

BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM ÓLEO CRU: AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DE RAMNOLIPÍDIO QUANTO À TOXICIDADE E A EFICIÊNCIA DE BIODEGRADAÇÃO

Valéria Souza Millioli¹, Eliana Flávia C. Sérvulo Luiz Gonzaga Santos Sobral (CETEM/ MCT – Centro de Tecnologia Mineral), Denize Dias de Carvalho (EQ/UFRJ))

¹ Escola de Química/ UFRJ , vmillioli@cetem.gov.br

A biodegradação dos hidrocarbonetos em solo ocorre num sistema multifásico envolvendo gases, material orgânico insolúvel em água, sais dissolvidos e microrganismos, sendo que a variada composição dos constituintes do petróleo interfere na atividade dos microrganismos no solo, já que alguns hidrocarbonetos são considerados insolúveis em meios aquosos e quanto menor a solubilidade, menor a disponibilidade desses compostos para a ação dos microrganismos, ocasionando menor taxa de biodegradabilidade. Diversos são os fatores que influenciam na sorção dos hidrocarbonetos no solo como o tipo e concentração de solutos, tipo e quantidades de materiais argilosos no solo, pH, temperatura etc., entretanto, a utilização de um biossurfatante do tipo ramnolipídio auxilia na dessorção de compostos hidrofóbicos presentes no solo, disponibilizando-os para intensificar a ação dos microrganismos, aumentando, dessa forma, a eficiência de biodegradação do óleo cru. Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a potencialidade da adição de um biossurfatante do tipo ramnolipídio em solo contaminado com óleo cru, através de ensaios de toxicidade e biodegradabilidade, verificando-se diferentes concentrações de ramnolipídio que variaram de 0,1 a 1,5g de ramnolipídio para cada 100g de solo. Para avaliar a toxicidade, foram feitos testes de atividade desidrogenásica e de germinação de semente, utilizando a espécie *Lactuca sativa* em solo. Para os ensaios de biodegradabilidade foram utilizados biorreatores constituídos de 20 cm de altura e 5 cm de diâmetro, sendo utilizado 15 cm de leito de solo com 450 g de solo contaminado e 3 cm de camada de brita, ocupando 90% do biorreator. Os ensaios foram mantidos à temperatura ambiente, sendo empregada uma vazão de ar de 3L/h de ar úmido. Os nutrientes foram corrigidos através da adição de nitrato de amônio (NH_4NO_3) e fosfato de potássio dibásico (KH_2PO_4), numa relação nutricional de C:N:P = 100:15:1, cuja umidade foi ajustada em 50% da capacidade de retenção de líquido. Além das diferentes concentrações de ramnolipídio, um experimento controle, sem adição do mesmo, também foi avaliado. Os ensaios de biodegradabilidade ocorreram num período de 45 dias e foram analisados quanto à remoção de óleos e graxas (O&G). Ao término dos ensaios de biodegradabilidade foi verificado que houve cerca de 50% de remoção de O&G quando foram adicionados 0,4 e 0,6% de ramnolipídio ao solo contaminado com óleo cru. As adições de ramnolipídio nas concentrações 1,0 e 1,5% foram tóxicas à germinação das sementes e concomitantemente estas concentrações pouco ajudaram na eficiência de biodegradação do óleo cru.

palavra-chave: Biorremediação, toxicidade, biossurfatante, solo, petróleo.

1. INTRODUÇÃO

Apesar das indústrias de petróleo estarem cada vez mais cuidadosas no que diz respeito à preservação do meio ambiente, há ainda riscos de acidentes ambientais seja por transporte marinho ou rompimento de oleodutos, causando impacto negativo em todo ecossistema local. Quando estes acidentes ocorrem, há diversas técnicas que podem ser aplicadas para minimizar os impactos do óleo cru sobre o meio ambiente. Dentre as tecnologias desenvolvidas, destaca-se a biorremediação que é uma técnica que se baseia na propriedade que os microrganismos têm de metabolizar os hidrocarbonetos e outros compostos encontrados no óleo cru que representam uma fonte de energia para as bactérias. Quando as bactérias consomem o óleo, convertem-no em produtos mais solúveis, formando, quando a conversão é completa, CO_2 e H_2O . Entretanto, a biorremediação de solos impactados com óleo cru, sofre algumas limitações, dependendo das características e propriedades do solo contaminado. Solos muito argilosos dificultam a biodegradação do óleo cru, tendo em vista que quanto maior a fração orgânica do solo, maior a sorção e menor a disponibilidade dos hidrocarbonetos para a ação microbiana. Uma possibilidade de se aumentar a disponibilidade destes hidrocarbonetos para que se possa configurar a ação microbiana seria a aplicação de biossurfactantes. Os efeitos positivos mais conhecidos do uso de biossurfactantes, visando o aumento da biodegradação do óleo cru são o aumento da solubilidade dos hidrocarbonetos; dessorção dos hidrocarbonetos sorvidos no solo e a difusão facilitada dos hidrocarbonetos da fase sólida para a fase líquida, aumentando, assim, a disponibilidade do óleo para ação dos microrganismos. Entretanto, é indispensável um estudo mais aprofundado da aplicabilidade de biossurfactantes para fins de estímulo a biorremediação, quanto à toxicidade e concentração ótima a ser utilizada, tendo como objetivo principal baixo impacto ambiental. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar uma concentração ótima de biossurfactante a ser adicionada ao solo, visando maior biodegradabilidade e menor impacto ambiental.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Biossurfactantes

