



2º CONGRESSO BRASILEIRO DE P&D EM PETRÓLEO & GÁS

AVALIAÇÃO DA BIOESTIMULAÇÃO EM SOLOS ARGILOSOS CONTAMINADOS COM PETRÓLEO

Sandro J. Baptista¹, Magali C. Cammarota, Denize D. C. Freire²

Universidade Federal do Rio de Janeiro/Escola de Química/Departamento de Engenharia Bioquímica
Laboratório de Tecnologia Ambiental/Ilha do Fundão/Rio de Janeiro/RJ/Brazil – CEP 21.949-900

¹baptista@eq.ufrj.br, ²denize@eq.ufrj.br

Resumo – A bioestimulação é uma técnica usual que visa aumentar a atividade microbiana da população nativa do solo pela adição de nutrientes e/ou aceptores terminais de elétrons. O trabalho teve como objetivo inicial avaliar as relações carbono:nitrogênio:fósforo (C:N:P) que melhor contribuíssem para a biodegradação do óleo cru em biorreatores aeróbios de 50 mL. Nesta etapa, após 30 dias foi verificado que nos solos contaminados cuja concentração de fósforo adicionada foi 35 mg KH_2PO_4 /100g solo a eficiência de remoção de matéria orgânica (MO) foi de 35%, sem que fosse necessário adicionar nitrogênio. Além disto, foi verificado que elevadas concentrações de nitrogênio e fósforo propiciaram inibição da atividade microbiana, resultando em baixas remoções de MO. Na etapa seguinte, trabalhou-se com biorreatores aeróbios de 500 mL durante 45 dias, utilizando-se as melhores concentrações de fósforo obtidas na etapa anterior, com o propósito de avaliar a cinética do processo. Apesar dos ensaios indicarem a não necessidade de adicionar nitrogênio ao solo, trabalhou-se com uma concentração de 2,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /100 g. A eficiência de remoção de MO foi de 46%, de Óleos & Graxas (O&G) foi cerca de 38% e a eficiência de remoção de TPH (hidrocarbonetos totais de petróleo) ficou entre 30 e 45%.

Palavras-Chave: bioestimulação; óleo cru; nutrientes; solo argiloso

Abstract – Biostimulation has been used as a technic in order to increase the microbial activity adding inorganic nutrients and/or terminal electron acceptor in the contaminated place. The main goal of this work was evaluate how each inorganic nutrient could help the biodegradation at a given petroleum contaminated clay soil. At first, the work was designed to investigate the optimal relation between C:N:P that could influence the best organic matter removal (OMR) in aerobic bioreactors with 50 mL during 30 days. It was noticed that when one worked with 35 mg KH_2PO_4 /100g soil, without adding nitrogen source, the OMR was 35%. Furthermore, it was noticed that the highest concentration of nitrogen and phosphorus was a limiting factor for microbial degradation and this resulted in the lowest OMR. At second, it was designed in aerobic bioreactor with 500 mL for 45 days and worked with the optimal concentrations of added phosphorus from the last stage. Although the assays have focused that nitrogen was not necessary to add to the soil, it was worked with 2,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /100 g soil. The OMR was 46%, Oil & Grease removal was around 38% and TPH removal was around 45%.

Keywords: biostimulation; crude oil; inorganic nutrients; clay soil

1. Introdução

O derrame de hidrocarbonetos no mar vem causando problemas ambientais há décadas. No entanto, os problemas de contaminação não se restringem apenas aos derrames no mar, os solos também são afetados por vazamentos de oleodutos devido à falta de uma manutenção mais rigorosa dos mesmos. A necessidade de remediação desses ambientes contaminados tem estimulado o surgimento de técnicas que visam a eliminação dos poluentes.

