

Utilização da “Retro-Inoculação” como nova estratégia metodológica de Biorremediação de solos contaminados por petróleo

Bianca de Souza Manhães de Azevedo
Bolsista de Iniciação Científica, Química, UFF

Andréa Camardella de Lima Rizzo
Orientadora, Engenheira Química, M. Sc.

Resumo

Neste trabalho foram realizados testes de biodegradação em diferentes condições utilizando um solo contaminado com óleo cru. Tais testes foram realizados em 2 ciclos consecutivos com as mesmas condições de bioestímulo, temperatura, aeração, homogeneização e correção de pH para cada uma das condições estudadas. Ao final do primeiro ciclo de ensaios (42 dias) empregou-se 10% da massa de solo tratado como inóculo do 2º Ciclo. Esse procedimento foi repetido para cada uma das seis condições testadas. Este teste teve como principal objetivo avaliar a eficácia da aplicação de um solo tratado biologicamente como inóculo para o tratamento de uma nova porção de solo contaminado com hidrocarboneto de petróleo.

1. Introdução

Dentre as atividades industriais, uma das que mais ameaçam o meio ambiente é a atividade petrolífera. Em toda a sua cadeia produtiva há a possibilidade de contaminação do ar, das águas e dos solos por uma gama de compostos altamente poluentes. Freqüentes ocorrências de derramamentos em solos brasileiros vêm motivando a realização de pesquisas na área de biorremediação de solos (Soriano, 2000). Nos tempos atuais, as técnicas de biorremediação tornaram-se alternativas promissoras para o tratamento de solos contaminados por substâncias orgânicas. A biorremediação pode ser definida como um conjunto de tecnologias que se baseia em processos microbiológicos para converter poluentes ambientais em produtos não tóxicos tais como dióxido de carbono, água e sais inorgânicos simples (Bernoth et al, 2000). Algumas destas tecnologias de tratamento são aplicadas in-situ, isto é, no próprio local onde ocorreu a contaminação (impacto), onde os solos contaminados não são removidos ou as águas subterrâneas contaminadas não são bombeadas para o tratamento na superfície. Outras tecnologias requerem a remoção do material contaminado de sua origem para um local adequado, sendo tratado posteriormente. Estas tecnologias são denominadas ex-situ (Alexander (1999) *apud* Trindade (2002)). Algumas técnicas de biorremediação podem ser utilizadas em todas as tecnologias, visando à otimização do processo de degradação dos poluentes pelos microrganismos. Dentre estas se destacam: bioestímulo (que proporciona aumento da atividade microbiana nativa através da adição de nutrientes); bioaumento (aumento da população microbiana através da adição de microorganismos exógenos, ou mesmo através da adição de microorganismos nativos do próprio solo impactado crescidos em laboratório e introduzidos no solo); adição de surfatantes, que auxilia a metabolização dos compostos poluentes ou ainda a adição de enzimas comerciais, que favorecem a oxidação de moléculas de difícil degradação em

moléculas de fácil assimilação pelos microrganismos. Os hidrocarbonetos de petróleo, por serem poluentes hidrofóbicos tendem a ficar sorvidos na matriz do solo, diminuindo assim sua disponibilidade aos microorganismos e, conseqüentemente, limitando sua biodegradação. A validade da aplicação da técnica de bioaumento (com linhagens exógenas ou não) tem sido questionada devido aos diversos resultados desencorajadores que vêm sendo apresentados na literatura. Na maioria dos casos estudados adiciona-se inóculo microbiano em concentração elevada e ao final do tratamento a população microbiana tende a voltar a concentração inicial. Vários fatores podem estar relacionados a isso, dentre eles pode-se destacar a tendência ao re-estabelecimento do “equilíbrio” da população local e ao fato dos microorganismos crescidos em laboratório saírem de uma condição “ótima” (meio líquido de cultura específico, contendo macro e micronutrientes, agitação e aeração favorecidas, etc.) que não é reproduzida no ambiente final (solo). Logo, muitas vezes a introdução de inóculos microbianos pode não resultar em maximização das taxas de degradação dos poluentes, mas sim na incorporação de um custo adicional ao processo (energia, reagentes, etc). Normalmente, ao final de um processo de biorremediação, o solo contém uma população microbiana, em equilíbrio, adaptada às condições ambientais adversas e em concentração adequada. Desta forma, o reciclo de parte de um solo que foi previamente submetido a um processo de biorremediação como “fonte de inóculo microbiano” a ser aplicado na biorremediação de uma nova porção de solo contaminado surge como uma nova estratégia metodológica promissora. Por este motivo no presente trabalho optou-se pela adoção dessa nova prática, juntamente com o bioestímulo, visando aumentar a população microbiana do solo impactado aumentando assim, sua atividade e conseqüentemente a eficiência de remoção do poluente. Diversas condições foram testadas a fim de se verificar a condição ótima para a biodegradação do óleo no solo estudado.

