

Atenuação natural monitorada de solo contaminado com óleo cru: avaliação da toxicidade e degradação do óleo cru.

Débora Sanchez Pereira

Bolsista de Iniciação Científica, Química, Souza Marques.

Valéria Souza Millioli

Orientadora: Eng.^a Química, MSc.

Resumo

O processo de atenuação natural monitorada (ANM) é baseado em processos naturais de degradação no solo e águas subterrâneas e resulta das interações de processos químicos, físicos e biológicos. É uma alternativa tecnológica de remediação, normalmente é realizado por um tempo longo. Para a realização dos ensaios de ANM foi utilizado solo nordestino brasileiro contaminado com 5% de óleo cru postos em lisímetros e com captação de água. Os testes foram realizados por 240 dias, deixando-os em ar livre para ações naturais. A cada 30 dias foram analisados dados como pH, capacidade de retenção de líquido, matéria orgânica, nitrogênio, fósforo, hidrocarbonetos totais de petróleo e contagem da população microbiana. Trimestralmente foram realizados testes de mortalidade das minhocas, fitotoxicidade e atividade de desidrogenase. Os testes de TPH indicaram uma pequena diminuição do óleo no solo ao longo do tempo, atingindo cerca de 25 % de remoção. Os testes de toxicidade indicaram uma queda após 90 dias, sendo que nenhuma toxicidade foi observada após os 240 dias de ensaio.

1. Introdução

A ANM é baseada nos princípios naturais de degradação *in-situ* e resulta da interação de uma série de mecanismos de processos físicos, químicos, biológicos ou processos que, em condições favoráveis, atuam sem intervenção humana para reduzir a massa, toxicidade, mobilidade, volume, ou concentração de contaminantes no solo ou nas águas subterrâneas. Mas mesmo se as condições forem as mais propícias para se iniciar um programa de biorremediação, com solo arenoso e homogêneo, bactérias apropriadas para a degradação e contaminantes em fase dissolvida, ainda assim é necessário ser muito criterioso para não se desperdiçar tempo e dinheiro com operações dispensáveis. Isso por uma razão simples: se não há risco que justifique pressa para remediar a área, sobretudo com contaminantes em sua fase dissolvida ou adsorvida no solo (muito menos suscetíveis a avançarem em direção a corpos d'água), o melhor a fazer é deixar a natureza se auto-depurar. Ou seja, optar pela chamada Atenuação Natural Monitorada (NOBRE & NOBRE, 2003; FURTADO 2006).

2. Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a degradação do óleo no solo por ANM através de análise TPH (hidrocarbonetos totais de petróleo) e ainda, realizar testes ecotoxicológicos como atividade de desidrogenase (AD), fitotoxicidade (*Lactuca sativa*) e mortalidade de minhocas (*Eisenia fetida*).

3. Materiais e métodos

3.1. Caracterização do solo

No presente trabalho, foi usado solo da região Nordeste do Brasil. Este solo foi homogeneizado, peneirado e quarteado e contaminado artificialmente com 5% de óleo cru em laboratório. Sendo caracterizados conforme os resultados apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Características do solo

Parâmetro	Teor no Solo Virgem	Teor no Solo Contaminado
N (g/kg)	0,35	0,3
P (g/kg)	0,1	0,075
Silte*	14%	-----
Areia*	75%	-----
Argila*	11%	-----
Densidade Aparente (g/mL)	1,1	1,3
Densidade de Partículas (g/mL)	2,2	1,5
PH	6,8	6,4
C orgânico (%)	2,3	5,3
Microrganismos hidrocarbonoclasticos (cel/g)	$2,8 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$
Matéria orgânica (%)	4	9,2
Capacidade de campo (%)	45	28
Microrganismos Heterotróficos totais (UFC/g)	$9,8 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$
Porosidade (%)	50	20

3.2. Características do óleo cru

O petróleo foi classificado como óleo parafínico, com baixos teores de N, S. Vide Tabela 2.

