,03	0,00	46,20 ±3,43	8,75	45,20 ±4,44	10,72	41,34 ±2,63	18,34
óleo - ni - ÁGUA	4,10 ±0,20	18,88	3,53 ±0,20	30,17	3,44 ±0,40	32,05	2,80 ±0,00	44,66
ÓLEO - ni - ÁGUA	40,77 ±4,24	19,47	36,63 ±2,42	27,65	36,06 ±0,00	28,78	33,06 ±0,20	34,71
óleo - NI - ÁGUA	5,06 ±0,07	0,00	4,06 ±0,44	25,94	3,87 ±0,13	21,70	3,02 ±0,34	35,57
ÓLEO - NI - ÁGUA	47,49 ±1,21	6,21	43,34 ±2,22	14,39	35,63 ±3,84	29,63	32,77 ±0,61	35,27
Ponto Central	22,27 ±3,03	27,87	20,41 ±1,30	25,86	18,55 ±2,70	38,16	20,32 ±1,24	30,78
CONCENTRAÇÕES INICIAIS	Téorico	0,5% = 5mg/g 2,75% = 27,5mg/g 5% = 50mg/g			Real	0,5% = 5,06mg/g 2,75% = 28,46mg/g 5% = 50,63mg/g		

Foram obtidos valores nulos de remoção para o controle abiótico para todos os tratamentos em todos os tempos analisados. Portanto, é possível considerar que todas as variações obtidas pelos sistemas são de origem biológica.

As variações no percentual de remoção para os diferentes tratamentos ao longo do tempo podem ser melhor visualizadas através do gráfico em barras (Figura 2). Foi possível verificar que nos experimentos com nível de umidade mínimo, valores percentuais de remoção significativos ocorreram apenas após o décimo quinto dia. Já nos experimentos com umidade máxima, os valores de remoção atingiram até 30% neste mesmo tempo, mostrando que a água foi um fator de grande influência positiva nos sistemas, neste tempo.

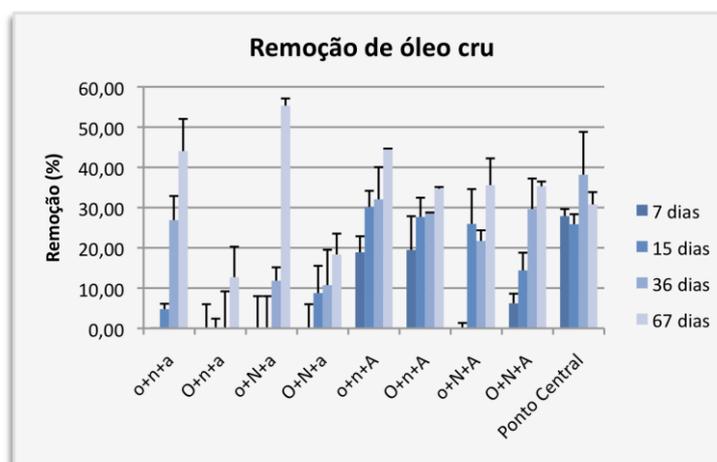


Figura 2. **Gráfico da remoção percentual do óleo nos diferentes sistemas de tratamento ao longo de 67 dias.** Onde pela simbologia o= 0,5% p/p; O= 5%p/p; n= 130mg/kg; N= 260mg/kg; a= 45% da CRA; A= 70% da CRA

Os resultados obtidos com o ponto central mostram que o nível de umidade foi suficiente para que o perfil de degradação fosse muito similar aos experimentos de alta umidade. Com isto, foram obtidos dois fatores favoráveis para o manejo da umidade nesse processo. O primeiro é que o tipo de solo permite o uso do teor de água de 70% da CRA sem que ocorra a sua compactação e conseqüente travamento do motor do biorreator. O outro aspecto é que, pelos resultados obtidos, a umidade requerida para uma remoção quase em seu nível máximo, através dos parâmetros estudados, encontra-se próximo ao valor de 58% da CRA (ponto central).

Unidos, estes dois fatos, oferecem uma ampla margem de trabalho, em relação ao teor de umidade a ser utilizado no biorreator.