2. Objetivo

Este trabalho tem como objetivo verificar as melhores condições (capacidade de campo, bioestímulo) para se ter uma alta taxa de remoção do poluente orgânico (óleo cru) do solo utilizando a metodologia de “Retro-Inoculação”.

3. Materiais e Métodos

3.1. *Amostras de solo empregadas* - Foram utilizadas amostras de solo virgem e solo contaminado por óleo cru, provenientes da região Nordeste do Brasil cujas características são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1- Características dos solos estudados

Parâmetro	Teor no Solo Virgem	Teor no Solo Contaminado
N	1,3 g/Kg	2,3 g/Kg
P	0,15 g/Kg	0,13 g/Kg
Silte*	14%	—
Areia*	75%	—
Argila*	11%	—
Densidade da Partícula	2,2 g/mL	1,5 g/mL
Densidade do solo	1,3 g/mL	1,2 g/mL
Porosidade	43%	16,5 %
Matéria orgânica	1,7%	5,8%
pH	6,8	6,4
Capacidade de campo	34%	28%
C orgânico	1%	3,4 %
Microrganismos heterotróficos totais	2,2 x 10 ⁷ UFC/g	1,6 X10 ⁵ UFC/g
Microrganismos degradadores de óleo cru	4,8 X10 ² cel/g	1,5 X10 ² cel/g

3.2. Preparo de Amostras para os Ensaios de Biodegradação

Pesaram-se, em kitassatos com capacidade de 250mL, 50g de solo homogeneizado, peneirado em peneira de 10 # (1,68 mm). Foram estabelecidas seis diferentes condições (Tabela 2), com relação à capacidade de campo (50 ou 75%) e bioestímulo (adição ou não de nutrientes). A relação nutricional utilizada para o bioestímulo foi de C:N:P = 100:5:1, sendo a mesma obtida através apenas da adição de quantidade adequada de KH₂PO₄, uma vez que o teor de nitrogênio no solo já era suficiente para a manutenção desta relação nutricional. Dentre as seis condições estudadas três foram de controle (solo virgem).

Os ensaios foram realizados em quadruplicata (A, B, C, D) e todos os frascos foram incubados em estufa a 30°C durante 42 dias e passaram pelas mesmas condições de aeração, homogeneização e correção de umidade. Dois frascos (A e B) foram retirados periodicamente (diariamente na primeira semana, e a cada 48h durante o restante do período do teste, exceto finais de semana) para análise cromatográfica do CO₂ gerado (monitoramento da atividade

microbiana), aeração e correção de umidade, quando necessário. Os outros dois frascos (C e D) foram utilizados como amostras de “sacrifício” para realização da contagem de microorganismos heterotróficos totais e dos microorganismos degradadores de óleo cru, sendo o primeiro frasco (C) retirado no 15º dia para contagem e o segundo (D) no 42º dia de ensaio. Ao final dos primeiros 42 dias de ensaio o conteúdo dos frascos A e B, para cada condição, foram homogeneizados e parte foi utilizada como inóculo no 2º Ciclo. O restante da amostra foi empregado para as determinações analíticas necessárias. No 2º Ciclo de experimentos foram repetidas as mesmas condições adotadas no 1º Ciclo (Tabela 2) sendo que a amostra de solo empregada para cada condição testada era composta de 45g de solo “fresco” (virgem ou contaminado) e 5g (10% p/p) do solo já tratado no ciclo anterior.

