

# **Influência do níquel na biodegradação do petróleo**

**Camila Ferreira Chaves Mattos**

Bolsista de Iniciação Científica, Engenharia de Bioprocessos, EQ/UFRJ

**Cláudia Duarte da Cunha**

Orientadora, Eng. Química, D. SC

**Natália Franco**

Co-orientadora, Microbiologista, Mestranda, EQ/UFRJ

## **Resumo**

A indústria do petróleo é responsável por grandes despejos de poluentes orgânicos e inorgânicos no ambiente. Por este motivo várias técnicas de remediação vem sendo desenvolvidas, destacando-se a biorremediação por ser uma estratégia de baixo custo e menos poluente. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do níquel na biodegradação do óleo cru em microcosmos contendo solo e em biorreator de bancada num período de 67 e 29 dias, respectivamente. Foi realizado um planejamento fatorial completo utilizando 3 parâmetros (óleo, níquel e umidade) em dois níveis. O parâmetro resposta definido foi a remoção de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP). Para o monitoramento microbiológico do solo foi realizada a contagem de bactérias heterotróficas totais e de bactérias degradadoras de óleo cru. Com os resultados obtidos, foi possível verificar que a presença do metal promoveu um atraso na remoção do óleo cru nos primeiros 7 dias e que a umidade foi o fator de maior influência positiva na biodegradação em microcosmos. Com relação ao aumento de escala, os resultados obtidos no biorreator de bancada confirmaram os valores de remoção previstos pelos ensaios em microcosmos.

## **1. Introdução**

A contaminação por petróleo no meio ambiente é uma importante fonte de poluentes orgânicos e também inorgânicos. Entre os compostos inorgânicos, destacam-se os metais, como por exemplo o níquel e o vanádio. Resíduos gerados pela indústria do petróleo não só oferecem grandes riscos ao meio ambiente, como à saúde pública. Estudos relatam o aumento de incidência de câncer nos ossos, cérebro e pulmões, além de leucemias induzidas pelos resíduos gerados (Nadal, Schuhmacher & Domingo, 2007).

Dados fornecidos pela USEPA mostrou um aumento da contaminação por metais associados a compostos orgânicos de quase 300% de 1994 à 2003. A presença de compostos orgânicos influenciam a mobilidade do metal no solo, prejudicando o tratamento para remoção destes poluentes do ambiente. Compostos orgânicos com maior viscosidade afetam as técnicas de lavagem do solo, portanto deve-se remover prioritariamente os poluentes orgânicos para posterior remoção dos poluentes inorgânicos (Dermont, Mercier & Richer-Lafleche 2008).

Os efeitos tóxicos e inibitórios dos metais pesados sobre o crescimento microbiano requer atenção, uma vez que os íons metálicos dependendo de sua natureza, concentração e disponibilidade irão interferir em atividades essenciais aos 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 vias físico-químicas quanto por biológicas. A biorremediação é uma estratégia freqüentemente adotada por permitir o tratamento do contaminante a baixo custo (Dobler, Saner & Bachofen, 2000). Esta pode ser definida como um processo baseado no emprego de organismos 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, importantes para os microrganismos presentes no solo (Moreira & Siqueira, 2002).

Uma das tecnologias de tratamentos *ex situ* utilizadas é o emprego de biorreatores de fase sólida, que possibilita uma melhor homogeneização do solo durante o tratamento assim como um maior controle das condições de tratamento de forma mais efetiva. Dentre os diferentes tipos de biorreatores, os horizontais de fase sólida podem ser com tambores rotativos ou fixos, sendo empregados em resíduos sólidos com teor de umidade suficiente apenas para a manutenção da atividade microbiana (Rizzo, 2008).

## 2. Objetivos

Avaliar a influência do níquel na biodegradação do óleo cru em microcosmos constituídos de solo e após o aumento para escala piloto em biorreator.

## 3. Materiais e Métodos

### 3.1. Amostragem

O solo e o óleo utilizados nos experimentos são proveniente da região nordeste do país, próxima a uma região de exploração de petróleo. O solo foi homogeneizado, quarteado e submetido a classificação numa peneira de 10 mesh (1,68 mm) . Suas características físico-químicas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Tabela contendo as características físico-químicas e de fertilidade do solo usado nos experimentos.