Sendo assim, a biorremediação tem sido uma tecnologia alternativa de remediação de solos contaminados utilizada com o propósito de minimizar o efeito dos poluentes e até mesmo eliminá-los do ambiente afetado pelos vazamentos de óleo e derivado, através do uso de microrganismos (leveduras, fungos ou bactérias) (EPA, 1996). No entanto, quando necessário, deve-se promover algumas alterações ambientais a fim de se obter melhores remoções dos poluentes e estimular a atividade microbiana nativa, tais como: melhorar a aeração do solo, monitorar e corrigir a sua umidade, o seu pH e adicionar nutrientes. Tais alterações fazem parte da técnica utilizada na biorremediação denominada de bioestimulação. É evidente que existem outros fatores que podem influenciar na biorremediação do solo, como a temperatura do ambiente, o tipo de solo e o teor de materiais argilosos, o tipo e a concentração de poluentes e a concentração de microrganismos no local afetado.

Em muitos casos, o tratamento de solos contaminados com óleo cru tem envolvido a necessidade de bioestimulação dos microrganismos nativos (Cunningham e Philp, 2000). O nitrogênio e o fósforo são os nutrientes mais comumente utilizados na bioestimulação para favorecer o crescimento microbiano (Liebeg e Cutright, 1999). Estes nutrientes são considerados fatores limitantes para a degradação microbiana e, quando empregados em concentrações adequadas, podem estimular a biodegradação no solo (Zhou e Crawford, 1995).

O trabalho teve como objetivo inicial avaliar as relações carbono:nitrogênio:fósforo (C:N:P) que melhor contribuíssem para a biodegradação do óleo cru em biorreatores aeróbios de 50 mL e verificar como cada nutriente ((NH₄)₂SO₄ e KH₂PO₄) poderia influenciar a biodegradação de um solo, com características argilosas, contaminado com petróleo. Posteriormente, encontrada a melhor relação C:N:P, trabalhou-se com um biorreator aeróbio de 500 mL para se avaliar a cinética do processo.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostragem e Caracterização

O solo contaminado utilizado foi coletado em junho de 2000, de uma região do estado de Sergipe e serviu para estudos de outros trabalhos como de Borges (2001). Foram coletadas amostras em três pontos distintos da região contaminada a fim de se obter uma amostragem mais representativa do solo para este estudo. Essas amostras foram armazenadas a 4°C. A partir dos solos provenientes desses três pontos foi preparada uma amostra composta para se realizar a caracterização e os ensaios experimentais.

2.2. Ensaios de Biodegradabilidade

Os ensaios de biodegradabilidade foram realizados em duas etapas experimentais. A primeira foi realizada em microcosmos em três sub-etapas cujo propósito foi avaliar as relações C:N:P que melhor contribuíssem para a biodegradação do óleo cru. As sub-etapas foram: **SUB1** – trabalhou-se com a concentração natural de fósforo presente no solo e adicionou-se diferentes teores de nitrogênio de 5 a 30 g (NH₄)₂SO₄/100 g solo; **SUB2** - promoveu-se um planejamento experimental \mathcal{Z} , cujas variáveis independentes foram as concentrações de nitrogênio e de fósforo e a variável dependente foi o percentual de remoção de matéria orgânica. Sendo assim, trabalhou-se com diferentes teores de fósforo (20-50 mg KH₂PO₄/100 g solo) e de nitrogênio (0-5 g (NH₄)₂SO₄/100 g solo); **SUB3** - não houve adição de fonte de nitrogênio e variou-se somente a concentração de fósforo (35 a 80 mg KH₂PO₄/100 g solo). Nesta primeira etapa, trabalhou-se com 60 gramas de solo contaminado em biorreatores aeróbios de 50 mL, sob aeração constante de 6 L/h e a uma temperatura de 35°C, durante 30 dias. A **SUB1** foi realizada em triplicatas, enquanto as demais sub-etapas foram realizadas em duplicatas para garantir a reprodutibilidade dos ensaios. Na segunda etapa trabalhou-se com os teores de nutrientes segundo a melhor relação entre C:N:P obtida na etapa anterior. Foram realizados os ensaios em macrocosmos constituídos de biorreatores de coluna de 500 mL, contendo 300g de solo contaminado, sob a mesma taxa de aeração e a temperatura ambiente, durante 45 dias. Estes ensaios foram realizados em quadruplicatas (biorreatores **C1**, **C2**, **C3** e **C4**). É importante ressaltar que apesar da indicação da não adição de nitrogênio ao solo, ainda assim optou-se por trabalhar com uma concentração de 2,5 g (NH₄)₂SO₄/100 g solo, visando avaliar a biodegradação do óleo cru dentro da faixa anteriormente estudada na **SUB2**, e 35 mg KH₂PO₄/100 g solo.

