

# **Utilização da técnica de bioestímulo, avaliando-se parâmetros como relação nutricional e umidade na biorremediação de solo contaminado com óleo cru**

**Flávia Romero de Oliveira**

Bolsista de Iniciação Científica, Biologia, UNIVERCIDADE

**Valéria Souza Millioli**

Orientadora, Eng. Química, M. Sc.

## **Resumo**

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a relação nutricional e a umidade de um solo oriundo da região nordeste do Brasil contaminado, em laboratório, com 5% de óleo cru. Para este fim, empregou-se um planejamento fatorial completo com 3 fatores e 2 níveis onde foram verificadas a adição de nitrogênio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) na relação C:N = 100:10 e 100:5; fósforo ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) na relação C:P = 100:2 e 100: 1 e umidade analisada em 50 e 90% da capacidade de campo. Neste planejamento, a variável resposta foi o percentual de biodegradação do óleo através da análise de geração de  $\text{CO}_2$  (cromatógrafo HP5890 - DCT). A análise estatística apontou como variável mais significativa a adição de nitrogênio, observando-se que quanto maior a concentração do nitrogênio maior a biodegradação do óleo. Os fatores fósforo e umidade não foram estatisticamente significativos nas concentrações analisadas. Baseado nos resultados do planejamento experimental, outras relações nutricionais foram avaliadas para se determinar uma relação nutricional ótima a ser adicionada ao solo. De acordo com os resultados, a melhor relação nutricional foi a relação C:N:P = 100:15:1 obtendo-se uma biodegradação de 25,2 % do óleo cru após 30 dias.

## **1. Introdução**

A Biorremediação e a recuperação de solos contaminados com os materiais perigosos receberam a crescente atenção internacional nos últimos anos em decorrência de danos à saúde humana e ao meio ambiente (Wilson e Jones, 1993). Os métodos biológicos baseiam-se no fato de que os microrganismos têm a possibilidade de metabolizar compostos químicos e tanto o solo quanto as águas subterrâneas contêm elevado número de microrganismos que gradualmente se adaptam às fontes de energia e de carbono disponíveis. As técnicas de biorremediação usando plantas e microrganismos têm sido amplamente utilizadas na recuperação de solos contaminados com óleo cru porque transformam, através de processos naturais, esses compostos em substâncias inócuas. No entanto, o grau de descontaminação irá depender da natureza e concentração do poluente presente, assim como as características do solo (Autry e Ellis, 1992; Del'arco, 1999; Adeniyi e Afolabi, 2002).

A biorremediação possui vantagem em relação a outras técnicas, como as térmicas e físico-químicas em termos de baixos custos e também porque o solo, como um sistema vivo para o crescimento da planta, não é destruído.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 - SOLO: Amostragem e armazenamento

Neste trabalho foi utilizado um solo da região Nordeste do Brasil. O solo foi homogeneizado, peneirado e quarteado, sendo o mesmo contaminado em 5% de óleo cru.

Tabela 1 - Características físico-químicas e microbiológicas do solo contaminado com óleo cru

Parâmetro	Teor no solo contaminado
N	2,3 g/Kg
P	0,13 g/Kg
Matéria orgânica	5,8
pH	6,4
Capacidade de campo	28%
Carbono orgânico	3,4 %
Microorganismos degradadores de óleo cru	2,1X10 <sup>6</sup>
Microorganismos heterotróficos totais	2,310 <sup>6</sup>

### 2.2- Planejamento experimental completo 2<sup>3</sup>

Este planejamento teve como objetivo investigar a adição de nitrogênio, fósforo, bem como verificar a umidade do solo. O planejamento fatorial completo consistiu em 8 experimentos em duplicata. A Tabela 2 mostra os fatores e os níveis avaliados no planejamento.

Tabela 2 - Fatores avaliados para verificação do Percentual de Biodegradação (PB) do óleo contido no solo, empregando planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>.

FATORES	NÍVEIS	
	Nível (+1)	Nível (-1)
Nitrogênio	C : N = 100 : 10	C : N = 100 : 5
Fósforo	C : P = 100 : 2	C : P = 100 : 1
Umidade	90% da CC	50% da CC

### 2.3- Ensaios de biodegradação do planejamento experimental 2<sup>3</sup>

Nestes ensaios foram pesados 50g de solo seco, contaminado com 5% de óleo cru, e colocados em kitsato com capacidade de 250 mL, sendo os nutrientes corrigidos através da adição de nitrato de amônio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) e fosfato de potássio dibásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). A umidade foi ajustada conforme apresentado anteriormente na Tabela 2. Posteriormente, as amostras de solo foram homogeneizadas com um bastão de vidro, tampando-se os frascos com rolha de silicone, sendo a saída lateral vedada com tubo de latex e pinça de Hoffman. Os frascos foram incubados em estufa à 30°C durante 30 dias, sendo retirados periodicamente para análise cromatográfica e aeração. A umidade foi corrigida periodicamente por método gravimétrico. A Tabela 3 mostra a matriz padrão do planejamento experimental.