A análise fatorial completa realizada para cada tempo estudado (7, 15, 36 e 67 dias) gerou gráficos da normal versus resíduos, sendo que a distribuição dos dados reais em relação ao modelo gerado configurou uma distribuição normal. Portanto, podemos levar em consideração os resultados gerados a partir do cálculo de probabilidade.

Do sétimo ao trigésimo sexto dia de tratamento, a análise do diagnóstico estatístico verificou que tanto o modelo quanto a curvatura eram significativos ($p < 0.05$), o que permite a análise das influências geradas pelo modelo, porém sem avaliação dos valores intermediários nos diferentes níveis estudados. Para isso, seria necessário utilizar uma análise por mistura de superfície.

3.2. Análise Fatorial Completa

Após as análises individuais de cada tempo de coleta foi possível unir os dados dos modelos e levando em consideração os valores das influências, gerou-se um gráfico comparando os valores de influência de cada parâmetro em todos os tempos estudados (Figura 3). Foi possível verificar que a umidade mostrou influência positiva ao longo de todo o estudo e que o metal apresentou influência negativa no início do tratamento, confirmando uma adaptação rápida dos microrganismos presentes. Já o óleo apresentou uma influência significativa e negativa mais tardia (67 dias). Isto pode ser devido a composição do óleo cru, que é uma mistura complexa de substâncias e que muitas vezes seus produtos de degradação geram compostos ainda mais tóxicos, forçando a comunidade degradadora a se adaptar e se modificar constantemente a essa gama de substâncias (MAILA & CLOETE, 2005).

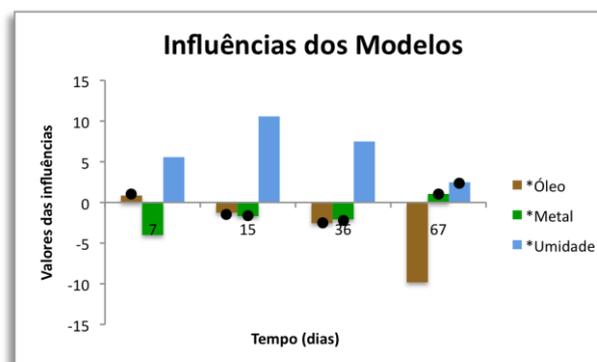


Figura 3. Gráfico com os valores das influências dos parâmetros avaliados em relação aos tempos de coleta. As esferas pretas marcam valores de influência não significativos.

Em 15 dias, o metal já não apresentou influência negativa, assim como o óleo, isto pode ter relação com as características do solo usado. No trabalho de Maliszewska-Kordybach & Smreczak (2003) que estudou a influência de metais pesados (zinco, chumbo e cádmio) e HPAs nas comunidades microbianas de diferentes culturas de plantas (trigo, aveia, milho, feijão, girassol e tomate), foi mostrado que o efeito dos dois tipos de contaminantes juntos sempre possuem um impacto inicial negativo, porém a capacidade de desenvolvimento

das plantas e o grau de impacto nas comunidades microbianas está intimamente relacionado com as características do solo.

A umidade é um fator conhecidamente positivo aos processos de biodegradação de compostos orgânicos que geralmente envolvem reações de hidrólise, além disso, quase todas as reações enzimáticas das células ocorrem em meio aquoso, portanto este parâmetro quando oferecido de forma limitada gera um atraso nas reações de biodegradação. Portanto, quando há a presença de metais a níveis tóxicos no ambiente, uma oferta alta de umidade pode acarretar em uma maior biodisponibilidade destes, e conseqüentemente aumento de sua toxidez. Neste trabalho em que encontramos os dois tipos de contaminantes juntos, a umidade teve uma influência positiva mostrando que as vantagens oferecidas a comunidade hidrocarbonoclástica é maior do que o aumento da biodisponibilidade do metal (DERMONT et al., 2008).