Para se ter um melhor controle de umidade foi feita uma corrida experimental de perda de umidade ao longo de 7 dias nos ensaios em microcosmos, antes de se iniciar a primeira etapa. O mesmo foi feito nos ensaios em macrocosmos, no entanto o experimento teve uma duração de 22 dias. A dosagem do teor de umidade foi realizada diariamente.

2.3. Metodologias Analíticas

As metodologias analíticas empregadas vêm sendo desenvolvidas e adaptadas através de trabalhos realizados no Laboratório de Tecnologia Ambiental/EQ, visando uma padronização dos métodos aplicados a solos. Desta forma,

foram realizadas as seguintes análises nos ensaios em microcosmos: teor de matéria orgânica, teor de nitrogênio total e fósforo assimilável. Nos ensaios em macrocosmos foram realizadas as seguintes análises: a) teor de matéria orgânica a cada cinco dias; b) teor de Óleos & Graxas e TPH (hidrocarbonetos totais de petróleo) após 5, 25 e 45 dias; c) teor de nitrogênio total, fósforo assimilável e pH após 5, 15, 25, 35 e 45 dias; d) contagem microbiana (bactérias heterotróficas totais e bactérias hidrocarbonoclásticas) no início e após 45 dias.

O teor de matéria orgânica presente nas amostras de solo foi determinado de acordo com o método modificado de Walkey & Black descrito por Jaramillo (1996). Quanto ao teor de Óleos & Graxas (O&G) foi utilizada uma adaptação da metodologia descrita na seção 5520 D do Standard Methods e descrita por Millioli (2001). O teor de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) foi feito empregando-se uma extração a frio com solvente S-316 e leitura no infravermelho em equipamento OCMA-350 (Horiba).

A determinação do nitrogênio nas amostras de solo foi feita pelo método descrito por Jaramillo (1996). Esse método consiste em uma modificação do método de Kjeldahl para que a análise inclua os nitratos presentes. O teor de fósforo assimilável foi obtido segundo metodologia descrita por Jaramillo (1996), com algumas alterações, visando adequar a análise ao tipo de solo estudado (Pala, 2002). O pH do solo foi medido através do método potenciométrico descrito por Jaramillo (1996), utilizando-se medidor de pH (QUIMIS) previamente calibrado com solução tampão (pH 7,0 e 4,0).

A contagem de bactérias heterotróficas totais (BHT) foi feita segundo método do espalhamento em superfície e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama de solo (UFC/g). A contagem de bactérias hidrocarbonoclásticas (BHc) foi realizada segundo a técnica do Número Mais Provável (NMP) (Volpon *et al.*, 1997). Os resultados foram expressos em NMP/g de solo seco.

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização do Solo

Na caracterização do solo contaminado foram realizados os ensaios das características mais relevantes que poderiam influenciar na biodegradação do óleo. Na Tabela 1 são apresentadas algumas dessas características físico-químicas do solo. Baseando-se na relação C:N:P de 100:10:1 citada como ótima por alguns autores (Riser-Roberts, 1998), foi observado que a princípio seria necessário complementar os teores de nitrogênio e fósforo no solo, apesar de se verificar que o solo era rico em nitrogênio segundo metodologia descrita por Jaramillo (1996). Em relação ao pH do solo, verificou-se que este se encontrava próximo da neutralidade não sendo necessário o ajuste de pH nos ensaios de biodegradabilidade. Quanto à umidade, verificou-se que esta era elevada, o que poderia interferir nos ensaios de biodegradabilidade, impossibilitando uma boa aeração do solo.

