

# **Efeito da adição de ramnolipídio em solo contaminado com óleo cru: Avaliação da concentração ótima quanto à toxicidade e biodegradabilidade**

**Débora Sanchez Pereira**

Bolsista de Iniciação Científica, Química, FTESM

**Valéria Souza Millioli**

Orientadora, Engenheira Química, D. Sc.

## **Resumo**

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar, através do processo de biorremediação, a degradação dos Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP) num solo cujo teor inicial de HTP era de 4,7 mg/g. A toxicidade também foi avaliada antes e após aos ensaios de biodegradabilidade. Para este fim, os ensaios de biodegradabilidade foram realizados em biorreatores constituídos de colunas com 20 cm de altura e 5 cm de diâmetro, sendo utilizado 15 cm de leito mineral (solo + óleo cru) e 3 cm de camada de brita, ocupando 90% do biorreator. Foram adicionados a esses biorreatores cerca de 400 g de solo contaminado, sendo adicionadas diferentes concentrações do ramnolipídio que variaram entre 1 a 15 mg/g em relação a massa do solo. Os ensaios foram mantidos à temperatura ambiente, empregando-se uma vazão de ar úmido de 3L/h. Os nutrientes foram corrigidos através da adição de nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) e fosfato de potássio di-básico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) numa relação nutricional C:N:P = 100:15:1, sendo a umidade ajustada em 50% da capacidade de retenção de líquido. Os ensaios foram conduzidos por um período de 45 dias e foram feitas análises quinzenais de TPH, atividade da desidrogenase e fitotoxicidade com *Lactuca sativa*. Ao final do ensaio foi verificado que a concentração ótima de ramnolipídio a ser utilizada nos ensaios de biodegradabilidade dos compostos orgânicos foi de 4 mg/g alcançando cerca de 60% de remoção de HTP, com diminuição gradativa da toxicidade causada por esses orgânicos.

## **1- Introdução**

O petróleo é a principal fonte de energia do mundo, representando cerca de 40% das necessidades energéticas mundiais. No entanto, as reservas desse recurso natural não renovável, em nosso tempo, são encontradas em poucos países, necessitando de ser transportado pelo mundo afora através de Navios Tanques e Oleodutos. Em função dessa grande movimentação, há riscos de contaminação tanto no solo quanto no mar, causando danos ao meio ambiente. Dentre as tecnologias desenvolvidas para remediar solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, destaca-se a biorremediação que se baseia na propriedade que os micro-organismos têm de metabolizar os hidrocarbonetos que representam uma fonte de energia para os mesmos. Esses micro-organismos consomem o óleo, convertendo-o em produtos mais solúveis, sendo que, em alguns casos, pode ocorrer total mineralização com formação de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . A fração orgânica do solo é responsável pela sorção de muitos compostos, particularmente, os hidrofóbicos e quanto maior for a fração orgânica do solo maior será o número de moléculas sorvidas, e quanto maior for o tempo de exposição desses contaminantes no

solo, maior será sua sorção e, conseqüentemente, menor a disponibilidade dos hidrocarbonetos para a biodegradação. Entretanto, há uma possibilidade de se aumentar a disponibilidade desses hidrocarbonetos, mesmo em solos com alto teor de argila e/ou óleo cru, através da utilização de surfatantes sintéticos e/ou biológicos.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Solo e Óleo Cru

Neste trabalho o solo e o óleo cru são provenientes da região Nordeste do Brasil. O solo não contaminado foi homogeneizado, peneirado e quarteado, sendo contaminado, em laboratório, com 5% do óleo cru. O óleo cru, procedente do campo de produção terrestre, possui as seguintes características: Enxofre: 0,44%; Carbono: 86,2%; Hidrogênio: 12,3%; Nitrogênio: < 0,3%.

A caracterização do solo foi baseada nos parâmetros normalmente avaliados no processo de biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo. Para tanto, foram feitas as seguintes análises: densidade aparente, densidade de partícula, porosidade, pH, capacidade de retenção de líquido, teor de nitrogênio total, fósforo assimilável, teor de matéria orgânica, determinação de hidrocarbonetos totais de petróleo. A Tabela 1 mostra os resultados da caracterização do solo antes da contaminação (solo virgem) e logo após a contaminação.

