

# **Biodegradação de Petróleo de solo areno-argiloso por fungo filamentoso**

**Sabrina Dias de Oliveira**

Bolsista de Iniciação Científica, Química, UFF.

**Judith Liliana Solórzano Lemos**

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

## **Resumo**

No presente trabalho, foram estudadas as condições de biodegradação de um solo contaminado por petróleo, utilizando fungos filamentosos e duas técnicas convencionais: o bioaumento e a bioestimulação. Os resultados mostraram que a adição de inóculo fúngico e das fontes de nitrogênio, avaliadas através da determinação de CO<sub>2</sub>, beneficiaram o percentual de biodegradação de petróleo, atingindo um valor máximo de 19,16% quando utilizada uréia na proporção de 100:10. Quanto à remoção dos hidrocarbonetos de petróleo, empregando a determinação de TPH, o resultado apontou um incremento de aproximadamente 57% em relação à amostra controle, ao empregar extrato de levedura e uréia como fontes de nitrogênio, ambas na proporção de 100:10. O estudo tornou evidente o benefício indistinto das duas fontes de nitrogênio empregadas, bem como mostrou com clareza que a determinação de TPH é uma técnica analítica mais acurada do que a de CO<sub>2</sub>.

## **1. Introdução**

Nos últimos tempos, têm crescido a preocupação com o meio ambiente, em especial, com os impactos decorrentes de derrames de petróleo. Um dos melhores processos para recuperar solos contaminados é fazer uso de microorganismos capazes de degradar compostos tóxicos em um processo de biorremediação (Bento *et al.*, 2005).

Biorremediação pode ser definida como o uso de microorganismos vivos para remoção de poluentes do solo, água e gases, podendo ser aliada a duas técnicas: bioaugmentação e bioestimulação (Pandey *et al.*, 2000).

O processo de bioaugmentação envolve a introdução de microorganismos que têm sido cultivados para degradar várias cadeias de hidrocarbonetos dentro de um sistema contaminado. As culturas podem ser derivadas de um solo contaminado ou obtidas de uma cultura estoque que têm demonstrado, previamente, capacidade para degradar hidrocarbonetos (Sarkar *et al.*, 2005).

O processo de bioestimulação consiste em introduzir nutrientes adicionais na forma de fertilizantes orgânicos e/ou inorgânicos em um sistema contaminado, o que causa o aumento da população de microorganismos indígenas. Os microorganismos podem ou não, inicialmente, ter como alvo os hidrocarbonetos como fonte de alimento. Contudo, os hidrocarbonetos são, supostamente, degradados mais rapidamente do que no processo de degradação natural, devido à elevação do número de microorganismos causado pelo aumento dos níveis de nutrientes (Sarkar *et al.*, 2005).

Na última década, têm sido identificadas e caracterizadas diferentes espécies de bactérias e fungos filamentosos, utilizados nos processos de biorremediação. Algumas características dos fungos filamentosos, como a bioatividade e o crescimento morfológico, os tornam melhores degradadores potenciais do que as bactérias. Além disso, os fungos são capazes de crescer sob condições ambientais de estresse: meios com baixos valores de pH, pobres em nutrientes e com baixa atividade de água, favorecendo o seu desenvolvimento diante de outros microorganismos (Mollea *et al.*, 2005).

## **2. Objetivo**

O presente trabalho teve como objetivo definir a fonte de nitrogênio mais adequada ao processo de biorremediação, empregando *Aspergillus versicolor* como agente de degradação, bem como comparar o emprego de duas técnicas analíticas para avaliação do mesmo.

## **3. Materiais e Métodos**

### **3.1.Solo**

O solo utilizado foi 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 julho de 2001 (2ª Remessa).

