

8º CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS



TÍTULO DO TRABALHO:

EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE MATERIAIS VEGETAIS NA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO POR BORRA OLEOSA DO PETRÓLEO

AUTORES:

Danielle Aparecida Duarte Nunes, Maria Clara Reis Nucci, Nathalie Rocha Verly, Emanuela Forestieri da Gama-Rodrigues, Andréa Medeiros Salgado, Claudia Duarte da Cunha, Eliana Flávia Campoprese Sérvulo

INSTITUIÇÃO:

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Este Trabalho foi preparado para apresentação no 8º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás - 8º PDPETRO, realizado pela Associação Brasileira de P&D em Petróleo e Gás - ABPG, no período de 20 a 22 de outubro de 2015, em Curitiba/PR. Esse Trabalho foi selecionado pelo Comitê Científico do evento para apresentação, seguindo as informações contidas no documento submetido pelo(s) autor(es). O conteúdo do Trabalho, como apresentado, não foi revisado pela ABPG. Os organizadores não irão traduzir ou corrigir os textos recebidos. O material conforme, apresentado, não necessariamente reflete as opiniões da Associação Brasileira de P&D em Petróleo e Gás. O(s) autor(es) tem conhecimento e aprovação de que este Trabalho seja publicado nos Anais do 8º PDPETRO.

EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE MATERIAIS VEGETAIS NA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO POR BORRA OLEOSA DO PETRÓLEO

Abstract

The recovery of soil contaminated by petroleum hydrocarbons (HTP) can be conducted by bioremediation. A possible strategy for inducing microbial decomposing activity towards petroleum sludge includes the addition of plant residues to the soil in order to promote the improvement of nutritional quality, physical properties, and aeration. The use of leaf litter of forest leguminous plant such as *Mimosa caesalpinifolia* (sabiá) is advantageous because of the association with symbiotic N₂-fixing bacteria and mycorrhizal fungi, improving nutrients absorption. The aim of this study was to evaluate the effect of adding sabiá leaf litter in the bioremediation of soils impacted with petroleum oily sludge. The soil (1 kg) was placed in plastic containers with and without addition of plant residues, for comparative purposes. The experiments were conducted in a greenhouse where the temperature ranged from 25 to 30°C. The soil initial moisture content of 40% was restored whenever necessary, watering and revolving the soil. During 90 days, it was performed pH monitoring, quantification of total heterotrophic bacteria (THB), total fungi (TF), and micro-organisms degrading oil (MDO) every 30 days. At the 90th day, the soil was analyzed for total petroleum hydrocarbons (TPH). Comparing the results for leaf litter (10 to 20 g kg⁻¹) it was observed a higher TPH removal of 3,4% w/w for the control assay and 0,2% w/w HTP degradation for the plants residues (sabiá). In this condition, it was also detected an increase of indigenous microbial populations up to 1.12 x 10⁸ CFU g⁻¹ and 2.50 x 10⁵ g NMP g⁻¹, in 1 and 3 orders of magnitudes, respectively to HTB and MDO. Sabiá leaf litter seems to be responsible for increasing the availability of nutrients, especially nitrogen, favoring the activity of indigenous microbial populations. The small degradation HTP when there was addition of sabiá leaf litter indicates that this plant material may also have been active in retention of these contaminants, which can prevent the increase in soil contamination.

Introdução

O petróleo, que é constituído de uma combinação complexa de hidrocarbonetos e metais pesados, além de ser uma fonte indireta de contaminação ao longo do seu processamento, englobando as etapas de exploração, refino, transporte e armazenamento, frequentemente é a causa de derramamentos acidentais. Os derrames, aliados a disposição inadequada dos resíduos gerados pela indústria petrolífera, tem sido os principais responsáveis pelo aumento da contaminação ambiental, causando uma frequente introdução de substâncias químicas tóxicas em diferentes ambientes, como solos, águas e atmosfera (SUSARLA et al., 2002). Neste caso, os metais pesados, e especialmente os hidrocarbonetos aromáticos, quer simples (BTEX) quer os policíclicos (HPAs) despontam, devido à elevada toxicidade e persistência no meio ambiente.