Tabela 3 – Matriz padrão para os experimentos conduzidos no planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>.

Experimentos	Níveis dos Fatores		
	Nitrogênio	Fósforo	Umidade
1	1	1	1
2	1	1	-1
3	1	-1	1
4	1	-1	-1
5	-1	1	1
6	-1	1	-1
7	-1	-1	1
8	-1	-1	-1

#### **2.4 – Ensaios das diferentes relações nutricionais**

Estes ensaios foram conduzidos conforme o item anterior (2.3), sendo a umidade ajustada para 50% da capacidade de campo e as relações nutricionais analisadas em: C:N:P = 100:10:1 e 100:15:1; C:N = 100:10 e 100:15 (sem adição de fósforo) e C:P = 100:1 (sem adição de nitrogênio).

#### **2.5 - Cálculo do percentual de biodegradação (PB)**

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 do contaminante 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:

$$PB (\%) = (C_{\text{consumido}} \times 100) / C_i \quad \text{Equação 4.1}$$

Onde:  $C_{\text{consumido}} = 2 \times (\text{CO}_2 \text{ acumulado ao longo do processo})$ ;  $C_i$  = Concentração inicial de carbono (de acordo com Jaramillo (1996), pode-se fazer uma conversão de matéria orgânica a carbono orgânico, dividindo-se o percentual da matéria orgânica por 1,72. Dessa forma, para fins de cálculo do carbono orgânico, foi utilizado o valor de 3,4% de Carbono de acordo com o resultado apresentado na Tabela 1)

#### **2.6 – Metodologias analíticas**

##### 2.5.1 – Densidade de Bulk, densidade da partícula e porosidade

Estas metodologias foram feitas de acordo com Deuel *et al.*(1997).

##### 2.5.2 - pH e capacidade de campo.

O pH de acordo com a metodologia da EMBRAPA (1997); A capacidade de campo foi determinada de acordo com metodologia descrita por Alef, K. & Nannipieri (1995).

##### 2.5.3 – Teor de nitrogênio, fósforo assimilável e matéria orgânica

A determinação do teor de nitrogênio, fósforo assimilável e matéria orgânica das amostras de solo foram feitas pelo método descrito por Jaramillo (1996).

##### 2.5.4 – Análise microbiológica

#### 2.5.4.1 – Quantificação de microrganismos heterotróficos totais

A de quantificação microbiológica foi determinada de acordo com a metodologia de Urrahy (1998).

#### 2.5.4.2 – Quantificação de microrganismos degradadores de óleo cru

A quantificação da população microbiana degradadora foi feita pela técnica do Número Mais Provável (NMP) (Oblinger & Koburger , 1975). O meio mineral líquido (Vecchioli *et al.* 1990) utilizado para o crescimento dos microrganismos degradadores .

### 2.6 – Análise cromatográfica do CO<sub>2</sub> produzido

Empregando-se uma seringa cromatográfica foram injetadas, no cromatógrafo a Gás HP 5890 (DTC), amostras de 0,5 mL das atmosferas internas dos kitsatos (Head space). As leituras foram feitas em duplicata e os resultados expressos pelas médias dos valores obtidos. As condições gerais de análise empregadas durante o 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. Resultados e discussão

### 3.1 - Análise do planejamento experimental 2<sup>3</sup>

Com a finalidade de encontrar a melhor relação nutricional (C:N:P) e a melhor umidade para o solo estudado, ou seja, a relação que mais influenciou o potencial de biodegradação, fez-se, necessária, a análise da matriz do planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>. Nesta etapa foram analisados 8 experimentos em duplicatas e os resultados mostraram diferentes percentuais de biodegradação que variaram de 27,7 a 9% (Tabela 4).

Tabela 4 - Matriz do Planejamento Fatorial Completo 2<sup>3</sup> com os respectivos percentuais de biodegradação (PB).

