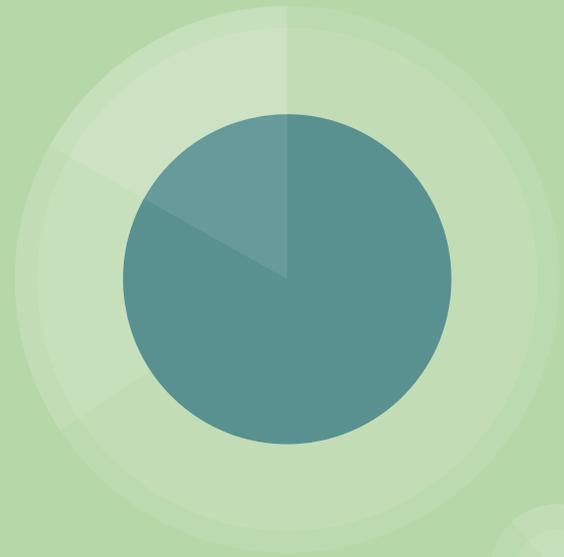


Biorremediação do BTEX em solos



Guilherme Henrique	Nº USP: 11837456
Marcela Fernandes da Costa	Nº USP: 11797730
Maria Fernanda Suffiati	Nº USP: 11797806
Rebecca Sankarankutty	Nº USP: 5570548
Professora: Dra. Maria Bernadete Amancio Varesche	

USP

O que é biorremediação?

- ★ Conceito;
- ★ Degradação bioquímica;
- ★ Tipos de Biorremediação:
 - ex-situ
 - in-situ



Biorremediação aeróbia

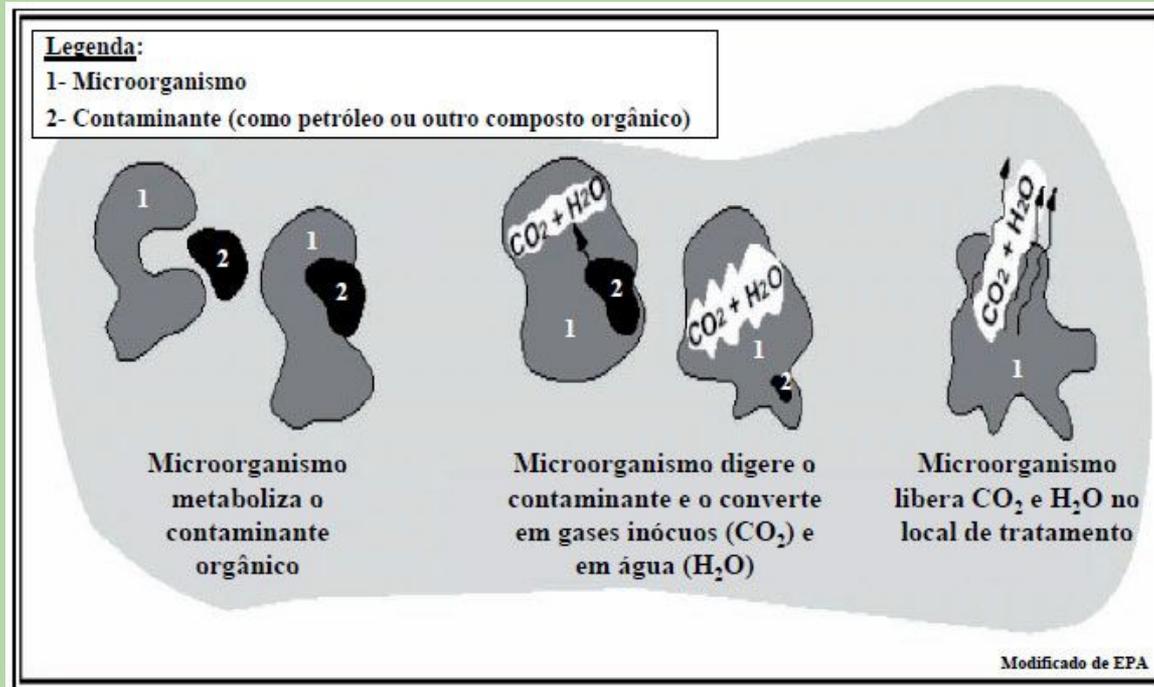
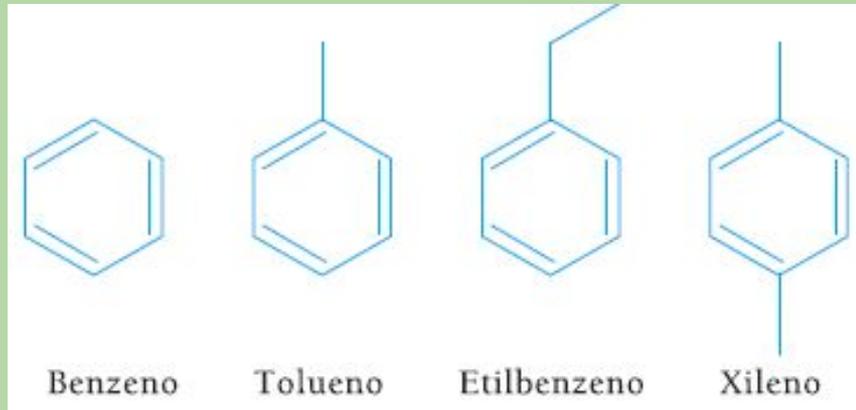