Na busca de alternativas para promover a recuperação de áreas contaminadas com variadas substâncias de elevada toxidade, tem sido consenso que a medida a ser adotada deva contemplar à eficiência na descontaminação, simplicidade na execução, curto tempo e baixo custo. Neste contexto, cresce o interesse pela utilização da biorremediação, técnica utilizada para descontaminação do solo pela ação efetiva de organismos vivos, como micro-organismos, ou sua associação com plantas, denominada fitorremediação (PIRES et al., 2003). No caso específico da biorremediação, deve-se estimular a atividade dos micro-organismos degradadores do(s) poluente(s) mediante adequação das condições do ambiente a fim de assegurar seu pleno metabolismo (WIECHETECK et al., 2004). Esta técnica é uma boa ferramenta para a recuperação de áreas degradadas pela contaminação com resíduos petrolíferos, podendo alcançar a mineralização total do poluente orgânico, sem geração de resíduos secundários (ANASTASI et al., 2008).

Dentre as possibilidades para melhorar o processo de biorremediação do solo, pode-se adotar o emprego de materiais vegetais. A incorporação desses aos solos, além de aumentar a disponibilidade de matéria orgânica (MO), tornam mais eficientes a ciclagem e a mobilização de nutrientes, melhoram

as suas propriedades físicas, e podem contribuir para a drenagem da água e para a difusão de oxigênio, entre outros benefícios gerados (FERNANDES et al., 2006). Portanto, os materiais vegetais podem estimular a atividade dos micro-organismos degradadores de óleo, e consequentemente a remoção dos HTP.

Os resíduos vegetais, quando adicionados no solo ou na água, também podem atuar na adsorção ou absorção de contaminantes como os hidrocarbonetos provenientes do petróleo, o que pode impossibilitar a locomoção destas substâncias e, portanto pode trazer o benefício de impedir o alastramento da contaminação nesses ambientes, possibilitando inclusive a retirada dos contaminantes retidos nos resíduos vegetais, quando o ambiente contaminado é a água (ITOPF, 2012).

Quando o material vegetal a ser utilizado é a serapilheira de leguminosas, a relevância do emprego deste material reside na capacidade dessas plantas de acumularem nutrientes. Uma vez que elas realizam associação com bactérias fixadoras de N_2 e fungos micorrízicos em suas raízes, o que promove a melhoria na absorção de nutrientes (CARVALHO et al. 2003). Sendo assim, o fornecimento da serapilheira de leguminosas ao solo com o intuito de incrementar a biorremediação do mesmo, pode ser uma alternativa eficaz a baixo custo, uma vez que pode diminuir gastos com fertilizantes, prática frequentemente adotada em tratamentos biológicos. Neste sentido, o presente estudo propôs avaliar o efeito da adição da serapilheira da leguminosa florestal *Mimosa Caesalpinifolia* (sabiá) na biorremediação de um solo impactado por borra oleosa do petróleo.

Metodologia

A coleta do solo impactado por borra oleosa do petróleo foi realizada em três pontos aleatórios de um sistema *landfarming* de uma refinaria de petróleo brasileira (Figura 1), e as amostras foram posteriormente encaminhadas para o laboratório, onde o solo foi destorroado e quarteado para sua homogeneização.

O material vegetal utilizado neste experimento foi a serapilheira da leguminosa florestal *Mimosa Caesalpinifolia* (Sabiá), que foi coletada com uma ferramenta apropriada para esta coleta (gabarito metálico com área de 25 cm x 25 cm), no solo de um plantio de sabiá localizado na fazenda Carrapeta, localizada no município de Conceição de Macabu, RJ. A serapilheira consiste em todo material vegetal acumulado sobre a superfície do solo, abaixo do dossel das árvores (Figura 1).



Figura 1 – Foto do sistema *landfarming* de uma refinaria de petróleo brasileira (1) e foto da área da leguminosa florestal *Mimosa Caesalpinifolia* (Sabiá) indicando o local da serapilheira (2).

