

# **Monitoramento do processo de atenuação natural de um solo contaminado com diesel comercial**

**Ricardo Terra de Melo Marques**

Bolsista de Iniciação Científica, Engenharia de Bioprocessos, UFRJ

**Andréa C. de Lima Rizzo**

Orientadora, Eng. Química, D.Sc.

**Claudia Affonso Barros**

Co-orientadora, Química, Mestranda EQ/UFRJ.

## **Resumo**

Esse estudo teve como objetivo realizar o monitoramento microbiológico do processo de atenuação natural de um solo argiloso, contaminado com diesel comercial de composição granulométrica característica do Estado do Rio de Janeiro, sem histórico de contaminação prévia.

Os ensaios foram conduzidos em biorreatores de PVC, construídos de modo a simular uma área em campo, de 18 dm<sup>3</sup> de capacidade. Após a contaminação do solo com 10% (p/p) de óleo diesel comercial metropolitano B4, teve início a determinação da concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP, %) e a quantificação das populações de bactérias heterotróficas totais (UFC/g de solo) e de bactérias hidrocarbonoclasticas (NMP/g de solo) a cada 20 dias por um período total de 60 dias.

Os resultados obtidos indicaram que a presença do contaminante estimulou a atividade da população de bactérias hidrocarbonoclasticas endógenas, resultando em aumento considerável da sua concentração celular no solo cuja ordem inicial foi de 10<sup>1</sup> NMP/g solo para 10<sup>5</sup> NMP/g solo, nos primeiros 20 dias. No restante do período monitorado, as concentrações das duas populações microbianas se mantiveram elevadas dentro da ordem de 10<sup>5</sup> NMP/g solo, demonstrando que as concentrações de contaminante estavam adequadas para sua sobrevivência. A atividade microbiana resultou na degradação do diesel, já que em comparação com o ensaio abiótico, houve uma redução da concentração do poluente de cerca de 20% após os 60 dias de ensaio.

## **1. Introdução**

A partir do início do século XXI, muitos esforços têm sido realizados para a preservação e melhoria do meio ambiente. Em vista disso, cientistas do mundo inteiro vêm intensificando seus estudos para encontrar soluções técnicas e economicamente viáveis para o tratamento de áreas atingidas por contaminantes. Nesse âmbito, a biorremediação surge como uma importante ferramenta que tem como fundamento o emprego de microrganismos para degradar os contaminantes do solo, muitas vezes presentes no próprio solo, ditos microrganismos endógenos. (SARKAR, 2005).

Biorremediação pode ser definida como o uso de microorganismos vivos para remoção de poluentes do solo, água e gases. (Pandey *et al.*, 2000). Dentre as diversas técnicas de biorremediação de áreas contaminadas, o processo de Atenuação Natural representa um conjunto de processos físicos, químicos e biológicos, que reduzem a concentração de contaminantes no solo sem a intervenção humana. O processo de biodegradação ocorre devido à adaptação natural da microbiota nativa do solo à presença do contaminante que, em associação a processos químicos e físicos (oxidação, lixiviação, volatilização) que também ocorrem no solo, levam a redução da concentração do poluente (SANTOS *et al.*, 2008).

A fim de alcançar a eficiência pretendida pela técnica de biorremediação é necessário que a população microbiana esteja adaptada ao contaminante de modo a reduzir o tempo de tratamento. Por isso, a inoculação de bactérias com capacidade em degradar hidrocarbonetos, denominadas hidrocarbonoclásticas, têm sido empregada em alguns casos. Porém, quando no solo esses microorganismos já estão presentes essa técnica de inoculação é dispensável.

## **2. Objetivo**

Monitorar o comportamento da população microbiana ao longo do processo de atenuação natural de um solo argiloso contaminado artificialmente, com óleo diesel comercial metroplitano (com 4% de biodiesel, B4).

O monitoramento englobou a contagem de bactérias degradadoras de diesel (NMP/g de solo), contagem de microrganismos de ensaio heterotróficos totais (UFC/g de solo) e concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP. % ao longo de 60 dias).