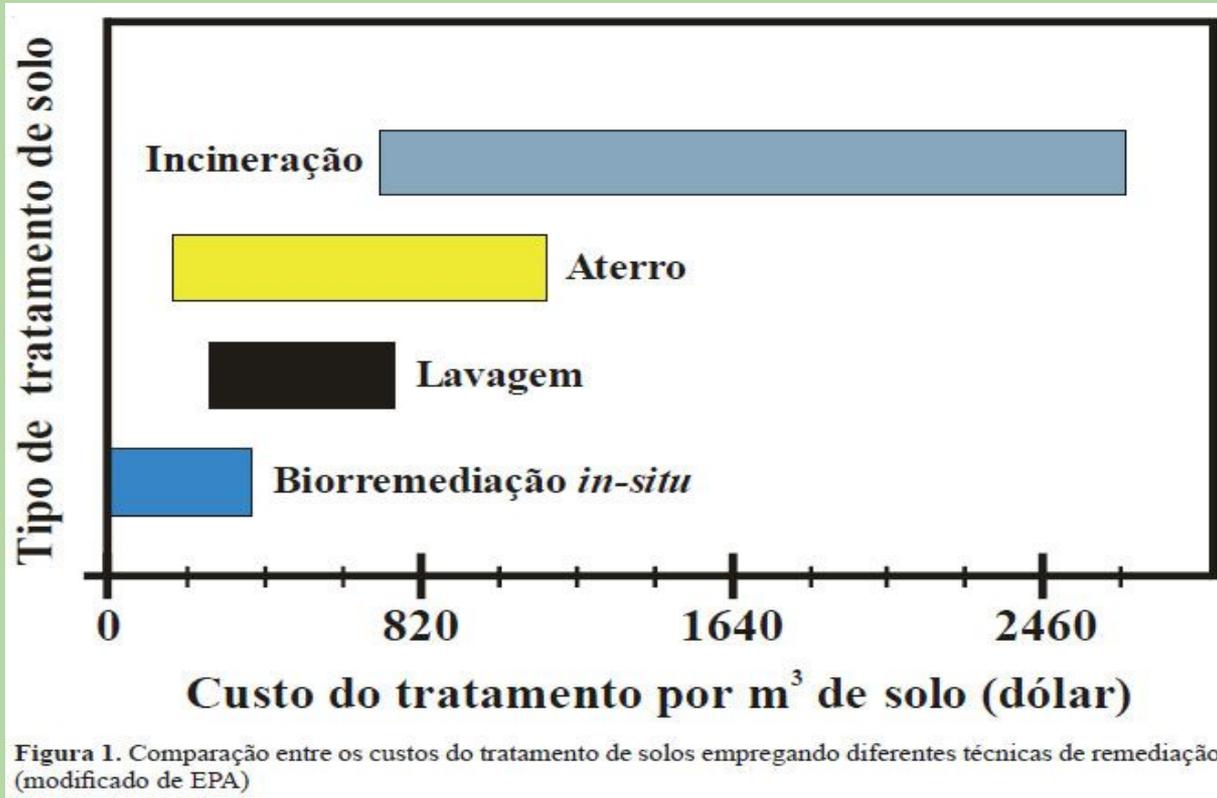
Figura 2. Esquema simplificado da ação de microorganismos em processos de biorremediação (EPA, 2001b)

O que são BTEX?

- ★ Hidrocarbonetos monoaromáticos;
- ★ Presentes em solventes e em combustíveis;
- ★ Derivado do petróleo.



Por que usar a biorremediação?



Quais os impactos do BTEX?

- ★ Tóxicos tanto ao meio ambiente como ao ser humano, mesmo em concentrações da ordem de $\mu\text{g/L}$;
- ★ Doenças e complicações;
- ★ Contaminam as águas subterrâneas.



Tabela 1: Valores orientadores para solos no Brasil (CETESB, 2005)

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO EM PESO SECO (mg kg ⁻¹)			
	Valores de prevenção	Valores de intervenção		
		agrícola	residencial	industrial
Benzeno	0,03	0,06	0,08	0,15
Tolueno	0,14	30	30	75
Etilbenzeno	6,2	35	40	95
Xilenos	0,13	25	30	70
HPA*	12,7	56,6	147,1	384,8
HTP	---	---	---	---

* Soma das concentrações de dez compostos selecionados pela CETESB: antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(k)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno, benzo(a)pireno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno, indeno(1,2,3-c,d)pireno e naftaleno.

