

**VI-181 - BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM DIESEL B5
EMPREGANDO BIOESTÍMULO E BIOAUMENTO****Denise Celeste Godoy de Andrade Rodrigues⁽¹⁾**

Engenheira Química pela Escola de Química (EQ/UFRJ). Mestre em Biotecnologia Industrial pela Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP). Doutora em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/USP). Professora Adjunta da Faculdade de Tecnologia (FAT/UERJ), atuando na graduação de Engenharia de Produção e no Programa de Pós Graduação em Química. Docente do Mestrado Profissional em Ensino em Ciências da Saúde e do Meio Ambiente (MECSMA/UniFOA).

Lívia Braga Maia⁽¹⁾

Estudante de Iniciação Científica. Graduando em Engenharia de Produção da Faculdade de Tecnologia (FAT/UERJ).

Francisco Maciel Monticeli⁽¹⁾

Estudante de Iniciação Científica. Graduando em Engenharia de Produção da Faculdade de Tecnologia (FAT/UERJ).

Sergio Machado Corrêa⁽¹⁾

Licenciado em Química pela UERJ. Mestre e Doutor em Físico-Química pela UFRJ. Professor Adjunto da Faculdade de Tecnologia (FAT/UERJ), atuando na graduação do curso de Engenharia de Produção - Química, no Programa de Pós Graduação em Química e Doutorado multidisciplinar em Meio Ambiente.

Endereço⁽¹⁾: Rodovia Presidente Dutra, Km 298 – Pólo Industrial - Resende - RJ - CEP: 27537-000 - Brasil - Tel: (24) 3381-3889 ramal 226 - e-mail: denisegodoy@uerj.br

RESUMO

Nas últimas décadas, os problemas ambientais ocasionados por acidentes com combustíveis fósseis tornaram-se mais frequentes. Vários estudos tem buscado técnicas de tratamento remediadoras destes ambientes contaminados. Neste panorama as técnicas de biorremediação destacam-se pelo baixo custo e relativa simplicidade de execução. No presente trabalho objetivou-se comparar as técnicas de bioestímulo (BE) e bioaumento (BA) no tratamento *ex-situ* de solo artificialmente contaminado com 5% de diesel B5. Os ensaios foram conduzidos em microcosmos de bancada, simulando-se biopilhas, que foram periodicamente aeradas por revolvimento mecânico manual. Ao final de 126 dias verificou-se uma degradação dos n-alcenos de 81,8% para a atenuação natural (solo controle), 90,9% para a técnica de bioestímulo e 87,9% para a técnica de bioaumento. Embora a diferença entre o BE e o BEA não seja estatisticamente significativa, considera-se a re-inoculação de micro-organismos autóctones bastante promissora para a remediação do solo.

PALAVRAS-CHAVE: biorremediação, biodiesel, aclimação, solo.

INTRODUÇÃO

Derivados de petróleo são e continuarão a ser, durante as próximas décadas, uma das principais fontes de energia e uma fonte de poluição potencial de importância mundial. O uso crescente de automóveis fez com que ocorresse um proporcional aumento do número de postos revendedores e de postos de abastecimento e conseqüente refinamento da legislação que rege o setor. O processo de logística da produção e distribuição de derivados de petróleo opera basicamente em regime de batelada e a etapa final antes de chegar ao consumidor é a estocagem dos derivados de petróleo em tanques subterrâneos (SASC – Sistema de Armazenamento Subterrâneo de Combustíveis) ou em tanques aéreos (SAAC – Sistema de Armazenamento Aéreo de Combustíveis). Entretanto, a possibilidade de vazamentos destes produtos no solo e subsolo é alta e existem diversas possibilidades de remediação do problema.

Em função da elevada toxicidade de alguns compostos constituintes dos combustíveis, a contaminação do solo por esses produtos representa uma grande ameaça não apenas à sua qualidade, mas também a das águas subterrâneas, uma vez que ambos estão intimamente interligados. Além disso, esse tipo de contaminação pode resultar de forma imediata (ou não) em graves danos à vida e à saúde da população (FINOTTI; CAICEDO, 2001; GOUVEIA; NARDOCCI, 2007). Desta forma, a introdução de novos combustíveis ou de aditivos aos mesmos também podem configurar uma possível ameaça a qualidade dessas matrizes ambientais.