Os biossurfactantes são classificados de acordo com sua composição química e sua origem microbiana e são produtos metabólicos de bactérias e fungos. Essas biomoléculas são principalmente produzidas pelo crescimento aeróbico de microrganismos em meio aquoso contendo como fonte de carbono os carboidratos, hidrocarbonetos ou misturas destes. Em geral, os biossurfactantes são neutros ou aniônicos, variando desde pequenos ácidos graxos até grandes polímeros. São moléculas anfipáticas que possuem um grupo polar (hidrofílico) e um grupo apolar (hidrofóbico) e devido a esta estrutura, tendem a interagirem entre si formando agregados denominados de micelas. Normalmente, o grupo hidrofóbico é formado por hidrocarbonetos com 10 a 18 átomos de carbono, sendo que a parte hidrofílica é bastante diversificada, podendo ser um carboidrato, éster, hidroxila, fosfato ou grupo carboxílico (BOGNOLO, 1999). Possuem melhores propriedades que muitos surfatantes químicos, tendo em vista que geralmente possuem baixos valores de CMC (Concentração Micelar Crítica) e tensão interfacial na solução aquosa (BANAT, 1995). Além da propriedade de possuir baixos valores de CMC, destacam-se outras propriedades como tolerância à temperatura e pH (BOGNOLO, 1999); Força Iônica: os biossurfactantes não são precipitados ou saturados em soluções salinas acima de 10%, enquanto 2-3% de sal são suficientes para desativar os surfatantes químicos (LIN, 1996; BOGNOLO, 1999); Alto índice de emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água (WEST & HARWELL, 1992; NITSCHKE & PASTORE, 2002); Alta biodegradabilidade e baixa toxicidade (NITSCHKE & PASTORE, 2002; MULLIGAN *et al.*, 2005).

2.2 - Efeito da adição de biossurfactante na degradação de xenobióticos sorvidos no solo.

Como dito anteriormente, a etapa limitante na biorremediação é o baixo nível de disponibilidade de certos hidrocarbonetos, seja por estarem sorvidos na matriz do solo ou por possuírem baixa solubilidade em sistemas aquosos, ambos impeditivos ao ataque microbiano. Entretanto, os biossurfactantes podem auxiliar na biodisponibilidade através da dessorção do óleo cru sorvido no solo e pelo aumento da solubilidade dos mesmos (MORAN *et al.*, 2000; OU, 2000). A seguir serão relatados alguns experimentos com utilização de surfatantes e/ou biossurfactante para aumentar a taxa de biodegradação do óleo sorvido no solo.

ROBINSON *et al.* (1996) estudaram a aplicação de um ramnolípido usando 4g/L deste biossurfactante, obtendo-se a mineralização do 4,4-clorobifenil (cerca de 213 vezes maior que o controle). DESCHÊNES *et al.* (1996) avaliaram o efeito de 2 surfatantes (um químico e um biológico) num solo contaminado por um longo período por hidrocarbonetos totais de petróleo (HPAs). O surfatante químico era o SDS e o biológico era produzido por *Pseudomonas aeruginosa*. Os surfatantes foram adicionados ao solo a cada 2 semanas numa concentração de 10, 100 e 500mg/g de solo. Após 45 dias de ensaios de biodegradação, os autores observaram que os HPAs com 3 anéis foram quase que totalmente biodegradados quando utilizaram o dodecil sulfato de sódio (SDS). Para os HPAs acima de 4 anéis foi sugerida a degradação preferencial dos surfatantes já que não foi observado diminuição na biodegradação dos HPAs. MAYER & CHAVEZ (2000) verificaram que a adição de

um ramnolipídio pôde aumentar a biodegradação de hexadecano, octadecano, n-parafinas e fenantreno em sistemas líquidos e a biodegradação do hexadecano, tetradecano, pristino e misturas de hidrocarbonetos em solo. NOORMAM *et al.* (2002) estudaram os efeitos do ramnolipídio e observaram que estes foram úteis quando a taxa de biodegradação era limitada. Por exemplo, no caso de solo com tamanho do poro pequeno (6nm), o hexadecano estava aderido ao solo e sua disponibilidade era limitada. A adição do ramnolipídio liberou o substrato e o contaminante para intensificar a ação dos microrganismos.

Ultimamente, os surfatantes e/ou biossurfatantes vêm sendo muito utilizados na biorremediação de solos impactados por óleo cru para disponibilizar os hidrocarbonetos para ação dos microrganismos. Entretanto, as interações entre surfatantes e óleo cru; surfatantes e os componentes do solo e entre surfatantes e os microrganismos do solo devem ser bem investigadas, sendo que a investigação da toxicidade dos surfatantes em solos é extremamente importante para prever o impacto da adição dos mesmos ao meio ambiente. A seguir serão descritos alguns testes que podem ser aplicados, visando um estudo da toxicidade desses compostos em solo.