Tabela 2. Coeficiente médio anual de mortalidade por leucemia (x 100.000) por grupos ocupacionais potencialmente expostos ao benzeno. Brasil, 2006-2011

Grandes grupos ocupacionais	Coeficiente médio de mortalidade por leucemia (x 100.000)
Químicos	6,0
Assistentes de laboratório	6,7
Frentistas de posto de combustíveis	3,4
Tapeceiros/estofadores e afins	6,0
Trab. do couro, sapatos e fábrica de calçados	4,9
Operadores e mecânicos de máquinas e motores	4,2
Pintores e afins	5,1
Impressores e impressão gráfica	6,9
Refinaria, destiladores e outros da indústria química	3,6
Operadores de máquinas de fabricar borracha	2,8
Operadores de máquinas em lavanderias e tinturarias	6,1

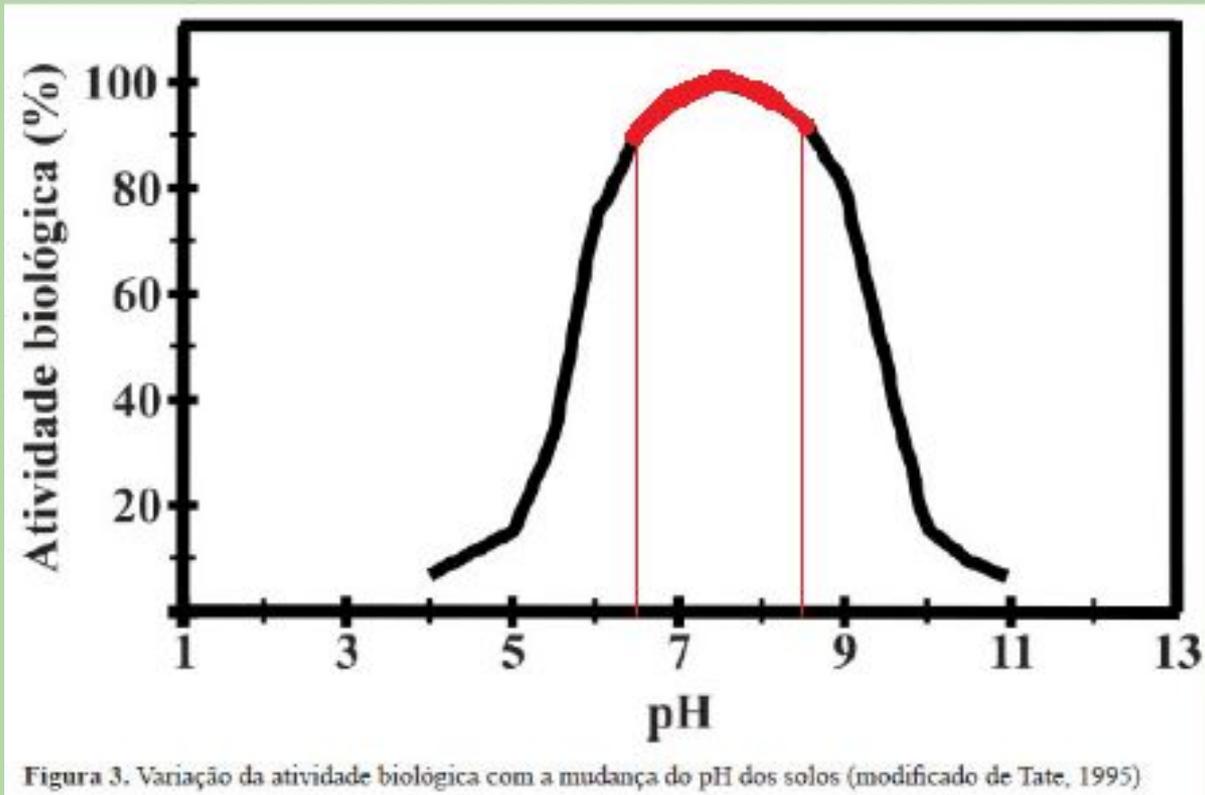
Fonte dos dados: Estimado com dados dos Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM), 2006-2011, do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2010 e da FINJEM.



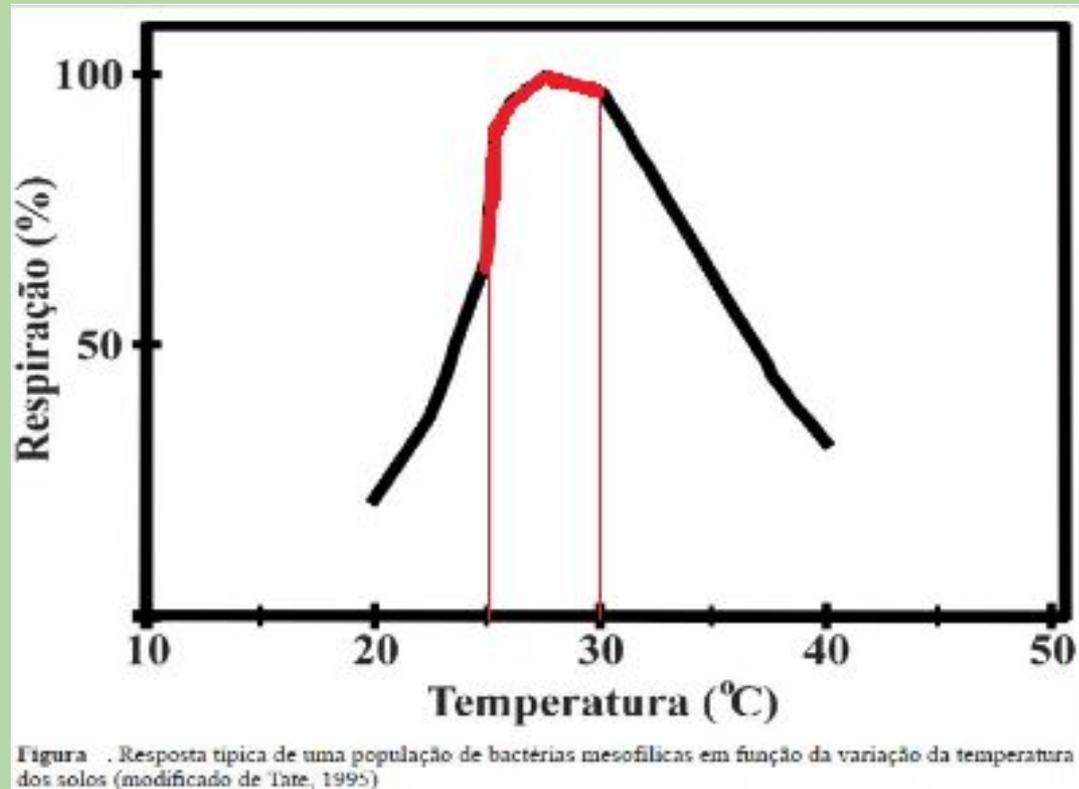
Fatores que influenciam a biodegradabilidade dos contaminantes