## **3. Materiais e Métodos**

### **3.1. Solo**

O solo utilizado neste trabalho foi coletado em uma área sem histórico de contaminação, no município de Belford Roxo-RJ, e caracterizado como argiloso, sendo gentilmente cedido pela Dra Alcione Chagas Ribeiro (Petrobras). O solo foi peneirado em peneira de malha 10 mesh, depois homogeneizado e quarteado, sendo armazenado em porções de 25 kg em câmara fria (4°C) até o momento do uso.

### **3.2. Óleo Diesel**

Foi utilizado óleo diesel comercial metropolitano B4, o que indica seu conteúdo em biodiesel (4%). O combustível, fornecido pela REDUC/Petrobras, foi estocado em câmara fria a 4°C até o momento do uso.

### **3.3. Procedimento Experimental**

Os ensaios foram conduzidos em reatores estáticos de PVC, com 60 cm de altura e 22 cm de diâmetro, construídos de modo a simular o perfil de uma superfície de uma área real. A avaliação microbiológica e da degradação do contaminante foi realizada ao longo de um período total de 60 dias com intervalos de 20 dias.

De modo a garantir que as amostragens fossem adequadas, foram utilizados 3 reatores de sacrifício, isto é, para cada período monitorado (20 dias (D1), 40 dias (D2) e 60 dias (D3)) foi utilizado um reator. Também foi

empregado um reator para a estimativa dos dados em ensaio abiótico (controle), determinados apenas para 60 dias. O controle abiótico foi operado do mesmo modo que os demais, exceto pela adição de azida de sódio a 4% (m/v), para inativação dos microorganismos naturais do solo.

Na Tabela 1, estão relacionadas as descrições de cada amostra utilizada no monitoramento do sistema experimental, realizadas em duplicata.

Tabela 1. Descrição das condições ensaiadas

<b>Amostras</b>	<b>Especificação</b>
<b>SV</b>	Reator com solo sem contaminação.
<b>D1</b>	Reator com solo contaminado com óleo diesel (10% p / p) operado por 20 dias.
<b>D2</b>	Reator com solo contaminado com óleo diesel (10% p / p) operado por 40 dias.
<b>D3</b>	Reator com solo contaminado com óleo diesel (10% p / p) operado por 60 dias.
<b>D4</b>	Controle abiótico com solo contaminado com óleo diesel (10% p / p) e sem atividade microbiana operado por 60 dias.

### 3.4. Quantificação Microbiana

#### 3.4.1. Bactérias Heterotróficas Totais

Para a quantificação de bactérias heterotróficas totais, inicialmente foi obtida uma suspensão celular através da homogeneização de 5 g de solo em 50 mL de solução salina (NaCl 0,85%) em shaker a 150 rpm por 1 hora à 30°C. Em seguida, uma amostra da suspensão celular obtida foi diluída através de diluições decimais sucessivas até 1:10<sup>10</sup>, de onde foram tomadas alíquotas de 0,1 mL que foram plaqueadas em meio orgânico pela técnica *spread plate*. Após 48 horas de incubação em estufa a 30°C foi feita a contagem do número de unidades formadoras de colônias com resultados expressos em UFC/g solo.

#### 3.4.2. Bactérias Degradadoras de Óleo Cru

A quantificação da população de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos (bactérias hidrocarbonoclasticas) foi realizada aplicando-se a técnica do Número Mais Provável (TRINDADE, 2002). As etapas de homogeneização e diluição foram idênticas às descritas no item anterior. Alíquotas de 0,1 mL das diluições foram adicionadas nos poços das placas de polietileno, utilizadas para estimativa do NMP, contendo 1,8 mL de meio mineral cada. Em seguida, foram adicionados 10 µL de óleo cru como única fonte de carbono e energia presentes. As placas foram então incubadas por 7 dias em estufa a 30°C, quando foi realizada a estimativa do NMP, cujos resultados foram expressos em NMP/g solo.