Tabela 2 – Condições utilizadas no teste

Condição	Solo	Adição de Fósforo	Correção de Umidade (%)
1	Virgem	Sim ^(a)	50
2	Contaminado	Sim ^(a)	50
3	Virgem	Sim ^(a)	75
4	Contaminado	Sim ^(a)	75
5	Virgem	Não	50
6	Contaminado	Não	50

(a) Relação nutricional utilizada C:N:P=100:5:1

3.3. Análise Cromatográfica do CO₂ gerado

Com o auxílio de uma seringa para análise cromatográfica, foram injetadas, no cromatógrafo a gás com detector de condutividade térmica (TCD), 0,5ml dos headspaces dos sistemas testados. Todas as injeções foram realizadas em duplicata, e os resultados foram avaliados em termos de evolução de CO₂ ao longo do tempo. As condições gerais empregadas durante o ensaio encontram-se listadas abaixo.

- ❖ Equipamento: Cromatógrafo HP 5890
- ❖ Vazão do gás de arraste (He): 17,5mL/min
- ❖ Vazão do gás de referência (He): 29,0mL/min
- ❖ Temperatura do forno: 105oC
- ❖ Temperatura do injetor: 160oC
- ❖ Temperatura do detector: 220oC
- ❖ Coluna de aço inox (3m/3mm) recheada com Chromosorb 102

3.4. Quantificação do Teor de Óleos e Graxas (OG)

Amostras de dois gramas de solo foram extraídas em ultrassom utilizando n-hexano como solvente, conforme descrito no método IT2003-001-00, registrado na biblioteca do CETEM. O extrato orgânico obtido foi primeiramente concentrado em rotoevaporador até cerca de 10 mL e em seguida concentrado até a secura em concentrador de amostras com purga de nitrogênio. O teor de OG foi determinado por diferença de peso (gravimetria).

3.5. Quantificação dos Microrganismos Heterotróficos Totais

A quantificação da população microbiana heterotrófica total foi feita a partir do plaqueamento em meio orgânico sólido pela técnica de pour-plate (Ururahy, 1998). Foram adicionados 5g de solo em 50mL de solução salina (NaCl 0,9%) e fez-se a agitação da suspensão em shaker por 1 hora a 25°C. Após agitação, então, foi feito o plaqueamento adicionando 0,1ml de diluições adequadas da suspensão salina nas placas. Incubou-se por 48 horas a 30°C e contou-se o número de unidades formadoras de colônias (resultados expressos em UFC/gsolo).

3.6. Quantificação dos Microrganismos degradadores de óleo cru

A contagem dos microrganismos degradadores de óleo cru é realizada empregando-se a técnica do *Número Mais Provável* (NMP) utilizando placas de polietileno com 24 cavidades (Ururahy, 1998). O procedimento de diluições sucessivas é o mesmo utilizado no item 3.6. Às cavidades da placa devem ser adicionados 1,8 mL de meio mineral, 0,1mL de inóculo e, finalmente, 0,1mL de óleo cru. As placas são então incubadas em estufa a 30° C por uma semana e em seguida procede-se à contagem no número mais provável (NMP) por grama de solo.

4. Resultados e Discussão

As Figuras 1 e 2 apresentam respectivamente, para o 1º e 2º ciclos, as curvas representativas da evolução de CO₂ para cada uma das condições testadas.

