

# **USO DE BIORREMEDIANTE NO TRATAMENTO, EM BIORREATOR, DE SOLO CONTAMINADO POR ÓLEO CRU**

**Rosana Candida Macedo**

Bolsista de Nível Médio, Tec. em Química Industrial, CEFETEQ de Nilópolis

**Andréa Camardella de Lima Rizzo**

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

**Valéria Souza Millioli**

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

## **RESUMO**

*A biorremediação é uma técnica que vem alcançando importância mundial, uma vez que o aumento da atividade industrial está prejudicando cada vez mais, os ecossistemas naturais. No entanto, o limite da disponibilidade de muitos poluentes para os microrganismos é um dos principais pontos que afetam a eficiência do processo de*

*biodegradação. Esse fator pode ser minimizado através do uso de surfatantes ou biossurfatantes.*

*Por esse motivo, o presente trabalho foi realizado com o intuito de avaliar a eficiência do uso de um biossurfatante no processo de biodegradação em biorreator de fase sólida, de um solo contaminado com óleo cru.*

## **1. INTRODUÇÃO**

As indústrias de petróleo lidam diariamente com problemas decorrentes de derrames acidentais durante a exploração, refino, transporte, e operações de armazenamento do petróleo e seus derivados (BRATBERG E HOPKINS, 1995). Tais ocorrências vêm motivando a realização de pesquisas na área de biorremediação de solos (SORIANO, 2000).

A biorremediação é uma tecnologia aplicada na recuperação de áreas contaminadas por compostos tóxicos, através da otimização de processos de degradação por microrganismos nativos (ATLAS, 1993) portanto, um dos fatores limitantes ao processo de biorremediação em solos contaminados é o baixo nível de disponibilidade dos hidrocarbonetos (baixa solubilidade em água, alta fixação sobre a matriz do solo, e pouca transferência dos poluentes adsorvidos da fase sólida para fase aquosa) (VOLKERING et al., 1995).

Uma maneira de aumentar a disponibilidade destes hidrocarbonetos para a ação microbiana é a aplicação de surfatantes ou biossurfatantes.

## **1.1 Surfatantes**

Surfatantes sintéticos e biológicos têm sido utilizados no auxílio a biorremediação. Entretanto, os surfatantes químicos (sintéticos) tendem a ser mais tóxicos à população microbiana, levando muitas vezes, à redução nas taxas de degradação dos hidrocarbonetos de petróleo (PROVIDENTI et al., 1993). Já os biossurfatantes apresentam vantagens como baixa toxicidade, biodegradabilidade, produção a partir de substratos renováveis, capacidade de modificação estrutural através da engenharia genética ou técnicas bioquímicas e estabilidade em valores extremos de pH e temperatura (FIECHTER, 1992 e PRUTHI & CAMEOTRA, 1997).

Os biossurfatantes são produzidos principalmente pelo crescimento aeróbico de microrganismos em meio aquoso com uma fonte de carbono, como carboidratos, hidrocarbonetos, óleo e graxas ou misturas destes. Possuem uma estrutura comum composta por uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica e são capazes de emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo, tornando-os mais acessíveis aos microrganismos. Algumas pesquisas enfocam que os surfatantes sintéticos ou biológicos melhoram a biodegradação de hidrocarbonetos e outros reportam que a presença dos mesmos inibe a biodegradação (ARONSTEIN & ALEXANDER, 1992 ; JAHAN et al. 1999). A explicação para o efeito negativo da adição dos surfatantes ao meio, varia principalmente com a concentração a ser utilizada dos mesmos.

## **2. OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade do uso de biossurfatante do tipo raminolipídio no tratamento, em biorreator, de solo contaminado por óleo cru através de um planejamento experimental prévio.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Amostra de solo

O solo utilizado foi de Guararema - SP, caracterizado como 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 outubro de 2000, cuja caracterização se encontra descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização da amostra de solo coletada em outubro de 2000.

| Parâmetro            | Teor(Solo) | Feita por: |
|----------------------|------------|------------|
| C orgânico           | 46g/kg     | UFRRJ      |
| N                    | 1,0g/kg    | UFRRJ      |
| P                    | 0,001g/kg  | UFRRJ      |
| TPH's                | 26,2mg/g   | CENPES     |
| Matéria Orgânica     | 8,54%      | CETEM      |
| Capacidade Campo C/C | 38,50%     | CETEM      |
| pH                   | 5,1        | UFRRJ      |

#### 3.2. Avaliação da adição de surfatante através do planejamento experimental fracionário $2^{(4-1)}$ em solo contaminado com óleo cru

O planejamento consistiu em oito experimentos, com 3 pontos centrais (para se verificar a reprodutibilidade dos ensaios). A Tabela 2 apresenta os fatores e os níveis avaliados no planejamento.