PARÂMETRO	TEOR NO SOLO CONTAMINADO		PARÂMETRO	TEOR NO SOLO CONTAMINADO
N (g/kg)	3,5		C orgânico (%)	5,3
P (g/kg)	0,08		BHT (UFC/g)	7,4 X10 <sup>6</sup>
Mat. Orgânica (%)	9,2		BH (cel/g)	2,0 X10 <sup>3</sup>
pH	6,4		TPH (%)	4,7
CRL (%)	28		O&G (%)	5,2

Tabela 1: caracterização do solo contaminado com 5% de óleo cru.

O biossurfatante escolhido foi do tipo raminolipídio que é amplamente utilizado como auxiliar no processo de biorremediação (Noordman *et al.* 2002; Nitschke & Pastore, 2002; Mulligan *et al.* 2005). Este biossurfatante é produzido pela empresa JENEIL Company localizada nos Estados Unidos e Alemanha, cujo nome é JBR 210. Este biossurfatante é caracterizado como aniônico e possui 10 % de ingrediente ativo.

### 2.2. Testes de Ecotoxicidade Terrestre

2.2.1. Verificação da atividade da desidrogenase através da adição de surfatantes em diferentes concentrações no solo.

Estes testes foram baseados no método descrito por Alef & Nannipiere (1995) com algumas adaptações, já que foi utilizado metanol como extrator. Pesou-se cerca de 5g de cada amostra, sendo

adicionado 5 mL de uma solução contendo 1% de TTC. Os testes foram conduzidos em triplicata, cujas amostras permaneceram incubadas por 24h em estufa a cerca de 30°C. O TPF foi extraído em 40 mL de metanol após 2h de agitação em shaker a 150 rpm. Após a extração, o extrato foi filtrado em papel de filtro de filtração lenta e posteriormente realizou-se a leitura em espectrofotômetro na faixa de 485 nm.

### 2.2.2. Teste de germinação com *Lactuca sativa*

O método de germinação e crescimento das raízes, sugerido por Reis (2003) foi aplicado utilizando-se sementes de alface da espécie *Lactuca sativa* da marca Isla Pak, isenta de defensivos agrícolas. As sementes foram, inicialmente, lavadas em solução contendo 0,1% de NaClO durante 20 minutos, sendo, posteriormente, colocadas em água destilada por 10 minutos, conforme proposto por Wang *et al.* (2002). Pesou-se cerca de 10g de solo adicionando-se água destilada num volume total de 100 mL (solução teste). Colocou-se esta solução em erlenmeyer de 250 mL agitando-se por 30 min a 150 rpm em *shacker*. Após a lavagem, foram distribuídas 10 sementes em placa de Petri forrada com papel de filtro e contendo cerca de 2,0 mL de cada solução teste (5 réplicas) a fim de manter o papel umedecido. As placas foram fechadas e colocadas em estufa na ausência de luz e na temperatura de aproximadamente 24°C cujo tempo de germinação foi de 120h ou 5 dias. Após esse tempo, contou-se o número de sementes que germinaram, e fez-se a medida do comprimento do ponto de transição entre o hipocótilo e a extremidade da raiz. Para o Cálculo do índice de germinação utilizou-se seguintes Equação 1, 2 e 3.

$$\%IG = \frac{(\%GS) \times (\%CR)}{100} \quad (1); \quad \%GS = \left( \frac{\%GE}{\%GC} \right) \times 100 \quad (2); \quad \%CR = \left( \frac{MCE}{MCC} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde: % IG = Germinação de sementes; % CR = Crescimento da raiz.; % GE = germinação no extrato; % GC = germinação do controle; MCE = média do comprimento do crescimento no extrato e MCC = média do comprimento do crescimento no controle.