- ★ Concentração de contaminante;
- ★ Gênero e concentração de microorganismos catalisadores;
- ★ Condições física e químicas do sítio contaminado;
- ★ Teor de matéria orgânica;
- ★ Presença da vegetação.

pH do solo



Temperatura do solo



Dificuldades na descontaminação do BTEX

- ★ 1 - Presença de argilominerais;
- ★ 2 - BTEX é hidrofóbico;





Atenuação natural

- ★ Biorremediação in-situ;
- ★ Uso de processos naturais para degradar os contaminantes e reduzir suas concentrações a níveis aceitáveis.



Quais microrganismos são capazes de metabolizar hidrocarbonetos?

- ★ Os microrganismos são do gênero *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Cladophialophora*, *Cladosporium* e *Pseudomonas*;
- ★ Exemplo (estudo de caso):



Estudo de caso escolhido

- ★ Tese de Núbia Martins de Oliveira (UFRGS) - Estudo 3;
- ★ “Avaliação dos compostos dos combustíveis gasolina pura, gasolina comercial e etanol, em solo, pelos processos de atenuação natural e bioestimulação (1% de glicose): escala piloto e de laboratório”.



Introdução

- ★ Objetivo geral dos estudos - biodegradação em solo e meio líquido;
- ★ Objetivo específico - biodegradação apenas no solo:
 - Análise da atividade microbiana - sistema fechado;
 - Redução dos compostos presentes nos combustíveis - sistema aberto;

Contextualização

- ★ Tanques de Armazenamento Subterrâneos;
- ★ Contaminação do solo por combustíveis - 79%;
- ★ Toxicidade dos compostos da gasolina;





Contextualização

★ Legislação Brasileira:

Compostos	Concentração		
	<u>Área residencial</u>	<u>Água</u>	<u>Água potável</u>
Benzeno	0.08mg.kg^{-1}	$5\mu\text{g.L}^{-1}$	$5\mu\text{g.L}^{-1}$
Tolueno	30mg.kg^{-1}	$700\mu\text{g.L}^{-1}$	$40\mu\text{g.L}^{-1}$
Xileno	30mg.kg^{-1}	$500\mu\text{g.L}^{-1}$	$20\mu\text{g.L}^{-1}$

★ Gasolina brasileira: mistura com etanol e suas consequências;



Resumo do estudo 3

- ★ Biorremediação por atenuação natural:
 - Sistemas fechados - frascos de 1,5;
 - Sistemas abertos - tubos de PVC;
- ★ Concentrações dos compostos de acordo com a CETESB.

Materials - Solo

- ★ Amostras de solo *in natura*;
- ★ Argissolo vermelho distrófico;
- ★ Armazenamento com condições controladas.



Parâmetro	Unidade	Valor
Argila	$\text{g} \times \text{kg}^{-1}$	290.0
pH	H_2O	4.9
Índice SMP		5.7
Fósforo	$\text{mg} \times \text{dm}^{-3}$	2.9
Potássio	$\text{mg} \times \text{dm}^{-3}$	246.0
Matéria Orgânica	$\text{g} \times \text{kg}^{-1}$	34.0
Alumínio trocável	$\text{cmol}_c \times \text{dm}^{-3}$	0.8
Cálcio trocável	$\text{cmol}_c \times \text{dm}^{-3}$	3.5
Magnésio trocável	$\text{cmol}_c \times \text{dm}^{-3}$	1.7
Al + H	$\text{cmol}_c \times \text{dm}^{-3}$	6.2
Capacidade de Troca de Cátions	$\text{cmol}_c \times \text{dm}^{-3}$	12.0
Saturação de bases	% SAT da CTC	48.0
Saturação de Alumínio	% SAT da CTC	6.6
Enxofre	$\text{mg} \times \text{dm}^{-3}$	6.1
Zinco	$\text{mg} \times \text{dm}^{-3}$	3.8
Cobre	$\text{mg} \times \text{dm}^{-3}$	1.2
Boro	$\text{mg} \times \text{dm}^{-3}$	0.6
Manganês	$\text{mg} \times \text{dm}^{-3}$	35
Nitrogênio (TKN)	%	0.12