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

Para fins de avaliação da degradação do diesel, foi realizada a análise de HTP através da medição de OGT (óleos e graxas totais) por espectrofotometria de infravermelho no equipamento Infracal, modelo HART-T da Wilks Enterprise. Para tanto, as amostras de solo foram submetidas a secagem, maceração, extração com n-hexano PA padrão HPLC em ultra-som, centrifugação e análise de sobrenadante no infracal. (RIZZO et al., 2008).

O teor de HTP expresso em % para cada amostra analisada foi determinado através de curva de calibração previamente construída com o diesel comercial (B4).

## 4. Resultados e Discussão

A Figura 1 apresenta as concentrações de bactérias heterotróficas totais (UFC/g de solo) e de hidrocarbonoclasticas (NMP/g de solo) determinadas nas amostras de solo contaminado com óleo diesel durante 60 dias de monitoramento. Como pode ser observado, analisando a figura, o número de bactérias heterotróficas totais já era bem elevado no solo virgem, cerca de  $10^5$  UFC/g de solo seco. Segundo Mishra (2001), este valor é condizente para se ter um processo de biorremediação eficiente. Após a contaminação, esta população se manteve praticamente inalterada por 60 dias, mostrando que as condições se mantiveram apropriadas para sua atividade metabólica.

No caso das bactérias hidrocarbonoclasticas, seu número era baixo no solo virgem (SV), cerca de  $10^1$  NMP/g de solo. Este resultado é compatível com dados da literatura que indicam que, para ecossistemas não poluídos, menos do que 0,1% da população microbiana total corresponde aos microrganismos degradadores de hidrocarbonetos (ATLAS, 1981). Entretanto, após 20 dias de exposição ao contaminante, pôde-se observar um expressivo aumento da concentração de bactérias hidrocarbonoclasticas. (de  $10^1$  para  $10^4$  NMP/g solo). Tal resultado indica o potencial de um solo sem histórico de contaminação poder ter uma microbiota adaptada com a capacidade de degradar um contaminante assim que a ele é exposto. Além disso, pode também ser considerada como indicativo da biodegradabilidade do contaminante visto que o mesmo contém 4% de biodiesel na sua composição.

Verifica-se. Na Figura 1, que tanto a densidade microbiana heterotrófica total quanto a hidrocarbonoclastica se mantiveram em valores adequados à degradação do contaminante ao longo dos 60 dias de ensaio. Uma pequena redução na população hidrocarbonoclastica pode ser observada após 60 dias (D3) podendo ser indicativa de uma queda na fração biodisponível de contaminante.

Não houve detecção de microrganismos no controle abiótico, o que demonstra a efetividade da azida de sódio como biocida para aplicação em solo.