2.3 - Toxicidade

Bioensaios de ecotoxicidade são metodologias analíticas que permitem caracterizar a toxicidade de substâncias químicas em geral. A exposição de organismos vivos (bioindicadores) a estas substâncias é uma ferramenta valiosa de análise ambiental. Para testes de toxicidade em solo, as interações entre os compostos químicos e o solo devem ser levadas em consideração para prever corretamente o impacto químico no ambiente. O solo é um componente-chave do meio ambiente e, dependendo do tipo de minerais, matéria orgânica, pH, potencial redox, umidade e manejo do solo, os contaminantes podem ser adsorvidos ou liberados, tendo efeitos tóxicos diferentes. Os testes de toxicidade podem ser classificados de acordo com o tempo de exposição (agudo ou crônico), o modo do efeito (morte, crescimento, reprodução) ou a resposta do efeito (letal ou sub-letal) (KAPANEN & ITAVAARA, 2001). A seguir serão descritos os testes de toxicidade estudados no presente trabalho.

2.3.1 – Testes enzimáticos

A atividade enzimática pode ser utilizada para descrever os efeitos de compostos tóxicos sobre a população microbiológica do solo. As enzimas usadas na atividade microbiológica do solo são as hidrolases (fosfatases e ureases) e as oxidoredutases (desidrogenases) (RATSEP, 1991). A determinação da atividade desidrogenásica é o método mais comum utilizado para testes de toxicidade enzimática e é o método baseado na estimativa da taxa de redução de TTC (trifeniletrazilium clorídrico) a TPF (trifenil formazan) nos solos após incubação a 30°C por 24 h. O TTC funciona comoceptor final de elétrons, sendo, portanto, um dos métodos mais frequentemente usado para tal estimativa (BITTON & KOOPMAN, 1992).

2.3.2 – Fitotoxicidade

Plantas sensíveis a substâncias tóxicas podem ser utilizadas como bioindicadores. De acordo FLETCHER (1991), os testes com plantas podem ser utilizados em 5 categorias diferentes:

1) - Biotransformação: transformação de compostos causados pelas plantas; 2) - Captação de cadeia alimentar: quantidade e concentração de elementos tóxicos que podem entrar na cadeia alimentar através da captação das plantas; 3) - Sentinela: monitoramento de poluentes observando os sintomas de toxicidade exibidos pelas plantas; 4) - Indicadoras: certas plantas que indicam as características do solo, tanto físicas, quanto químicas; 5) - Fitotoxicidade: dentre esses testes, o de fitotoxicidade tem recebido maior atenção nos últimos anos.

A fitotoxicidade pode ser determinada pela germinação das sementes, alongamento da raiz e crescimento da muda. A Tabela 1 mostra algumas espécies recomendadas pela A OECD (1984b); USEPA e FDA (FLETCHER, 1991).

Tabela 1: Espécies recomendadas pela OECD (1984b), USEPA e FDA (FLETCHER, 1991)

Nome comum	Espécie		Nome comum	Espécie		Nome comum	Espécie
Azevém	<i>Lolium perene</i>		Rabanete	<i>Raphanus sativus</i>		Cenoura	<i>Daucus carota</i>
Arroz	<i>Oryza sativa</i>		Nabo	<i>Brassica rapa</i>		Soja	<i>Glycine Max</i>
Aveia	<i>Avena sativa</i>		Repolho	<i>Brassica campestris</i>		Milho	<i>Zea mays</i>
Tomate	<i>Lycopersicon</i>		Feijão	<i>Phaseolus aureus</i>		Cebola	<i>Allium cepa</i>
Sorgo	<i>Sorghum</i>		Alface	<i>Lactuca sativa</i>		Trigo	<i>Triticum</i>

Através da revisão bibliográfica foi possível avaliar que para solos com alto teor de argila e contaminados com altas concentrações de compostos hidrofóbicos, a técnica de biorremediação sofre limitações, tendo em vista que estes compostos, por estarem sorvidos na matriz do solo, estão pouco disponíveis para ação dos microrganismos (BANAT, 1995; DESCHÊNES *et al.* 1996; LIN, 1996; BOGNOLLO, 1999; MAYER & CHAVEZ, 2000; MORAN *et al.*, 2000; OU, 2000; NITSCHKE & PASTORE, 2002; NOORMAM *et al.* 2002; MULLIGAN *et al.*, 2005). Dessa forma, muitos estudos vêm demonstrando que a adição de surfatantes e/ou biossurfatantes auxiliam a técnica de biorremediação aumentando a disponibilidade dos hidrocarbonetos para iniciar o ataque dos microrganismos presentes no solo. Contudo, as interações entre surfatantes e óleo cru; surfatantes e os componentes do solo e entre surfatantes e os microrganismos do solo devem ser bem investigadas, sendo que a investigação quanto à toxicidade dos surfatantes em solos é extremamente importante para prever o impacto da adição dos mesmos ao meio ambiente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Solo

Neste trabalho foi utilizado um solo da região Nordeste do Brasil. Este solo foi homogeneizado, peneirado e quarteadado, sendo contaminado em laboratório com 5% de óleo cru. As características químicas, físicas e biológicas do solo encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2: Características do solo

	SOLO			SOLO	
Parâmetro	Virgem	Contaminado	Parâmetro	Virgem	Contaminado
N (g/kg)	0,2	0,2	Dens. da Partícula (g/mL)	2,2	1,5
P (g/kg)	0,1	0,075	Densidade Aparente	1,3	1,2
Silte ⁽¹⁾	14%	—	Porosidade (%)	43	16,5
Areia ⁽¹⁾	75%	—	Matéria orgânica (%)	4	9,2
Argila ⁽¹⁾	11%	—	pH	6,8	6,4
C orgânico (%)	2,3	5,3	CRL ⁽²⁾ (%)	34	28
MHT ⁽³⁾ (UFC/g)	9,8 X10 ⁶	2,3 X10 ⁶	MH ⁽⁴⁾ (cel/g)	2,8 X10 ⁴	2,1 X10 ⁴

⁽¹⁾ Resultados cedidos pelo laboratório de geotecnia ambiental da COPPE.