Propriedades físico-químicas														
pH		Areia (%)				Silte (%)				Argila (%)		CRA (%)		
6,0		75%				14%				11%		42		
Fertilidade														
Na	Ca	Mg	K	H+Al	Al	S	T	V	m	n	C.org	P	K	N
			-----Cmol/dm <sup>3</sup> -----											
0,066	24	7,7	0,02	9,2	0	31,79	40,99	78	0	0	6	10	8	1,4
											--mg/L--		--%--	

As concentrações de óleo cru adotadas nesse experimento foram de 0,5% (p/p), por ser o valor de intervenção de acordo com a lista holandesa (CETESB, 2005) e de 5,0%(p/p), por ser uma concentração considerada alta.

O metal adotado para simular uma multicontaminação foi o níquel, adicionado na forma de NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, por ele estar presente no petróleo assim como nos catalisadores de refino do mesmo. As concentrações de níquel adotadas foram de 130mg/kg por ser o valor de intervenção em área industrial de acordo com a resolução nº 420 (CONAMA, 2009) e a de 260mg/kg por ser o dobro da permitida.

O teor de umidade avaliado foi de 45 e 70% da CRA (Capacidade de Retenção de Água) do solo usado. Tais níveis são de importante avaliação por estarem diretamente relacionados com aumento da atividade microbiana assim como o bom funcionamento do biorreator.

### 3.2. Ensaio em microcosmos

Para a montagem dos microcosmos foram utilizados erlenmeyers de 250 mL contendo 50g de solo. Foi utilizada uma análise fatorial completa levando em consideração três fatores (umidade, concentração do metal e concentração de óleo) em dois níveis, gerando 8 tratamentos em duplicata com triplicata de ponto central (Tabela 1). O experimento ocorreu durante 67 dias tendo 4 pontos de coletas (7, 15, 36 e 67 dias). De 3 em 3 dias foram realizadas aerações forçadas com injeções de ar comprimido (aproximadamente 20L/min) durante 2min, seguido de um reajuste da umidade e uma homogeneização através de agitação com um bastão de vidro.

Tabela 2. Relação dos tratamentos experimentais baseados na análise fatorial completa.

	Óleo (%p/p)	Níquel (mg/kg)	Umidade (%CRA)	Simbologia
1	0,5	130	45	o-n-a
2	5	130	45	O-n-a
3	0,5	260	45	o-N-a
4	5	260	45	O-N-a
5	0,5	130	70	o-n-A
6	5	130	70	O-n-A
7	0,5	260	70	o-N-A
8	5	260	70	O-N-A
9	2,75	190	57,5	Ponto Central

Com o propósito de atribuir a degradação do óleo à atividade microbiana, foi montado um sistema de controle abiótico da mesma forma que o explicado anteriormente, sendo que para este sistema, o solo foi autoclavado 5 vezes e houve adição periódica de uma solução biocida (azida de sódio 1%), durante o ajuste de umidade, para garantir a inatividade biológica.

### 3.3. Biorreator

Foi realizado um experimento com a condição que continha as maiores concentrações de óleo e metal e o melhor valor de umidade obtido (5,0%p/p de óleo, 260 mg/kg de Ni e 70%CRA) em um biorreator tipo U, contendo 8Kg de solo (Figura 1). O revolvimento mecânico do solo foi realizado duas vezes ao dia por 15 min cada, sendo que uma vez ao dia era feita uma aeração por injeção de ar comprimido (aprox 20L/min) durante 1h. O experimento durou 29 dias tendo 4 pontos de coleta ( 8, 15, 22, 29 dias).

### 3.4. Análises Microbiológicas

#### 3.4.1. Bactérias Heterotróficas Totais

A quantificação de organismos heterotróficos totais foi realizada através da técnica de plaqueamento *spread plate*, utilizando meio Luria-Bertani (LB). As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 30°C, tendo por fim a contagem de unidades formadoras de colônias (resultados expressos em UFC/g solo).