Fonte: Estudo de caso escolhido

Materiais - Combustíveis

- ★ Gasolina pura, gasolina comercial e etanol;
- ★ Fornecimento da COPESUL - transporte e armazenamento controlados;
- ★ Caracterização dos componentes de cada combustível;



Gasolina pura e comercial - características

Compostos	% em volume dos compostos presentes na gasolina	
	Gasolina Pura	Gasolina Comercial
Álcool-etanol	0	24.6
Total de aromáticos	30.0	21.9
Total de olefinicos	14.3	3.60
Total de saturados	55.7	49.5
Total	100	100
Benzeno	1.1	0.76
Densidade ($\text{mg} \times \text{mL}^{-1}$)	0.761	0.757

Fonte: Estudo de caso escolhido

Etanol - características

Acidez com ácido acético ($\text{mg}\times\text{L}^{-1}$)	10.46
Aspecto visual	Límpido, sem material em suspensão
Condutividade a 20°C ($\mu\times\text{S}\times\text{m}^{-1}$)	0.921
Cor	Alaranjada
Densidade ($\text{mg}\times\text{mL}^{-1}$)	0.7908
Pureza	99.5%

Fonte: Estudo de caso escolhido

Métodos - Análise respirométrica

- ★ Medir a concentração de CO₂ em sistemas fechados;
- ★ Titulação da solução com HCl e BaCl₂;

<i>pH abaixo de 8</i>		<i>pH entre 8,0 e 10,0</i>		<i>pH entre 10,0 e 12,0</i>
incolor	≅	rosa	≅	carmin ou roxo

- ★ Cálculo da concentração de CO₂:

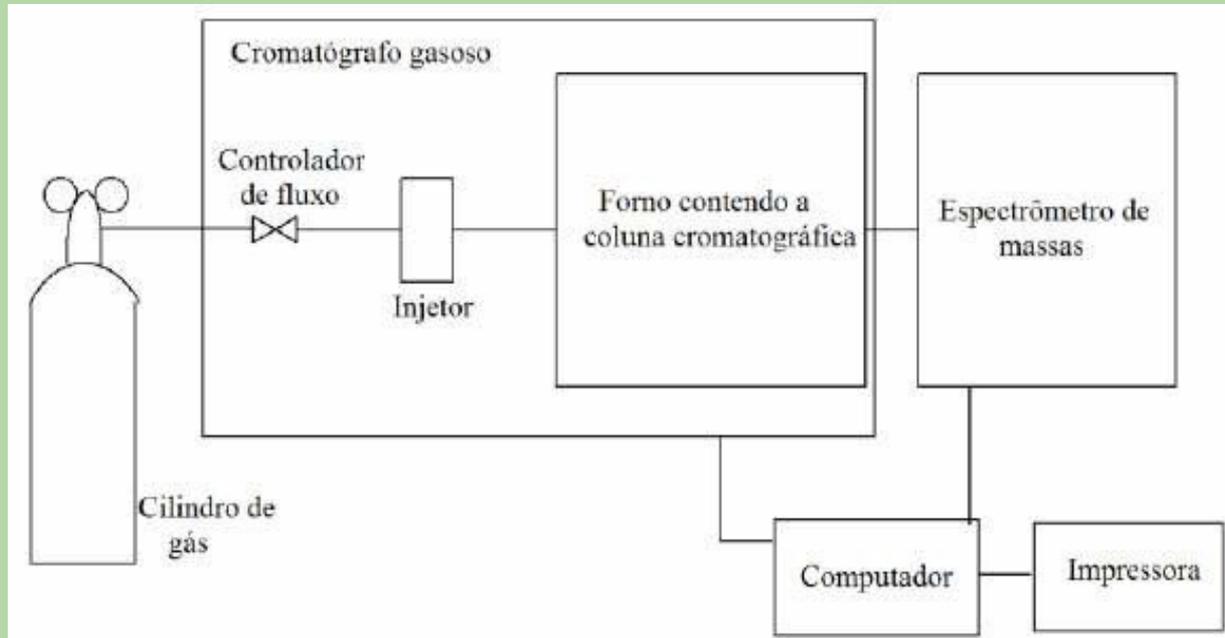
$$(C \rightarrow CO_2) = (B - V) \times C_{HCl} \times \frac{\bar{M}_{CO_2}}{2} \times F$$

Métodos - Análise por cromatografia

- ★ O que é;
- ★ Determinação da concentração dos compostos dos combustíveis analisados;
- ★ Todos os sistemas e formas de biorremediação;



Materiais e métodos - Análise por cromatografia



Padronização do cromatógrafo a gás

★ Solução A:

Componentes	% de Pureza
Benzeno	99.6
Tolueno	99.68
Xileno (1 meta: 1 para: 1 orto - v.v ¹)	99.23
C9+	98.03

$$C_i(\% \text{ de massa}) = \frac{M_i \times \text{Pureza} (\%)}{M_T}$$

Padronização do cromatógrafo a gás

★ Solução B:

- Depende da solução A;
- Determina a concentração de cada componente da solução A:

$$C_i(\text{mg} \times \text{kg}^{-1}) = \frac{C_i \text{ na solução A} \times \text{massa da solução A adicionada em mg} \times 1000}{\text{Massa total da solução B em g} \times 100}$$



Padronização do cromatógrafo a gás

- ★ Solução C:
- ★ Verificar faixa de linearidade e curvas de calibração;
- ★ Depende da solução B - 200, 400, 600, 800, 1000 μ L;
- ★ Curvas de calibração;

Padronização do cromatógrafo a gás

- ★ Cálculo da concentração de cada componente;
- ★ Cálculo do fator resposta:

$$A_{ip} = F_i \times C_{ip} \quad \text{ou} \quad C_{ip} = \frac{A_{ip}}{F_i} \quad \text{ou} \quad F_i = \frac{A_{ip}}{C_{ip}}$$

- ★ Cálculo da concentração do componente i na amostra de

solo:

$$C_{ia} \left(\text{mg} \times \text{kg}^{-1} \text{ de solo} \right) = \frac{C_{ip} \times 10 \text{ mL} \times A_{ia}}{A_{ip} \times m \text{ da amostra em g}}$$



Experimento - cromatógrafo a gás

"utilizaram temperatura e tempo de condicionamento do frasco de 80°C, por 15 minutos; programa de temperatura do forno de 40°C por 3 minutos, seguido de taxa de aquecimento de 5°C.min.⁻¹ até 90°C, mantido por 5 minutos com posterior aquecimento de 10°C.min.⁻¹ até 150°C, permanecendo por um minuto. As temperaturas do injetor e detector foram 120°C e 210°C, respectivamente. Volume de injeção: 1.0µL no modo splitless. Nestas condições o tempo de análise foi de 43 minutos."

★ Comparação dos resultados com as concentrações iniciais;



Estimativa do número mais provável (NMP) para microrganismos heterotróficos

- ★ Placas de poliestireno;
- ★ Caldo nutritivo (3 g de extrato de carne e 5 g de peptona, diluídos em 1 litro com água deionizada e o pH ajustado para neutro);
- ★ Diluição de 1 g de amostra de solo;
- ★ Coloca-se os inóculos na placa de poliestireno e em condições específicas, após 24 h, observa-se a turbidez do meio.



Estimativa do número mais provável (NMP) de microrganismos degradadores

- ★ Meio Bushnell Hass (BH):
 - 0,2 g/L de sulfato de magnésio;
 - 0,02 g/L de cloreto de cálcio;
 - 1 g/L de dihidrogenofosfato de potássio;
 - 1 g/L de nitrato de amônio;
 - 0,05 g/L de cloreto férrico;

- 
- ★ Indicador de oxirredução cloreto de trifenil-tetrazólio (TTC), na concentração de 0,025 g em 100 mililitros de água destilada;
 - ★ Diluição e adição do meio mineral incolor + combustível;
 - ★ Em condições específicas, avaliou-se a coloração do indicador redox



Determinação do pH

- ★ Realizada em água (com relação de solo: água 1:1,v/v);
- ★ Total de 10 mililitros.



Experimento

- ★ Potes de 1,5L;
- ★ 200 gramas de solo in natura;
- ★ Contaminação feita com 5% de gasolina comercial;
- ★ Umidade corrigida para 12%;
- ★ Tempo de coleta: 0,1,2,3,7,15,30,70,90 e 150 dias.

Experimento



Figura 7. 2 Sistema fechado, com frascos de vidro com 1,5 L, com amostra de solo.

a= branco e b= tratamentos



Resultados e discussões



1. Cromatografía gasosa

Tabela 7. 1 Concentrações, em mg kg^{-1} , dos compostos BTX e C9+ , em solos contaminados com gasolina comercial ou pura, a 1 cm de profundidade, em sistema fechado, nos processos de atenuação natural e bioestimulação em função do tempo.

Processo de biorremediação										
<i>Concentração dos compostos da gasolina comercial</i>										
<i>(mg kg⁻¹)</i>										
composto	Atenuação Natural (dias)					Bioestimulação (1% glicose) (dias)				
	0*	15	30	70	150	0*	15	30	70	150
Benzeno	762± 25	116± 39	19± 9	2± 6	0± 0	658± 276	121± 49	16± 12	4± 1	0± 0
Tolueno	1262± 59	271± 20	42± 24	4± 2	0± 0	1170± 257	279± 12	26± 16	5± 2	1± 0
Xilenos	1005± 43	202± 8	69± 45	10± 2	2± 1	978± 128	197± 67	36± 17	10± 4	4± 1
C9+	1861± 78	263± 12	153± 100	36± 13	23± 6	1746± 91	235± 27	90± 26	31± 9	41± 15
gasolina pura										
<i>(mg kg⁻¹)</i>										
	Atenuação Natural (dias)					Bioestimulação (1% glicose) (dias)				
	0*	15	30	70	150	0*	15	30	70	150
Benzeno	685± 114	205± 14	70± 27	13± 5	0± 0	596± 105	231± 13	110± 6	10± 1	0± 0
Tolueno	1726± 56	530± 1	23± 5	2± 2	0± 0	1320± 30	540± 3	30± 1	4± 2	0± 0
Xilenos	3130± 902	801± 2	459± 2	117± 34	6± 1	2393± 608	798± 77	558± 6	104± 6	11± 3
C9+	1737± 92	475± 0	256± 0	136± 43	46± 9	1525± 387	476± 124	284± 25	74± 20	47± 3

Obs: * coleta 1 hora após a montagem dos experimentos.

