



VI-027 - BIORREMEDIAÇÃO ESTIMULADA DE SOLO CONTAMINADO POR RESÍDUO DE PETRÓLEO

Sônia Valéria Pereira⁽¹⁾

Química, doutora em Botânica pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, coordenadora do Laboratório de Tecnologia Ambiental da Associação Instituto de Tecnologia de Pernambuco

Helio Alexandrino Viana da Silva Filho

Biólogo, mestre em Tecnologia Ambiental pela Associação Instituto de Tecnologia de Pernambuco

Franklin Santos Freire

Biólogo, mestre em Tecnologia Ambiental pela Associação Instituto de Tecnologia de Pernambuco

Graziella de Sá Gattai

Bióloga, mestre em Biologia de Fungos pela Universidade Federal de Pernambuco

Endereço⁽¹⁾: Av. Prof. Luiz Freire, 700 – Cidade Universitária, Recife, PE CEP: 50740-540 - Brasil - Tel: (81) 32724284 soniaitep@gmail.com

RESUMO

Esse trabalho realizado em microcosmo com solo contaminado com borra de petróleo proveniente do Porto do Recife-PE traz uma preocupação com a utilização dessa energia não renovável e as principais fontes de contaminação advinda desta atividade, mas também indica solução de tratamento através da biorremediação estimulada por nutrientes. Os principais objetivos do trabalho foram: a. Verificar, em escala de laboratório, se a adição de nutriente estimula o crescimento microbiano em solo contaminado por borra de petróleo; b. Avaliar a emissão de CO₂ e o carbono da biomassa microbiana em amostras de solo contaminados com borra, adicionados de sais de nitrogênio e fósforo; c. Determinar o número de colônias (UFC) de fungos filamentosos dos tratamentos estudados, relacionando com os parâmetros de biodegradabilidade; Foram avaliados parâmetros indicativos de atividade microbiana, tais como: biológicos (carbono microbiano, respirometria, quociente metabólico q_{CO_2} e crescimento fúngico) e físico-químicos (pH, solúveis em hexano e matéria orgânica). Os resultados sugerem que a adição de 5% de borra de petróleo no solo com resíduo e após adição de nutriente apresentou biodegradação do contaminante. Dos parâmetros analisados a respirometria e o carbono microbiano foram considerados os mais indicativos das alterações na atividade microbiana submetidos aos distintos tratamentos.

PALAVRAS-CHAVE: Biorremediação, atividade microbiana, resíduo de petróleo

INTRODUÇÃO

A geração de resíduos tóxicos pelas indústrias ligadas ao setor petrolífero representa uma fonte poluidora de grande impacto ambiental nos ecossistemas. Uma questão chave para as empresas do setor é o desenvolvimento de tecnologias focadas no aprimoramento dos processos de extração, beneficiamento e distribuição visando, minimizar os impactos no meio ambiente e promover a disposição adequada dos rejeitos gerados. A história da indústria petrolífera no mundo tem mostrado uma série de acidentes graves, que trouxeram e tem trazido um grande risco para os ecossistemas. Um alerta ficou bastante evidente, com os primeiros acidentes envolvendo petroleiros que poluíram e provocaram grandes prejuízos ambientais, como por exemplo, o ocorrido em 1967 com o navio liberiano "Torrey Canyon" que encalhou frente à costa da Grã-Bretanha, próximo das ilhas Scilly, causando uma maré negra de 300 km², ao derramar 123 mil toneladas de petróleo. Na ocasião, cerca de 180 km de praias francesas e inglesas foram atingidas. Em 1989 o petroleiro "Exxon Valdez" encalhou, derramando 40 mil toneladas de petróleo bruto no estreito Prince William. Um ano depois, tinham sido recolhidos 34.400 cadáveres de aves, mil de lontras e 151 de águias-calvas. Em 1991, na Guerra do Golfo, vários poços de petróleo foram explodidos ocasionando grande contaminação, com mais de 820 mil toneladas de petróleo derramados, contaminando uma vasta região do Kuwait.