### 3.4.2. Bactérias Degradadoras de Óleo Cru.

A quantificação de organismos degradadores de óleo cru foi realizada de acordo com a técnica no número mais provável (NMP) descrita por Wrenn & Venosa (1996) e Petrovic et al.(2008) utilizando meio Bushnell-Hass (Difco®). As placas contendo 24 cavidades foram incubadas por uma semana na estufa a 30°C, tendo por fim a análise da alteração do filme de óleo em comparação ao controle, que não continha inoculo, obtendo o resultado como estimativa do NMP/g solo.

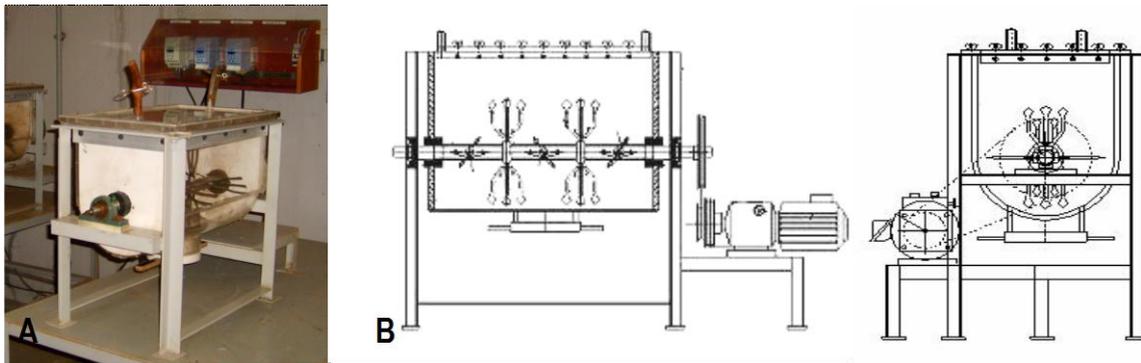


Figura 1.A. Foto do biorreator utilizado nos experimentos. B. Esquema do biorreator com visão frontal e lateral.

### 3.5. Análise da Concentração de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPH)

As análises foram realizadas utilizando o aparelho Infracal (modelo HART-T da Wilks Enterprise) que permite a quantificação dos hidrocarbonetos totais de petróleo por espectrofotometria de infravermelho, baseando-se na absorbância das ligações C-H dos hidrocarbonetos.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Microcosmos

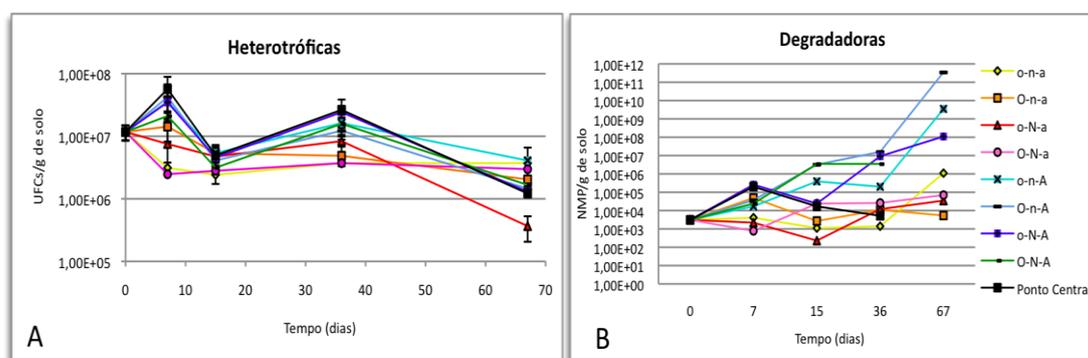
Os resultados obtidos na análise da contagem de bactérias heterotróficas totais estão apresentados na Figura 2. Em 7 dias foi possível visualizar melhor uma diferença nas contagens, com valores maiores nos tratamentos com alto teor de umidade. Em 36 dias, essa diferença se manteve, porém mais discreta, sendo que em 67 dias não foi possível mais observar separação entre os tratamentos pelo teor de umidade, exceto o tratamento 3, que continha baixo teor de umidade e alta concentração de níquel (o-N-a).