CONDIÇÕES	FATORES			PB ( % )*
	NITROGÊNIO	FÓSFORO	UMIDADE	
1	1	1	1	26,7 ± 2,4
2	1	1	-1	27,6± 3,9
3	1	-1	1	26,6 ± 3,9
4	1	-1	-1	27,7 ± 0,14
5	-1	1	1	13,4 ± 2,1
6	-1	1	-1	9 ± 0,07
7	-1	-1	1	14,4 ± 2,7
8	-1	-1	-1	10,3 ± 0,07

\* Resultados obtidos através da equação do cálculo do percentual de biodegradação

O software Statistica gerou uma curva de regressão linear com um fator de correlação de 0,94 para um intervalo de confiança de 95%, cujos resultados foram obtidos através de análises de geração de CO<sub>2</sub>. Assumindo um valor de 6 graus de liberdade, foi fornecido pelo software um valor de  $t = 2,447$ . Com base no valor de  $t$  de student, os efeitos significativos no processo de biodegradação do óleo foram analisados. Para que um efeito ou interação fosse considerado importante, o valor de  $t$  calculado deveria ser maior que o tabelado.

Estas análises são melhores visualizadas num gráfico Pareto (Figura 1), no qual a linha vertical (para  $p=0,05$ , o valor de  $t$  de Student tabelado) indica a mínima magnitude dos efeitos estatisticamente significativos na análise em questão. Os efeitos positivos indicam que os fatores devem ser usados no nível +1 (Tabela 2) para que se obtenha melhor resposta do sistema. Os efeitos negativos indicam que os fatores devem ser usados no nível -1. Assim, através do gráfico Pareto, observa-se que o fator principal para o percentual de biodegradação foi o nitrogênio, sendo que este valor foi estatisticamente positivo, o que indica que os ensaios onde se trabalharam com a maior concentração de nitrogênio geraram melhores resultados de percentual de biodegradação. Os fatores umidade e fósforo analisados, separadamente, não foram estatisticamente significativos para um intervalo de confiança de 95% na distribuição  $t$  de "Student".

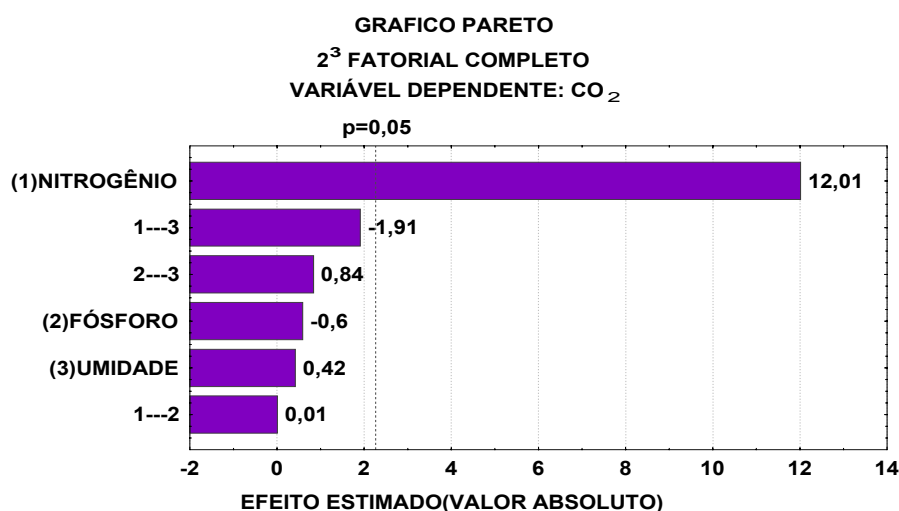


Figura 1: Gráfico de Pareto para a eficiência de degradação do contaminante de acordo com a geração de CO<sub>2</sub> produzida ao longo dos 30 dias de experimentos.

A Figura 2 mostra as interações entre os fatores Umidade---nitrogênio---fósforo. Pode-se observar que ao se trabalhar com a relação nutricional C:N:P = 100:10:1 e a umidade ajustada em 50% da capacidade de campo obtém-se, estatisticamente, maior percentual de biodegradação (27%).