Tabela 2. Características do óleo cru

Componentes	Quantidades (%)
Enxofre (S)	0,44
Carbono (C)	82,6
Hidrogênio (H)	12,3
Nitrogênio (N)	$<0,3^{(1)}$

⁽¹⁾ Abaixo do limite

3.3. Atenuação natural monitorada (ANM)

As análises foram realizadas em simulação da ANM em solos contaminados com intuito de verificar a degradação do óleo no solo ao longo do tempo. O solo foi contaminado artificialmente em laboratório com 5% de óleo cru e colocado em recipientes Perspex (acrílico) lisímetros com dimensões de 40x30x25 cm, duplicata A e B com 40Kg de solo cada, preenchido com rochas de tamanhos diferentes no fundo e um tubo de drenagem para escoamento da água percolada e originária de chuva (Figura 1), deixando-os em ar livre para ações naturais de intemperismo. Os ensaios foram monitorados durante 9 meses, o solo e o óleo cru são do nordeste brasileiro.

A ANM é baseado nos princípios naturais de degradação, embora seja uma alternativa adicional para o tratamento de aquíferos e solos contaminados, essa tecnologia normalmente demanda um maior período de

tempo (entre meses e até anos). No primeiro dia foram analisados: germinação de sementes com *Lactuca sativa*, mortalidade das minhocas com *Eisenia fetida*, atividade de desidrogenase (AD), pH, hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH), o conteúdo de população microbiana (Microorganismos hidrocarbonoclasticos, Microorganismos Heterotróficos totais), Densidade Aparente, Densidade de Partículas (DP), porosidade, Capacidade de Retenção de Líquidos (CRL). Mensalmente foram analisados: TPH, o teor de população microbiana, pH, AD, germinação de sementes com *Lactuca sativa*. Trimestralmente eram vistos o nitrogênio (N), fósforo (P), Densidade Aparente, DP, porosidade, CRL, mortalidade das minhocas com *Eisenia fetida*.



Figura 1: Lisímetros com solo contaminado de petróleo

3.4. Metodologias analíticas.

3.4.1. Hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH): Consiste na metodologia a extração de hidrocarbonetos do solo, a pesagem de 0,1g de solo seco (e triturado) em 5mL de solvente (S-316/HORIBA). A homogeneização foi realizada em ultra-som por 1 hora. Após, foi feita a filtragem com 2g de sílica gel (60 a 200 malhas), a solução filtrada foi lida em espectrômetro (Horiba OCMA-350).

3.4.2. Quantificação da população microbiana: A quantificação dos microorganismos heterotróficos totais foi feita pela técnica de Pour Plate, usando uma mistura orgânica (TSA - Tryptic Soy Agar). Cerca de 5g de solo foram adicionados em 50mL de solução salina (NaCl 0,85%) e suspensas no agitador por 1 hora à 30 °C. Após a agitação foi efetuada o procedimento de placas adicionando 0,2mL de solução salina em suspensão previamente preparadas na superfície. Essa placa foi colocada em estufa por 48 horas a 30°C , onde o número de unidades colônias formadas foi contada (resultado expresso em UFC/g de solo). A quantidade de população microbiana degradadoras de óleo cru foi feita através da técnica do número mais provável (NMP) em acordo com Oblinger & Koburger (1975).

3.4.3. Propriedades químicas e físicas: A densidade aparente, densidade de partículas e porosidade foram disponibilizados por um Deuel *et al.* (1997) e do nitrogênio, fósforo foi determinado pela EMBRAPA (1997).

3.4.4 Determinação de pH: Em cada erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 20gramas de cada solo e adicionado 50mL de água destilada, foi posto no agitador por 30 minutos em temperatura ambiente, logo após foi lido o pH em pH-mêtro.

3.5. Ecotoxicidade

3.5.1. Verificação da atividade da desidrogenase (AD), foi realizada de acordo com Aleph & Nanipiere (1995). Sendo a mostra após filtrada, foi lida no espectrofotômetro na faixa de 485 nm.

3.5.2. Fitotoxicidade: O método de fitotoxicidade foi realizado por germinação de sementes conforme sugerido por Yerushalmi *et al.* (2003), sendo aplicado sementes de alface de espécie *Lactuca sativa*. O extrato de amostras de solo (10%p/v) foi colocada em placas Petri, sendo distribuídos 10 sementes de *Lactuca sativa*, espaçados igualmente. As placas foram incubadas a 24°C durante 120 horas. Após este tempo, o número de sementes germinadas foi contado e o comprimento das raízes foi medido a partir da transição entre o ponto hipocolito a sua extremidade.