3.3. Análises Microbiológicas

3.3.1. Contagem de microrganismos cultiváveis (Heterotróficos Totais e Degradadoras)

As contagens por métodos dependentes de cultivo geraram perfis muito semelhantes. Para aumentar a resolução das respostas geradas, foi utilizada uma análise multivariada para a construção de dendrogramas a partir das matrizes com os valores das contagens nos diferentes tempos e tratamentos realizados. Estes dendrogramas mostram que os tratamentos foram separados pelo teor de umidade usado, tanto para as heterotróficas totais (Figura 4A), quanto para as degradadoras (Figura 4B), indicando portanto uma alta influência da umidade no número de microrganismos cultiváveis.

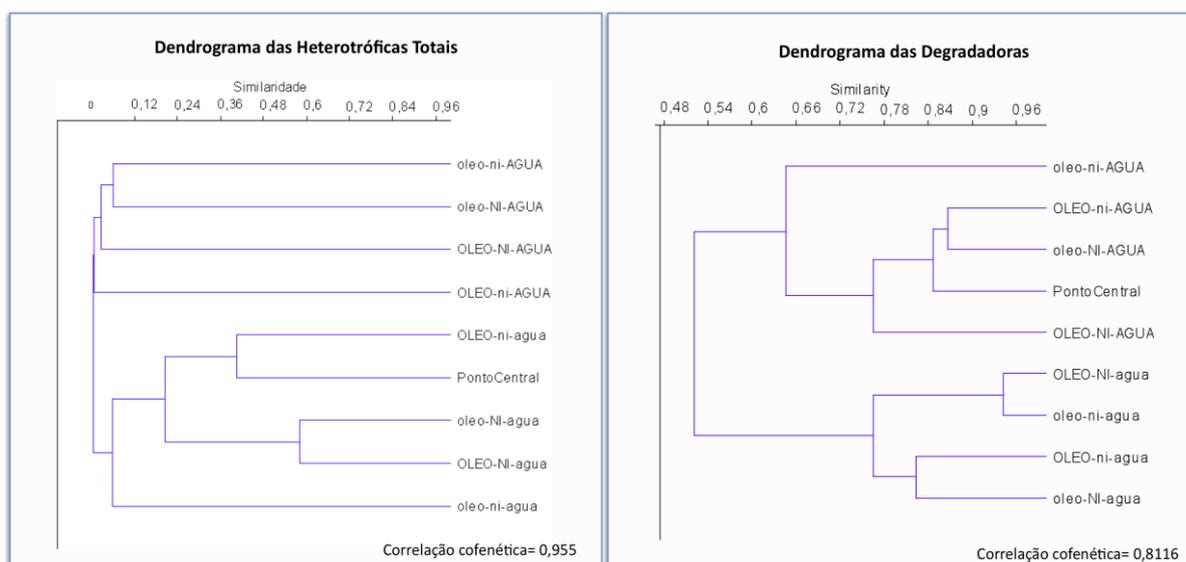


Figura 4. Dendrogramas gerados a partir das matrizes com os valores das contagens das bactérias heterotróficas totais e degradadoras para cada tempo de coleta, respectivamente. Onde pela simbologia óleo= 0,5% p/p; ÓLEO= 5%p/p; ni= 130mg/kg; NI= 260mg/kg; água= 45% da CRA; ÁGUA= 70% da CRA

3.3.2. Alterações nas Comunidades Microbianas Dominantes (DGGE)

Para uma análise mais robusta dos perfis gerados, foi feito para cada marcador, por matriz de similaridade (coeficiente de Bray-Curtis), um gráfico de PCoA mostrado na Figura 5. Estes gráficos mostram a dispersão espacial das amostras e cada símbolo refere-se a um tratamento (ÓLEO-ni, ÓLEO-NI, ÓLEO e NI). A observação mais clara para todos os marcadores avaliados foi a separação do tratamento NI (concentração de níquel alta) do restante das amostras, portanto quando havia a presença do óleo nas amostras, essas se alteravam para um perfil mais similar entre si, o que demonstra que o óleo foi o parâmetro de maior influência na estrutura da comunidade bacteriana neste estudo.