⁽²⁾ CRL = Capacidade de retenção de líquido

⁽³⁾ MHT = Microrganismos heterotróficos totais

⁽⁴⁾ MH = Microrganismos hidrocarbonoclasticos

3.2 – Óleo cru

O óleo cru foi cedido pela PETROBRAS/CENPES, sendo classificado como parafínico. Este óleo possui baixos teores de N e S, conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3: características do óleo cru

Componentes	Teor (%)
Enxofre	0,44%
Carbono	86,2%
Hidrogênio	12,3%
Nitrogênio	< 0,3% ⁽¹⁾

⁽¹⁾ (Abaixo do limite de detecção)

3.3 – Biossurfatante

O biossurfatante utilizado nos ensaios é do tipo ramnolipídio que é amplamente utilizado como auxiliar no processo de biorremediação (NOORDMAN *et al.* 2002; NITSCHKE & PASTORE, 2002; MULLIGAN *et al.* 2005). Este biossurfatante é concentrado com apenas 10% de ramnolipídio e não sofreu processos de

purificação. É denominado de JBR 210, sendo comercializado pela empresa JENEIL Company localizada nos Estados Unidos e Alemanha.

3.4 – Teste de ecotoxicidade

3.4.1 - Verificação da atividade desidrogenásica através de diferentes concentrações do biossurfatante ao solo

Muitas variações desta técnica têm sido testadas e estes testes foram baseados no método descrito por ALEF & NANNIPIERI (1995), com algumas adaptações. As amostras de solo virgem foram contaminadas com 0,1 a 1,5% de ingrediente ativo para cada 100g de solo. Após a adição de diferentes concentrações do ingrediente ativo foram retiradas 5g de cada diferente concentração, adicionando-se 5 mL de solução contendo 1,5% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC). Estes ensaios foram conduzidos em quintuplicata e permaneceram incubados por 24 h em estufa a cerca de 30°C. O TPF (trifenil formazan) foi extraído em 40 mL de Metanol, sendo filtrado em papel de filtro de filtração lenta, realizando-se a leitura em espectrofotômetro na faixa de 485 nm. A Curva de Calibração trifenil formazan (TPF) foi preparada uma solução estoque a partir da dissolução 0,1 g de TPF em 80 mL de metanol, avolumados em 100 mL de água. Foram feitas diluições desta solução padrão variando de 0,0002 a 0,01 mg/mL e lidas no espectrofotômetro SMART SPECTRO (La Motte) num comprimento de onda de 485 nm.

3.4.2. – Fitotoxicidade

3.4.2.1 – Teste de germinação

O método de germinação e crescimento das raízes, sugerido por YERUSHALMI *et al.* (2003) foi aplicado utilizando-se sementes de alface da espécie *Lactuca sativa*. O solo foi contaminado com diferentes concentrações de ramnolipídio que variaram de 0,1 a 1,5% para cada 100g de solo. O extrato das amostras de solo com diferentes concentrações do biossurfactante foi colocado em placas de Petri, sendo distribuído 10 sementes de *L. sativa*, igualmente espaçadas. As placas foram colocadas em estufa a 24°C, aplicando-se um tempo de incubação de 120h. Após este tempo, contou-se o número de sementes germinadas e fez-se a medida do comprimento das raízes do ponto de transição entre o hipocótilo até a extremidade da raiz. Uma das maneiras mais utilizadas de se caracterizar o composto segundo sua fitotoxicidade, é através do cálculo do índice de germinação. O índice de germinação (%IG) pode ser calculado através da seguinte fórmula:

$\%IG = (\% \text{ germinação das sementes}) \times (\% \text{ crescimento das raízes}): 100$

Onde: % Germinação de sementes = $(\% \text{ germinação no extrato}): (\% \text{ germinação no controle}) \times 100$

% Crescimento das raízes = $(\text{média de crescimento no extrato}): (\text{média de crescimento no controle}) \times 100$

3.5 - Ensaios de biodegradação de solo mediada por adição do biossurfatante em biorreator

Os experimentos foram realizados em biorreatores constituídos de 20cm de altura e 5cm de diâmetro, sendo utilizado 15cm de leito de solo e 3cm de camada de brita, ocupando 90% do biorreator. Os ensaios foram mantidos à temperatura ambiente, empregando-se uma vazão de ar de 3L/h de ar úmido conforme estabelecido por PALA (2002) em ensaios anteriores. A Figura 4 mostra o esquema de montagem dos ensaios de biodegradação. Os ensaios foram realizados pela adição de diferentes concentrações do biossurfactantes que variaram de 0,1 a 1,5% p/p (g de ramnolipídio por 100g de solo). Os nutrientes foram corrigidos através da adição de nitrato de amônio (NH_4NO_3) e fosfato de potássio dibásico (KH_2PO_4), empregando-se uma relação nutricional de C:N:P = 100:15:1, conforme estabelecido em ensaios anteriores (OLIVEIRA, 2005). Os ensaios foram conduzidos em 45 dias, sendo retirado amostras a cada 15 dias para determinação de Óleos e Graxas (O&G), pH e população microbiana. Durante o período experimental a umidade foi controlada através de balança termogravimétrica.