O experimento foi realizado em casa de vegetação (Figura 2), com temperatura média de 26°C. O solo foi colocado na quantidade de 1kg em recipientes plásticos (13,5 x 12 x 20,5 centímetros), e foi avaliado quando não foi adicionado a serapilheira do sabiá, e com a adição da serapilheira do sabiá na quantidade de 10g e 20g (Figura 2). O experimento foi conduzido por 90 dias, havendo amostragem do solo a cada 30 dias para realização das análises de hidrocarbonetos totais do

petróleo (HTP), contagem das bactérias heterotróficas totais (BHT), fungos totais (FT), e dos Micro-organismos degradadores de óleo (MDO). O solo utilizado apresentou inicialmente 40% de umidade (verificada em balança de secagem por infravermelho), que foi restabelecida semanalmente, junto com o monitoramento do pH e teve a monitoração diária de temperatura em todos os tratamentos. Os solos também foram revolvidos semanalmente.



Figura 2 – Casa de vegetação onde os experimentos foram conduzidos (1), Recipientes plásticos onde foram colocadas as amostras de solo do experimento (2) e solo com a serapilheira do sabiá com algumas setas para ajudar na visualização da mesma (3).

A contagem das bactérias heterotróficas totais (BHT) e fungos totais (FT) foram feitas por unidade formadora de colônia (UFC), enquanto a contagem dos Micro-organismos degradadores de óleo (MDO), foi realizada pela técnica do número mais provável (NMP) (Wrenn e Venosa, 1996). Os hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP) foram extraídos conforme a metodologia de Telhado (2009), e a determinação dos mesmos foi realizada por espectrometria de infravermelho, utilizando o equipamento Infracal (modelo HART-T da Wilks Enterprise).

Resultados e Discussão

Após receber a serapilheira do sabiá nas diferentes quantidades avaliadas (10g e 20 g kg⁻¹ solo) as análises microbiológicas do solo mostraram que a população de BHT somente foi maior que a do solo inicial (1,12x10⁸ UFC), aos 60 dias de experimento (1,89 x 10⁹ UFC g⁻¹ solo) (Figuras 4), embora não tenha apresentado diferença em relação ao controle. A população de FT não foi maior que a do solo inicial (4,35x10⁴ UFC) para nenhum dos tempos e tratamentos avaliados, e foi menor que a população de BHT (10⁴ de ordem de grandeza) (Figura 3). SHAHSAVARI et al. (2013), estudaram diferentes tipos de resíduos (feno de alfafa, palha de ervilha, palha de trigo, e a mistura dos resíduos com gesso), e também verificaram para os melhores resultados (quando o solo foi tratado com palha de trigo), que a população de fungos (na ordem de grandeza de 10⁶ UFC g⁻¹ solo) foi menor que a de bactérias (na ordem de grandeza de 10⁸ UFC g⁻¹ solo). Mesmo que em menor número que as bactérias, os fungos presentes no solo são importantes como cooperadores no processo de biorremediação, pois possuem crescimento micelial, o que possibilita a esses uma boa colonização de substratos, digerindo-os através de enzimas extracelulares, e consequentemente facilitando a atuação por bactérias (CLEMENTE et al., 2001).