Para remediar solos e águas subterrâneas impactadas por petroderivados como o diesel, uma variedade de tecnologias e procedimentos tem sido utilizados atualmente, e um grande número de novas tecnologias tem se mostrado bastante atrativas e promissoras; dentre elas a biorremediação microbiana (BENTO et al., 2005; CHAGAS-SPINELLI, 2007). Tal tecnologia abrange um grupo de técnicas, que associadas a diferentes estratégias de tratamento, exploram a diversidade genética e a versatilidade metabólica de micro-organismos para transformar contaminantes ambientais em produtos finais mais estáveis e inócuos, os quais podem ser integrados aos ciclos biogeoquímicos (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005; SEPÚLVEDA; TREJO, 2002).

Dentre as estratégias de biorremediação, o bioestímulo (ou bioestimulação), que envolve a adição de agentes estimulantes à atividade microbiana, como nutrientes e oxigênio, e o bioaumento que consiste na inoculação de culturas puras de micro-organismos ou consórcios microbianos com potencial para degradar o contaminante alvo, têm sido as mais reportadas na literatura atual (BENTO et al., 2005; DIAS, 2007; JACCQUES et al., 2007).

Tendo-se em vista a introdução da mistura diesel/biodiesel na matriz energética brasileira, faz-se necessário estudar a remediação deste contaminante no solo. Desta forma, este trabalho tem por objetivo avaliar a aplicabilidade das técnicas de biorremediação denominadas bioestímulo (BE) e bioaumento (BA) na degradação dos hidrocarbonetos em um solo contaminado artificialmente com diesel B5.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção, preparação e contaminação do solo

O solo empregado nos experimentos foi coletado em um posto de revenda de combustíveis, localizado no bairro Manejo, Município de Resende, Km 293 da Rodovia Presidente Dutra. A escolha deste solo deve-se ao fato deste posto encontrar-se em reforma depois de cerca de 2 anos de interdição. Parte do solo do local havia sido escavada para remoção dos tanques de armazenamento subterrâneos, facilitando o acesso e o processo de amostragem.

O solo foi peneirado empregando-se peneira série tyler 9, em equipamento Granutest Produtest. Uma amostra foi coletada e enviada à EMBRAPA Solos para análise físico-química e a outra foi analisada em relação à umidade total, à capacidade de campo (capacidade de retenção de água) e à população microbiana heterotrófica total.

Contaminou-se o solo artificialmente com diesel B5 preparado no laboratório a partir de amostras de óleo diesel de referência e biodiesel de soja. A mistura foi preparada por pesagem dos respectivos percentuais de diesel/biodiesel adotado: 95/5 (g/g). Ambos os óleos foram cedidos gentilmente pelo professor e pesquisador Sérgio Machado Corrêa, do Departamento de Química e Ambiental da Faculdade de Tecnologia (FAT), UERJ – Resende, sendo os mesmos procedentes do Centro de Pesquisa da Petrobrás (CENPES).

Montagem das Biopilhas

Foram montadas três biopilhas em bandejas de isopor, em duplicata, com 300 g de solo: ATN com solo contaminado; BE com solo contaminado e correção nutricional C:N:P de 100:10:1 (MOLINA-BARAHONA et al., 2004) com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e K_2HPO_4 ; BEA com solo contaminado, correção nutricional e re-inoculação de micro-organismos indígenas após enriquecimento e aclimação em meio BH (DIFCO MANUAL, 1984) com 1% de diesel B5. A umidade do solo foi monitorada semanalmente e mantida em 32% (50% da capacidade de campo). O experimento foi conduzido por 126 dias.

Metodologias analíticas

As amostras foram analisadas em relação aos micro-organismos heterotróficos totais pela técnica de unidades formadoras de colônias (UFC) plaqueadas *pour plate* em meio PCA.

Os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) foram extraídos do solo em extrator *Soxhlet* de acordo com a metodologia U.S.EPA 3540C. Os hidrocarbonetos extraíveis de petróleo foram analisados por cromatografia

de fase gasosa com detector seletivo de massas (GC-MSD), utilizando como referência o Método USEPA 8015.