### **3.2.Microorganismo**

*A. versicolor* foi cultivado através da propagação de biomassa em tubos de ensaio, contendo Czapeck agarizado. Os conídeos, obtidos após 5 dias de cultivo, foram removidos com o auxílio de 3 mL de água destilada estéril e transferidos a 200 mL de meio Czapeck líquido. Após o cultivo durante 5 dias a 30 °C, a uma rotação de 150 rpm, os “pellets” foram inoculados nos solos a serem tratados numa concentração de 25% v/v da Capacidade de Retenção de Água (CRA).

### **3.3.Procedimento para avaliação do efeito das fontes de nitrogênio**

Para a realização deste experimento foram empregadas duas fontes orgânicas de nitrogênio, uréia ((NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO) e extrato de levedura (EL). O solo em estudo possuía uma relação carbono-nitrogênio (C/N) de 100/4,55 e foi empregado como controle do tratamento. No entanto, os experimentos foram conduzidos ajustando as relações C/N em 100/10 e 100/25 para EL e em 100/10 e 100/20 para uréia, sabendo que o teor de carbono do solo era igual a 22,32 mg/g de solo e o de nitrogênio era de 1mg/g de solo. Os ensaios foram conduzidos em duplicata, em kitsatos de 250 mL, contendo cada um 50 g de solo, sem ajuste de pH (pH natural do solo = 4,76) e teor de umidade ajustado em 100% da capacidade de retenção de água (CRA). Os frascos foram mantidos em estufa, a 30°C, durante os 48 a 50 dias de experimento.

### **3.4.Quantificação de CO<sub>2</sub>**

O acompanhamento do processo de biodegradação foi realizado por cromatografia gasosa mediante a dosagem de CO<sub>2</sub> como descrito em Pereira e Lemos (2003).

### 3.5. Determinação de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPH)

A análise de TPH foi realizada no laboratório do CENPES/PDEDS/BTA/PETROBRAS utilizando a técnica de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama, conforme o método USEPA 8015B.

## 4. Resultados e Discussão

Após o estabelecimento de parâmetros que regulam o metabolismo fúngico, foram avaliadas as condições consideradas relevantes no mesmo processo biológico. Desta forma, os gráficos subsequentes, mostrados nas Figuras 1, 2, 3 e 4, apresentam os resultados referentes ao emprego de relações carbono/nitrogênio nas proporções 100:10 com EL, 100:25 com EL, 100:10 com uréia e 100:20 com uréia, respectivamente, empregados nas amostras de solo contaminado.

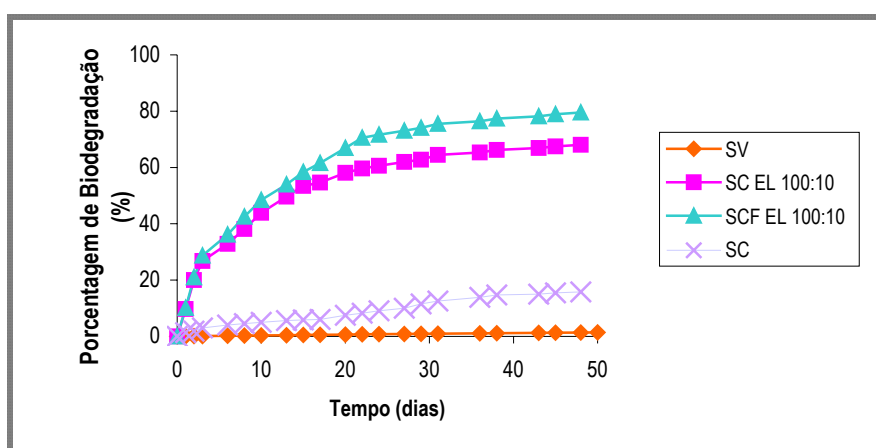


Figura 1. Relação C/N 100:10 com EL, onde SV é solo virgem; SC, solo contaminado por petróleo; SCEL, solo contaminado por petróleo mais EL e SCFEL, solo contaminado por petróleo mais fungo e EL.