3.5.3. Mortalidade das minhocas: Foram utilizadas a espécie *Eisenia fetida*, onde os testes de mortalidades forma realizados em recipientes de vidro contendo 200g de solo, 20g de esterco, 10 minhocas e água suficiente para gerar um índice de umidade de 25%. Cada experimento foi realizado em duplicata e monitorado, respectivamente, após sete e quatorze dias, foram observadas as taxas de mortalidade. Durante todo o período de pesquisa, um experimento foi mantido com solo isento de contaminante, funcionando como grupo controle para eventuais comparações. Testes com foram efetuados de acordo com método Edwards (1983).

4. Resultados e Discussão

4.1. Avaliação das características do solo durante 9 meses

A Tabela 3 mostra os resultados de alguns dos parâmetros que foram avaliados durante os experimentos, sendo verificados modificações ao longo do tempo.

Tabela 3: Características do solo ao longo do tempo.

Parâmetro	Inicial	90 dias	180 dias	210 dias	240 dias
N (g/Kg)	0.35	0.36	0.3	0.29	0.27
P (g/kg)	0.075	0.06	0.05	0.04	0.04
Densidade de Partícula (g/L)	1.6	2.24	2.16	2.2	2.3
Densidade Aparente(g/L)	1.3	1.15	1.1	1.1	1.1
Porosidade (%)	18.7	48.6	49.1	50	52
PH	6.8	6.8	6.67	6.7	6.9
CLR ⁽²⁾ (%)	45	35	40	50	53

⁽²⁾ CRL = Capacidade de retenção líquida.

As fontes de nitrogênio e fósforo diminuiram ao longo do tempo, indicando que os microrganismos assimilaram estes elementos ao longo do tempo. A granulometria do solo indicou 75% de areia, 14% do silte e 11% de argila respectivamente, indicando que o solo é areno-argiloso conforme o diagrama proposto por Resende *et al.* (2002). Contudo, as relações entre as propriedades físicas e biológicas do solo são importantes para analisar o impacto ambiental do contaminante, sendo que neste trabalho foram analisadas algumas características como porosidade, DA, DP e a CRL. Solos com baixa porosidade são geralmente solos arenosos e solo com alta

porosidade são solos argilosos, no entanto, os baixos valores de porosidade e densidade de partícula são devido à contaminação com o óleo cru que dificultou os resultados aqui realizados. De acordo com Archer & Smith (1972), o valor ótimo de densidade aparente de solos é cerca de 1,2 g/L, porque acima deste valor há baixa permeabilidade e aeração, e esses fatores são importantes para o metabolismo aeróbico das bactéria no solo. Os resultados mostraram que houve aumento da porosidade e CRL, sendo observado diminuição dos valores de densidade aparente, atingindo características mais similares às de solo sem contaminação, sugerindo que houve a diminuição do petróleo ao longo do tempo.

4.2. Avaliação da remoção dos hidrocarbonetos totais ao longo do tempo.

A Figura 3 mostra os resultados de TPH durante nove meses, sendo observado redução gradual TPH ao longo do tempo com cerca de 0,94 de regressão linear. Após 9 meses foi observado uma remoção de 25% de TPH.