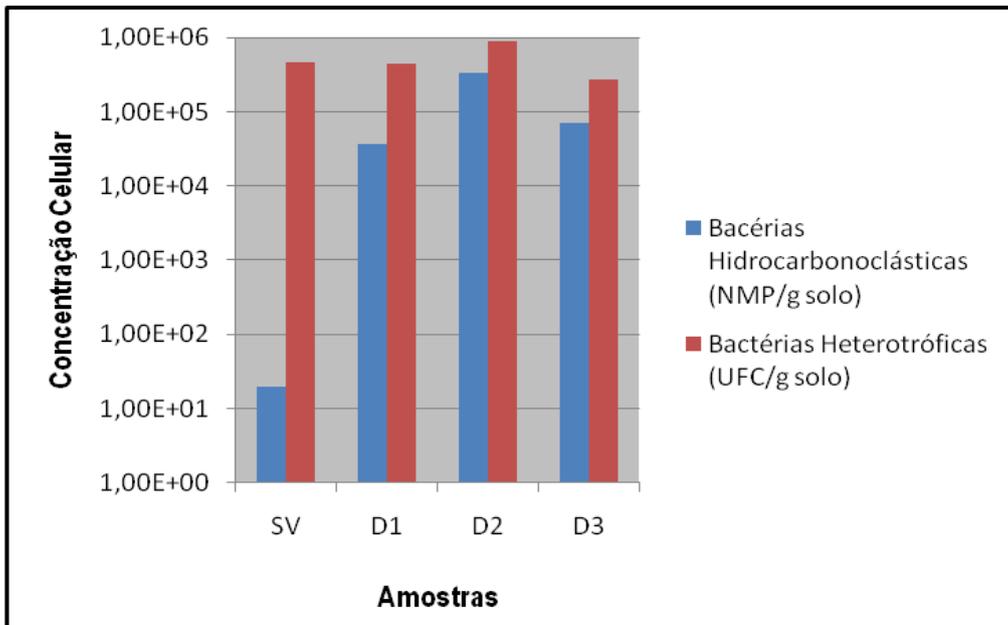


Figura 1: Variação das concentrações das populações de bactérias heterotróficas totais e de hidrocarbonoclasticas em amostras de solo contaminado com óleo diesel (10% p/p) ao longo de 60 dias [SV: solo virgem; D1: 20 dias; D2: 40 dias; D3: 60 dias].

Na Figura 2 encontram-se os dados referentes a porcentagem de degradação do diesel no solo estudado. Houve uma crescente, embora pequena, degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) com o decorrer do tempo. Comparando-se ao ensaio abiótico (D4), pode-se concluir que grande parte da redução do teor de contaminante está associado a atividade microbiana. Estes resultados são compatíveis com o crescimento microbiano observado (Figura 1).

Portanto, a degradação ocorreu durante todo o ensaio, não havendo perda de atividade por parte da população microbiana como um todo.

A queda da concentração da população microbiana após o 40º dia pode estar associada ao acúmulo de frações orgânicas de maior complexidade e, portanto, mais recalcitrantes, uma vez que a maior atividade observada na etapa inicial pode ser atribuída ao consumo das frações mais leves, ou seja, de menor complexidade (Figura 3).

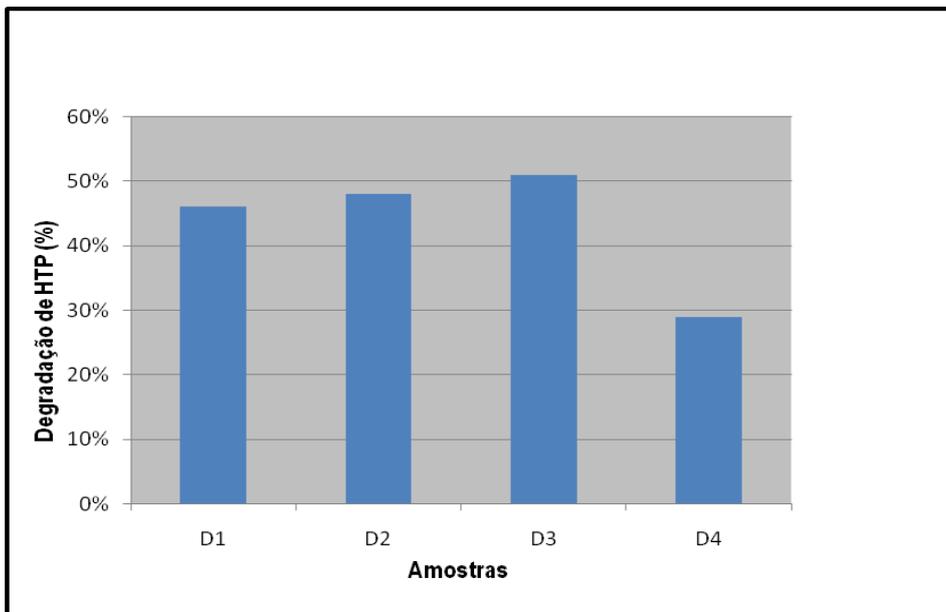


Figura 2: Degradação de HTP pela microbiota natural do solo em diferentes tempos D1: 20 dias; D2: 40 dias; D3: 60 dias; D4: 60 dias (controle abiótico).