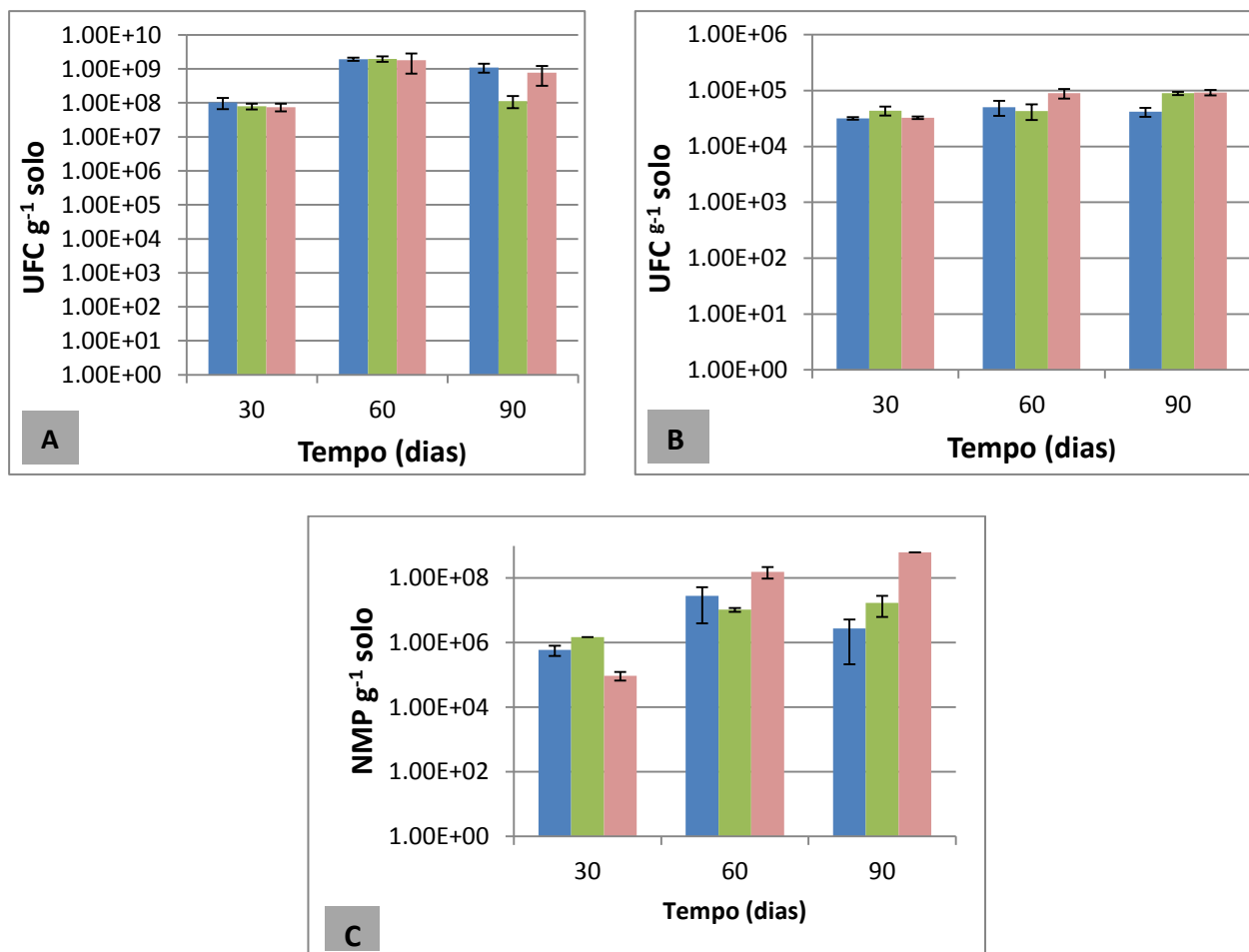


Figura 3. Quantificação de bactérias heterotróficas totais (BHT) (A), de fungos totais (FT) (B), e dos micro-organismos degradadores de óleo (MDO) (C), nos tempos de 30, 60 e 90 dias. Solo sem tratamento (controle) (■); solo com 10 g kg⁻¹ solo da serapilheira do sabiá (■); solo com 20 g kg⁻¹ solo da serapilheira do sabiá (■). (A população inicial de BHT, FF e BDO do solo foi de 1,12x10⁸ UFC; 4,35x10⁴ UFC e 2,50x10⁵ NMP g⁻¹ solo respectivamente).