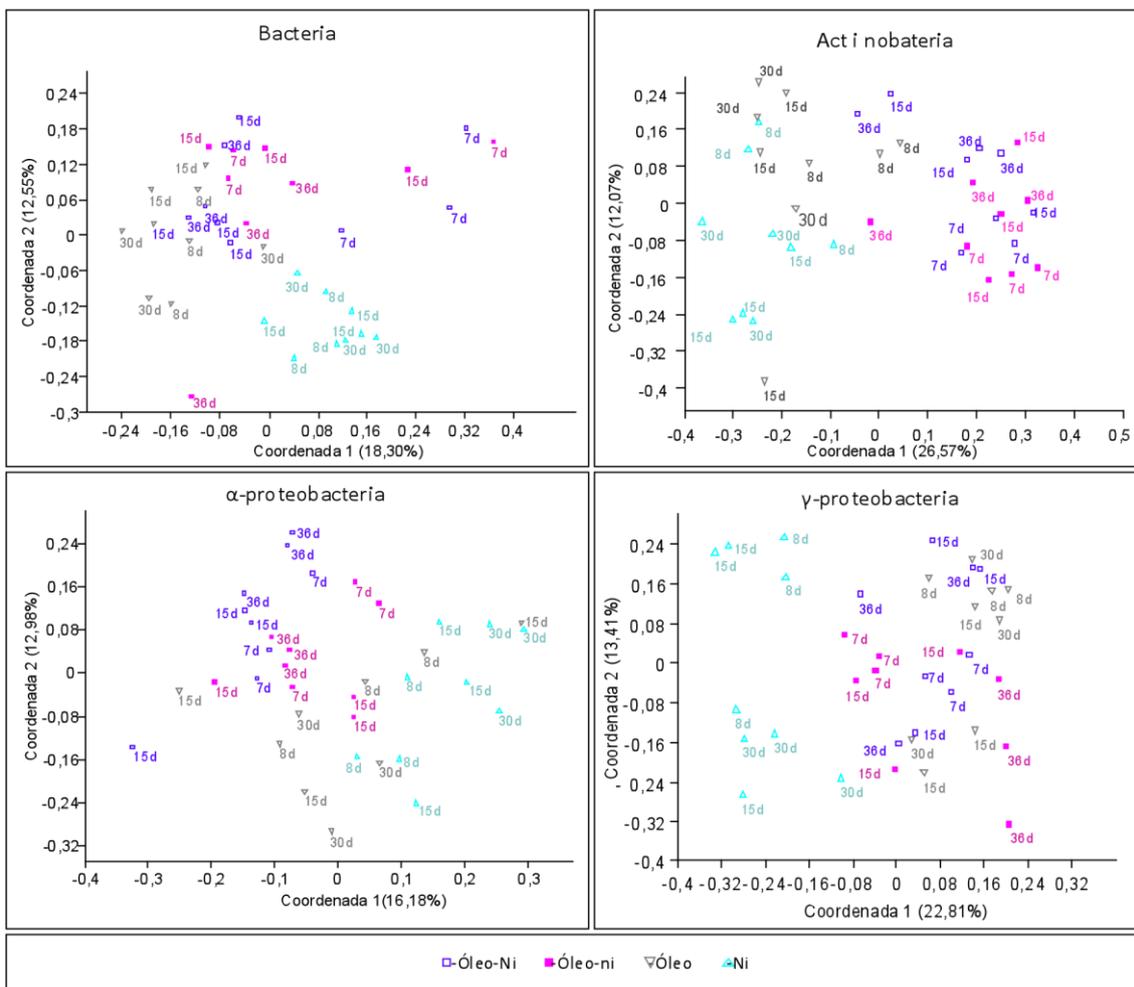


Figura 5. **Análise de coordenadas principais (PCoA) dos perfis de DGGE obtidos dos experimentos em microcosmos.** PCoA obtido a partir de matriz de similaridade calculada pelo método de Bray-Curtis. Os gráficos representam as comunidades bacteriana total, de actinobacterias, α - e γ -proteobacterias conforme indicado acima dos gráficos. Os tratamentos estão separados por cores e formas conforme indicado na legenda. Valores próximos os pontos representam o tempo de tratamento.