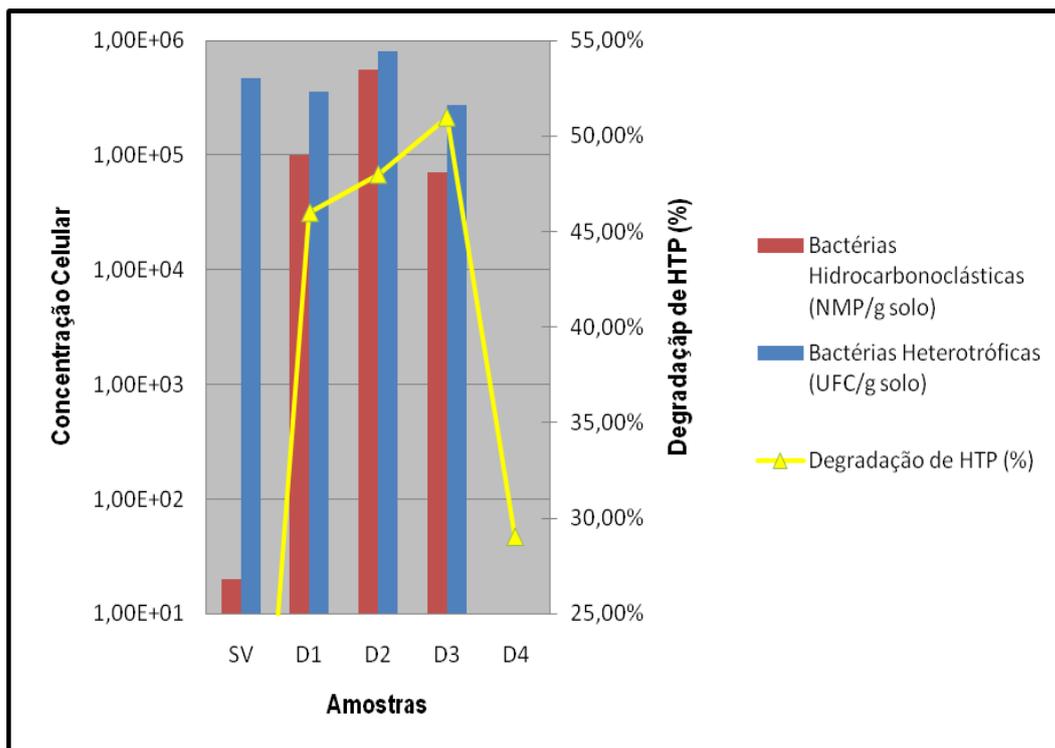


Figura 3: Análise comparativa entre a concentração celular e a degradação de HTP no solo estudado.

## 6. Conclusões

Com base nos resultados obtidos, pode-se atribuir aos microrganismos presentes no solo à degradação da maior parte do óleo diesel, sendo o aumento populacional microbiano correspondente aos organismos hidrocarbonoclásticos que se favoreceram da presença dos hidrocarbonetos, utilizando-o como principal fonte de carbono.

Além disso, pode-se observar uma relativa facilidade de adaptação da população microbiana endógena a presença do contaminante, e conseqüente biodegradação do mesmo.

## **07. Agradecimentos**

Agradeço a oportunidade de bolsa concedida pelo CNPQ por meio do Programa Industrial de Bolsa e Iniciação Científica – PIBIC, além de todo o pessoal do CETEM que colaborou na execução do trabalho.

## **8. Referências Bibliográficas**

ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbial Reviews**, 1981 v.45 (1), p. 180-209.

MISHRA, S.; JYOT, J.; KUHAD, R.C.; LAL, B. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, 1675-1681.

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.

RIZZO, A. C. L. *et al.* Guia Rápido para uso de analisador de TOG/TPH por infravermelho, Infracal em amostras de solo. **Instrução de Trabalho elaborado para o CETEM/MCT**, Centro de Tecnologia Mineral (CETEM), 2008.

SANTOS, R. L. C. *et al.* Aspectos Químicos, Físico-Químicos e Biológicos da Qualidade de Solos Impactados por Atividades da Indústria do Petróleo - **Projeto Solo Integral. 2º Relatório Técnico Parcial elaborado para o CENPES/PETROBRAS**, Centro de Tecnologia Mineral (CETEM), 2008.

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.