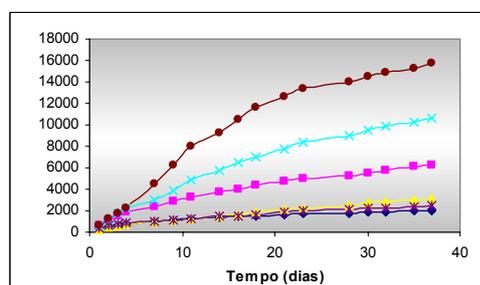
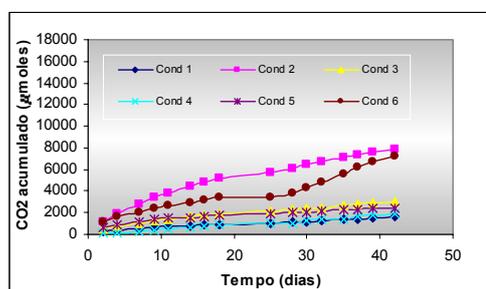


Figura1- Acompanhamento da evolução de CO₂ do 1ºCiclo

Figura 2- Acompanhamento da evolução do CO₂ do 2ºciclo

(cond 1 - solo + umidade (50%) + fósforo ; Cond 2 - solo + óleo + umidade (50%) + fósforo; Cond 3 - solo + umidade (75%) + fósforo; Cond 4 - solo + óleo + umidade (75%) + fósforo; Cond 5 - solo + umidade (50%); Cond 6 - solo + óleo + umidade (50%))

Pode-se verificar, comparando-se as Figuras 1 e 2, que a concentração de CO₂ dobrou do primeiro para o segundo ciclo para a condição 6 (foi de 7.216µmoles para 15.740µmoles), e aumentou cerca de seis vezes para condição 4 (foi de 1.866µmoles para 10.620µmoles) o que caracteriza o aumento da atividade microbiana e, possivelmente, um aumento do percentual de remoção do poluente.

As Figuras 3 e 4 apresentam os resultados das contagens de microorganismos heterotróficos totais e de microorganismos degradadores de óleo cru para os dois ciclos.

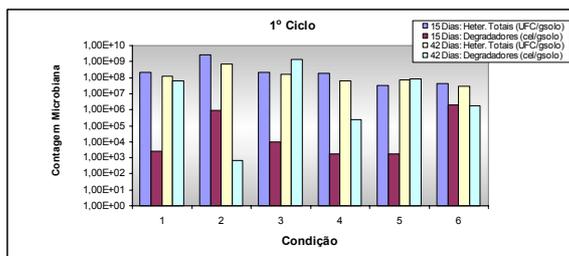


Figura 3 – Contagem de Microorganismos do 1ºCiclo

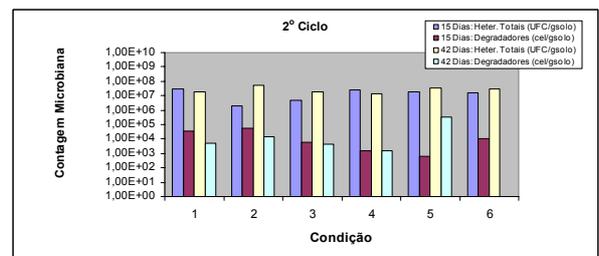


Figura 4 – Contagem de microorganismos do 2ºCiclo

Pode-se verificar através das Figuras 3 e 4 que a concentração de microorganismos heterotróficos totais e microorganismos degradadores de óleo cru se mantiveram praticamente estáveis, nas análises do solo contaminado, para todas as condições testadas nos dois ciclos analisados, permanecendo a concentração de microorganismos heterotróficos totais em torno de $3,4 \times 10^7$ UFC/gsolo e a concentração de microorganismos degradadores de óleo cru por volta de $4,0 \times 10^5$ cel/gsolo. Para as análises feitas no solo virgem a concentração de microorganismos heterotróficos totais se manteve em torno de $3,0 \times 10^7$ UFC/gsolo em ambos os ciclos e a concentração de microorganismos degradadores de óleo cru se manteve em torno de $5,0 \times 10^5$ cel/gsolo no 1º Ciclo e $2,5 \times 10^7$ cel/gsolo no 2º Ciclo.