- 
- ★ Etanol favorece a biodegradação dos compostos BTEX (diferentemente do que a literatura diz);
 - ★ Comportamentos diferentes dependendo do tempo de coleta de amostragem;

Tabela 7. 3 Percentual (%) de redução dos compostos (etanol, BTX, C9+, TPH) presentes em cada combustível (gasolina comercial, gasolina pura, etanol), contido no solo, nos processos de atenuação natural e bioestimulação. Os percentuais de redução calculados em relação ao tempo zero, de cada tratamento.

<i>Percentual (%) de redução dos compostos da gasolina comercial</i>												
Tempo (dias)	Atenuação Natural (%)						Bioestimulação (1% glicose) (%)					
	Etanol	Benzeno	Tolueno	Xilenos	C9+	TPH	Etanol	Benzeno	Tolueno	Xilenos	C9+	TPH
0-15 d	86	85	79	80	86	87	90	82	76	80	87	86
0-30 d	94	98	97	93	92	97	95	98	98	96	95	98
0-70d	100	100	100	99	98	99	100	100	100	99	98	99
0-150 d	100	100	100	100	99	99	100	100	100	100	98	99
<i>Percentual (%) de redução dos compostos da gasolina pura</i>												
Tempo (dias)	Atenuação Natural (%)					Bioestimulação (1% glicose) (%)						
	Benzeno	Tolueno	Xilenos	C9+	TPH	Benzeno	Tolueno	Xilenos	C9+	TPH		
0-15 d	70	69	74	73	78	61	59	67	69	72		
0-30 d	90	86	85	85	91	82	77	77	81	86		
0-70d	98	99	96	92	97	98	97	96	95	97		
0-150 d	100	100	100	99	99	100	100	100	97	99		
<i>Percentual (%) de redução do etanol</i>												
Tempo (dias)	Atenuação Natural (%)						Bioestimulação (1% glicose) (%)					
	Composto Etanol						Composto Etanol					
0-15 d	87						87					
0-30 d	93						94					
0-70d	97						97					
0-150 d	100						100					



2. Análise respirométrica

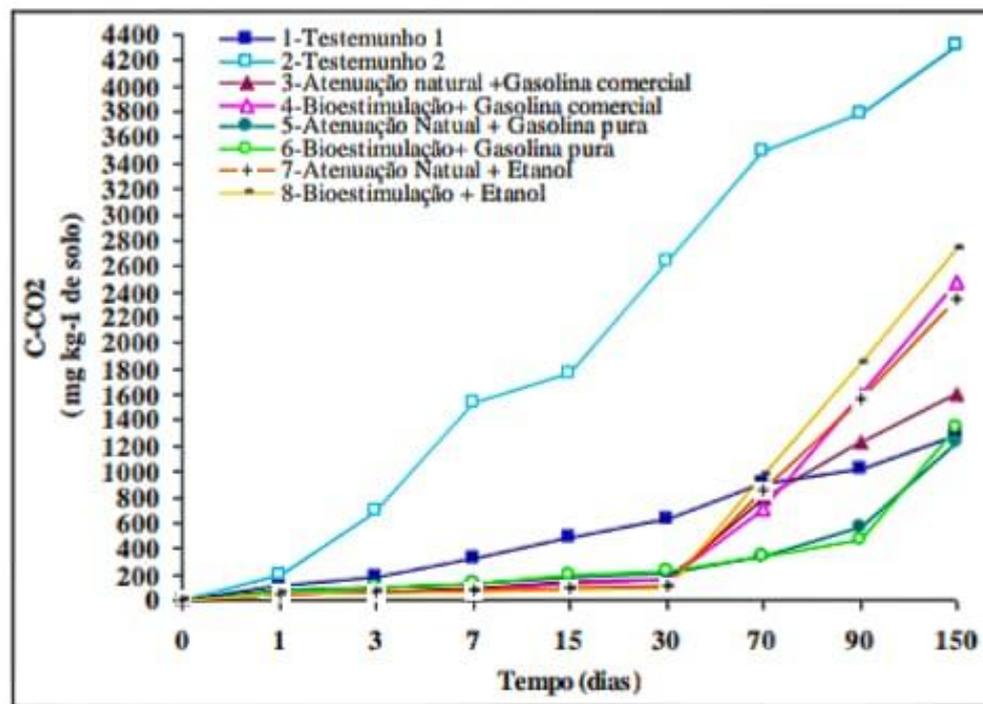


Figura 7.4 Concentrações de C-CO₂ produzidos pelos micro-organismos dos solos em diferentes tratamentos em função do tempo.



- ★ Testemunho 2 libera mais gás carbônico;
- ★ Após 30 dias, os tratamentos com combustível passaram a ter significativa liberação de gás carbônico.



3. Análise biológica



3.1 Microrganismos heterotróficos

- ★ Não houve aumento significativo no NMP de heterotróficos no tratamento, no período de 0 e 150 dias.