RESULTADOS

Os resultados relativos às análises físico-químicas e microbiológicas do solo são apresentados na Tabela 1.

Como mostrado na Tabela 1, quanto à proporção granulométrica apresentada, o solo é caracterizado como de textura ou granulometria argilosa.

Tabela 1 – Caracterização físico-química e microbiológica do solo estudado antes da contaminação.

PARÂMETROS		VALORES
Granulometria (%)	Areia	8,92
	Silte	16,31
	Argila	74,70
Capacidade de campo (%)		64,5
Umidade (%)		5,6
Complexo sortivo (ccmol _e /Kg)	Ca ²⁺	2,2
	Mg ²⁺	0,4
	K ⁺	0,57
	Na ⁺	012
	Al ³⁺	0
	H ⁺	0
pH	Água	7,0
	KCl 1eqg/L	6,7
Carbono orgânico total (g/Kg)		4,6
Nitrogênio total (g/Kg)		0,3
Fósforo assimilável (mg/Kg)		43
População Heterotrófica total (UFC/g de solo)		1,75x10 ⁷

A capacidade de campo, parâmetro que pode ser definido como a quantidade máxima de água que um solo pode reter em condições normais ou como o limite máximo de água disponível aos micro-organismos e plantas, foi de 64,5%. Optou-se em utilizar nos experimentos de biodegradação, valores em torno de 50% da capacidade de campo, os quais estariam próximo ao meio da faixa ótima citada na literatura.

Com relação ao pH, o solo em estudo mostrou-se neutro, não necessitando de correção, uma vez que a faixa ótima de pH citada na literatura para tal fim situa-se entre 6,5 a 8,5.

De acordo com os valores de carbono, nitrogênio e fósforo expostos na Tabela 1 foi possível calcular a relação C:N:P do solo em 100:6,5:0,9. Essa relação indica que os teores de N e de P estão abaixo do limite mínimo reportado na literatura como adequado ao desenvolvimento da microbiota nativa, que é de 100:10:1. Logo, a correção de nitrogênio e fósforo foi necessária. Com a introdução do óleo diesel B5, ou seja, com a entrada de uma nova fonte de carbono, a proporção seria alterada, segundos os cálculos para 100:0,6:0,09, considerando que o teor de carbono orgânico proveniente da contaminação seria de 85% da massa total do contaminante adicionada (p/p), que foi de 50 g/Kg de solo. Desse modo, para a execução dos processos de biorremediação propostos, houve a necessidade do acréscimo desses nutrientes no solo.

No que diz respeito aos micro-organismos, o solo *in natura* apresentou uma população heterotrófica total de 1,75 x 10⁷ UFC/g de solo, sendo considerado, de um modo geral, um solo bem povoado.

Os resultados da quantificação dos micro-organismos heterotróficos totais encontrados a partir das análises microbiológicas do solo contaminado no decorrer do estudo e nas diferentes condições estão apresentados na

Figura 1. Cabe ressaltar que os micro-organismos heterotróficos são aqueles que utilizam compostos orgânicos como sua principal fonte de carbono, sendo os componentes de destaque na biodegradação de contaminantes orgânicos. No solo, a maioria desses micro-organismos é representada por actinomicetos, fungos e bactérias (Moreira e Siqueira, 2006).