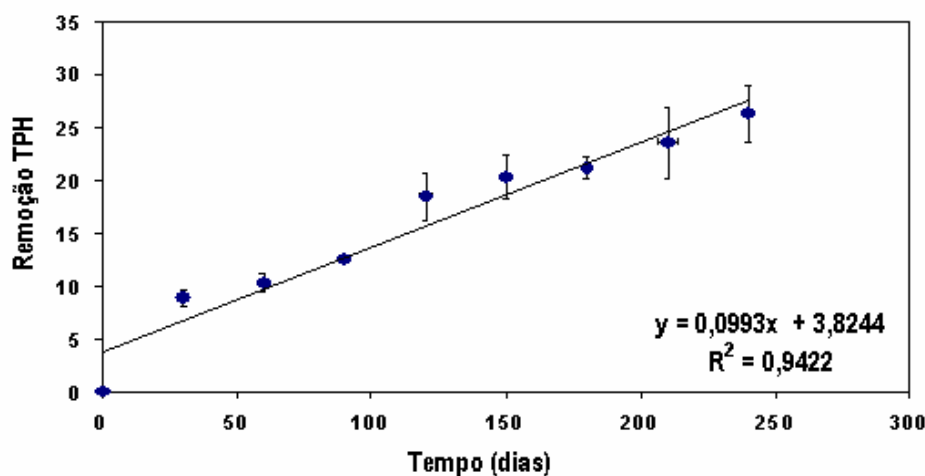


Figura 3: Remoção de TPH ao longo de 240 dias.

4.3. Avaliação da toxicidade ao longo do tempo

A atividade da desidrogenase do solo reflete a atividade microbiana no solo e pode ser utilizado como um bom indicador de toxicidade Garcia *et al.* (1997) o mesmo efeito foi observado com os microrganismos heterotróficos totais e os hidrocarbonoclasticos. A germinação de sementes com *Lactuca sativa* e mortalidade com *Eisenia fetida* são testes estabelecidos para avaliar a toxicidade do solo. Os resultados de toxicidade indicaram um aumento gradual da atividade ao longo do tempo, sendo que os testes de fitotoxicidade e mortalidade das minhocas indicaram logo após 90 dias de experimento houve diminuição desses resultados.

Tabela 4: População de microrganismos ecotoxicidade

Dias	BHT ⁽³⁾ UFC/g de solo	BH ⁽⁴⁾ Cel/g de solo	Atividade Desidrogenase	<i>Lactuca Sativa</i>	<i>Eisenia Fetida</i>
0	7,4 X 10 ⁶	6,2 X 10 ³	4,17 ± 0,94	65 ± 3,55	100
90	5,25 X 10 ⁶	1,7 X 10 ³	5,2 ± 0,78	87 ± 2,62	30
180	5,4 X 10 ⁷	2,3 X 10 ⁴	6,8 ± 1,26	94 ± 3,12	0
240	7,5 X 10 ⁷	3,2 X 10 ⁴	8,1 ± 2,2	95 ± 2,54	0

⁽³⁾ BHT = Bactérias heterotróficas totais ⁽⁴⁾ BH = bactérias hidrocarbonoclasticas

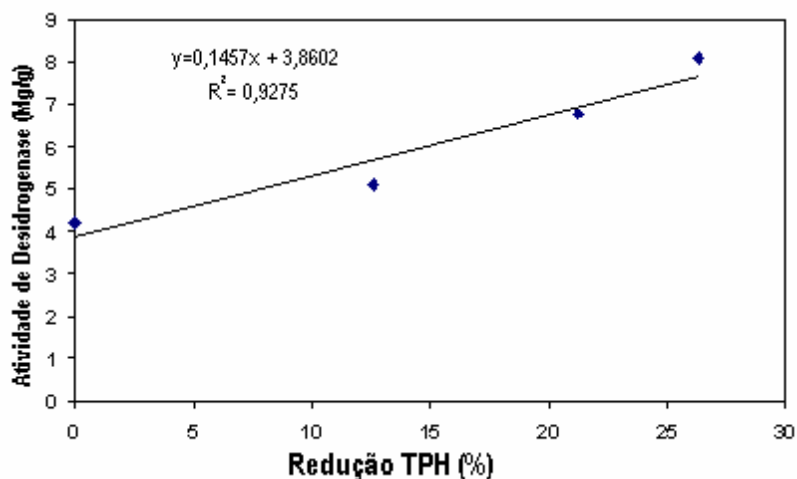


Figura 3: Relações entre atividade da desidrogenase e remoção TPH

A atividade de desidrogenase do solo tem sido recomendada como um indicador global da atividade microbiana dos mesmos. Entretanto, o conhecido que a contaminação do petróleo provoca mudanças significativas na população microbiana podendo-se correlacionar a biodegradação e a atividade enzimática do solo Song & Bartha (1990); Sextone *et al.* (1978). Neste trabalho foi observado que aumentou a remoção TPH, com o aumento da atividade desidrogenase com um coeficiente de correlação, em cerca de 0,92.

