



## EFEITO DA CONTAMINAÇÃO POR ÓLEO DIESEL NA COMUNIDADE DE MICROORGANISMOS HETEROTRÓFICOS EM UM SOLO FRANCO-ARGILO-ARENOSO

Bruno Cordeiro Rocha Barroso<sup>1</sup>

Andréa Rodrigues Marques<sup>2</sup>

Fabiana da Conceição Pereira Thiago<sup>3</sup>

Mariana Soares Madeira Pereira<sup>4</sup>

Sarah Estevam Bonfim<sup>5</sup>

Vinícius Viana Coelho<sup>6</sup>

### Conservação de Solos e Recuperação de áreas degradadas (RAD)

#### *Resumo*

O óleo diesel é um combustível muito utilizado no mundo, não sendo incomum o seu derramamento por meio de acidentes. Este estudo teve como objetivo simular o derramamento de óleo diesel num solo franco-argilo-arenoso e avaliar o seu impacto na comunidade de microrganismos heterotróficos presentes. Uma amostra de solo foi coletada, peneirada e secada à temperatura ambiente. Em cinco potes foram colocados 200g de solo contaminado com óleo diesel (5% da massa seca de solo), os quais foram fechados e incubados à temperatura ambiente por 21 dias. Três coletas do solo incubado foram realizadas para cultivos em meio para fungos (Ágar dextrose Sabouraud) e bactérias heterotróficas (Plate Count Agar). Utilizou-se três diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  para realizar a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) dos microrganismos. Os resultados mostraram uma diminuição no número de UFC de fungos e bactérias. A diversidade de microrganismo foi considerada baixa e acredita-se que este resultado se deve ao óleo diesel. No entanto, alguns microrganismos conseguiram se desenvolver após a contaminação, sendo um resultado importante para a biorremediação.

**Palavras-chave:** Bactérias; Fungos; Solo contaminado; Óleo diesel.

<sup>1</sup>Graduando em Engenharia Ambiental e Sanitária, Centro Federal de Educação Tecnológica – Departamento de Ciência e Tecnologia Ambiental, brunocrb2.0@gmail.com.

<sup>2</sup>Profa. Dra. do Centro Federal de Educação Tecnológica – Departamento de Ciências Biológicas, andreamg@cefetmg.br.

<sup>3</sup>Profa. Dra. do Centro Federal de Educação Tecnológica – Departamento de Ciências Biológicas, fabianatiago@cefetmg.br.

<sup>4</sup>Graduanda em Engenharia Ambiental e Sanitária, Centro Federal de Educação Tecnológica – Departamento de Ciência e Tecnologia Ambiental, marianampereira2011@gmail.com.

<sup>5</sup>Graduanda em Engenharia Ambiental e Sanitária, Centro Federal de Educação Tecnológica – Departamento de Ciência e Tecnologia Ambiental, sarahbonfim97@gmail.com.

<sup>6</sup>Graduando em Engenharia Ambiental e Sanitária, Centro Federal de Educação Tecnológica – Departamento de Ciência e Tecnologia Ambiental, viniciusvvc27@gmail.com.



## INTRODUÇÃO

Durante a exploração, o refino, o transporte e as operações de armazenamento de combustíveis derivados do petróleo podem ocorrer derramamentos acidentais, ocasionando a contaminação de solos e da água (ANDRADE et. al., 2010). Por isso, atividades que vão desde a exploração até a utilização de derivados do petróleo, como o óleo diesel, podem resultar em contaminação dos ambientes, fazendo da busca por alternativas de recuperação ambiental um enorme desafio (JACQUES et al., 2007). Em casos de acidentes ou outra ocasião de derramamento do óleo diesel na superfície, quando o combustível entra em contato com o solo, por exemplo, ocorre uma variedade de efeitos físicos, químicos e biológicos (BONA et al., 2011; SILVA, 2007). O impacto pode ser grande ou pequeno, sendo que uma maior ou menor retenção desse poluente vai depender das propriedades físico-químicas do solo, pois suas matrizes são complexas e apresentam grande afinidade química por diversos compostos (KNOP, 1996; MEYER, 2011). Ademais, no Brasil há uma diversidade na superfície sólida da crosta terrestre e os solos tipicamente brasileiros apresentam características físico-químicas específicas, como o franco-argilo-arenoso, que é um solo fácil de se trabalhar, estando na posição intermédia entre o solo argiloso e arenoso.