Em relação aos vazamentos, a história da exploração de petróleo no Brasil é acompanhada por uma infinidade de desastres ambientais. O pior deles ocorreu em março de 1975, quando cerca de seis milhões de litros de petróleo vazaram de um cargueiro iraniano na baía de Guanabara. Outro episódio aconteceu em 1983, quando 1,5 milhões de litros de óleo vazaram do oleoduto Rio-Santos, atingindo o canal Bertioga e mais 17 praias. O



prazo de recuperação dos ecossistemas em desastres como este é de mais de 20 anos. Em muitos casos, as consequências decorrentes do acondicionamento inadequado e da destinação final do contaminante podem alterar a composição do solo e contaminar por lixiviação ou infiltração o lençol freático.

A indicação de alternativas tecnológicas voltadas para questões ambientais se insere no contexto atual de desenvolvimento industrial do estado, como oportuna, necessária e desafiadora para atuais gestões dos segmentos públicos e privados.

Na perspectiva de utilização de uma tecnologia ambiental de baixo custo e eficiente, a biorremediação surge como alternativa para atenuar os efeitos negativos das contaminações com o uso de organismos, que via processos metabólicos, são capazes de utilizar esses resíduos como fonte de energia.

Em estudo realizado por Freire (2007), com solo contaminado com óleo oriundo de uma área pertencente ao Porto do Recife-PE, foi constatada atividade microbiana nas amostras submetidas a um processo de biodegradação passiva. Considerando a presença de microorganismos tolerantes a este tipo de contaminante, este estudo objetivou avaliar, em escala de laboratório (microcosmo), o comportamento metabólico da microbiota do solo contaminado com resíduo de petróleo em presença de nutrientes.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi selecionada, para coleta de solo, uma área pertencente ao Porto do Recife - PE, localizado no centro-leste da cidade, com confluência com as margens dos rios Capibaribe e Beberibe (coordenadas: Lat 08°04'S Long 34°52'W).

A amostragem do solo foi realizada em uma área sem histórico de contaminação, em pontos aleatórios e na profundidade de 0-10 cm. Após coleta, as amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno, transferidas para o Laboratório de Tecnologia Ambiental – LABTAM/ITEP e acondicionadas sob refrigeração de 10°C, até momento da análise.

O solo contaminado utilizado no estudo foi oriundo de um processo de remediação de uma área utilizada, durante 50 anos, por empresas distribuidoras de combustível. O solo estava acondicionado na ocasião em sacos de 1,0 ton, dispostos no pátio de estocagem do referido Porto.

Em amostras de solo não contaminado (100g), com a capacidade de campo ajustada para 50%, foram acrescidos 0,5g do resíduo oleoso e sais de nitrogênio e fósforo, segundo as concentrações: $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ e NH_4NO_3 (C; N; P, 10:1,0:0,2) para estimular a atividade microbiana utilizando como testemunha solo contaminado sem adição de nutrientes (R). Os tratamentos aplicados foram os seguintes: R+N (solo + sais de nitrogênio); R+P (solo + sais de fósforo) e R+N+P (solo + sais de nitrogênio + sais de fósforo). Após os períodos de 7, 21, 35, 49 e 63 dias de incubação a temperatura ambiente, foram analisados os parâmetros: pH (1 solo: 2 H_2O), matéria orgânica (Tedesco et al., 1995), crescimento fúngico (Warcup, 1950), respirometria (Grisi, 1978) e carbono microbiano (Vance et al., 1997). A atividade dos microrganismos do solo, caracterizada pela emissão de CO_2 foi determinada pela captura de CO_2 em solução de KCL e respiração específica da biomassa microbiana foi determinada pelo quociente metabólico ($q\text{CO}_2$). Os resultados foram submetidos a análises de estatísticas, utilizando-se o programa Statistica, e o teste de Tukey ao nível de 5%.

A análise físico-química do solo foi realizada no Laboratório de Análises Agrícolas LTDA – LAGRI e os experimentos de biodegradação foram realizados no LABTAM.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey com 5% de significância, usando o programa STATISTICA.

RESULTADOS

Crescimento fúngico

A estimativa do número de colônias fúngicas formadas em meio de cultura (UFC), apesar de não ser considerada uma medida confiável devido às variáveis e as limitações de cultivo em laboratório, é um importante parâmetro no estudo da dinâmica das comunidades microbianas. Esse pode indicar variações na densidade e na diversidade de populações submetidas a diferentes tratamentos, segundo diversos autores (ATLAS, 1986; ATLAS et al., 1990; AZEVEDO, 1997).