### 2.3. Ensaio de Biodegradabilidade em Solo Contaminado com Óleo Cru Conduzidos em Biorreatores: Avaliação da Adição de Diferentes Concentrações de Biossurfatante e da Toxicidade ao Longo do Tempo

Os experimentos foram realizados em biorreatores constituídos de colunas com 20 cm de altura e 5 cm de diâmetro, sendo utilizado 15 cm de leito de solo e 3 cm de camada de brita, ocupando 90% do biorreator. Foram adicionados a estes biorreatores cerca de 400 g de solo contaminado, sendo adicionadas diferentes concentrações do biossurfatante que variaram entre 1 a 15 mg/g de biossurfatantes em relação a massa do solo. Os ensaios foram mantidos à temperatura ambiente, empregando-se uma vazão de ar úmido de 3L/h conforme estabelecido por Pala (2002) em ensaios anteriores. Os nutrientes foram corrigidos através da adição de nitrato de amônio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) e fosfato de potássio dibásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) numa relação nutricional C:N:P = 100:15:1, conforme estipulado em ensaios de planejamento experimental (dados não mostrados), sendo a umidade ajustada em 50% da capacidade de retenção de líquido. Os ensaios tiveram duração de 45 dias e análises de

TPH, realizadas quinzenalmente, atividade da desidrogenase, fitotoxicidade com *Lactuca sativa* e população de micro-organismos hidrocarbonoclásticos. A Figura 1 mostra os experimentos conduzidos em biorreatores.

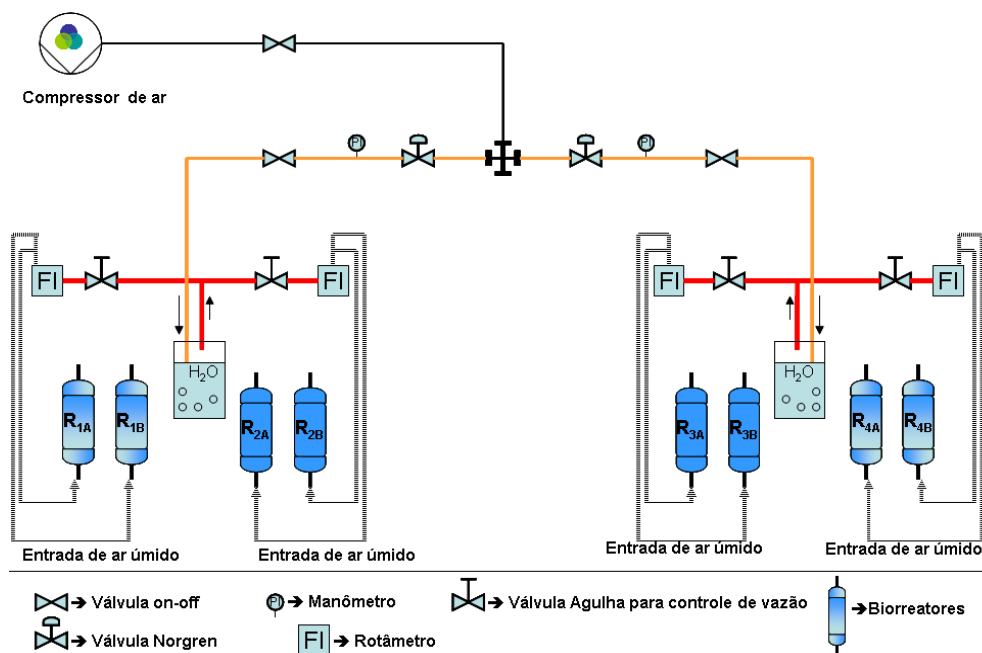


Figura 1. Fluxograma utilizado na realização dos ensaios de biodegradação.

## 2.4. Metodologias analíticas

### 2.4.1. Determinação de hidrocarbonetos totais de petróleo

Para a quantificação dos hidrocarbonetos totais de petróleo foi utilizado um espectrofotômetro de infravermelho (Horiba OCMA-350), Tal quantificação consiste em extrair os hidrocarbonetos de petróleo, a partir de uma massa de 0,2 g de solo seco, com 10 mL de solvente S-316 específico para HORIBA. Essa extração foi feita a frio em ultrassom durante 2h. Após extração, a solução resultante foi filtrada em papel de filtro Whatman nº 40 com 2 gramas de sílica gel (60 a 200 mesh) e as quantidades de CH, CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> determinadas nos comprimentos de onda de 3,38, 3,42 e 3,50 µm, respectivamente.