Os parâmetros tipicamente medidos em testes laboratoriais da eficiência da biodegradação incluem a contagem de microrganismos heterotróficos totais, contagem de microrganismos degradadores de um ou de vários substratos específicos, medidas da taxa de respiração microbiana (consumo de oxigênio e/ou produção de dióxido de carbono) e a determinação das taxas de degradação (desaparecimento de poluentes individualmente e/ou na totalidade) (SONG et al., 1990; BALBA et al., 1998; OH et al., 2000; KATAOKA, 2001, apud RAMINHO, 2015).

A presença de grande população de microrganismos heterotróficos totais não apresenta necessariamente correlação direta com a biodegradação, porém, a quantificação da fração da comunidade que degrada o resíduo de interesse tem sido utilizada como um

Realização



Apoio





dos métodos mais comuns para o monitoramento de poluição ambiental com hidrocarbonetos (KATAOKA, 2001).

Tendo em vista os efeitos prejudiciais do derramamento de óleo diesel no solo e a importância dos microrganismos, este estudo teve como objetivo avaliar experimentalmente o impacto da contaminação de óleo diesel na comunidade de microrganismos heterotróficos presentes em um solo.

## METODOLOGIA

### Caracterização do solo

Para execução deste estudo foram retiradas, de três pontos distintos, amostras de solo sem manejo nas dependências do CEFET-MG, a 5 centímetros da superfície. As amostras foram peneiradas, com uma peneira de malha de 10 mm, misturadas e homogêneas, totalizando 5 quilogramas de solo. Três quilogramas de solo foram enviados ao laboratório de química do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) para as análises químicas e granulométricas, e o restante foram usadas para ensaios laboratoriais. A caracterização química do solo determinou que o solo apresentava capacidade de troca catiônica de 7,46 cmol.carga/dm<sup>3</sup>, pH em água de 8,3, teor de matéria orgânica de 2,72 dag/kg e carbono 1,58 dag/kg. A definição do tipo de solo foi determinada pela caracterização granulométrica: 51,45% de areia, 15,34% de silte e 33,21% de argila; esses parâmetros definiu a classe de texturas conforme partículas unitárias das frações do solo, e determinou o solo como franco-argilo-arenoso (RIBEIRO, GUIMARÃES e ALVAREZ, 1999).

### Design experimental

Cinco amostras contendo 200 gramas do solo seco (4,94%) foram distribuídas em potes de plástico de 500 mL. Em seguida, foi realizada a contaminação do solo com 10mL de óleo diesel (5% da massa seca de solo), segundo descrito por GONÇALVES et al. (2018). O óleo foi adicionado ao solo utilizando uma pipeta e, concomitantemente, o solo

Realização



Apoio





foi misturado até homogeneização completa. Os frascos com as amostras foram tampados, embalados com folha de alumínio e incubados em temperatura ambiente.

O período de incubação ocorre ao longo de 21 dias, sendo que a amostra de controle foi definida logo após a coleta do solo. Desse modo, a primeira etapa de contaminação foi determinada após 60 minutos de aplicação do óleo diesel no solo. As etapas consecutivas foram realizadas após 7, 14, 21 dias, de maneira que totalizam 5 etapas desde o controle. A partir das diferentes características morfológicas das colônias de bactérias e fungos foi calculado a riqueza e diversidade através do índice de Shannon.

### **Caracterização microbiológica**

Para a caracterização microbiológica, 10g de solo foram coletadas do controle e nos quatro diferentes tempos de incubação com o contaminante e diluídos em uma solução de salina preparada (1L de água destilada e 0,9g de NaCl). Foram feitas diluições de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  utilizando 9 mL de solução salina e 1 mL de inóculo de solo, descartando-se 1 mL de cada tubo para garantir o mesmo volume em todas as diluições. Utilizando-se da técnica *spread plate*, 100  $\mu$ mL das diluições foram transferidas para as placas de Petri contendo meio Ágar dextrose Sabouraud (triplicata) e placas contendo meio Ágar PCA (Plate Count Agar) (triplicata). As placas de Petri foram incubadas à 30°C (para bactérias) e a temperatura ambiente (para fungos) durante 48 h e 7 dias, respectivamente. Após os períodos de incubação foram realizadas as contagens das unidades formadoras de colônias (UFC) e caracterização morfológica das colônias.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