Na Figura 1, foi possível observar que os tratamentos referentes as amostras de solo + resíduo (SR) e solo + resíduo + fósforo (SR + P) apresentaram comportamento similar durante o período de incubação, no entanto, foi verificado diminuição do número de colônias a partir do 7º dia de crescimento



No 21^o de incubação foi verificado que, no tratamento recebendo sais de nitrogênio e fósforo (SR + N + P), obteve-se maior número de colônia fúngicas, em relação aos outros tratamentos, possivelmente devido ao aporte de nutrientes ao meio. Com relação ao tratamento apenas com adição de sais de nitrogênio (SR + N), ou seja, sem a presença de fósforo, foi observado crescimento inferior ao controle no 7^o e no 21^o dias de incubação, sugerindo que o fósforo é um elemento essencial para o crescimento fúngico. Após 49 dias de incubação foi constatado uma diminuição do crescimento em todos os tratamentos estudados, sendo atribuído-se ao fato a possível escassez de nutrientes.

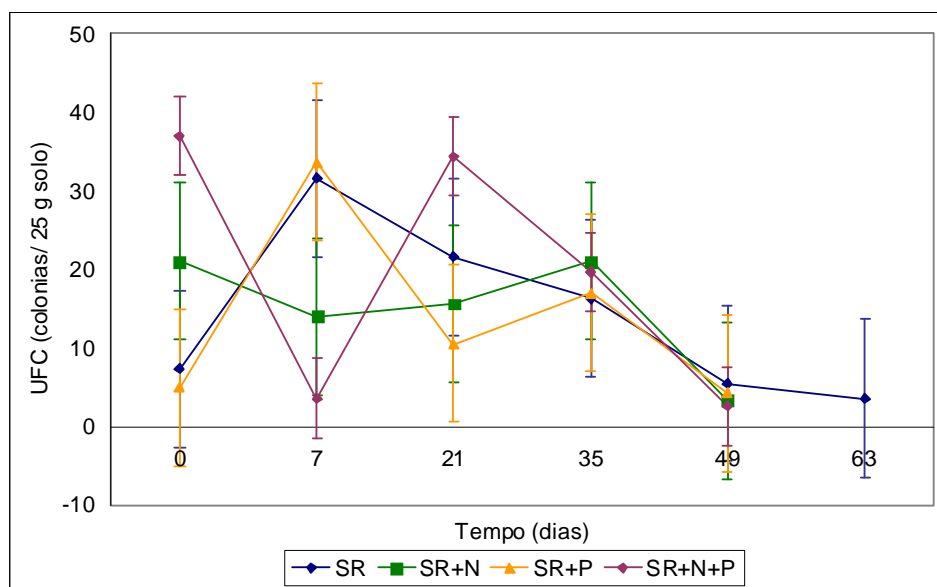


Figura 1: Valores médios do crescimento das colônias fúngicas (UFC) submetidas aos tratamentos de solo. (SR- solo com resíduo; SR+N- solo com resíduo e nitrogênio; SR+P- solo com resíduo e fósforo; SR+N+P- solo com resíduo, nitrogênio e fósforo)

Respirometria

Durante o experimento utilizando a técnica de biodegradação foi observado comportamento distinto na emissão de CO₂ referente as amostras de solo submetidas aos diferentes tratamentos (Figura 2). As amostras de solo + resíduo (SR) e solo + resíduo + fósforo (SR + P), apresentaram comportamentos similares em relação aos valores acumulados de C-CO₂ durante os 63 dias de incubação, variando entre 3,47- 177,1 µg C-CO₂. 100.g solo⁻¹. Por outro lado, os tratamentos recebendo concentrações de sais de nitrogênio (SR + N) e de nitrogênio e fósforo (SR + N + P) apresentaram valores próximos e superiores ao controle (177,1; 173,3 e 42,66 µg C-CO₂/100.g solo⁻¹, respectivamente) após o período de incubação. Esse aumento na emissão de CO₂ pode esta relacionada a uma condição de estresse em função da adição de sais inorgânicos no meio. Resultados similares foram obtidos por Millán (2004), em experimento realizado com lodo de refinaria. Segundo o autor, a incorporação de nutrientes (fósforo e nitrogênio) de forma exógena ao solo não provoca aumento no processo de degradação de hidrocarbonetos.