Na contagem de bactérias degradadoras de óleo cru foi perceptível a influência positiva da umidade, havendo uma nítida separação dos grupos de tratamentos com alta e baixa umidade a partir de 7 dias, sendo mais clara a cada ponto de monitoramento até atingir o tempo de 67 dias. Os valores obtidos nos tratamentos com alta umidade foram significativamente maiores ( $10^8$  a  $10^{11}$  NMP/g) que os valores obtidos nos tratamentos com umidade reduzida ( $10^3$  a  $10^6$  NMP/g solo).

No trabalho realizado por Telhado (2009), utilizando células de tratamento com o mesmo solo em estudo, no entanto contaminado somente com óleo cru, foi possível visualizar a relação da quantificação de bactérias degradadoras de óleo com as concentrações de óleo usadas nos experimentos, fato que não ocorreu neste estudo, onde o fator que determinou a separação dos tratamentos foi o teor de umidade.

Como os resultados do sistema abiótico não mostraram qualquer remoção de óleo, pode-se considerar que os resultados obtidos pelos experimentos são por biodegradação, ou seja por atividade microbiana.

Os resultados percentuais de remoção de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) para todos os sistemas testados estão apresentados na Tabela 2. Foi possível observar que a presença de níquel nos 7 primeiros dias, independente do teor de umidade, desfavoreceu a remoção do óleo, enquanto que no tempo de 36 dias as maiores taxas de remoção estão relacionadas ao maior teor de umidade. Isto comprova o atraso promovido pela presença do metal na remoção do óleo.



o- concentração óleo 0,5%(p/p); O- concentração óleo 5% (p/p); n- concentração de níquel 130mg/Kg; N- concentração de níquel 260mg/kg; a- teor de umidade 45%CRA; A- teor de umidade 70%CRA. A legenda situada no gráfico B é a mesma para o gráfico A.

Figura 2. Gráficos das análises microbiológicas. A. Contagens de bactérias heterotróficas totais , B. Contagem de degradadoras de óleo cru.

Tabela 3. Valores de remoção do óleo cru nos sistemas gerados a partir da análise fatorial.

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 (%)
o - n - a	5,87 ±0,00	0,00	4,82 ±0,07	4,76	3,70 ±0,30	26,88	2,83 ±0,40	44,04
O - n - a	55,91 ±3,03	0,00	52,34 ±1,21	0,00	51,06 ±4,65	0,00	44,20 ±3,84	12,70
o- N - a	5,58 ±0,40	0,00	5,63 ±0,40	0,00	4,46 ±0,17	11,82	2,26 ±0,09	55,33
O - N - a	56,20 ±3,03	0,00	46,20 ±3,43	8,75	45,20 ±4,44	10,72	41,34 ±2,63	18,34
o - n - A	4,10 ±0,20	18,88	3,53 ±0,20	30,17	3,44 ±0,40	32,05	2,80 ±0,00	44,66
O - n - A	40,77 ±4,24	19,47	36,63 ±2,42	27,65	36,06 ±0,00	28,78	33,06 ±0,20	34,71
o - N - A	5,06 ±0,07	0,00	4,06 ±0,44	25,94	3,87 ±0,13	21,70	3,02 ±0,34	35,57
O - N - A	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		

o- concentração óleo 0,5%(p/p); O- concentração óleo 5% (p/p); n- concentração de níquel 130mg/Kg; N- concentração de níquel 260mg/kg; a- teor de umidade 45%CRA; A- teor de umidade 70%CRA. A legenda situada no gráfico B é a mesma para o gráfico A.

A análise fatorial completa realizada através do softwear Design Expert 6.0 (Stat Easy®) gerou modelos significativos ( $p < 0,05$ ) para todos os tempos de coleta, sendo que a influência da umidade foi positiva para a remoção do óleo até 36 dias, já a influência do níquel foi negativa nos primeiros 7 dias, confirmando o atraso na degradação observada na tabela de remoção nesse período, nos tratamentos com maior concentração do metal. Foi selecionado, portanto, o valor máximo de umidade (70% da CRA) para os experimentos no biorreator,, lembrando que o teor ótimo de umidade é importante para a biodegradação e para o melhor desempenho nos biorreatores de fase sólida.