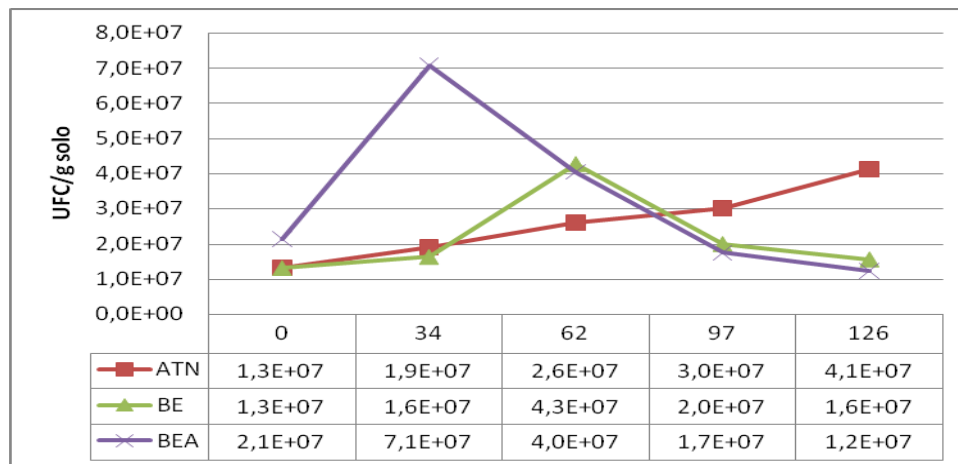


Figura 1: Estimativa média dos micro-organismos heterotróficos totais (UFC.g⁻¹ solo) aos 0, 34, 62, 97 e 126 dias de monitoramento do experimento.

Observa-se na Figura 1 que a população microbiana praticamente manteve-se na ordem de 10⁷ UFC.g⁻¹ solo para todos os tratamentos adotados. Estes resultados indicam que o contaminante presente no solo provocou a inibição da microbiota presente.

Ciannella (2010) avaliou diferentes estratégias de biorremediação em solo contaminado por óleo diesel e também verificou que o número de micro-organismos heterotróficos totais não foi influenciado pelos tratamentos, concluindo que a biomassa microbiana pode ser um indicador pouco específico para se determinar o potencial de biodegradação.

Dos hidrocarbonetos presentes no diesel, os alcanos lineares de comprimento C₁₀-C₂₆ constituem os substratos mais prontamente utilizados pelos micro-organismos por serem mais susceptíveis ao ataque dos mesmos. Por conta disso, tendem a ser rapidamente degradados no ambiente. No entanto, já foi comprovada a biodegradação de n-alcanos até C₄₄ (ATLAS, 1981). Estudos relatam que a biodegradação aeróbia desses compostos ocorre normalmente por um ataque monoterminal ou diterminal. Isso significa que a quebra ocorrerá em um ou em dois átomos de carbonos terminais. Na oxidação monoterminal, o grupo metila desses compostos é comumente oxidado por uma série de reações que conduzem, primeiramente, a formação de um álcool primário, seguido de um aldeído e um ácido carboxílico (BENTO, 2005). O ácido carboxílico é posteriormente degradado via β-oxidação com a formação de ácidos graxos com dois carbonos a menos e a formação de acetilcoenzima A, com liberação eventual de CO₂. Na oxidação diterminal de alcanos C₁₀ a C₁₄, por exemplo, ocorre a formação de diálcool primários e, posteriormente, ácidos alifáticos (ATLAS, 1981; BAPTISTA, 2003).

No presente experimento, a remoção dos hidrocarbonetos alifáticos na faixa de C₁₀-C₂₆ (n-alcanos) foi utilizada como parâmetro de avaliação da biodegradação do óleo diesel B5 (Figura 2). Ressalta-se que os n-alcanos não são considerados um grupo de elevada toxicidade a biota e seres humanos quando comparados aos compostos aromáticos. Contudo, são importantes indicadores de biodegradação, uma vez que são os primeiros compostos a serem degradados pelos micro-organismos. Na Figura 3 são mostrados os resultados da degradação dos hidrocarbonetos, nos diferentes tratamentos estudados.