A estimativa do desprendimento acumulativo de C-CO₂ evidenciou o comportamento metabólico no processo de biodegradação de contaminantes sob condições estimulada e controlada em laboratório.

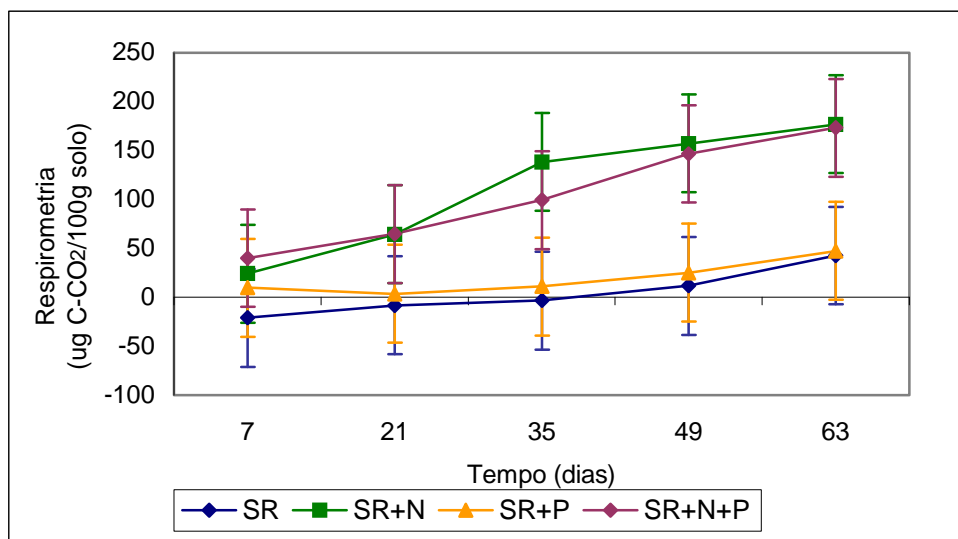


Figura 2: Valores médios de C-CO₂ (µgC-CO₂.g solo⁻¹) nos diferentes tratamentos de solo. (SR- solo com resíduo; SR+N- solo com resíduo e nitrogênio; SR+P- solo com resíduo e fósforo; SR+N+P- solo com resíduo, nitrogênio e fósforo)

Carbono microbiano

A quantidade de carbono da biomassa microbiana e a emissão de C-CO₂ *in situ* ou em laboratório, têm sido utilizados como parâmetros indicativos de qualidade do solo em experimentos voltados para a elucidação do papel dos microrganismos no processo de degradação e recuperação de áreas degradadas. Os métodos de avaliação C microbiano do solo são bastante variados, mas, de uma forma geral, permitem avaliar o *status* de carbono e de outros nutrientes contidos nos microrganismos (DE-POLLI & GUERRA, 1997).

Neste estudo, os resultados obtidos do Cmic no experimento de biodegradação (Figura 3) não diferiram estatisticamente. No entanto, os dados apresentados no 35º dia de incubação indicaram um decréscimo nos valores do Cmic, referente ao tratamento com nitrogênio (123,75 µg C/g solo seco⁻¹) em relação ao controle (433,12 µg C/g solo seco⁻¹). Considerando os dados da emissão de CO₂ (Figura 2), é possível observar que o coeficiente metabólico (*q*CO₂) neste período foi maior que 1,0 (Figura 4) sugerindo uma condição de estresse provocada possivelmente pela adição do nitrato de amônia. Segundo Paula et. al. (2006) valores elevados de *q*CO₂ podem indicar estresse fisiológico na comunidade microbiana. Ainda no período de 35º dia de incubação, foi observado que as amostras com adição de fósforo (SR + P) e o controle (SR), apresentaram baixos valores de coeficiente metabólico (0,01; 0,05, respectivamente). Esse comportamento pode ser comprovado nos dados indicados na Figura 4. Segundo Pinzari et al., (1999), valores elevados de *q*CO₂ refletem dificuldades do uso de substratos orgânicos pela biomassa microbiana presente no solo, com adição de nutrientes.

