

# AValiação DA BIODEGRADABILIDADE NO SOLO EM CASO DE DERRAMES DE BIODIESEL METÁLICO DE SOJA E SEBO BOVINO (B0, B5, B20 E B100)

Angélica Rech Tamborski<sup>1,e</sup>, Fátima Menezes Bento<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biodeterioração de Combustíveis e Biocidas

<sup>e</sup>tamborski.ar@gmail.com

## Introdução

A exposição do solo a diferentes fontes de poluição afeta sua qualidade, comprometendo suas funções ecológica e econômica. Dentre as fontes geradoras de poluentes, estão os postos de combustíveis, cujos tanques subterrâneos antigos podem sofrer corrosão interna e externa, liberando compostos que atingem não apenas o solo, mas também aquíferos.

Para recuperar essas áreas impactadas, pode-se realizar a biorremediação através de técnicas de baixo custo operacional, que promovem a mineralização dos contaminantes. Dentre as alternativas existente, estão as estratégias de monitoramento das condições do meio (atenuação natural), de correção nutricional do solo (bioestimulação) e de incorporação de microrganismos degradadores no solo (bioaugmentação). Porém, pouco se sabe em relação aos efeitos do manejo do solo antes da realização do tratamento.

Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi: 1) selecionar microrganismos autóctones potencialmente degradadores em solo contaminado com B5 e de 2) comparar duas estratégias de manejo e de armazenamento do solo, de maneira a avaliar a influência de parâmetros pré-tratamento de secagem e peneiramento (**solo 1** – secagem à 25° ± 5°C e peneiramento em malha de 3mm; **solo 2** – acondicionamento a 4°C, sem submissão ao peneiramento) no resultado das três técnicas de biorremediação citadas: atenuação natural, bioestimulação e bioaugmentação.

## Materiais e Métodos

O solo contaminado, obtido em um posto de combustíveis localizado na zona Sul de Porto Alegre, foi retirado de camada subterrânea com cerca de 4m profundidade, abaixo de antigos tanques corroídos de armazenamento de biodiesel B5. A amostra foi dividida em sacos plásticos em dois lotes para serem submetidos a diferentes sistemas de manipulação e armazenamento: um foi peneirado em malha de 3mm e mantido sob temperatura ambiente (25 ± 5°C) durante 10 dias e o outro apenas acondicionado a 4°C.

A partir de combustíveis obtidos da Companhia Ipiranga de Petróleo S.A. (B0 e B100) foi preparada e esterilizada a mistura diesel/biodiesel 5% (B5), para utilização nos ensaios de bioprospecção de microrganismos em meio líquido. Para tanto, foram adicionados 10% de amostra de solo em frascos contendo 1% de combustível (B0, B5 ou B100) e meio mineral estéril, em incubação sob agitação em temperatura a 30°C. Aliquotas de 10mL da cultura foram transferidas a cada 7 dias para novo sistema de mesma composição. Depois de 21 dias, foram plaqueadas diluições seriadas em meio enriquecido (PCA). Após 24h de crescimento a 30°C, colônias isoladas que apresentavam diferenças morfológicas foram purificadas e armazenadas a 4°C.

Para a seleção de microrganismos isolados com potencial biodegradador, foi realizado ensaio preliminar (de acordo com Hanson et al. 1993) em placas de poliestireno estéreis de 96 poços, contendo 240uL meio mineral e o indicador redox cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), 10uL do microrganismo de interesse, padronizado para 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, e 10uL do combustível a ser testado (B0, B5 ou B100), como única fonte de carbono. Os isolados foram previamente submetidos a um período de 24h de esgotamento das reservas energéticas. A incubação ocorreu por 7 dias a 30°C e os resultados foram verificados pela análise visual da mudança de coloração do meio, como indicativo da redução do TTC a trifenil formazan (TPF). Os ensaios de controle negativo foram realizados sem o combustível.

Foram aplicadas três estratégias de biorremediação: 1) atenuação natural – AN; 2) bioestimulação – BS; 3) bioaugmentação – adição de consórcio microbiano pré-estabelecido no ensaio com o indicador redox – BA. Todos os tratamentos tiveram correção da umidade do solo para 20% e nos tra-

tamentos 2 e 3 foram adicionados Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9.9g L<sup>-1</sup>; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 359.5g L<sup>-1</sup> e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 44.1g L<sup>-1</sup>.

A avaliação das diferentes estratégias de biorremediação foi realizada através do acompanhamento da produção microbiana de CO<sub>2</sub>. Para isso, foram montados microcosmos contendo amostras de 300g de solo, em quadruplicatas, mantidos em frascos de vidro de 2L hermeticamente fechados, a 25 ± 5°C. Durante 34 dias o CO<sub>2</sub> foi capturado em 10mL de solução de NaOH (1M), localizada em recipiente plástico no interior dos frascos, sendo periodicamente substituído para evitar saturação. A quantidade de CO<sub>2</sub> absorvida pela solução foi estabelecida por titulação do NaOH residual, após adição de 5 gotas de BaCl<sub>2</sub> 35% com solução de HCl 5M. Durante esse procedimento, os sistemas passavam por aeração mecânica durante 1min. As quantificações foram realizadas nos dias 1, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 16, 19, 24 e 34 do período experimental. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste post hoc de Tuckey com p<0,005.