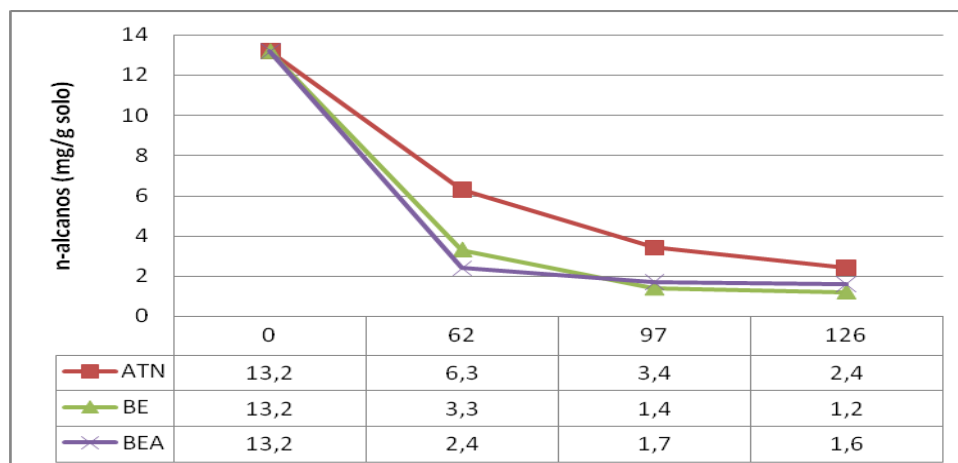


Figura 2: Acompanhamento dos n-alcenos extraídos do solo contaminado aos 0, 62, 97 e 126 dias de monitoramento do experimento.

A partir da Figura 2 observa-se um perfil de degradação dos n-alcenos em função do tempo correspondente a um polinômio de terceiro grau para todos os tratamentos. Aos 62 dias de tratamento verificou-se que a velocidade de degradação para os tratamentos BE e BEA é semelhante e superior a do tratamento ATN, o que pode ser verificado pela queda acentuada das respectivas curvas apresentadas na Figura 2. Este perfil persiste até os 126 dias de experimento.

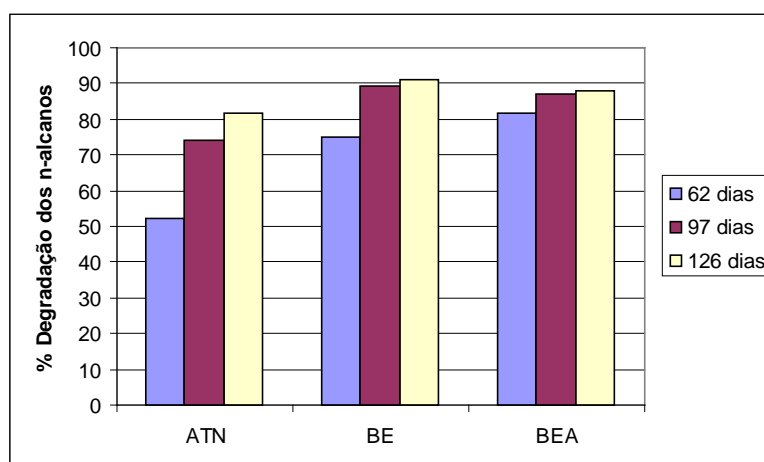


Figura 3: Degradação percentual dos n-alcenos extraídos do solo contaminado aos 62, 97 e 126 dias de monitoramento do experimento.

Em relação à degradação percentual dos n-alcenos observou-se que esta ocorreu de forma mais acentuada até 97 dias para os tratamentos ATN e BE, enquanto para o tratamento BEA esta ocorreu de forma mais gradativa (Figura 3). Ao final do experimento o tratamento BE foi o que atingiu o maior percentual de degradação dos n-alcenos. Ao comparar os tratamentos BE e BEA com o ATN é possível verificar que aos 62 dias a remoção dos n-alcenos pelo tratamento BEA foi superior ao ATN (29,5%), enquanto para os demais períodos BE foi superior.

CONCLUSÕES

Quanto à degradação dos n-alcenos, após 126 dias de experimento, obteve-se 81,8% (ATN), 90,9% (BE) e 87,9% (BEA) em relação ao solo inicial. Os resultados sugerem que a re-inoculação de micro-organismos autóctones, após aclimação ao contaminante, melhoram o processo de biorremediação apenas para os primeiros dias, embora o resultado não seja estatisticamente significativo. Entretanto, a reinoculação do solo com micro-organismos pré-selecionados do próprio ambiente contaminado tem sido considerada por alguns

autores como a abordagem mais promissora no processo de biorremediação (BENTO et al., 2003; CUNNINGHAM; PHILP, 2000). Segundo Thompson et al (2005) a população indígena prevalente do habitat alvo encontra-se mais adaptável fisiologicamente as condições do mesmo sendo, portanto, mais favorável a persistir como um inóculo reintroduzido do que aquela população estranha ou mesmo transitória.