Os micro-organismos degradadores de óleo (MDO) refletiram a mesma tendência das BHT quando houve a adição de serapilheira do sabiá. Somente após 60 dias de experimento esses micro-organismos apresentaram uma população maior que a do solo inicial (2,50x10⁵ NMP) (Figura 3). As maiores populações de MDO, ocorreram com 60 (1,58x10⁸ NMP) e 90 (6,25x10⁸ NMP) dias, no tratamento com a maior quantidade de serapilheira do sabiá (20g kg⁻¹ solo), alcançando valores muito próximos ao da população de BHT (Figura 3). O aumento da população das BDO e dos MDO somente após 60 dias pode indicar que a serapilheira do sabiá tem um material recalcitrante, o que provavelmente se deve ao alto teor de lignina em sua composição (Tabela 1). Apesar disso, esse material vegetal pode atuar como uma boa fonte de nutrientes para que os micro-organismos possam degradar os hidrocarbonetos presentes na borra oleosa do petróleo, e utilizar o C presente nos hidrocarbonetos como fonte de substrato, pois de fato, a serapilheira do sabiá possui maiores teores nutricionais de P, Ca, Mg e N e uma boa relação C/N (26,0) (Tabela 1), quando comparada a outros vegetais. NUNES (2011) ao estudar a liberação de fósforo orgânico (Po) de solos plantados com a mesma leguminosa florestal deste trabalho (sabiá), e de outra leguminosa florestal (*Acácia Auriculiformis*), em relação a um pasto, verificou uma maior liberação de Po no solo, atribuindo isso aos maiores valores de Ca, Mg e N da serapilheira dessas leguminosas. A relação C/N do sabiá, provavelmente também favoreceu a liberação de nutrientes para os micro-organismos, uma vez que relações C/N abaixo de 30 favorecem a liberação de N no solo (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

Como a serapilheira do sabiá possui um considerável teor nutricional, principalmente de N (Tabela 1), a lenta decomposição da serapilheira do sabiá pode ser importante porque além de manter a população de micro-organismos ativa por um tempo maior, ao fornecer C e outros nutrientes gradativamente ao solo, pode evitar a deficiência de alguns nutrientes que muitas vezes é gerada pela retenção ou perda de alguns elementos no perfil do solo quando são adicionados por meio de fertilizações minerais, como é o caso do P e N respectivamente (NOVAIS et al., 2007; SANGOI et al., 2003; BERTOL et al., 2005).

Ao final do experimento (90 dias), as populações de BHT, FT e BDO dos solos que receberam a serapilheira do sabiá se mantiveram, com exceção apenas para as BHT, na presença da menor quantidade de serapilheira (10g kg^{-1} solo), que apresentaram uma redução na quantidade de micro-organismos (figura 3). Este decréscimo pode indicar que para essa quantidade de serapilheira, como já não era mais possível observá-la visualmente no solo ao final do experimento, pode ter havido uma diminuição na quantidade de substrato e do efeito de bioestímulo promovido por ela, o que fez com que ocorresse uma diminuição na população das BHT.

Tabela 1. Caracterização química e física dos materiais orgânicos vegetais.

Material vegetal	Caracterização química									
	P	Ca	Mg	K	Na	Polifenóis	C	N	Celulose	Lignina
	-----mg/kg-----					-----%-----				
Sabiá	525	12171,5	1939,5	1500	600	0,496	36,36	1,384	24,08	51,08

Ao final do experimento (90 dias), foi possível observar que embora a população de MDO tenha aumentado durante o tratamento com a serapilheira do sabiá, apenas no solo onde foi adicionada a quantidade de 20g kg^{-1} solo da serapilheira houve uma pequena degradação de HTP (0.210%) (Figura 4). A pequena remoção de HTP verificada para este tratamento pode ter ocorrido em função da quantidade de serapilheira utilizada, que pode não ter sido suficiente para promover uma maior degradação de HTP pelos micro-organismos. Além disso, como no solo do controle foi verificada uma maior remoção de hidrocarbonetos (3,356%), pode ser que tenha havido uma retenção dos HTP pelo material vegetal adicionado.