## 3. Resultados e discussão

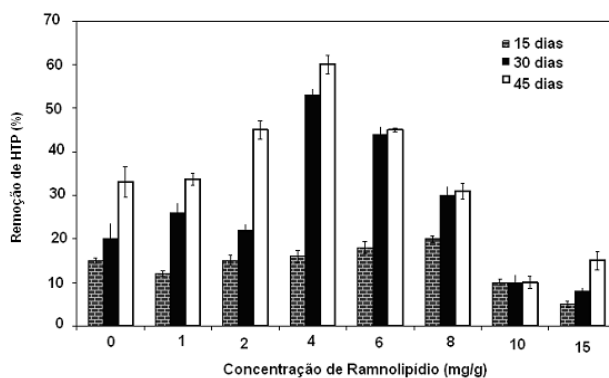


Figura 2: Remoção quinzenal de HTP ao longo de 45 dias em 7 diferentes ensaios de biodegradabilidade.

A Figura 2 mostra a remoção de HTP ao longo do tempo, observando-se que, logo nos primeiros 15 dias, houve, praticamente, a mesma remoção de HTP para todos os experimentos, que esteve na faixa de 15 a 20 % de remoção, excetuando-se os experimentos com 10 e 15mg/g, que apresentaram valores abaixo do experimento controle (sem adição de ramnolípido). Entretanto, decorridos os 30 dias de teste, pôde-se observar quais experimentos se destacaram, verificando-se que a utilização da concentração de 4 mg/g de ramnolípido foi a que melhor removeu o óleo do solo em termos de HTP, sendo este resultado confirmado aos 45 dias de ensaios de biodegradabilidade, alcançando cerca de 60% de remoção de HTP com quase o dobro de remoção em relação ao controle. A utilização das concentrações de 6 e 8 mg/g de ramnolípido apresentou, também, bons resultados com cerca de 45% de remoção de HTP. Porém, os tratamentos com 10 e 15 mg/g de ramnolípido obtiveram valores de biodegradabilidade inferiores ao controle com cerca de 10 e 15% de remoção, respectivamente. No entanto, vale à pena destacar que a adição de 2mg/g de ramnolípido apresentou bom resultado ao término dos experimentos com 40% de remoção de HTP, sendo que a concentração de 1 mg/g de HTP pouco influenciou em relação ao controle com apenas 33,7% de remoção em relação a 33% do controle. Com a repetição dos experimentos, pôde-se verificar, mais uma vez, que o melhor resultado foi obtido pela adição de 4mg/g de ramnolípido. Mais uma vez foi verificado que a adição das concentrações 10 e 15mg/g não foram benéficas aos ensaios de biodegradabilidade. Em alguns casos, os surfatantes apresentam efeitos inibitórios sobre a biodegradação, pois à medida que se aumenta a solubilidade do óleo aumenta-se, também, a toxicidade (SINGH *et al.* 2007). Outro fator que pode ter inibido a degradação dos HTP é a degradação preferencial em detrimento da degradação dos hidrocarbonetos (TIEHM, 1997; YU *et al.* 2007).