Para a avaliação da similaridade entre os diferentes marcadores moleculares foi usado o teste de Mantel (Tabela 2). Este utiliza a matriz de Bray-curtis, porém o valor de R dado reflete o grau de similaridade (quanto maior o valor de R, maior a similaridade). Os valores entre parênteses mostram o valor de p , sendo que apenas os valores em **negrito** foram significativos.

Conforme o teste de Mantel, o comportamento das γ -proteobactérias foi significativamente parecido com o comportamento das Actinobactérias e das Bactérias.

Tabela 2. Teste de Mantel para os diferentes marcadores utilizados no DGGE.

	Actinobacteria	α -proteobacteria	Bactéria
Actinobacteria			
α -proteobacteria	0,107* (0,119)**		
Bacteria	-0,289 (0,515)	-0,095 (0,830)	
γ -proteobacteria	0,183 (0,021)	0,084 (0,176)	0,266 (0,014)

Valores em negrito indicam correlações significativas entre as matrizes.

- Matrizes de similaridade obtidas por Bray-Curtis.

* - Valores representam os valores de R observados.

** - Valores entre parênteses representam os valores de p observados.

3.4. Ensaio em Biorreator

3.4.1. Remoção de HTP

Com os dados de remoção de HTP apresentados na Figura 6 foi possível observar a eficiência da ampliação de escala, onde há um aumento da remoção de óleo nos 20 primeiros dias, mostrando uma aceleração inicial no processo de biodegradação. Ao final de 30 dias o percentual de remoção foi muito próximo nos dois sistemas (em torno de 35% de remoção do óleo cru), sugerindo que a ampliação de escala se mostrou eficiente na biodegradação do óleo cru.

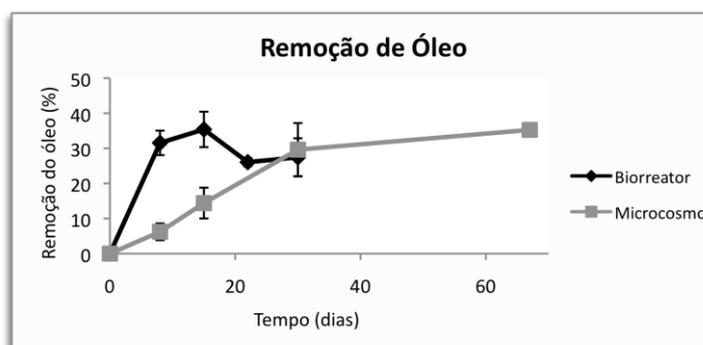


Figura 6. Gráfico com as porcentagens de degradação obtidas nos testes em microcosmos e em biorreator.

3.4.2. Contagem de microrganismos

Os resultados de contagens de microrganismos heterotróficos totais e degradadores para o biorreator (Figura 7) não refletiram os eventos de degradação ocorridos, mostrando a não eficácia eventual das técnicas dependentes de cultivo que avaliam uma parcela muito pequena dos microrganismos do solo.

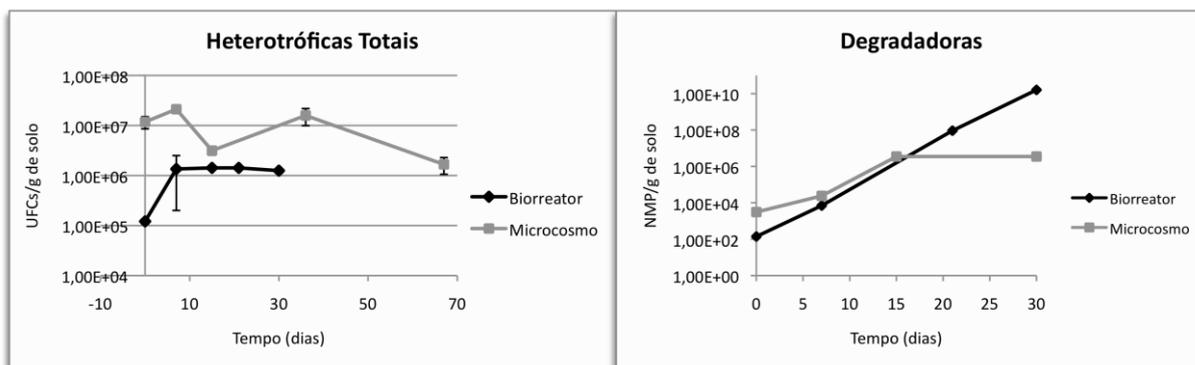


Figura 7. Gráfico com as contagens de bactérias heterotróficas totais e degradadoras obtidas no biorreator e em microcosmo sob os mesmos níveis de contaminação.