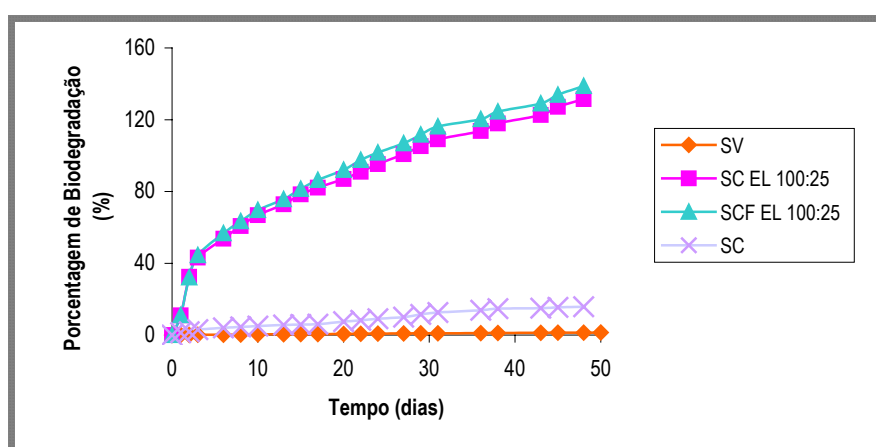


Figura 2. Relação C/N 100:25 com EL, onde SV é solo virgem; SC, solo contaminado por petróleo; SCEL, solo contaminado por petróleo mais EL e SCFEL, solo contaminado por petróleo mais fungo e EL.

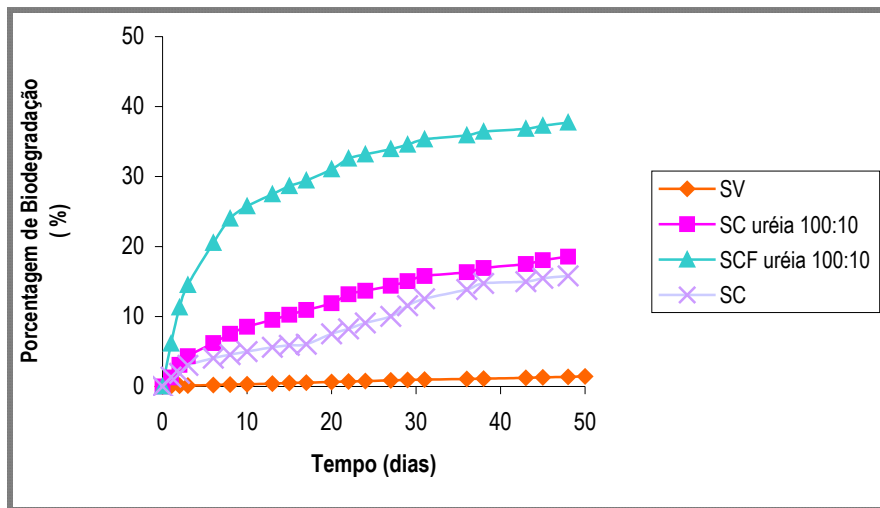


Figura 3. Relação C/N 100:10 com uréia, onde SV é solo virgem; SC, solo contaminado por petróleo; SC uréia, solo contaminado por petróleo mais uréia e SCF uréia, solo contaminado por petróleo mais fungo e uréia.