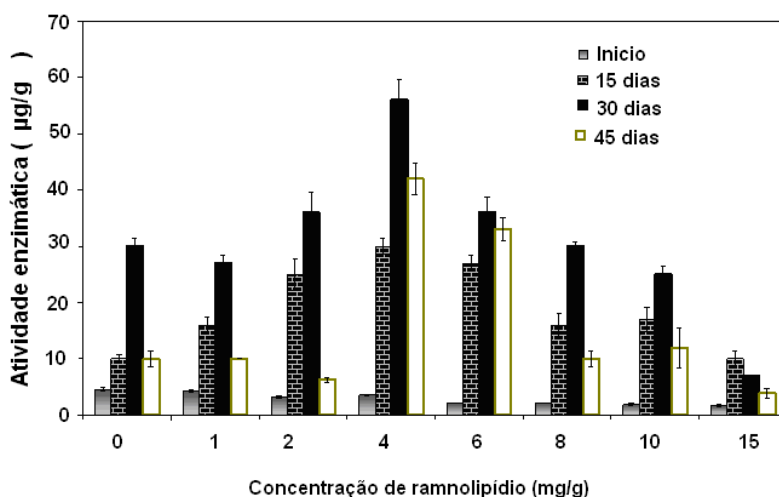


Figura 3: atividade enzimática em termos  $\mu\text{g}$  de TPF (Trifenilformazan) por g de solo em 24h.

A Figura 3 mostra a atividade enzimática do solo através da adição de diferentes concentrações de ramnolípido, destacando-se que a adição de ramnolípido ao solo contaminado com óleo cru foi extremamente impactante à atividade da desidrogenase, observando-se que quanto maior a concentração de ramnolípido adicionada menor a atividade. Este efeito, extremamente negativo, pode ser explicado devido a alta solubilidade do óleo, sobretudo, porque à medida que se aumenta a concentração de ramnolípido, aumenta-se, também, a solubilidade do óleo cru, disponibilizando mais óleo a ser metabolizado, dificultando a ação dos microrganismos.

Contudo, pode-se observar que somente o óleo cru já apresentou efeito tóxico à atividade inicial, observando-se uma queda da atividade de 6,5 para 4,6  $\mu\text{g/g}$  sem adição de ramnolipídio (0). No entanto, a partir dos 15 dias houve considerável aumento da atividade enzimática, atingindo cerca de 30  $\mu\text{g/g}$  entre os tratamentos de 2 a 6 mg/g de ramnolipídio, o que indica que apesar da adição do ramnolipídio, no início, ser altamente impactante à atividade da desidrogenase, logo nos primeiros dias houve uma adaptação e a microbiota conseguiu se restabelecer. Aos 30 e 45 dias a concentração de 4 mg/g de ramnolipídio foi a que apresentou maior atividade, alcançando cerca de 60  $\mu\text{g/g}$ . Entretanto, ao final dos experimentos houve uma queda brusca na atividade para todos os experimentos; contudo, houve pouca diferença de remoção entre 30 e 45 dias, sugerindo que a partir dos 30 dias estavam presentes no solo as frações mais recalcitrantes e mais difíceis de serem biodegradadas, diminuindo, dessa forma, a atividade da desidrogenase.

A toxicidade foi, também, avaliada ao longo dos ensaios de biodegradabilidade através do teste de germinação da espécie *Lactuca sativa* e, logo no início dos experimentos, foi observado, na Figura 4, que quanto maior a concentração do biossurfactante menor o índice de germinação. Porém, com o passar do tempo, a toxicidade foi diminuindo, destacando-se que aos 45 dias, com as concentrações de 1 a 4 mg/g, houve um índice de germinação em torno de 80% e a partir de 4 mg/g o índice de germinação foi diminuindo, o que indica que maiores concentrações de ramnolipídio acarretam alta solubilidade do óleo cru, resultando em maior toxicidade.

Relacionando-se a remoção de HTP com a atividade da desidrogenase e com o índice de germinação, percebe-se que o melhor resultado de remoção de HTP, com adição de 4 mg/g de ramnolipídio, foi, também, o que apresentou melhor atividade, maior população de micro-organismos hidrocarbonoclasticos e maior índice de germinação. Paralelamente, os piores resultados de remoção de HTP foram os que apresentaram menor atividade, menor população de micro-organismos hidrocarbonoclasticos e menor índice de germinação ao final dos experimentos