Figura 4 - Representação esquemática do biorreator aeróbico de Leito fixo.

3.6 – Metodologias analíticas

3.6.1 – Determinação de óleos e graxas

Empregou-se o método descrito pelo Standard Methods (APHA, 1992), adaptado para a amostra de solo. A metodologia consistiu na separação de O&G a partir de uma determinada massa do solo (~ 2g). A extração foi conduzida com hexano, por 4 horas a uma velocidade de 20 ciclos por hora. Após este período, os extratos foram concentrados em rotoevaporador e, transferidos para tubos com diâmetro de 1cm, sendo o resíduo concentrado em purga de nitrogênio e banho à 45°C até a secura, conforme descrito por RIZZO e RAIMUNDO (2003). Após a concentração dos extratos estes foram pesados e, por gravimetria, determinou-se o teor de óleos e graxas de cada amostra.

3.6.2 – Quantificação da população microbiana

A quantificação da população microbiana heterotrófica total foi feita a partir do plaqueamento (em duplicata) em meio orgânico sólido (TSA – Tryptic Soy Agar), pela técnica de Pour Plate. Foram adicionados 5 g de solo em 50 mL de solução salina (NaCl 0,85 %) e fez-se a agitação da suspensão em shaker por 1h a 30 °C. Após agitação foi feito o plaqueamento, adicionando 0,2 mL de diluição da suspensão salina nas placas. Incubou-se por 48 horas a 30 °C e contou-se o número de unidades formadoras de colônias (resultado expresso em UFC/ g de solo).

A quantificação da população microbiana degradadora foi feita pela técnica do Número Mais Provável (NMP) de acordo com OBLINGER & KOBURGER (1975). O meio mineral líquido obtido de acordo com VECCHIOLI *et al.* (1990) foi utilizado para o crescimento dos microrganismos degradadores. Como método de avaliação, foi utilizada placa de polietileno contendo 24 cavidades. Em cada cavidade da placa foi adicionado 1,8 mL de meio mineral; 0,1 mL de inóculo e, finalmente, 10 µL de óleo cru, duas cavidades foram reservadas para o controle sem inóculo com óleo e duas cavidades para controle sem inóculo e sem óleo, conforme metodologia proposta por VOLPON (1998). As placas mantiveram-se em estufa a 30° C durante 7 dias, sendo os resultados expressos por NMP/g de solo .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Avaliação das concentrações utilizadas do biossurfatante no solo

4.1.1 – Atividade desidrogenase

A atividade da desidrogenásica do solo reflete a atividade oxidativa total da microbiota e pode atuar como um bom indicador da atividade microbiana presente no solo (GARCIA *et al.*, 1997). A Figura 5 apresenta os resultados das concentrações de TPF em µg/g de solo em diferentes concentrações do biossurfatante. O valor encontrado no solo virgem (sem adição do biossurfatante) foi de 6,5µg/g de TPF e o melhor valor encontrado através da adição do biossurfatante foi relativo à concentração de 0,4% de ingrediente ativo (~ 74 µg/g de TPF). A partir dessa concentração houve um decréscimo da atividade, observando-se uma queda acentuada da atividade em relação à concentração 1,5% p/p de ramnolipídio, entretanto, pode-se observar que este valor está

acima do encontrado no solo virgem caracterizando uma tolerância por parte da microbiota nativa até a concentração de 1,5% de ramnolipídio.