Tabela 1: Caracterização do Solo Contaminado (*desvios referentes as duplicatas da amostra composta do solo)

Parâmetros	Valores*
Carbono (g/Kg)	44,77±0,01
Nitrogênio (g/Kg)	2,93±0,02
Fósforo (g/Kg)	0,006±0,001
Óleos & Graxas (g/Kg)	27,51±1,52
TPH (g/Kg)	9,74±0,09
pH	7,54±0,09
Umidade (%)	53,6±0,3

3.2. Ensaio de Biodegradabilidade

No monitoramento dos ensaios de biodegradabilidade em microcosmos na primeira sub-etapa (**SUB1**) descrita na seção 2.2, buscou-se verificar a influência de diferentes concentrações de nitrogênio sobre a atividade microbiana na degradação do óleo cru no solo. Verificou-se que o percentual de redução de nitrogênio variou de 50% em 5g (NH₄)₂SO₄/100g a 10% em 30g (NH₄)₂SO₄/100g no solo à medida que se aumentou a concentração de (NH₄)₂SO₄ e a eficiência de remoção de matéria orgânica ficou abaixo de 5% em todas as concentrações estudadas. Tal fato pode ser justificado, segundo Zhou e Crawford (1995), pois o excesso de adição de nitrogênio pode prejudicar a biodegradação, devido à toxicidade de íons amônio. A avaliação dos resultados desta etapa levou à verificação, na sub-etapa seguinte (**SUB2**), de qual teor de nitrogênio que não promoveria a inibição do processo de biodegradabilidade, sob diferentes concentrações de fósforo.

Na etapa **SUB2**, em microcosmos, o monitoramento dos ensaios de biodegradabilidade é apresentado na Figura 1. O monitoramento do ensaio foi realizado em função do teor de matéria orgânica (MO), de fósforo (P) e de nitrogênio (N) após 30 dias de incubação. Verificou-se, a partir dos dados apresentados nesta Figura, que quando se adicionou ao solo uma concentração de (NH₄)₂SO₄ de 5g/100g, a eficiência de remoção de nitrogênio aumentou cerca de 60%, enquanto as eficiências de remoções de matéria orgânica e de fósforo foram 16% e 71%, respectivamente. Os microrganismos, nesta concentração, provavelmente tenderam a consumir preferencialmente nitrogênio disponível no solo, consumindo assim pouca matéria orgânica. O oposto ocorreu quando não se adicionou nitrogênio ao solo e a concentração da fonte de fósforo (KH₂PO₄) foi de 50mg/100g, obtendo-se uma remoção de matéria orgânica de 26% e

de fósforo de 86%. Neste ensaio, a flora microbiana passou a consumir uma maior quantidade de matéria orgânica, pois os microrganismos provavelmente estariam sendo forçados a consumir somente o nitrogênio necessário para seu crescimento. O planejamento experimental 2^2 indicou que o fósforo era a principal variável independente nos ensaios realizados. Sendo assim, na terceira sub- etapa (**SUB3**), avaliou-se diferentes teores de fósforo para as melhores remoções de matéria orgânica.

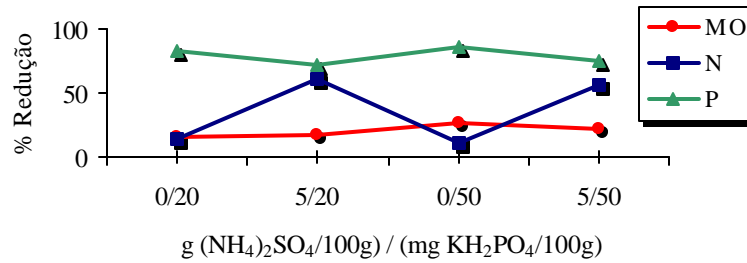


Figura 1: Redução de MO, N e P sob diferentes relações C:N:P após 30 dias.