Tabela 2. Fatores e níveis avaliados no planejamento experimental fracionário  $2^{(4-1)}$  no solo de Guararema.

| FATORES                 | NÍVEIS        |               |             |
|-------------------------|---------------|---------------|-------------|
|                         | Inferior (-1) | Superior (+1) | Central (0) |
| pH                      | 4,0           | 7,0           | 5,5         |
| Biossurfatante (g)      | 1             | 5             | 3           |
| Capacidade de Campo (%) | 50            | 90            | 70          |
| Nutrientes (C:N:P)      | 100:5:1       | 100:15:1      | 100:10:1    |

O pH do solo foi ajustado conforme os valores apresentados na Tabela 2 com adição de hidróxido de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) ou sulfato de ferro heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), e a relação nutricional (C:N:P) foi corrigida por

meio da adição de nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) e fosfato de potássio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).

Após as correções necessárias aos testes, foram pesados 50g de solo seco em Kitassatos de 250mL. Os experimentos realizados e as condições dos mesmos se encontram na Tabela 3.

**Tabela 3. Matriz padrão para os experimentos conduzidos no planejamento.**

| Experimentos | Níveis dos Fatores |         |                    |                    |
|--------------|--------------------|---------|--------------------|--------------------|
|              | pH                 | C/C (%) | Nutrientes (C:N:P) | biossurfatante (g) |
| 1            | 4,0                | 50      | 100:5:1            | 1                  |
| 2            | 7,0                | 50      | 100:5:1            | 5                  |
| 3            | 4,0                | 90      | 100:5:1            | 5                  |
| 4            | 7,0                | 90      | 100:5:1            | 1                  |
| 5            | 4,0                | 50      | 100:15:1           | 5                  |
| 6            | 7,0                | 50      | 100:15:1           | 1                  |
| 7            | 4,0                | 90      | 100:15:1           | 1                  |
| 8            | 7,0                | 90      | 100:15:1           | 5                  |
| 9            | 5,5                | 70      | 100:10:1           | 3                  |
| 10           | 5,5                | 70      | 100:10:1           | 3                  |
| 11           | 5,5                | 70      | 100:10:1           | 3                  |

Aos frascos foi adicionado o fungo *Aspergillus versicolor* na concentração de  $10^7$  conídeos/ g de solo. Os fungos foram cultivados em tubos inclinados a  $30^\circ\text{C}$  durante 6-7 dias, sendo os conídeos suspensos em água destilada estéril ao final do período. A contagem foi realizada em Câmara de Neubauer (MACEDO & BERBERT, 2002).

Os frascos foram incubados em estufa à  $30^\circ\text{C}$  durante 30 dias, sendo retirados periodicamente para análise cromatográfica e aeração. A umidade foi corrigida por método gravimétrico, sempre que necessário.

### **3.3. Teste de Biodegradação no protótipo do Biorreator**

Foi adicionado ao protótipo do biorreator, desenvolvido no CETEM, (RAIMUNDO, 2002) 8Kg de solo seco. As condições aplicadas ao solo no biorreator encontram-se descritas na Tabela 4.

**Tabela 4. Condições do solo durante o teste em biorreator**

|                            |           |
|----------------------------|-----------|
| Concentração de surfatante | 10% p/p   |
| pH                         | 7,0       |
| Umidade                    | 50% da CC |
| Nutrientes                 | 100:5:1   |

Tais condições foram definidas de acordo com os resultados do planejamento realizado anteriormente. Devido à dificuldades relacionadas à adição de fungo no reator e também ao observado em ensaios anteriores (SANTOS, 2003) onde a adição de fungo não representou um aumento significativo na Eficiência de Biodegradação, definiu-se que o teste em reator seria conduzido somente com adição de surfatante na concentração máxima, e com as demais correções (correção de pH, relação C:N:P e umidade). Como a relação C:N deste solo é de 100: 4,48 optou-se por não adicionar nitrogênio neste ensaio.

Após 15 dias de teste no protótipo do biorreator a umidade foi reajustada para 100% da CC devido à dificuldades de operação com a umidade em 50% da CC (aglomeração excessiva do material, prejudicando a homogeneização do mesmo).