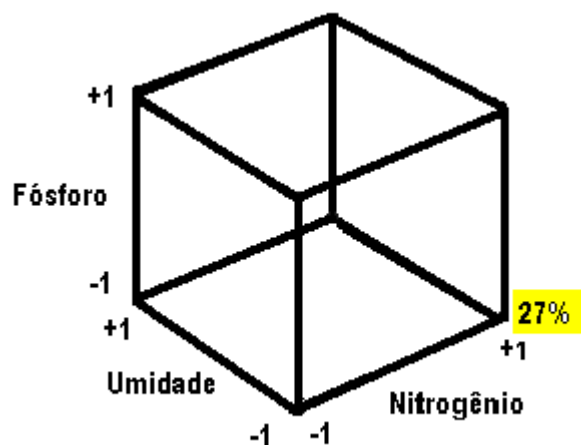


Figura 2. Interação entre os fatores nitrogênio, fósforo e umidade

### 3.2 – Análise da relação nutricional ótima

Estes ensaios foram feitos após a análise do planejamento experimental. Dependendo das condições de temperatura, aeração, condições do cromatógrafo, podem ocorrer aumento ou redução do percentual de biodegradação para ensaios conduzidos da mesma maneira, ou seja, mesma relação nutricional, umidade, pH etc. Dessa forma, nesta parte do trabalho, verificou-se uma queda no percentual de biodegradação em relação ao verificado no planejamento experimental. Foram analisadas 5 diferentes relações nutricionais conforme apresentado na Tabela 5. Os resultados demonstraram que a adição do nitrogênio ao solo é fundamental para que haja maior percentual de biodegradação (experimentos 2 e 4), obtendo-se 25,2 e 22,6% de biodegradação, respectivamente. Quando o nitrogênio não foi adicionado ao solo (experimento 5) houve menor percentual de biodegradação (11,7%).

Tabela 5: percentual de biodegradação (PB) para as diferentes relações nutricionais

Experimentos	Relação nutricional	PB (%)	Microorganismos degradadores de óleo cru
1	C:N:P = 100:10:1	18,5	5X10 <sup>9</sup>
2	C:N:P = 100:15:1	25,2	4X10 <sup>10</sup>
3	C:N = 100:10	19,1	6X10 <sup>9</sup>
4	C:N = 100:15	22,6	4X10 <sup>10</sup>
5	C:P = 100:1	11,7	1,7X10 <sup>8</sup>

Comparando o resultado inicial, referente aos microrganismos degradadores de óleo cru (Tabela 1), e após o término dos ensaios (Tabela 5), observou-se aumento da população microbiana em todos os ensaios. Observa-se, ainda, que as relações nutricionais C:N:P = 100:15:1 e C:N = 100:15 apresentaram maior aumento da população microbiana, o que possivelmente explica estes como melhores resultados.

#### 4 – Conclusões

Os ensaios de biodegradação do óleo resultaram em percentuais que variaram entre 9 e 27,7%

Através do planejamento experimental 2<sup>3</sup>, o fator que mais influenciou no percentual de biodegradação foi o NITROGÊNIO no seu maior nível (C:N = 100:10).

Com base no planejamento experimental, a melhor relação nutricional para o processo de biodegradação do foi a relação C:N:P = 100:15:1, obtendo-se uma biodegradação de 25,2%.

#### 5 – Agradecimentos

À minha orientadora Valéria Souza Millioli , CNPq pela bolsa concedida e a Petrobrás pelo apoio financeiro

#### 6. Referências Bibliográficas

- ADENIYI, A. A. & AFOLABI, J. A. Determination of total petroleum hydrocarbons and heavy metals in soils within the vicinity of facilities handling refined petroleum products in Lagos metropolis. *Environmental International*, vol. 28, pp. 79-82. 2002
- ALEF, K. e NANNIPIERI, P. (1995). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, 1<sup>st</sup> ed., 576p, 1995.
- AUTRY, A.R. AND ELLIS, G.M., Bioremediation: An effective remedial alternative for petroleum hydrocarbon-contaminated soil. *Environmental Progress*, vol. 11, n.4, pp. 318-323. 1992.
- DEL'ARCO, J. P. Degradação de hidrocarbonetos por bactérias e fungos em sedimento arenoso. Orientador: Francisca Pessôa de França. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 1999. 171p. *Dissertação.(Mestrado em ciências)*.
- DEUEL, L. E. e HOLLIDAY, G. H. *Soil Remediation for the Petroleum Extraction Industry*. PennWell, 2<sup>nd</sup> Ed., TULSA, U.S.A., 242p.1997
- JARAMILLO, I. R. *Fundamentos teóricos-práticos de temas selectos de la ciência Del suelo*. Parte 1 Universidad Autónoma Metropolitana, México. 1996.
- OBLINGER, J. L. e KOBURGER, J. A. Understanding and Teaching the Most Probable Number Technique. *Journal of Mik Food Tecnology*. 1975
- URURAHY, A. F. P. Biodegradação de resíduos oleosos proveniente de refinaria de Petróleo. *Dissertação Tese de D. Sc.*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 127p. 1998.
- 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*, vol. 67 , pp. 249-258.1990
- WILSON, S.C. and JONES, K.C. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review, *Environmental Pollution*. vol. 81 pp. 229-249. 1993.