Alguns autores estudaram a biorremediação de solos impactados por petróleo utilizando outros tipos de materiais vegetais (GABRIEL, 2008; BRANDÃO, 2006 e MOLINA-BARAHONA et al., 2004). Eles verificaram maiores degradações de óleo que o encontrado neste trabalho, mas é importante enfatizar que as pesquisas foram conduzidas com solos artificialmente contaminados em laboratório, o que não foi o caso deste trabalho. Além disso, os resíduos vegetais podem apresentar outros efeitos no solo além de propiciar a remoção de HTP, como por exemplo, a retenção de HTP (adsorção e/ ou absorção de óleo), o que está relacionado com a presença da lignina, que é um biopolímero presente nos vegetais que apresenta a capacidade de absorver poluentes orgânicos como os hidrocarbonetos do petróleo (SHAHSAVARI et al., 2013). Esse efeito pode promover outro benefício, evitar o aumento da contaminação de solos e águas, e consequentemente impedir que a contaminação chegue a lençóis freáticos.

Tendo em vista que os solos do controle não receberam a adição da serapilheira do sabiá e, portanto não podem ter sofrido o efeito da retenção dos HTP, a remoção de HTP no controle pode ter ocorrido porque assim como os outros tratamentos, o mesmo recebeu padronizações de umidade e revolvimentos semanais. A manutenção de uma boa quantidade de água no solo (entre 40% e 80% da

capacidade máxima de saturação do solo) promove uma boa mobilidade dos contaminantes através da movimentação da água no solo, impedindo que estes fiquem concentrados em determinados pontos do solo e se tornem mais disponíveis para a degradação pelos micro-organismos (RIZZO et al., 2006), enquanto o revolvimento do solo promove uma melhoria na aeração, o que estimula o crescimento dos micro-organismos aeróbios presentes no solo.

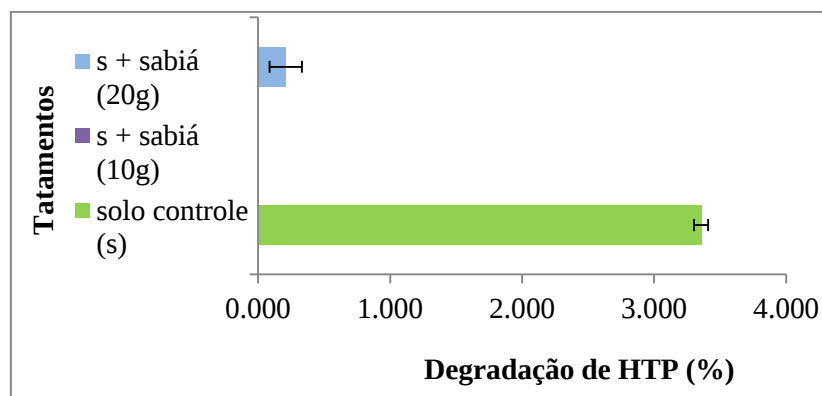


Figura 4 – Teor de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) no solo sem adição da serapilheira do sabiá e nos solos com adição da serapilheira do sabiá nas quantidades de 10 g (S + SER 10g) e 20g (S + SER 20g) kg^{-1} após 90 dias de experimento.

Conclusão

A adição da serapilheira do sabiá no solo impactado com borra oleosa do petróleo promoveu condições favoráveis para o aumento das populações de BHT e MDO, embora tenha promovido uma degradação de HTP muito pequena.