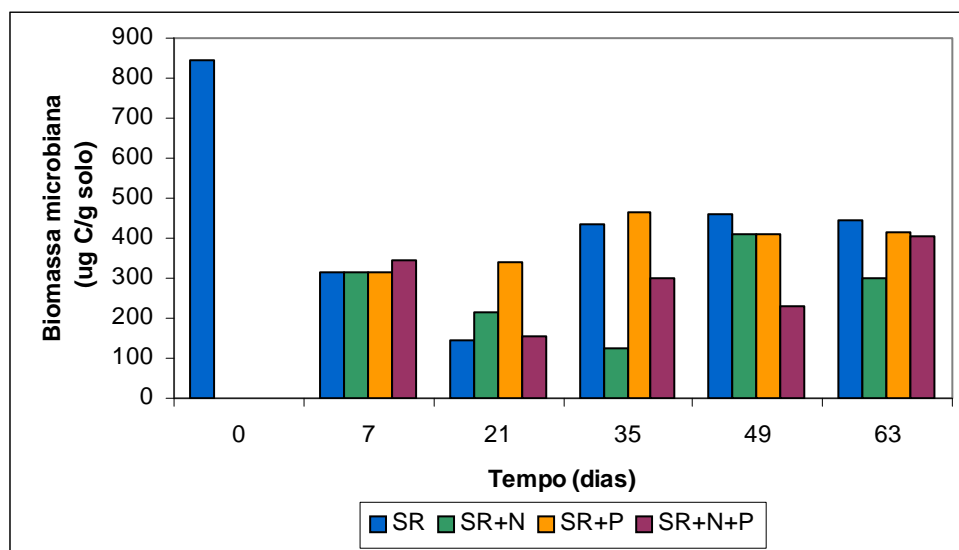


Figura 3: Carbono microbiano ($\mu\text{g C/g solo seco}^{-1}$) estimado nas amostras de solo nos diferentes tratamentos. (SR- solo com resíduo; SR+N- solo com resíduo e nitrogênio; SR+P- solo com resíduo e fósforo; SR+N+P- solo com resíduo, nitrogênio e fósforo)

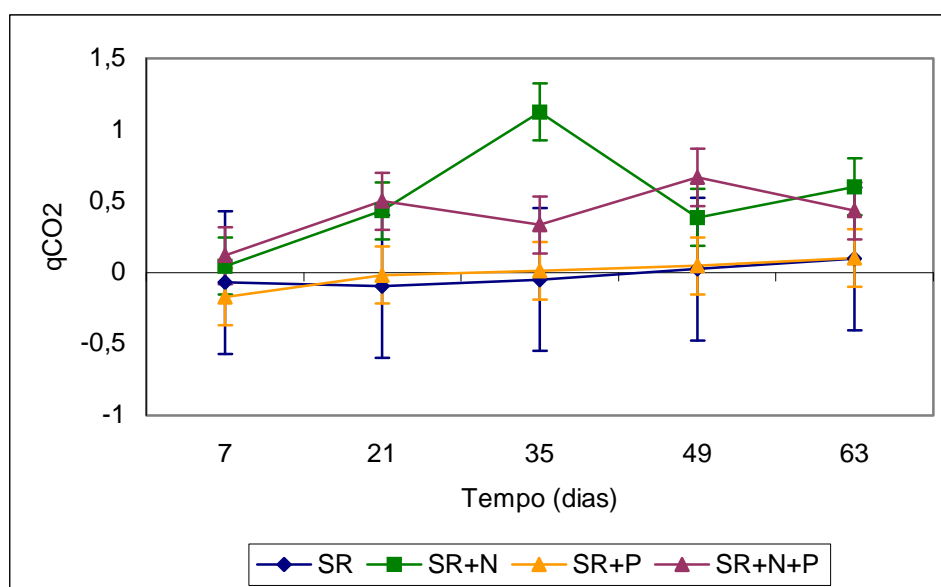


Figura 4: Valores médios do coeficiente metabólico ($\mu\text{gC} - \text{CO}_2 - \mu\text{g Cmic}$) observado durante os 63 dias de tratamento. (SR- solo com resíduo; SR+N- solo com resíduo e nitrogênio; SR+P- solo com resíduo e fósforo; SR+N+P- solo com resíduo, nitrogênio e fósforo).

pH do meio

A atividade microbiana é extremamente dependente do pH do meio. Da mesma forma, a solubilidade dos contaminantes e a sorção destes no solo podem variar em função deste parâmetro (Provident et. al., 1993). Segundo Alexander (1999), nas faixas de pH em torno da neutralidade a biodegradação tende a ser mais efetiva.