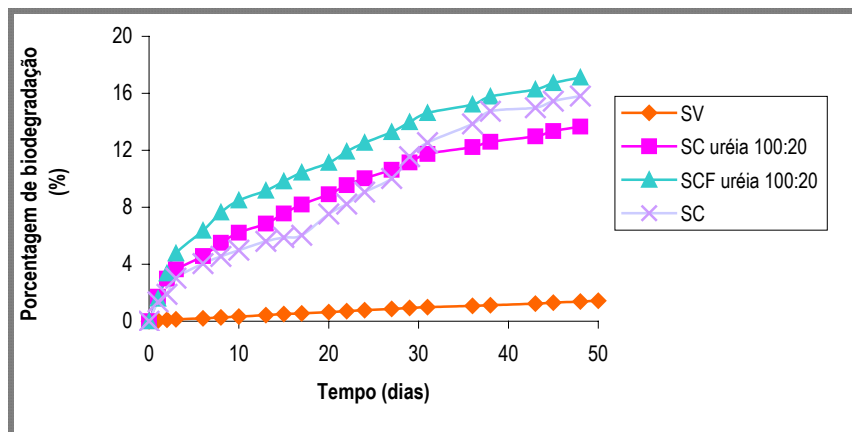


Figura 4. Relação C/N 100:20 com uréia, onde SV é solo virgem; SC, solo contaminado por petróleo; SC uréia, solo contaminado por petróleo mais uréia e SCF uréia, solo contaminado por petróleo mais fungo e uréia.

Analisando os resultados, observamos que a adição das fontes de nitrogênio em qualquer uma das relações, com exceção da adição de uréia na proporção 100:20, beneficiou o percentual de biodegradação em relação à amostra controle (relação C/N 100:4.55) que não continha nitrogênio extra. Nos mesmos gráficos, também podemos observar que o inóculo fúngico trouxe um efeito positivo ao processo de degradação, tornando mais patente a colaboração dos mesmos nas amostras bioestimuladas com EL e uréia nas proporções 100:10. Para melhor visualização do resultado, na Figura 5 mostra-se a porcentagem de biodegradação das quatro condições estudadas, sendo o melhor resultado o alcançado com a relação 100:10, utilizando uréia como fonte de nitrogênio.

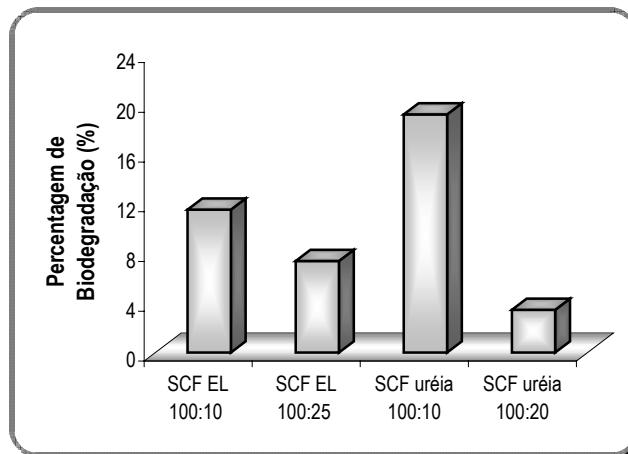


Figura 5. Percentagem de biodegradação das relações carbono/nitrogênio nas proporções 100:10 com EL, 100:25 com EL, 100:10 com uréia e 100:20 com uréia. A sigla SCF significa solo contaminado adicionado de fungo.

As quatro condições anteriormente estudadas, e analisadas através da determinação de  $\text{CO}_2$  foram a seguir analisadas quanto à remoção de TPH (Figura 6). O resultado mostrou um incremento na remoção de TPH de 6 a 8 % quando utilizadas as relações de 100:10 mais inóculo fúngico, empregando tanto uréia (39,30%) como EL (39,4%), em comparação às amostras com uréia 100:20 (37,2%) e EL 100:25 (36,4%), respectivamente. No que diz respeito à amostra controle, o efeito positivo ao empregar as fontes orgânicas de nitrogênio, juntamente com o inóculo fúngico, foi ainda maior, atingindo um aumento de 57,4%.