#### 4.2. Biorreator

Para a avaliação da ampliação de escala do processo de biodegradação do óleo cru na presença de níquel, foi selecionada a condição com os níveis altos estudados (5% óleo, 260mg/kg do metal) e o melhor teor de umidade obtido na etapa anterior (70% da CRA) .

Na figura 1 podemos observar o gráfico de percentual de remoção de óleo entre as duas diferentes escalas testadas , sendo importante ressaltar que os microcosmos foram mantidos com um controle maior da temperatura em torno de 25°C e o biorreator foi mantido em temperatura ambiente em torno de 40°C ( período do verão).

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. As diferentes temperaturas utilizadas também podem ter uma relação direta com as diferenças de remoção obtidas entre o ensaio em microcosmo e no biorreator. 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.

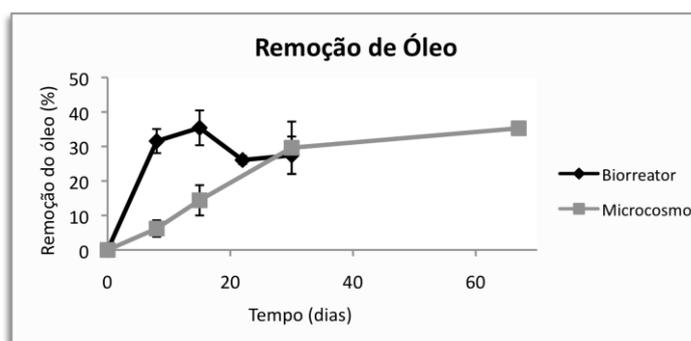


Figura 3. Gráfico com as porcentagens de degradação obtidas.

#### 5. 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.

## 6. Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa, ao CETEM/MCT pela infra-estrutura e a Petrobrás pelo financiamento do projeto e pelo fornecimento do solo e do óleo.

## 7. Referências Bibliográficas

- AMOR, L.;KENNES, C.; VEIGA, M.C. Kinetics of inhibition in the biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in presence of heavy metals. **Bioresource Technology**, v. 78, p.181-185, 2001.
- CETESB. **Manual de gerenciamento de águas contaminadas**, seção 6530..Disponível em:  
<[http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas\\_contaminadas/anexos/download/6530.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/anexos/download/6530.pdf) > Acesso em 29 de jun.2010.
- CONAMA-Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução Nº 420**, de 28 de dezembro de 2009.
- DERMONT, G.; BERGERON, M.; MERCIER, G.; RICHER-LAFLÈCHE, M. Metal-contaminated soils: remediation practices and treatment technologies. **Practice periodical of hazardous, toxic, and radioactive waste management**, v.12, p.188-209, 2008
- DOBLER, R.; SANER, M.; BACHOFEN, R. Population changes of soil microbial communities induced by hydrocarbon and heavy metal contamination. **Bioremediation Journal**, v.4, p.41-56, 2000.
- MOREIRA, F. M.S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. 1ªed. Lavras, MG, Brasil: Editora UFLA, 2002, 626p.
- NADAL, M.; SCHUHMACHER, M.; DOMINGO, J.L. Levels of metal, PCBs, PCNs and PAHs in soil of a highly industrialized chemical/petrochemical area: Temporal trend. **Chemosphere**, v.66, p.267-276, 2007.
- PETROVIĆ, O.; KNEŽEVIĆ, P.; MARKOVIĆ, J.; RONČEVIĆ. **Screening method for detection of hydrocarbon-oxidizing bacteria in oil-contaminated water and soil specimens**. Journal of Microbiological Methods, v.74, p. 110-113, 2008.
- RIZZO, A.C.L. **Desenvolvimento de biorreator não convencional para o tratamento de solos contaminados por petróleo**. 2008. 188p. Tese (Doutorado) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Brasil).
- TELHADO, M.C.S.C.L. **Avaliação da biodisponibilidade de contaminante orgânico em solo**. 2009. 124p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (Brasil).
- WRENN, B.A.; VENOSA, A.D. **Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most probable number procedure**. Canadian Journal of Microbiology v.42, p.252-258.