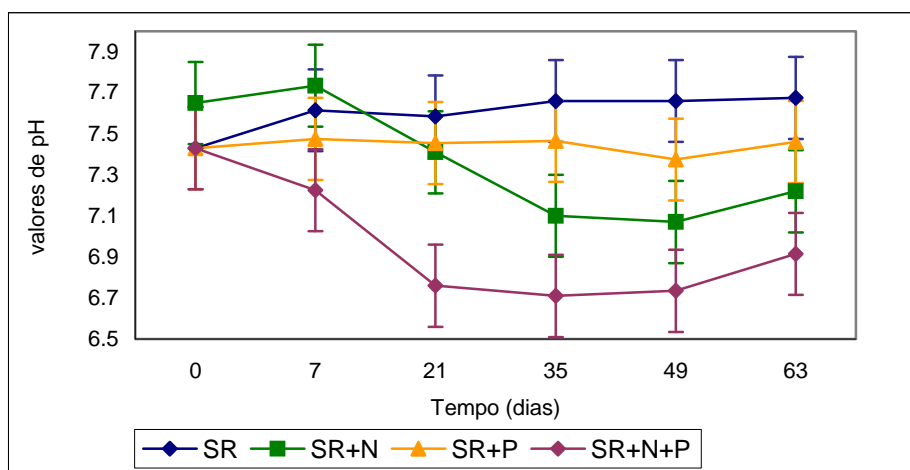


Figura 5: Média de variação de pH no solo submetido aos diferentes tratamentos em 69 dias de experimento. (SR- solo com resíduo; SR+N- solo com resíduo e nitrogênio; SR+P- solo com resíduo e fósforo; SR+N+P- solo com resíduo, nitrogênio e fósforo)

A análise estatística não revelou diferença significativa na variação do pH (6,5 - 7,7). No entanto foi possível observar que todos os tratamentos apresentaram os valores de pH inferior ao controle, sendo mais baixo o pH das amostras de solo referentes ao tratamento (SR + P + N) (Figura 5). Segundo Millán (2004), o pH do solo é um importante fator para o desenvolvimento dos microrganismos degradadores, sendo mais adequado entre a faixa 6 e 8.

Teor de Matéria Orgânica

A matéria orgânica do solo, considerada uma pequena parte da fase sólida do solo, é constituída pela fração decomposta de natureza coloidal conhecida como húmus e por outros materiais como resíduos de plantas, microorganismos, detritos, insetos e outros animais que se depositam no solo e que contribuem para a sua fertilidade, sendo seu percentual em torno de 3 - 5% do peso total (CARDOSO, 1992).

A análise de MO referente aos tratamentos (SR), (SR + P), (SR + N) e (SR + P + N) após 63 dias de experimento, apresentaram os seguintes valores, respectivamente: 1,60; 1,84; 2,16 e 1,76%. Segundo Pereira (2004), a matéria orgânica é um parâmetro que não responde prontamente a alterações na microbiota do solo sendo mais recomendado estimar as mudanças na população microbiana através de indicadores bioquímicos tais como a atividade enzimática, C mic e C-CO₂ entre outros.

Nas análises de óleos e graxas dos tratamentos (SR), (SR + P), (SR + N) e (SR + P + N), foi verificado, após 63 dias do experimento uma degradação de 58,3% nas amostras (SR) (120 -70 mg.100g solo⁻¹), ou seja numa condição espontânea biodegradação. Nos outros tratamentos não foi observado alterações com relação ao tempo inicial. Comportamento similar foi verificado por Millán (2004), quando observou um aumento de 22% na degradação de hidrocarbonetos submetidos à ação natural aumentando apenas a aeração com a técnica de landfarming.