O solo, ajustado conforme as condições da Tabela 4, foi mantido agitado no interior do reator através do movimento rotacional do eixo central (12rpm) durante cerca de 8 horas diárias, com exceção dos finais de semana e feriados quando o sistema de agitação era mantido desligado por questões de segurança. O teste foi conduzido por um período de 48 dias. O reator era aerado diariamente por 1 hora, utilizando-se de ar comprimido e um sistema de distribuição de ar específico. A vazão de ar alimentada foi monitorada e mantida a aproximadamente 20L/min.

Semanalmente, retirou-se uma alíquota do solo para acompanhamento do teor de umidade, do percentual de matéria orgânica por ignição e da concentração de óleos e graxas pelo método gravimétrico.

### **3.4. Metodologias analíticas empregadas**

#### **3.4.1. Quantificação do CO<sub>2</sub> gerado**

Recolheu-se da atmosfera interna dos frascos dos experimentos (headspace), um volume de 500µL, com o intuito de verificar a produção de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) pelos microrganismos como produto do metabolismo celular.

Para a quantificação, utilizou-se o cromatógrafo HP5890 série II, cuja as condições de análise encontram-se descritas abaixo:

Vazão do gás de arreste (He) → 17,89mL/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

Com base no valor acumulado de CO<sub>2</sub> (mmol) gerado ao final dos experimentos e calculou-se a eficiência de biodegradação (EB %) da seguinte forma:

Massa de Carbono Biodegradada Totalmente = 2 x Massa de carbono proveniente de CO<sub>2</sub> Gerado

EB% = (Massa de Carbono Biodegradada Totalmente) X 100 / Massa de Carbono Orgânico Total do Solo\*

\*Avaliada em termos de TPH inicial.

### **3.4.2. Análise de matéria orgânica pelo método de ignição**

A análise de matéria orgânica (MO) foi realizada através do método de ignição utilizando mufla à 1000°C por um período de 1 hora. Com os resultados obtidos foi possível calcular a eficiência de remoção (ERMO) conforme a fórmula abaixo:

$$\text{ERMO (\%)} = (\text{MO inicial} - \text{MO final}) * 100 / \text{MO inicial}$$

### **3.4.3. Determinação da porcentagem de óleos e graxas por gravimetria**

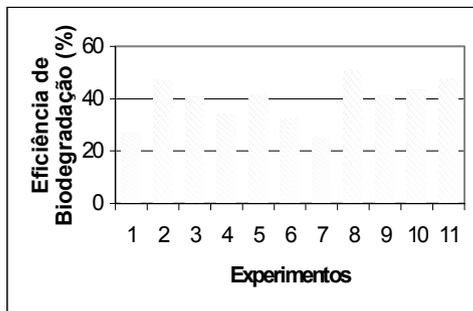
Foram realizadas repetidas extrações em ultrassom, utilizando n-hexano como solvente. As alíquotas obtidas foram primeiramente concentradas em evaporador rotatório e, posteriormente, em concentrador com purga de nitrogênio e banho à 45°C até *secura* (RIZZO & RAIMUNDO, 2002).

O resíduo (óleos e graxas totais) foi pesado e, por gravimetria determinou-se a porcentagem de óleos e graxas totais de cada amostra.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Planejamento experimental em solo contaminado com óleo cru**

Os resultados do planejamento experimental em solo contaminado com óleo cru e com a adição do biossurfatante do tipo raminolipídio encontra-se na Figura1.



**Figura 1. Resultados referentes à eficiência de biodegradação por geração de CO<sub>2</sub>**

Verifica-se que os resultados, tendo como variável a resposta a geração de CO<sub>2</sub>, revelaram uma eficiência máxima de 51,1% (condição 8), sendo que a menor eficiência de biodegradação foi de 25,41% (condição 7).

A Figura 2 mostra uma tendência da influência de cada um dos fatores estudados. As curvas do pH e do surfatante mostram que há uma tendência a ser trabalhar com os níveis mais altos desses fatores (pH = 7,0 e 5g de biossurfatante), já com respeito a umidade e a relação nutricional, a curva praticamente linear indica que estes fatores podem ser utilizados tanto em seus níveis mais altos quanto nos mais baixos.