4. Conclusão

Com os resultados obtidos, foi possível concluir que a presença do níquel nos experimentos em microcosmos foi capaz de provocar um atraso na remoção do óleo cru nos primeiros 7 dias, sendo que a umidade foi o fator de maior influência positiva para a biodegradação. Também foi possível verificar que o aumento de escala, confirmou os resultados previstos pelos ensaios em microcosmos.

5. Agradecimentos

Ao CETEM/MCT pela infra-estrutura e concessão da bolsa, a Petrobrás pelo financiamento do projeto e pelo fornecimento do solo e do óleo e a Dra. Siu Mui Tsai (CENA/USP) pela infra-estrutura na parte de Biologia Molecular.

6. Referências Bibliográficas

- AMOR, L.;KENNES, C. & VEIGA, M.C. 2001. Kinetics of inhibition in the biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in presence of heavy metals. *Bioresource Technology*, v. 78, p.181-185.
- CUNHA, C.D. 2004. Avaliação de diferentes tecnologias de biorremediação de água subterrânea contaminada com gasolina e análise molecular da comunidade bacteriana presente. 176p. Tese (Doutorado) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Brasil).
- DERMONT, G., BERGERON, M., MERCIER, G. & RICHER-LAFLÈCHE, M. 2008. Metal-contaminated soils: remediation practices and treatment technologies. *Practice periodical of hazardous, toxic, and radioactive waste management*, v.12, p.188-209.
- DOBLER, R.; SANER, M.; BACHOFEN, R. 2000. Population changes of soil microbial communities induced by hydrocarbon and heavy metal contamination. *Bioremediation Journal*, v.4, p.41-56.
- FRANCO, N.O., CUNHA, C.D. & ROSADO, A.S. 2006. Métodos moleculares para análise de comunidades microbianas em ambientes aquáticos: II. DGGE. *Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia*. 35(3): 67-71.

- GALVEZ-CLOUTIER, R. & DUBE, J. S. □2002. "Impact of residual NAPL on water flow and heavy metal transfer in a multimodal grain size soil under saturation conditions: Implications for contaminant mobility." ASTM Special Technical Publication, West Conshohocken, Pa. 126–137.
- KNOX, E.G. & GILMAN, E.A. 1997. Hazard proximities of childhood cancers in Great Britain from 1953–80. *Journal of Epidemiology Community. H.* 51, 151–159.
- MAILA M., & CLOETE, T. 2005. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants—perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review. U.S. Patent 1. *International Biodeterioration & Biodegradation* 55:1-8.
- MALISZEWSKA-KORDYBACH B. & SMRECZAK, B.. 2003. Habitat function of agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. U.S. Patent 8. *Environment international* 28:719-28.
- MOREIRA, F. M.S. & SIQUEIRA, J.O. 2002. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 1aed. Lavras, MG, Brasil: Editora UFLA, 626p.
- RIZZO, A.C.L. 2008. Desenvolvimento de biorreator não convencional para o tratamento de solos contaminados por petróleo. 188p. Tese (Doutorado) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Brasil).
- TELHADO, M.C.S.C.L. 2009. Avaliação da biodisponibilidade de contaminante orgânico em solo. 124p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (Brasil).
- USEPA. 1996. "Cleaning up the nation's waste sites: Markets and technology trends, 1996 Ed." EPA 542-R-96-005, Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, D.C.
- USEPA. 2004. "Cleaning up the nation's waste sites: Markets and technology trends, 4th Ed." EPA 542-R-04-015, Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, D.C.