CONCLUSÕES

- Amostras de solo contaminado com resíduo de petróleo suplementadas com sais de nitrogênio apresentam alterações na emissão de C-CO₂ após 35 dias de incubação;
- Aumento no coeficiente metabólico (q_{CO_2}) indica condições de estresse nas amostras com resíduo de petróleo e suplementadas com sais de nitrogênio;
- Após 35 dias de incubação houve decréscimo nos valores do Carbono da biomassa microbiano. No entanto, os dados apresentados no indicaram um decréscimo nos, referente ao tratamento com nitrogênio (123,75 µg C/g solo seco⁻¹) em relação ao controle (433,12 µg C/g solo seco⁻¹).
- A capacidade de crescimento fúngico em amostras de solo contaminado com borra de petróleo suplementado com nutrientes foi comprovada através do isolamento em condições de laboratório;
- O pH do solo, mediante aos diversos tratamentos realizados, não sofre variações, mantendo-se dentro dos padrões relatados nos diversos trabalhos descritos sobre biorremediação;



- Após 63 dias do experimento foi possível constatar a degradação de 58,3% do contaminante nas amostras de solo, sem adição de nutrientes.
- O composto xenobiótico presente nas amostras de solo é biodegradável e passível de aplicação da técnica de biorremediação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALEXANDER, M. Biodegradation and Bioremediation. Segunda edición. Academic Press, Inc., San Diego. 1999.
2. ATLAS, R.M. Fate of Petroleum Pollutants in Arctic Ecosystems. Water Science Technology, v. 18(2), p. 59-67, 1986.
3. ATLAS, R. M., e PRAMER, D. Focus on bioremediation. ASM News 56:7. 1990.
4. AZEVEDO, J. L. Fungos: Genética e melhoramento de fungos na biotecnologia. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento. Nº 1 – Maio /1997.
5. CARDOSO, E. J. N. Microbiologia do solo. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo; São Paulo. 1992.
6. DE-POLLI, H.; GUERRA, J. G. M. Determinação do carbono da biomassa microbiana do solo: método de fumigação-extração. Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1997. 10 p. (Embrapa- CNPAB. Documentos, 37).
7. FREIRE, F. S. Avaliação microbiana de solo impactado por resíduo de hidrocarbonetos: Porto do Recife - PE 2007. Dissertação de Mestrado – ITEP – Recife - PE, 2007.
8. GRISI, B. M; Metodologia da determinação de biomassa microbiana de solo. Revista Brasileira de Ciência do solo, v.8, n 2, p.167-172. 1978.
9. MILLAN, M. A. Biorremediación mediante técnicas biológicas, de hidrocarburo contenidos en lodo de refineria. Universidade de Murcia. Departamento de Química Agrícola, Geología y Edafología Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC), 2004.
10. PAULA, A. M.; SOARES, R. F. S.; SIQUEIRA, J. O. Biomassa, atividade microbiana e fungos micorrízicos em solo de landfarmnig de resíduos petroquímicos. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.10, n 2, p.448 -455, 2006.
11. PINZARI, F.; TRINCHERA, A.; BENEDETTI. A.; SEQUI. P. Use of biochemical indices in the mediterranean environment: comparison among soils under different forest vegetation. Journal of Microbiological Methods, 36. 1999.
12. PROVIDENTI, M. A.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. Journal of Industrial Microbiology, vol. 12, p. 379-395, 1993.
13. PEREIRA, S. V.; OLIVEIRA, B. R. B.; MAIS, C. L.; PORTO, E. R; MARTINEZ, C. R. Atividade microbiana em solo do semiárido cultivado com *Atriplex nummularial* Lindl. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 2004.
14. TEDESCO, M. J., GIANELLO, C., BISSANI, C. A., BOHNEN, H., VOLKWEISS, S. J. Análise de solo, plantas e outros materiais. Porto Alegre, 2ª ed. Departamento de Solos/UFRGS, 174 p. (Boletim Técnico, 5). 1995.
15. VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.19, p.703-707, 1987.
16. WARCUP, J. H. The Soil plate method for isolations of fungi from soil. Nature, London, 166 (4211), p.117 -118, 1950.