com valor de atividade acima do encontrado no solo virgem

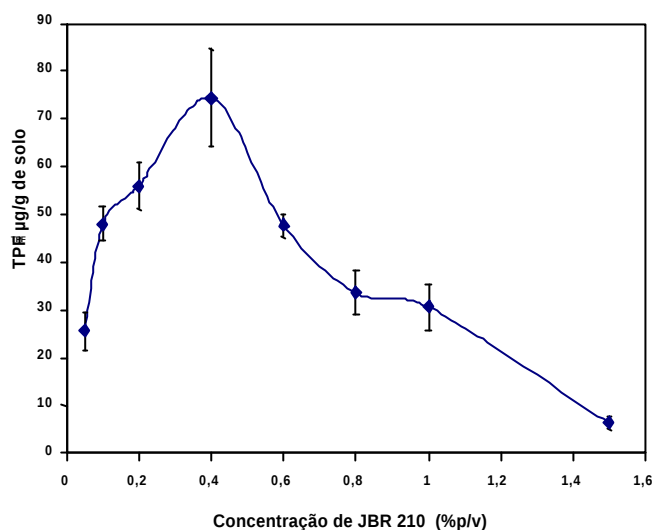


Figura 5: Atividade desidrogenase na adição do biossurfatante JBR 210

4.1.2 – Fitotoxicidade

As vantagens do teste de germinação são devido ao seu baixo custo e pela sua simplificação, contribuindo para que estes sejam muito utilizados em testes de fitotoxicidade. Nas últimas décadas, dezenas de publicações têm sido dedicadas à explicação das razões por que as sementes de alface não germinam em determinadas condições e, ou, quais tratamentos permitem a germinação, contudo, no estudo em questão foi verificado que a adição do biossurfatante ao solo diminuiu o índice de germinação à medida que aumentou a concentração do mesmo (Figura 6). Alguns surfatantes apresentam efeito inibitório sobre o crescimento das plantas (STAHLMAN et al., 1999). Os resultados de fitotoxicidade indicam que entre as concentrações 0,4 e 0,8 o índice de germinação foi praticamente constante (~ 45 a 40%), sendo que na menor concentração (0,1 % p/p de ramnolipídio) foi observado aumento no índice de germinação de aproximadamente 20% em relação ao controle, sugerindo que baixas concentrações do ramnolipídio podem contribuir para aumentar fertilidade do solo. Nas concentrações entre 1 e 1,5% houve um efeito inibitório muito acentuado, apresentando cerca de 70 e 80% de inibição em relação ao controle, indicando que essas concentrações são tóxicas para germinação da *L. sativa*.

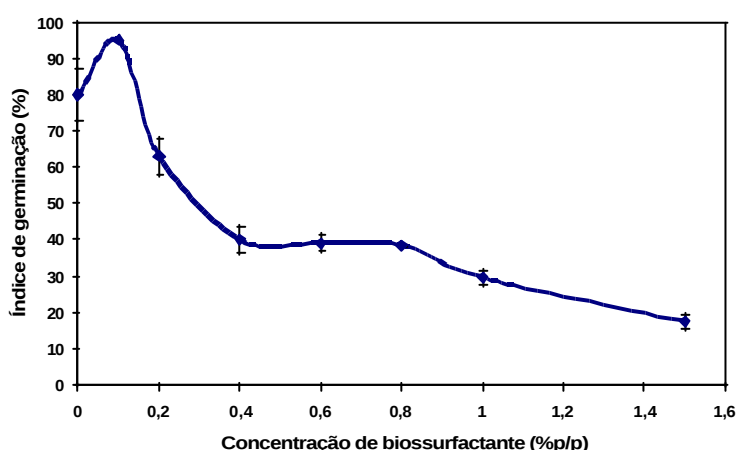


Figura 6: Índice de germinação de diferentes concentrações de ramnolipídio.

4.2 – Avaliação da biodegradação do óleo cru em solo em diferentes concentrações do biossurfatante

A Figura 7 mostra os resultados da quantificação de óleos e graxas nos ensaios de biodegradação onde foram adicionados diferentes concentrações de ramnolipídio, comparando-se ainda com o ensaio controle (sem biossurfatante). Verificou-se que após 45 dias de tratamento, as condições que apresentaram maior percentual

de remoção do óleo foram às condições 0,4 e 0,6 % com cerca de 50% de remoção de óleos e graxas. Contudo, a condição com 0,4% de ramnolipídio apresentou uma tendência a se obter maior índice de biodegradação num período superior a 45 dias de tratamento. Observa-se ainda, que exceto os tratamentos com adição de 1,0 e 1,5% de ingrediente ativo, todos os outros apresentaram remoção de óleo superior ao controle. Os testes de fitotoxicidade demonstraram que estas concentrações eram inibitórias para a germinação da *L. sativa*, sugerindo que seriam tóxicas ao solo contaminado com óleo cru. De fato a concentração com 1,5% de ramnolipídio contribuiu para que houvesse inibição do processo de biodegradação do óleo, além disso, esta concentração (1,5%) foi a única que apresentou diminuição dos microrganismos hidrocarbonoclasticos (MH) que são os microrganismos capazes de degradar o óleo cru (Tabela 4). Através da Tabela 4 pode-se observar o crescimento dos microrganismos ao longo do tempo, verificando-se que o controle manteve a mesma ordem de grandeza dos microrganismos heterotróficos totais (MHT) e microrganismos hidrocarbonoclasticos (MH) ao longo dos 45 dias. Nas condições entre 0,2 a 0,8% de ramnolipídio observou-se aumento dos MHT, sendo que a condição 0,6% mostrou aumento logo nos primeiros 15 dias tanto para os MHT quanto para os MH. As condições 0,4 e 0,6% apresentaram maior aumento de MHT, sendo estas também as condições que obtiveram maior percentual de biodegradação do óleo após 45 dias de experimento em biorreatores, conforme observado na Figura 7.

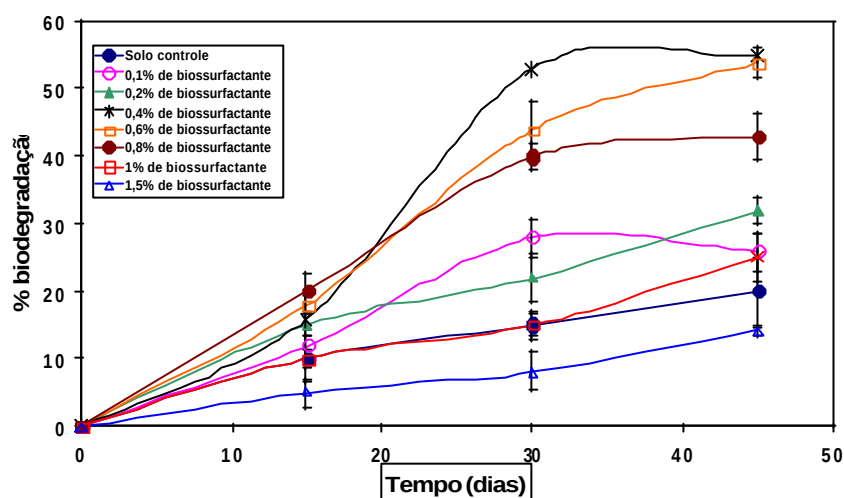


Figura 7: Biodegradação do óleo cru ao longo dos 45 dias em diferentes concentrações de biossurfactante, além do controle.