Na etapa **SUB3**, foram realizados os mesmos procedimentos de monitoramento da **SUB2** para se acompanhar a biodegradabilidade do óleo cru no solo. Os resultados deste monitoramento encontram-se na Figura 2. Nesta sub- etapa, obteve-se melhores resultados quando o teor de fonte de fósforo foi de 35 mg/100g de solo, a remoção de matéria orgânica foi de 35%. É importante destacar que quando se trabalhou com maiores concentrações de fósforo, a remoção de matéria orgânica tendeu a cair, atingindo um valor de 19% para 80mg $\text{KH}_2\text{PO}_4/100\text{g}$ solo. Talvez isso tenha ocorrido devido à alteração de pH do solo pois, segundo Riser-Roberts (1998), a concentração de fósforo no solo pode afetar o seu pH e por conseguinte interferir na mineralização dos poluentes.

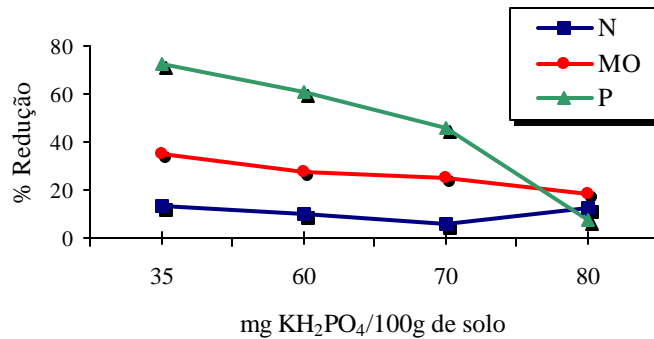


Figura 2: Redução de MO, N e P sob diferentes concentrações de KH_2PO_4 após 30 dias.

Os resultados do monitoramento dos ensaios de biodegradabilidade em macrocosmos encontram-se nas Figuras 3 a 5. A partir da Figura 3 pode-se verificar que no quinto dia de ensaio houve uma eficiência de remoção de matéria orgânica entre 15 e 20% e transcorridos os 45 dias esta ficou entre 40 e 46%. Além disto, pode-se verificar que entre o décimo quinto e o vigésimo quinto dia ocorreu uma oscilação na dosagem de matéria orgânica, visto que neste período houve uma variação muito intensa da temperatura ambiente, prejudicando assim o controle de umidade nos biorreatores. Nos biorreatores **C1** e **C3**, a partir do quadragésimo dia, a eficiência de remoção de MO tendeu a permanecer constante. Apesar de todos os reatores inicialmente apresentarem as mesmas concentrações de fonte de nitrogênio (2,5 g/100 g solo) e de fósforo (35 mg/100 g solo), pode-se verificar que a remoção de MO e de O&G não foram as mesmas para todos os ensaios. Tal fato pode ser devido a diferença de aeração ocorrida nos reatores, embora tenha-se realizado o controle da vazão de ar por rotâmetros.

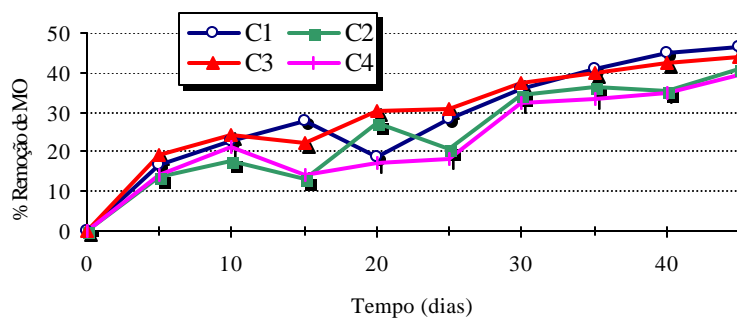


Figura 3: Percentual de remoção de MO ao longo de 45 dias de experimentos em macrocosmos.