A remoção efetiva do poluente (óleo cru) foi verificada através da análise do teor de óleos e graxas (OG), cujos resultados são apresentados nas Figuras 4 e 5.

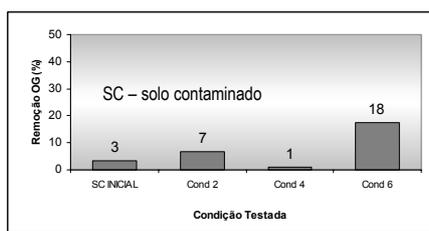


Figura 4 – Remoção de óleos e graxas – 1º ciclo

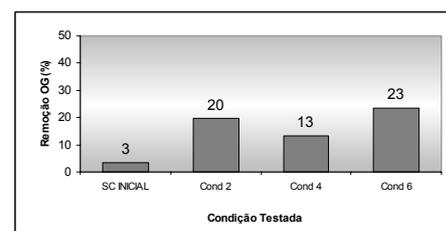


Figura 5 – Remoção de óleos e graxas – 2º ciclo

Analisando-se as Figuras 4 e 5 verifica-se um aumento na eficiência de remoção do poluente, comparando-se o 1º com o 2º Ciclo, de até 15 vezes para a Condição 4 (solo + óleo + umidade(75%) + fósforo), de cerca de 3 vezes para Condição 2 (solo + óleo + umidade (50%) + fósforo) e de cerca de 1,3 vezes para Condição 6 (solo + óleo + umidade (50%)). Comparando a análise feita em termos de remoção de óleos e graxas e evolução de CO₂ verifica-se que há uma discrepância nos resultados das condições 2 e 4, pois analisando os resultados de evolução de CO₂ observa-se que a atividade microbiana (comparando 1º e 2ºCiclos) foi menor na condição 2 supondo então, que o percentual de remoção de óleos e graxas também seria menor, no entanto não foi esse o resultado observado. Este fato pode ser

explicado, pois ao final dos testes do 2º Ciclo foi verificado um vazamento no Kitassato referente à condição 2 o que pode ter acarretado as diferenças encontradas no resultados.

5. Conclusão

Os resultados obtidos tanto em termos de evolução de CO₂ quanto em termos de remoção de óleos e graxas indicam que a estratégia de reciclar parte do solo tratado no 1º ciclo de biodegradação com o objetivo de servir como “fonte de inóculo microbiano” a ser aplicado no 2º ciclo de biodegradação se mostrou adequada. Desta forma, pode-se indicar a técnica de “Retro-inoculação” como uma nova estratégia metodológica a ser aplicada em processos de biorremediação de solos impactados com petróleo.

6. Agradecimentos

A Andréa Rizzo que me orientou, aos estagiários de nível médio Pedro Felix e Paula Baptista e aos órgãos de fomento do projeto – Petrobrás, CETEM e CNPq.

7. Referências Bibliográficas

ALEXANDER, M., biodegradation and bioremediation. *Waste Management and Research*, **17**, 390-391, 1999.

BERNETH, L.; FIRTH, I.; MCALLISTER, P.; RHODES, S. “Biotechnologies for remediation and pollution control in the mining industry”. *Minerals & Metallurgical Processing*, **17 (2)**, 105-111, 2000.

SORIANO, A.U. “Tratamento de solos argilosos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo”. Relatório de Atividades Apresentado ao CNPq, para Renovação de Bolsa Modalidade RD, Processonº 300479/99-9, Área - Engenharia Química (cadastro na biblioteca do CETEM/MCT como Relatório Técnico - RT43/2000), 2000.

TRINDADE, P.V.O. “Avaliação das técnicas de bioaugmentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo”. *Tese M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química*, Rio de Janeiro, Brasil, 127p, 2002.

URURAHY, A. F. P. “Biodegradação de Resíduo Oleoso Proveniente de Refinaria de Petróleo”. *Tese DSc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química*, Rio de Janeiro, Brasil, 344p, 1998.