Agradecimentos

UFRJ, ANP e FINESP

Referências Bibliográficas

- ANASTASI, A.; VARESE, G. C.; BOSCO, F.; CHIMIRRI, F.; MARCHISIO, V. F. Bioremediation potential of basidiomycetes isolated from compost. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 6626–6630, 2008.
- BERTOL, O. J.; RIZZI, N. E.; FAVARETTO, N.; LAVORANTI, O. J. Perdas de nitrogênio via superfície e subsuperfície em Sistema de semeadura direta. *FLORESTA*, Curitiba, PR, v. 35, n. 3, 2005.
- BRANDÃO, P. C. Avaliação do Uso de Bagaço de Cana como Adsorvente para a Remoção de Contaminantes, Derivados de Petróleo, de Efluentes. Dissertação M. Sc., Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 147 p, 2006.
- CARVALHO, M. M. D. F.; XAVIER & M.J. ALVIM. Arborização melhora a fertilidade do solo em pastagens cultivadas. *Embrapa Gado de Leite*, 4 p. (Comunicado técnico, 29), 2003.
- RIZZO, A. C. L.; LEITE, S. G. F.; SORIANO, A. U.; SANTOS, R. L. C.; SOBRAL, L. G. S. Biorremediação de solos contaminados por petróleos: ênfase no uso de biorreatores. *CETEM - Centro de Tecnologia Mineral. Série Tecnologia Ambiental*, nº 37, 2006.

CLEMENTE, A. R.; ANAZAWA, T. A.; DURRANT, L. R. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 32, p. 255-261, 2001.

GABRIEL, S. Biorremediação do lodo de caixas separadoras de água e óleo utilizando bagaço de cana-de-açúcar, Dissertação M. Sc., Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 65p, 2008.

WRENN, BRIAN A.; VENOSA, ALBERT D. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 42, pp. 252-258. 1996.

WIECHETECK, F. V. B.; BISCAIA, I.; SCHERER, M. L.; GELINSKI, R.; BUENO, T.; OLIVEIRA, Z. C. Z.; PILEGGI, M. Análise microbiológica de resíduo suíno para avaliação de biorremediação e biodiversidade. *Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde*, Ponta Grossa, v.10, nº1, p. 47-51, 2004.

FERNANDES, M. M.; PEREIRA, M. G.; MAGALHÃES, L. M. S.; CRUZ, A. R.; GIÁCOMO, R. G. Aporte e decomposição de serapilheira em áreas de floresta secundária, plantio de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) e andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) na flona Mário Xavier, RJ. *Santa Maria, Ciência Florestal*, v. 16, nº 2, p. 163-175, 2006.

ITOPF – Use of sorbent materials in oil spill response. Technical information paper. ITOPF Ltd. Produced by impact PR & Design, Canterbury, UK. 2012.

MOLINA-BARAHONA, L.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; HERNÁNDEZ-VELASCO, M.; VEGA-JARQUÍN, C.; ZAPATA-PÉREZ, O.; MENDOZA-CANTÚ, A.; ALBORES, A. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v. 27, n. 2, p. 165-175, 2004.

NOVAIS, R. F.; SMITH, T. J. & NUNES, F. N. FÓSFORO. IN: NOVAIS, R. F; ALVARES, V. H.; BARROS. N. F.; FONTES, R. B. C.; NEVES, J. C. L. *Fertilidade do solo* 2007. 1. ed. Sociedade Brasileira de Ciência do solo, Viçosa, M G, p. 471-550, 2007.

NUNES, D. A. D. Mineralização de fósforo orgânico em solos sob leguminosas florestais, floresta secundária e Pastagem. Dissertação (Mestrado), Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do norte Fluminense – UENF, 78p, 2011.

PIRES, F.R., SOUZA, C.M., SILVA, A. A., PROCÓPIO, S.; O. E FERREIRA, L.R. Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v.21, nº2, p.335-341, 2003.

SHAHSAVARI, E.; ADETUTU, E. M.; ANDERSON, P. A. BALL, A. S. Plant residues - A low cost, effective bioremediation treatment for petrogenic hydrocarbon-contaminated soil. *Science of the Total Environment*, v.443, p. 766–774, 2013.

SIQUEIRA, J.O. & FRANCO, A.A. *Biotechnology do solo: fundamentos e perspectivas*. Brasília, Ministério da Educação e Cultura, 236p., 1988.

SUSARLA, S.; MEDINA, V.F.; MCCUTCHEON, S.C. Phytoremediation: An Ecological Solution to Organic Chemical Contamination. *Ecological Engineering*, v. 18, p. 647-658, 2002.

TELHADO, M.C.S.C.L. Avaliação da biodisponibilidade de contaminante orgânico em solo, Dissertação M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 124p, 2009.