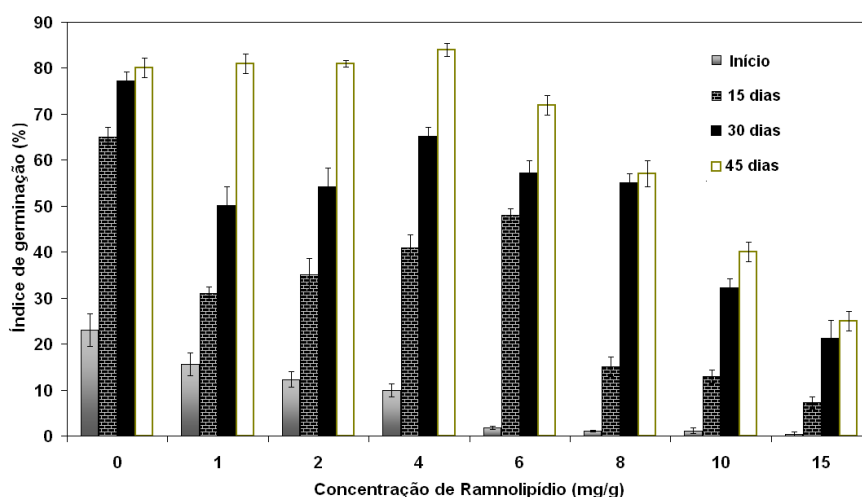


Figura 4: Índice de germinação através da adição de diferentes concentrações de ramnolipídio nos ensaios de biodegradabilidade, utilizando a espécie *Lactuca sativa*.

#### 4. Conclusões

A concentração ótima de ramnolipídio, como auxiliar no processo de biorremediação, foi de 4 mg/g alcançando cerca de 60% de remoção de HTP. A toxicidade do ramnolipídio no solo sem óleo cru indicou que há uma concentração ótima de ramnolipídio que foi de 4 mg/g para atividade da desidrogenase. Em relação ao índice de germinação à medida que a concentração do ramnolipídio ia aumentando o índice de germinação ia diminuindo no início do tratamento. Apesar de ser tóxico ao solo contaminado, a adição do ramnolipídio aumentou a biodegradabilidade do óleo e com o passar do tempo a toxicidade foi diminuindo.

#### 5. Bibliografia

- ALEF, K. & NANAPIERE, P. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. London: Academic Press. 576p. 1995.
- CUBITTO, M.A.; MÓRAN, A.C.; COMMENDATORE, M. CHIARELLO, M.N.; BALDINI, M.D.; SINERIZ, F. Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soil. *Biodegradation*. vol.15, Nº 5, pp. 281-287. 2005.
- MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*. vol.133, pp.183-198. 2005.
- NITSCHKE, M. PASTORE, G.M. "Biosurfactantes: propriedades e aplicações". *Química Nova*, vol. 25, No. 5, pp. 772-776. 2002.
- NOORDMAN, W.H.; WACHER, J.J.J.; BOER, G.L. de; JANSSEN, D.B. The enhancement by biosurfactants of hexadecane degrade by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate availability. *Journal of Biotechnology*, vol. 94; pp. 195-121. 2002.
- PALA, D.M. (2002). "Estudo da biorremediação de solo impactado por óleo cru". Orientadores: Geraldo Lippel Sant'Anna Jr. e Denize Dias de Carvalho Freire. Rio de Janeiro: COPPE/UFRJ. 114p. Dissertação (Mestrado em ciências).
- REIS, J.L.R. Estudo dos efluentes líquidos na indústria de borracha sintética com objetivo de avaliação da toxicidade. COPPE/UFRJ. Tese de doutorado, Rio de Janeiro. 383p. 2003.
- SINGH, R.P. GUPTA, N.; SINGH, S.; SINGH, A. SUMAN, R. ANNEI, K. Toxicity of ionic and nonionic surfactants to six microbes found in Angra, India. *Bull Environmente contam. Toxicol*. vol. 69, pp. 265-270. 2002.
- TIEHM, A., M. STIEBER, P. WEBER, D.; and FRIMEL, F. Surfactant-enhanced mobilization and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in manufactured gas plant soil. *Environ. Sci. Technol*. Vol. 31 2570–2576. 1997.
- WANG, X. SUN, C. WANG, Y. Quantitative structure – activity relationships for the inhibition toxicity to root elongation of *Cucumis sativus* of selected phenols and interspecies correlation with *Tetrahymena pyriformis*. *Chemosphere*, vol. 46, pp. 153 – 161. 2002.