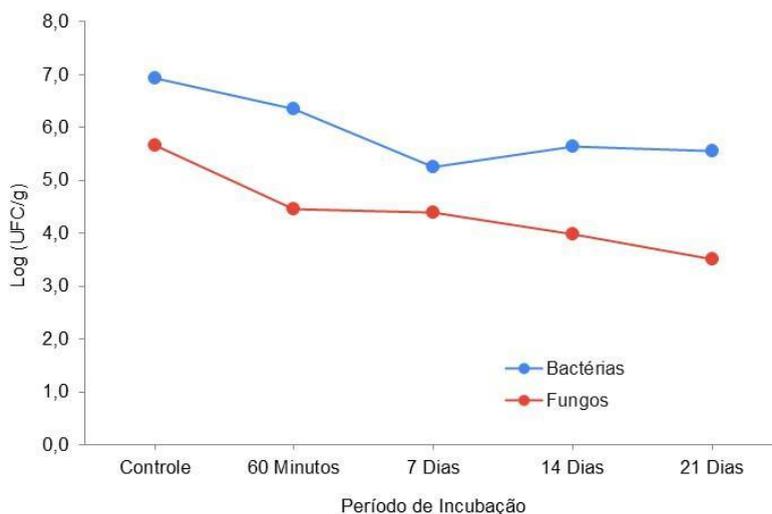
Os resultados dos números de UFC foram obtidos a partir das diluições  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , para fungos e bactérias, respectivamente. O gráfico 1 mostra a relação dos valores numéricos das UFC na forma logarítmica das por grama de solo do controle e nos diferentes tempos de incubação. Observou-se uma redução imediata dos microrganismos heterotróficos logo após a contaminação por óleo diesel. No entanto, não foi observado uma diminuição nos valores de UFC de bactérias ao longo do tempo de incubação

Realização

Apoio



(Gráfico 1). Ao contrário, o número de UFC de fungos diminuiu ao longo do tempo de incubação, mostrando maior sensibilidade dos fungos ao contaminante (Gráfico 1).



Fonte: Autor próprio

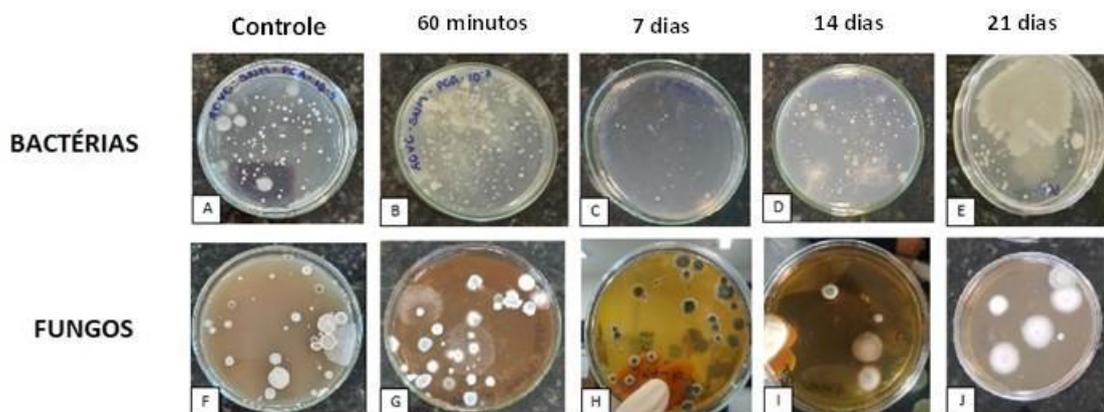
**Gráfico 1 – Curva com os valores do logaritmo das unidades formadoras de colônia por grama de solo (UFC/g) do controle e dos diferentes tipos de incubação do solo com o contaminante óleo diesel.**

Della Rosa et al. (2017), sugeriram que as bactérias encontradas no seu estudo possuíam uma maquinaria enzimática para converter hidrocarbonetos em intermediários de rotas catabólicas, ou seja, indicam a capacidade de degradar e utilizar o óleo diesel como fonte de carbonos e energia. No nosso estudo em questão, foi observado que houve uma estabilidade nos valores numéricos das UFC bacteriana após contaminação. Essa estabilidade pode estar ligada à capacidade das bactérias degradar o óleo diesel que, no entanto, mais estudos devem ser realizados para comprovar esta hipótese. Destaca-se que nenhum grupo de microrganismo conseguiu atingir os valores numéricos de UFC iniciais o que evidencia o potencial danoso do óleo diesel no meio ambiente.

Diferentes tipos morfológicos de colônias (morfotipos) foram observados ao longo do experimento. A figura 1 apresenta os aspectos das superfícies das colônias que cresceram nos meios seletivos nos diferentes tempos de incubação. Observou-se inicialmente, que as colônias bacterianas de aspecto cremoso com coloração branca



(Figura 1 B) e de fungos filamentosos de cores brancas e acinzentadas após 60 minutos de contaminação (Figura 1 G). Após 7 dias de contaminação, houve uma diminuição expressiva do número de UFC bacteriana, mas ainda foram evidenciadas as colônias de aspecto cremoso esbranquiçado (Figura 1C). Neste tempo de incubação, a maioria dos morfotipos fúngicos possuíam aspecto filamentoso de cor esverdeada e borda branca (Figura 1H).