Conclui-se que as técnicas empregadas (BE e BEA) são indicadas para serem empregadas na biorremediação de solo contaminado com diesel B5, sendo significativamente melhores que a atenuação natural (ATN) e de baixo custo. Sugere-se que o sistema seja monitorado por um período de tempo maior para se ampliar o potencial degradador das biopilhas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews*, v. 45, n. 1, p. 180-209, Mar., 1981.
2. BAPTISTA, Sandro José. *Seleção das melhores condições de biodegradação de petróleo em solo argiloso*. 2003. 163 f. Dissertação (Mestrado em Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria do Petróleo e Gás Natural) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.
3. BENTO, Douglas Mayer. *Análise química da degradação dos hidrocarbonetos de óleo diesel no Estuário da Lagoa dos Patos – Rio Grande/RS*. 2005. 112 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2005.
4. BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, C.; FRANKENBERGER Jr., W. T. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, suppl. 1, p. 65-8, Nov., 2003.
5. 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*. 2005 (96) 1049-1055.
6. CHAGAS-SPINELLI, Alessandra Carla Oliveira. *Biorremediação de solo argiloso contaminado por hidrocarbonetos poliaromáticos provenientes de derrame de óleo diesel*. 2007. 174 f. Tese (Doutorado em Geociências) - Centro de Tecnologia e Geociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.
7. CIANNELLA, Roberta Carvalho. *Avaliação de diferentes estratégias de biorremediação no tratamento de solo contaminado por diesel B5*. 182 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
8. CUNNINGHAM, C. J.; PHILP, J. C. Comparison of bioaugmentation and biostimulation in *ex situ* treatment of diesel contaminated soil. *Land Contamination & Reclamation*, v. 8, n. 4, p. 261-69, 2000.
9. DIAS, Fábio Guimaro. *Utilização de consórcio microbiano para biorremediação do meio ambiente contaminado com derivados de petróleo*. 2007. 106 f. Tese (Doutor em Ciências de alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2007.
10. FINOTTI, A. R.; CAICEDO, N. O. L. Contaminações subterrâneas com combustíveis derivados de petróleo: toxicidade e legislação brasileira. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, v. 6, n. 2, p. 29-46, abr./jun., 2001.
11. GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação. *Biotechnology Ciência & Desenvolvimento*, ano 8, n. 34, p. 36-43, jan./jun., 2005.
12. GHAZALI, F. M.; RHAMAN, R. N. Z. A.; SALLEH, A. B.; BARSİ, M. Biodegradation of hydrocarbons in a microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2004 (54) 61-7.
13. GOUVEIA, J. L. N.; NARDOCCI, A. C. Acidentes em postos e sistemas retalhistas de combustíveis: subsídios para a vigilância em saúde ambiental. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 12, n. 3, p. 317-324, jul./set., 2007.
14. JACCQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural, Santa Maria*, v. 37, n. 4, p.1192-1201, jul./ago., 2007.
15. JORGENSEN, K. S.; PUUSTINEN, J.; SUORTTI, A. M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental Pollution*, v. 107, p. 245-254, 2000.
16. MOLINA-BARAHONA, L.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; HERNÁNDEZ-VELASCO, M; VERGA-JAQUÍN, C.; ZAPATA-PÉREZ, O.; MENDOZA-CANTÚ, A.; ALBORES, A. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. *Applied Soil Ecology*, v. 27, n. 2, p. 165-175, 2004.

17. MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2 ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.
18. MELLO, G. S. L.; MORITA, D. M.; MANFREDINI, S.; RIVERA, I. N. G. Viabilidade da aplicação do método respirométrico de Bartha para determinação da biodegradação de poluentes ou resíduos em latossolos. *Eng. Sanit. Ambient*, v. 12, n. 1, p.71-78, jan/mar, 2007.
19. SEPÚLVEDA, T. V.; TREJO, J. A. V. *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. México: INE-SEMARNAT, 2002. 64 p.