Tabela 4: População microbiana em diferentes condições ao longo dos 45 dias de experimentos

CONDIÇÕES	MICRORGANISMOS							
	MHT ⁽¹⁾ - UFC/g de solo				MH ⁽²⁾ - Cel/g de solo			
	TEMPO				TEMPO			
	0	15	30	45	0	15	30	45
Controle	7,4X10 ⁶	2,3X10 ⁶	6,7X10 ⁶	5,3X10 ⁶	6,2X10 ³	1,5X10 ³	4X10 ³	1,7X10 ³
0,1% de biossurfactante	2,8X10 ⁶	1,5X10 ⁶	6,1X10 ⁵	2,3X10 ⁶	3,3X10 ³	1,1X10 ⁴	2,3X10 ³	1,9X10 ³
0,2% de biossurfactante	1X10 ⁶	1,7X10 ⁶	2,4X10 ⁷	5X10 ⁸	2,3X10 ³	7,3X10 ³	8,2X10 ⁵	6,8X10 ⁵
0,4% de biossurfactante	8,2X10 ⁶	1X10 ⁶	1,5X10 ⁹	6,2X10 ¹⁰	2,3X10 ³	7,3X10 ³	8,2X10 ⁵	6,8X10 ⁵
0,6% de biossurfactante	7,8X10 ⁶	2X10 ⁷	4,6X10 ⁹	1,3X10 ¹⁰	8,6X10 ³	6,1X10 ⁵	4,2X10 ⁵	3,3X10 ⁵
0,8% de biossurfactante	7,3X10 ⁶	1,1X10 ⁶	2,1X10 ⁸	3,1X10 ⁷	2,4X10 ³	1,1X10 ³	3,1X10 ⁴	8,2X10 ⁴
1% de biossurfactante	5,1X10 ⁶	3X10 ⁶	1X10 ⁵	5X10 ⁵	6,2X10 ³	2,1X10 ³	4,2X10 ³	2,7X10 ³
1,5% de biossurfactante	3,1X10 ⁵	1,6X10 ⁶	4,1X10 ⁵	3X10 ⁶	3,2X10 ³	1,5X10 ³	8,2X10 ²	8,5X10 ²

5. CONCLUSÕES

O teste de atividade desidrogenasica indicou uma concentração ótima a ser adicionada de biossurfatante ao solo que foi a concentração de 0,4% de ramnolipidio.

O teste de fitotoxicidade utilizando-se a espécie *Lactuca sativa* (alface) indicou que à medida que aumentou a concentração do biossurfatante, houve efeito inibitório na germinação, destacando-se que as concentrações com 1 e 1,5 % de ingrediente ativo contribuíram para que houvesse uma inibição de 70 e 80 % respectivamente no índice de germinação em relação à germinação controle (sem o biossurfatante).

Realizaram-se seis diferentes tratamentos com adição do biossurfatante e os resultados obtidos, por determinação de óleos e graxas, mostraram que as concentrações iguais a 0,4 e 0,6% de ingrediente ativo (p/p) apresentaram bons percentuais (~ 50%) de remoção de óleo cru, após 45 dias de ensaios de biodegradação.

Tomando-se como base o ensaio controle (sem adição do biossurfatante), verificou-se que a adição das concentrações iguais a 1 e 1,5% de ingrediente ativo não contribuiu para aumentar a biodegradação do óleo. Destacando-se que a concentração de 1,5% teve efeito inibitório na biodegradação do óleo no solo.

Analisando-se os testes realizados de atividade desidrogenasica, fitotoxicidade e biodegradação do óleo no solo, pode-se concluir que a melhor concentração utilizada nos ensaios de biodegradação foi a adição de 0,4% de ingrediente ativo, devido ao fato de ter sido apontada como uma concentração ótima para aumentar a atividade do solo, além de não ter apresentado um efeito inibitório tão acentuado para a germinação do alface (em torno de 55%). No que diz respeito a biodegradação do óleo, esta concentração ainda demonstrou uma tendência a se obter valores superiores a 50% de biodegradação se o tratamento do solo fosse acima de 45 dias.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a Petrobrás/CENPES pelo fornecimento do óleo cru e do solo. Ao CETEM, a EQ (Escola de Química) e a ANP pela bolsa cedida e pelo suporte financeiro.