Fonte: Autor próprio

**Figura 1 - Morfologia das colônias dos microrganismos heterotróficos do solo controle e do solo contaminado com óleo diesel nos diferentes tempos de incubação.**

Após 14 e 21 dias de incubação com o contaminante, observou-se uma retomada no crescimento bacteriano e aparecimento de colônias de aspecto cremoso esbranquiçado (Figura 1D e E). O número de colônias de fungos caiu consideravelmente nesses tempos de incubação, aparecendo de colônias de fungo filamentoso com aspecto cotonoso de cor branca e outras acinzentadas (Figura 1 I e J).

Considerando a variabilidade de morfotipos bacterianos e fúngicos encontrados durante o tempo de incubação do solo com o contaminante, foi observado a mesma riqueza em ambos os casos. Observou-se também, uma baixa diversidade de morfotipos de bactérias indicada pelo valor do índice de Shannon (0,026) e maior diversidade de fungos (0,627). No entanto, torna-se necessário um estudo mais detalhado, utilizando-se de técnicas de sequenciamento genético, para determinar as espécies encontradas neste estudo e a diversidade real.

Realização

Apoio



## CONCLUSÕES OU CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista os pontos abordados, percebeu-se que o óleo diesel promoveu uma alteração na comunidade de microrganismos heterotróficos. No entanto, destaca-se a existência de microrganismos que conseguiram se multiplicar após a contaminação, observando uma janela para estudos de biorremediação do solo. Os resultados encontrados permitem novas oportunidades de estudos e discussões no âmbito do impacto do óleo diesel na comunidade microbiana do solo.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a instituição CEFET-MG por proporcionar o espaço físico e os materiais necessários para essa pesquisa.

## REFERÊNCIAS

ALVAREZ, V.V.H. et al. **Interpretação dos resultados das análises de solos**. In: RIBEIRO, A.C.; GUIMARÃES, P.T.G.; ALVAREZ, V.V.H.. (Eds.) *Recomendações para uso decorretivos e fertilizantes em Minas Gerais*. Viçosa: CFSEMG. 1999. p. 25-32.

ANDRADE, J. de A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. **Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados**. *Eclética Química*, v. 35, n. 3, 2010.

BONA, C.; REZENDE, I. M.; SANTOS, G. O.; SOUZA, L. A. **Effect of soil contaminated by diesel oil on the germination of seeds and the growth of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) Seedlings**. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 54, n. 6, p. 1379-1387, nov. 2011.

DELLA ROSA, Isabela Karina *et al.* **EFEITO DA CONTAMINAÇÃO DO SOLO COM ÓLEO DIESEL SOBRE PARÂMETROS MICROBIANOS EM MICROCOSMOS**. In: VII JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA, 7., 2017, Cerro Largo. Anais [...]. Cerro Largo: Probic-Fapergs, 2017. p. 1-4. Disponível em: <https://portaleventos.uuffs.edu.br/index.php/JORNADA/article/view/5293>. Acesso em: 28 abr. 2022.

GONÇALVES, Naira Teresa Alves Campos *et al.* **EFEITO DAS CARACTERÍSTICAS DO SOLO NA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM ÓLEO DIESEL**. In: XIV SIMPÓSIO ÍTALO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL,

Realização

Apoio





14., 2018, Foz do Iguaçu. Anais [...] . Foz do Iguaçu: Abes, 2018. p. 1-6. Disponível em: <<https://abesnacional.com.br/XP/XP-EasyArtigos/Site/Uploads/Evento40/TrabalhosCompletoPDF/VI-010.pdf>>. Acesso em: 28 abr. 2022.

JACQUES, R.J.S., et al. **Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos**. Ciência Rural, v. 37, p. 1192-1201, 2007.

KATAOKA, A. P. A. G. **Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de "landfarming"**. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Unesp - Rio Claro, 2001

KNOP, A. **Encapsulamento de Solos Contaminados por Hidrocarbonetos**. 1996. 80f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996. MARIANO, Adriano Pinto. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. 2006.

MEYER, D. D. **Avaliação da biodegradabilidade de misturas de diesel e biodiesel (B0, B20 e B100) em dois solos com diferentes granulometrias**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

RAMINHO, Marcela Loureiro Fanni et al. **Utilização de tratamento físico e biológico conjugados empregando reatores de diferentes escalas na remediação de solo contaminado por biodiesel**. 2015.

SILVA, D. N. **Remediação de solos impactados com poluentes orgânicos usando os reagentes de fenton**. 2007. 124f. Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Realização



Apoio