5. Conclusão

A atenuação natural é método de remediação potencialmente aceitável para o público do que outras tecnologias, e este pode reduzir os custos de tratamento de solos, entretanto, há a desvantagem do tempo ser muito longo para obter bons resultados de remoção. Neste trabalho, os processos de ANM indicam uma redução gradual do TPH, ao longo do tempo com 25% de remoção do óleo após 9 meses de experimentos. Em relação aos testes de ecotoxicidade observou-se que após 90 dias, o solo contaminado não foi nocivo para a germinação de alface e para a mortalidade das minhocas. Além desses resultados, observou-se uma relação linear com a remoção de TPH e o aumento da AD.

6. Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a Petrobrás/CENPES de fornecimento do petróleo cru e do solo. O CETEM (Centro de Tecnologia mineral), a EQ (Escola de Química), ANP (Agência Nacional de Petróleo) e o CNPq.

7. Referências

ALEF F, K. & Nnnnipiere, P. Methods unapplied soil microbiology and biochemistry. London: Academic Press. 576p. 1995.

BOSMA TNP, Middeldorp PJM, Schraa G & Zehnder AJB. Mass transfer limitation of biotransformation: quantifying bioavailability. *Environmental Science & Technology*, vol. 31(1), pp. 248-252. 1997.

DEUEL, L. E. e Holliday, G. H. Soil Remediation for the Petroleum Extraction Industry . PennWell, 2nd. Ed., TULSA, U.S.A., 242p.1997.

EDWARDS,C.A. Development of a Standardized Laboratory Method for Assessing the Toxicity of Chemical Substances to Earthworms, Report EUR 714 EN, Commission of the European Communities (1983).

EMBRAPA. Manual de Métodos de análise de solo. 2ª edição, Rio de Janeiro. 1997.

MILLIOLI, V. S. Avaliação da potencialidade da utilização surfactantes na biorremediação de solo contaminado com hidrocarboneto de petróleo Orientadores: Luiz Gonzaga Sobral e Denize Dias de Carvalho. Rio de Janeiro: UFRJ/CETEM, 2006.

MILLIOLI, V. S. Monitored natural attenuation for crude oil-bearing soil: evaluation of oil biodegradability and toxicity for long term contamination. *Con Soil* 2008.

MOURA, T. S.; SANTOS, R. M.; RIZZO, C. L. Simulação de um processo de atenuação natural de solo contaminado por petróleo. In: 29 Reunião anual SBQ – Águas de Lindóia / São Paulo – SP, Brasil, 2006.

NOBRE, M.M; NOBRE, R.C.; Remediação de solos: Técnicas alternativas melhoram desempenho. In: Química e Derivados, Edição de 417 de julho de 2003.

OBLINGER, J. L. e Koburger, J. A. Understanding and Teaching the Most Probable Number Technique. *Journal of Mik Food Technology*. 1975.

RESENDE, M. Curi, N. Resende, S.B. Corrêa, G.F. Pedologia – Base para distinção de ambientes. Viçosa: NEPUT, 2002. 338p.

SEXTONE, A.J., Everett, K., Jenkins, T., Atlas, R. Fate of crude and refined oils in north slope soils. *Arctic* , vol. 31, pp. 339-1978.

SILVA, J. A. M. Análise comparativa de dois surfactantes aniônicos para fins de biorremediação de solo contaminado com óleo cru. In: XV Jornada de Iniciação Científica (Pesquisa) – CETEM. Orientadora: Valéria Millioli.

SONG, H.G., Bartha, R. Effects of jet fuel on the microbial community of soil. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 56, pp. 646-651, 1990.

Yerushalmi, L. Rocheleau, S. Cimpioia, R. Sarrazin, M. Sunahara, G. Peisajovich, A. Leclair, G. Guiot, S.R. Enhanced biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated soil. *Bioremediation Journal*, vol 7, pp. 37-51, 2003.