7. REFERÊNCIAS

- ALEF, K. & NANNIPIERE, P. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. London: Academic Press. 576p. 1995
- APHA, AWWA, WPCF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18th edition, New York. 1992.
- BANAT, I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. **Bioresource Technology**. vol. 51. pp. 1-12. 1995.
- BANAT, I.M. Potential commercial application of microbial surfactants. **Appl. Microbiol Biotechnology**. vol. 53, pp. 495-508. 2000.
- BIOTTON, G.; KOOPMAN, B. Bacterial and enzymatic bioassays for toxicity testing in the environment. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.** vol. 125, pp. 1-22. 1991.
- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces**. vol. 152. pp. 41-52. 1999.
- DESCHÊNES, L.; LAFRANCE, P.; VILLENEUVE, J. P.; SAMSOM, R. Adding sodium dodecyl sulfate and *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactant inhibits polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in a weathered creosote contaminated soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 46. Nº 5-6, pp. 638-646. 1996.
- DESHPANDE, S. SHIAU, B.J.; WADE, D.; SABATINI, D.A. and HARWELL, J.H. Surfactants selection for enhancing ex situ soil washing. Pergamon. vol. 33, Nº 2, pp. 551-360. 1999.
- EMBRAPA. Manual de Métodos de análise de solo. 2a edição, Rio de Janeiro. 1997.
- FLETCHER, J. A brief overview of plant toxicity testing. In: GORUCH, J.W.; LOWER, W.R.; LEWIS, M.A.; WANG, W. **Plants for toxicity Assessment**. Astm, Philadelphia, PA. ASTM Publication code number (PCN) 04011150-16. pp. 1-11. 1991.
- GARCIA, T.C; HERNANDEZ, T.; COSTA, F. Potential use of dehydrogenase activity as index of microbial activity in degraded soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, vol.28, p.123-134, 1997.
- GUIMARÃES, M. C. **Crescimento de crisântemo em substrato contendo surfatantes**. 1995. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1995.
- KAPANEN, A.; ITAVAARA, M. Ecotoxicity tests for compost applications. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 49, pp. 1-16.2001.
- LIN, S-C. Biosurfactants: recent advances. **Journal chem.. Tech. Biotechnol.** vol. 66, pp. 109-120. 1996.

- MAIER, R.M.; SOBERON-CHAVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential application. **Applied Microbiology and biotechnology**, vol. 54, pp. 625-633. 2000.
- MORÁN, A. C.; OLIVEIRA, N.; COMMENDATORE, M. ESTEVES, J.L. & SINERIZ, F. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis*: **Biodegradation** vol. 11, pp. 65-71. 2000.
- MOREIRA, M.S.F.; SIQUEIRA, J.O.; **Microbiologia e bioquímica do solo**. Editora UFLA. 626p. 2002.
- MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**. vol.133, pp.183-198. 2005
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Natural attenuation for groundwater remediation. **National Academy of Sciences**, Washington, 274p. 2000.
- NITSCHKE, M. PASTORE, G.M. “Biossurfactantes: 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.
- NYER, E. **Groundwater treatment technology**. New York Van Nostrand Reinhold. 306p. 1992.
- OBLINGER, J. L. e KOBURGER, J. A. Understanding and Teaching the Most Probable Number Technique. **Journal of Mik Food Tecnology**. 1975.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline 208: **Terrestrial Plants, Growth Test**. OECD Guidelines for testing of chemical. OECD Paris. (1984).
- OLIVEIRA, F.R.de, MILLIOLI, V.S. Utilização da técnica de bioestímulo avaliando-se parâmetros como relação nutricional e umidade na biorremediação de solo contaminado com óleo cru. 2005. **XIII Jornada de Iniciação científica (Pesquisa) – Centro de Tecnologia Mineral**, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Valéria Souza Millioli.
- OU, Z.Q. (2000). “Separate and combine environmental behavior of surfactants and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)” In: <http://tumb1.biblio.tu-muenchen.de/publ/diss/ww/2000/ou.pdf>. Acessado em março 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).
- RATSEP, R. Biological variables for monitoring the effects of pollution in a small catchments area. A Literature survey. **Environmental. Monitory**. Nord. vol. 8, pp. 6-21. 1991.
- RIZZO, A.C.L.; RAIMUNDO, R. (2003). Determinação de óleos e graxas, em solo, por gravimetria empregando método de extração com ultrassom **IT2003-001-00** – Instrução de Trabalho elaborada para o CETEM.
- ROBINSON, K.G.; GHOSH, M.M.; SHI, Z. Mineralization enhanced of non-aqueous phase and soil-bound PCB using biosurfactant. **Water Science and Technology**, vol. 34. pp. 303-309. 1996.
- ROJAS-AVELIZAPA, N.G.; RODRIGUEZ-VALQUEZ, R.; SAVAL-BOHORQUEZ, S. ALVAREZ, P.J.J.; Effect of C/N/P ratio and nonionic surfactant on polychlorinated biphenyl biodegradation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. vol 16, Nº 4, pp. 319-324. 2000.
- ROSENBERG, E. Exploiting microbial growth on hydrocarbon: new markets. **Trends biotechnol**, vol. 11, pp. 419-424. 1993.
- STAHLMAN, P. W.; CURRIE, R. S.; EL-HAMID, M. A. Nitrogen carrier and surfactant increase foliar injury in winter wheat (*Triticum aestivum*). **Weed Technology, Champaign**, v. 11, n. 1, p. 7-12, Jan./Mar. 1999.
- USEPA8015B. Nonhalogenated organics using CG/FID. EPA, revision 2, 28p. 1996.
- VECCHIOLI, G.L.; DEL PANNO, M.T.; PAINCEIRA, M.T. Use of selected autochthonous soil bacteria to enhance degradation of hydrocarbons in soil. **Environmental Pollution**, vol. 67, pp. 249-258. 1990.
- 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. 06/98.1998**
- YERUSHALMI, L. ROCHELEAU, S. CIMPOIA, 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 2003, 51.