Tabela 7. 5 Estimativa do NMP (número mais provável) de micro-organismos heterotróficos totais nas amostras de solo dos tratamentos, em sistema fechado, na profundidade de 1 cm, nos períodos de 0 e 150 dias.

Estimativa do NMP de micro-organismos heterotróficos, das amostras de solo de cada tratamento (processo ou testemunho), em sistema fechado, nos períodos de 0 e 150 dias.								
Solo	T	Processos: Atenuação natural e Bioestimulação com combustível: (log. g ⁻¹ de solo)				T	Testemunhos (solo sem combustível) (log. g ⁻¹ de solo)	
			Gasolina comercial	Gasolina pura	Etanol			
1-Solo	0	AN	6,47	5,24	5,46	0	1	5,97
	150		6,15	6,62	6,39	150		6,82
2-Solo + 1% glicose	0	BIE	6,21	6,18	5,15	0	2	6,75
	150		6,49	6,41	6,26	150		5,67

T= Tempo em dias, AN = Atenuação natural, BIE = Bioestimulação.



3.2 Microrganismo degradadores

- ★ Houve variações nos valores de NMP dos degradadores nos tratamentos, no período de tempo de 0 e 150 dias;
- ★ Variações observadas podem indicar mudança na biodiversidade da microbiota.

Tabela 7.6 Estimativa do NMP (número mais provável) de micro-organismos degradadores existentes nas amostras de solo (com e sem combustíveis) dos tratamentos, na profundidade de 1 cm, no período de 0 e 150 dias.

Estimativa do NMP de micro-organismos degradadores das amostras de cada tratamento (processo ou testemunho), em sistema fechado, nos períodos de 0 e 150 dias.

Solo	T	Processos: Atenuação natural e Bioestimulação com combustível (log. g ⁻¹ de solo) Na análise adicionar igual combustível.			T	Testemunhos (solo sem combustível) (log. g ⁻¹ de solo) Na análise adicionar combustível.				
			Gasolina comercial	Gasolina pura		Etanol		Gasolina comercial	Gasolina pura	Etanol
1-Solo	0	AN	4,23	4,19	4,01	0	1	3,70	2,20	2,40
	150		3,53	4,23	3,85	150		4,30	4,46	3,01
2-Solo + 1% glicose	0	BIE	4,16	4,35	3,46	0	2	3,56	2,30	2,20
	150		3,40	3,70	3,72	150		3,90	4,11	4,30

T= Tempo em dias, AN = Atenuação natural, BIE = Bioestimulação.



4. umidade e pH

- 
- ★ A umidade ideal para atividade microbiana no solo é de 12 a 18% (tende a favorecer a degradação dos hidrocarbonetos);
 - ★ Influencia quali e quantitativamente a atividade dos microrganismo;
 - ★ Não houve aumento significativo dos valores de pH no período estudado (efeito tamponante que o solo pode apresentar).

Tabela 7. 7 Valor médio de pH da amostra de solo de cada tratamento em sistema fechado, nos períodos de zero e 150 dias.

Tempo (dias)	Valores médios de pH da amostra de cada tratamento em sistema fechado, no período 0 e 150 dias						
	Solo	Processos com combustível				Testemunhos	
		Processos	Gasolina comercial	Gasolina pura	Etanol	Solo	
0	1-Solo	Atenuação Natural	5,0	5,0	5,0	1	5,1
150			5,3	5,3	5,1		5,2
0	2- Solo + 1% glicose	Bioestimulação	4,9	4,9	4,9	2	4,8
150			4,3	4,6	4,2		5,1



Referências Bibliográficas

- https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18138/tde-18122015-114648/publico/Tese_DeNardi_IvanaR.pdf
- https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782007000400049&script=sci_arttext&tlng=pt
- ANDRADE, Juliano de Almeida; AUGUSTO, Fabio and JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclét. Quím.* [online]. 2010, vol.35, n.3 [cited 2020-05-20], pp.17-43. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-46702010000300002&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0100-4670. <https://doi.org/10.1590/S0100-46702010000300002>.
- ALMEIDA, A. R. DE; CONEGLIAN, C. M. R.; PIZI, J. F.; TORIGOE, N.; FIGUEIREDO, H. Biorremediação de solo contaminado por BTEX com utilização de componente enzimático (Componente B). *Revista dos Trabalhos de Iniciação Científica da UNICAMP*, n. 26, 4 dez. 2018.
- <file:///C:/Users/rsank/Downloads/399-1225-1-PB.pdf>



Referências Bibliográficas

- <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/135498/000984945.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> acessado em 02/06/2020;
- <<http://www.shimadzu.com.br/analitica/produtos/gc/index.shtml>> acessado em 02/06/2020;
- <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Fenolftale%C3%ADna>> acessado em 02/06/2020;
- <https://www.google.com/search?q=cromat%C3%B3grafo+esquema&client=firefox-b-d&sxsrf=ALeKk00CR4Q9DAmAwCdoQdxAg0ol9of2qQ:1591155574061&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwi2t5i23OTpAhXrDrkGHdQ5CXAO_AUoAXoECAwQAw&biw=1366&bih=654#imgrc=WLubdO2A3kjxBM> acessado em 02/06/2020;