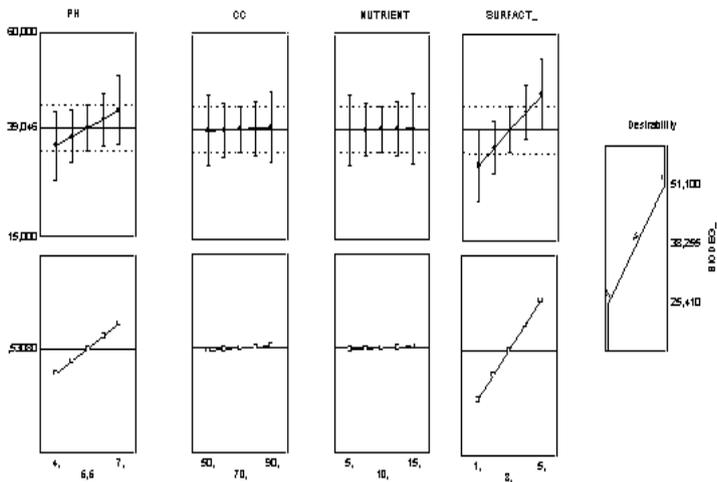


Figura 2. Curvas de tendência dos fatores estudados

#### 4.2. Teste de Biodegradação no protótipo do Biorreator

Na Figura 3 pode ser observado o controle de umidade, realizado semanalmente, durante o teste em biorreator.

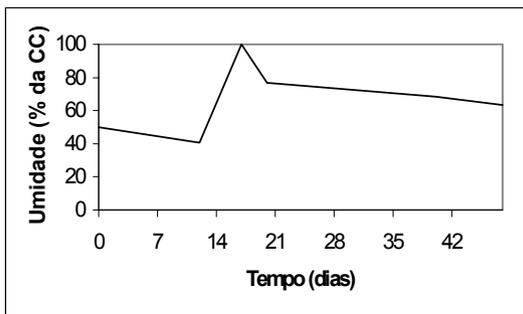


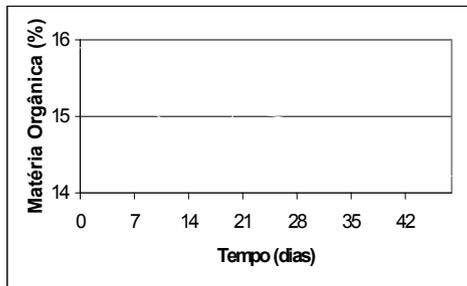
Figura 3 Controle do teor de umidade do solo durante o teste em biorreator.

O salto observado no décimo sétimo dia corresponde a adição de água de forma a se atingir 100% da CC. Esta correção foi realizada com o intuito de minimizar os problemas decorrentes da aglomeração excessiva do solo com 50% da CC. Testes anteriores realizados com este mesmo teor de umidade (50% da CC) no reator não apresentaram esta aglomeração excessiva. Uma justificativa para a aglomeração verificada no teste em questão é a presença do biossurfatante (biopolímero) em concentração elevada (10% p/p), o que pode ter conferido uma maior “plasticidade” ao solo e, conseqüentemente, o aumento da aglomeração deste, conforme a Figura 4.



**Figura 4. Aglomerações presentes no teste em biorreator com umidade equivalente a 50% da CC do solo.**

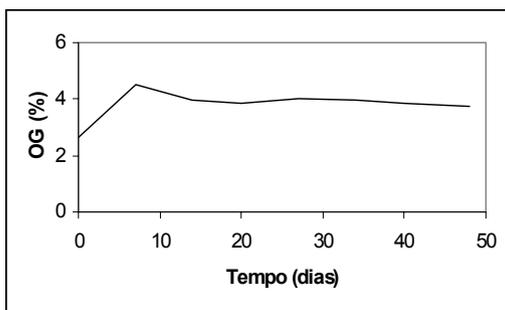
O gráfico com o acompanhamento do teor de Matéria Orgânica no solo se encontra na Figura 5.



**Figura 5. Acompanhamento do teor de matéria orgânica (por ignição) do solo**

A partir dos valores obtidos pelo método de análise de matéria orgânica por ignição foi possível calcular a eficiência de remoção de matéria orgânica ao final do teste em biorreator, cujo o resultado foi de 10,55%.

Na Figura 6 são apresentados os resultados do acompanhamento do teor de óleos e graxas presentes no solo utilizado no teste em biorreator em função do tempo.



**Figura 6. Controle de óleos e graxas totais do teste em biorreator.**

A partir dos valores obtidos pelo método de análise de óleos e graxas por gravimetria, pode-se concluir que o teste em questão apresentou eficiência de remoção de 20,43%.

Destaca-se que o aumento tanto do teor de matéria orgânica, quanto de óleos e graxas totais verificados nas Figuras 5 e 6 correspondem a data onde ocorre o ajuste de umidade para 100% da CC.