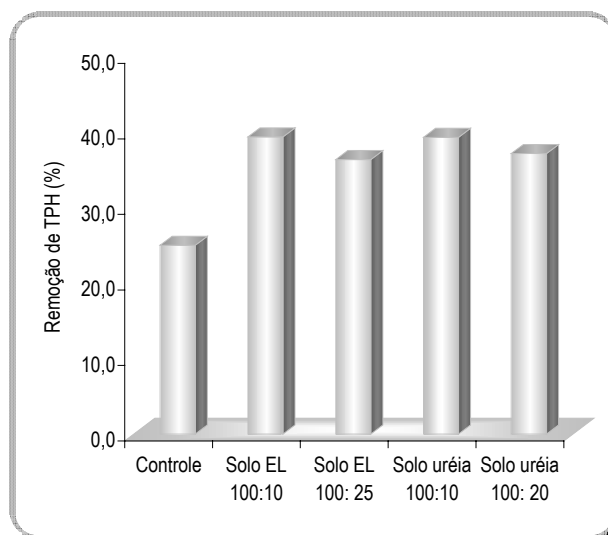


Figura 6. Remoção de TPH das relações carbono/nitrogênio nas proporções 100:10 com EL, 100:25 com EL, 100:10 com uréia e 100:20 com uréia.

As observações quanto à avaliação dos resultados empregando as duas técnicas analíticas permitem inferir que, o monitoramento dos experimentos através da evolução de  $\text{CO}_2$  torna-se uma ferramenta válida para tal, dentro das suas limitações. Sabe-se que, nesse tipo de determinação é dosado o produto final do processo de

mineralização do petróleo (CO<sub>2</sub>), cuja evolução não se constitui necessariamente no quadro real da degradação. Pois, existem, provavelmente, condições biológicas que não conduzem o petróleo até a etapa final da sua degradação. Dessa forma, o resultado da determinação de TPH reflete uma situação mais real da degradação dos hidrocarbonetos de petróleo presentes nas amostras.

Por outro lado, é válido salientar o benefício do tratamento ex-situ de amostras contaminadas por petróleo, empregando conjuntamente o bioestímulo, com fontes de nitrogênio, e o bioaumento com fungos filamentosos, pois quando comparado ao processo natural de degradação, o presente tratamento proporcionou uma atenuação de hidrocarbonetos de petróleo de aproximadamente 25% ao mês (42 % de remoção de TPH em 1,7 meses), enquanto que o processo natural de atenuação contribuiu com 2,44% de remoção mensal (51,2% de remoção de TPH em 21 meses). Percebe-se, então, que a biorremediação das amostras contaminadas por petróleo antecipou a atenuação do contaminante do solo, atingindo desta forma o objetivo do nosso trabalho. E assim, podemos afirmar que a biorremediação se constitui numa alternativa potencialmente válida para minimizar os impactos ambientais provocados pelos derramamentos de petróleo.

## 5. Conclusão

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que o bioestímulo com uréia e EL, principalmente na relação de 100:10, bem como a adição de *A. versicolor*, favoreceram a biorremediação dos solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. Quanto às técnicas analíticas empregadas, a determinação de TPH se constitui na mais adequada ao monitoramento da degradação de petróleo.

## 6. Agradecimentos

Ao Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica – PIBIC/CNPq – pela bolsa concedida. À Judith Liliana Lemos, minha orientadora, pela eterna pré-disposição e paciência; às técnicas, Grace Maria de Britto e Marcia Alves, pelos ensinamentos e aos amigos Acácia Reiche, Vanessa Monteiro, Pedro Felix e Paula Machado.

## 7. Referências Bibliográficas

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, W. T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v.96, p.1049-1055, 2005.

MOLLEA, C.; BOSCO, F.; RUGGERI, B. **Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies**. Itália, Jan. 2005. Disponível em: < <http://www.elsevier.com/locate/chemosphere> > Acesso em: 10 maio 2005.

PANDEY, A., SOCCOL, C.R. & MITCHELL, D. New development in solid state fermentation: I - bioprocesses and products. **Process Biochemistry**. V. 35. p. 1153-1169, 2000.

PEREIRA, L. T. C.; LEMOS, J. L. S. Os fungos filamentosos, uma opção em estudo para a biorremediação I. Em: **XI JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA** - CETEM, 2003, Rio de Janeiro. XI

Jornada de Iniciação científica - CETEM. 2003.

SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATA, R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, v.136 , p.187-195, 2005.