Na Figura 4 são apresentados os resultados obtidos para a eficiência de remoção de O&G nos quatro biorreatores. Foi possível observar que em cinco dias de ensaio a eficiência de remoção de O&G ficou em torno de 20% e após 45 dias esta eficiência foi de 38% no biorreator **C1** e cerca de 30% em **C2**, **C3** e **C4**. A baixa eficiência de remoção de O&G nos biorreatores **C2** e **C4** após 45 dias pode ter sido efeito da queda do pH do solo, apesar do valor ótimo para mineralização de hidrocarbonetos se encontra na faixa entre 6,5 a 8,0. Os biorreatores **C2** e **C4** apresentaram inicialmente um pH 7,6 e 7,4, respectivamente, decaindo para 6,7. No vigésimo quinto dia os reatores **C2**, **C3** e **C4** ainda apresentavam baixa remoção de O&G, pois podem ter sido afetados pela perda de umidade, devido a oscilação da temperatura ambiente, prejudicando a atividade microbiana nestes reatores. Sabe-se que os microrganismos necessitam de uma quantidade satisfatória de água para auxiliar a degradação do óleo presente, visto que esta umidade favorece o movimento microbiano, o transporte de nutrientes e de contaminantes (Cunha, 1996).

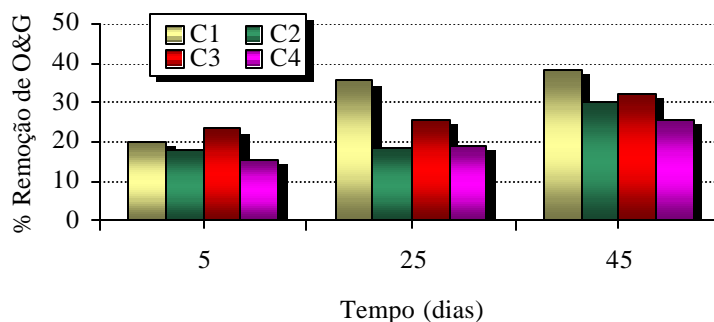


Figura 4: Percentual de remoção de O&G ao longo de 45 dias de experimentos em macrocosmos.

Na Figura 5 são apresentados os resultados obtidos para a remoção de TPH nos quatro biorreatores. Em **C1** e **C3** após cinco dias de ensaio a remoção de TPH ficou em torno de 22% e 23%, respectivamente, enquanto em **C2** e **C4** esta remoção foi aproximadamente de 18%. Após 45 dias de ensaios de biodegradabilidade a remoção de TPH foi cerca de 44% nos biorreatores **C1** e **C3**, enquanto em **C2** e **C4** esta remoção foi de 37% e 28%, respectivamente.

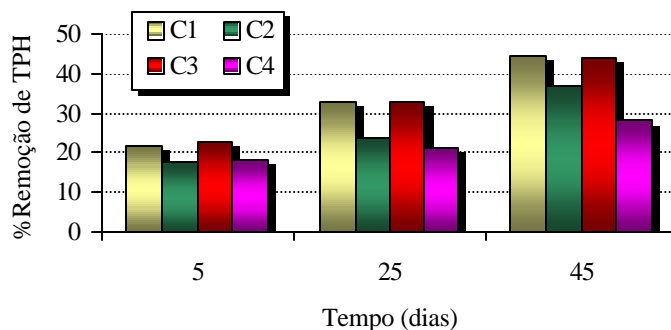


Figura 5: Percentual de remoção de TPH ao longo de 45 dias de experimentos em macrocosmos.

Quanto ao consumo de nitrogênio nos biorreatores em 45 dias, pôde-se verificar que o percentual de remoção foi aproximadamente de 11% em **C1**, 9% em **C3** e 6% em **C2** e **C4**. Em relação ao consumo de fósforo após 45 dias de ensaio o percentual de remoção ficou em torno de 18% em **C3**, 17% em **C1** e 13% em **C2** e **C4**. Estes resultados foram muito diferentes daqueles obtidos nos estudos preliminares (**SUB1**, **SUB2** e **SUB3**).