Comparando os resultados deste teste com o obtido anteriormente, em biorreator, sem adição de biossurfatante, onde se obteve eficiência de remoção de óleos e graxas da ordem de 43,8% (RAIMUNDO, 2002), pode-se dizer que o teste com adição de surfatante não obteve resultado favorável. Isto ocorreu, provavelmente, porque havia excesso de surfatante ao solo, prejudicando assim a degradação do óleo.

Destaca-se que o biossurfatante é também uma fonte de carbono para os microrganismos responsáveis pela degradação. Além de ser de fácil assimilação, o biossurfatante não encontrava-se fortemente aderido à matriz

do solo, como ocorria com o solo contaminado. Sendo assim, pode ter ocorrido o consumo preferencial do biossurfatante.

## **5. CONCLUSÕES**

### **5.1. Planejamento experimental em solo contaminado com óleo cru**

Seguindo a interpretação dos resultados através do planejamento experimental, o ensaio no protótipo do biorreator, pôde ser conduzido com a menor umidade (50% de CC), maior valor de pH (7,0), menor relação nutricional (100:5:1) e maior concentração de surfatante (10g / 100g de solo seco).

### **5.2. Teste de Biodegradação no protótipo do Biorreator**

O aumento do percentual de matéria orgânica e de óleos e graxas após o ajuste da umidade para 100% da CC se deu, pois com esse teor de umidade a homogeneização e a amostragem do solo se fez mais eficiente no biorreator, uma vez que com 50% da CC, ocorreram aglomerações em diversos pontos do reator e a formação de pellets.

O teste apresentou, num período de 48 dias, eficiência de remoção de matéria orgânica e de óleos e graxas correspondente à 10,55% e 20,43%, respectivamente. Tais eficiências apesar de serem ainda incipientes, estas podem ser explicadas pelo fato de que o solo contaminado empregado no teste passou por um processo intenso de intemperização causando assim uma redução da biodisponibilidade do contaminante.

Deverão ser realizados novos testes em biorreator empregando menores concentrações de biossurfatante de forma a reduzir a interferência relativa no consumo preferencial deste.

## **BIBLIOGRAFIA**

ARONSTEIN, B.N. and ALEXANDER, M. Surfactants at low concentrations stimulate biodegradation of sorbed hydrocarbons in samples of aquifer sand and soil lurrries, *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 11. pp. 1227-1233. 1992.

- ATLAS, R.M (1993). *World S.Microbiol. Biotechnol.* 493-494.
- BRATBERG, D., HOPKINS, L. Risk Based Corrective Action and Risk Assessment Procedures in the United States: a 1995 Survey. In: *Proceedings of the 1995 Petroleum Hydrocarbon and Organic Chemicals in Ground Water: Prevention, Detection, and Restoration Conference*, Houston, Texas. Nov. p. 25-31.
- FIECHTER, A. (1992) *Trends in Food Scienc & Tecnology.* 3, 286-293
- JAHAN, K., AHMED, T. and MAIER, W.J. Modeling the influence of nonionic surfactants on biodegradation of phenanthrene, *Wat. Res.* Vol 33. pp. 2181-2193. 1999.
- MACEDO, R. C. & BERBERT, V. H. C. (2002). Utilização de fungos filamentosos para biorremediação de solos contaminados por óleo cru. Relatório de Atividades Apresentado na X Jornada de Iniciação Científica – CETEM/MCT.
- PROVIDENTI, M.A., LEE, H., TREVORS, J.T., (1993). "Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds", *Journal of Industrial Microbiology*, vol. 12, p. 379-395
- PRUTHI, V., CAMEOTRA, S. S. (1997) *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 13, 133-135.
- RAIMUNDO, R. S. (2002). Utilização de biorreatores no tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo Relatório de Atividades Apresentado na X Jornada de Iniciação Científica – CETEM/MCT.
- RIZZO, A. C. L & RAIMUNDO, R. S. (2002). Referência IT cadastrada na biblioteca do CETEM/MCT – IT 2003-001-00.
- SANTOS, L. C. (2003). Avaliação da potencialidade do uso de biossurfactante na biorremediação de solo contaminado por óleo cru. Relatório de Atividades Apresentado na XI Jornada de Iniciação Científica – CETEM/MCT.
- SORIANO, A.U., (2000). Tratamento de solos argilosos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo". Relatório de Atividades Apresentado ao ANPq, para Renovação de Bolsa Modalidade RD, Processão° 300479/99-9, Área – Engenharia Química (cadastro na biblioteca do CETEM/MCT como relatório Técnico – RT43/2000).
- 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.