## Resultados e Discussão

Através do teste prévio de biodegradabilidade de óleo com o indicador redox foram selecionados os quatro isolados que promoveram alteração da coloração do meio em menor espaço de tempo, sugerindo a ocorrência de transferência de elétrons para o TTC devido à oxidação dos hidrocarbonetos. Pela técnica de quantificação de CO<sub>2</sub> liberado, que é proporcional ao grau de mineralização dos compostos do substrato, observou-se que para o tratamento de AN, a produção de CO<sub>2</sub> foi maior no solo 2, em que a amostra não foi submetida a quaisquer pré-tratamentos (Fig. 1A), enquanto que no emprego da BA verificou-se uma evolução superior de CO<sub>2</sub> no solo pré-tratado, sugerindo que a secagem tenha afetado a microbiota indígena, facilitando a ação dos degradadores introduzidos devido à falta de competidores (Fig. 1B). No uso da estratégia BS não foi observada diferença significativa (dados não apresentados).

Verificou-se estabilização nas taxas de liberação de CO<sub>2</sub> após a primeira semana, sugerindo redução na disponibilidade de fontes lábeis de carbono. Outra possibilidade é de ter ocorrido uma diminuição no crescimento da população devido à liberação de compostos tóxicos resultantes do processo de degradação, provenientes do metabolismo microbiano ou mesmo da degradação incompleta de contaminantes.

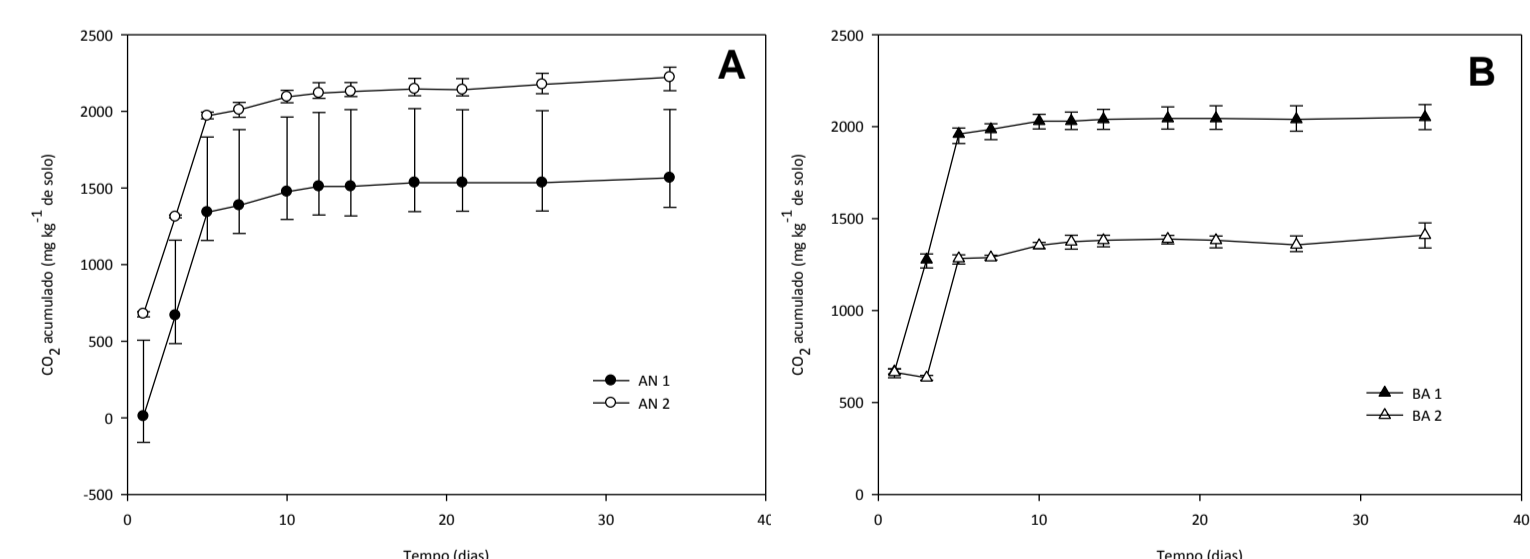


Fig. 1: Produção cumulativa de CO<sub>2</sub> para os solos 1 – armazenagem a 25°C e peneiramento em malha de 3mm, e 2 – armazenagem a 4°C sem peneiramento nas técnicas de (A) atenuação natural - AN e (B) bioaugmentação - BA.

## Conclusões

Considerando-se os resultados observados em relação ao manejo do solo antes da biorremediação, conclui-se que os efeitos podem variar, dependendo da estratégia utilizada. Estudos subsequentes são necessários para que se possa ampliar os conhecimentos a respeito da maneira mais apropriada de armazenar e manejar o solo contaminado.

## Referência

Hanson, K.G.; Desai, J.D.; Desai, A.J. 1993. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology Techniques*, 7, 745-748.