A contagem de bactérias heterotróficas totais (BHT) e de bactérias hidrocarbonoclasticas (BHC) da amostra composta antes dos ensaios de biodegradabilidade foi de $1,8 \cdot 10^6$ UFC/g de solo e de $1,5 \cdot 10^3$ NMP/g de solo, respectivamente. Após 45 dias de ensaios as BHT haviam crescido para $1,4 \cdot 10^7$, $1,8 \cdot 10^7$ e $1,2 \cdot 10^7$ UFC/g de solo em **C1**, **C2** e **C4**, respectivamente, enquanto em **C3** a contagem foi de $9,0 \cdot 10^6$ UFC/g de solo. Quanto à contagem de BHC em **C1** foi $7,9 \cdot 10^4$ e em **C3** foi $8,9 \cdot 10^4$ NMP/g de solo, enquanto em **C2** e **C4** foram contabilizados $5,2 \cdot 10^3$ e $4,8 \cdot 10^3$ NMP/g de solo, respectivamente.

6. Conclusões

Através dos ensaios preliminares (**SUB1**, **SUB2** e **SUB3**) foi possível verificar que nitrogênio e fósforo são fatores que podem realmente limitar a biodegradação do óleo cru presente no solo quando não são empregados dentro de uma relação C:N:P ideal para favorecer o crescimento microbiano. Estas relações podem não ser aquela comumente citada na literatura 100:10:1 e que vem sendo questionada por muitos autores. Verificou-se, ainda nestes ensaios, que o fósforo era uma variável fundamental para favorecer a biodegradação do óleo cru no solo contaminado, o que não foi percebido no trabalho de Borges (2001).

A bioestimulação pode ser utilizada como uma ferramenta a mais para auxiliar no tratamento de solos contaminados com petróleo. Porém, é evidente que se deve fazer um estudo preliminar de todas as possíveis fontes de nutrientes e de suas melhores relações C:N:P para favorecer a biodegradabilidade do petróleo no solo, visto que cada ambiente apresenta características e deficiências distintas, o que pode influenciar na disponibilidade destes nutrientes aos microrganismos.

7. Agradecimentos

Agradecimentos a Agência Nacional de Petróleo (ANP) pelo apoio incondicional dado a esta pesquisa e CNPq/CTPETRO, FINEP/PADCT e FUJB pelos auxílios prestados ao Laboratório de Tecnologia Ambiental (EQ/UFRJ).

8. Referências

- BORGES, R. M. H.. Biodegradação em solo argiloso contaminado com petróleo. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Brasil, 180p, 2001.
- CUNHA, C. D. Avaliação da biodegradação de gasolina em solo. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 97p, 1996.
- CUNNINGHAM, C. J., PHILP, J. C. Comparison of bioaugmentation and biostimulation in *ex situ* treatment of diesel contaminated soil. *Land Contamination & Reclamation*, v. 8, p. 261-269, 2000.
- EPA. A citizen's guide to bioremediation. EPA 542-F-96-007, p. 1-4, 1996.
- HORIBA – Instruction Manuel: Oil content analyzer OCMA-350.
- JARAMILO, I. R. Fundamentos teóricos-práticos de temas selectos de la ciencia del suelo. Universidad Autónoma Metropolitana, México, 1996.
- LIEBEG, E. W., CUTRIGHT, T. J. The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.44, p. 55-64, 1999.
- MILLIOLI, V. S. Tratamento de solo arenoso contaminado com petróleo por meio de oxidação química. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 122p, 2001.
- PALA, D. M. Estudo da biorremediação de solo impactado por petróleo. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, Brasil, 109p, 2002.
- RISER-ROBERTS, E. *Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical, and chemical processes*. Lewis Publishers, 1998.
- VOLPON, A. G. T., VITAL, R. L., CASELLA, R. C. Método NMP em microescala para contagem de microrganismos consumidores de hidrocarbonetos. *Comunicação Técnica SEBIO N.06/98*, 1997.
- ZHOU, E., CRAWFORD, R. L. Effects of oxygen, nitrogen and temperature on gasoline biodegradation in soil. *Biodegradation*, v. 6, p. 127-140, 1995.