



ESTUDOS EXPERIMENTAIS DA ANÁLISE DO PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO NA MITIGAÇÃO DO IMPACTO AMBIENTAL

Anabela Porto Rosa* e Jorge Alberto Trigüis
Laboratório de Engenharia e Exploração de Petróleo (LENEP),
Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF),
Rodovia Amaral Peixoto km. 163. Av. Brennand s/n – Imboacica,
CEP 27925-310 Macaé – RJ.

*E-mail: anabela@lenep.uenf.br

Recebido em Março de 2005 e aceito para publicação em Agosto de 2005

ABSTRACT

The use of bioremediation techniques to reduce the concentration and/or the toxicity of the spill oil on shorelines can be very useful. The goal of this study is to analyze the behavior of different nutrients to enhance the bioremediation process. Geochemical analysis from oil extracted from sediments, in experiments during a month, shows different behavior depending on the nutrients used. The choice of best nutrient is done considering the decrease in saturated hydrocarbons that is compensated by a relative enrichment in polar compounds. The results show that NPK fertilizer is likely the most efficient, confirmed by the fingerprint evaluation where a complete reduction of normal alkanes following by isoprenoids appear to occur.

RESUMO

O uso da técnica de biorremediação para reduzir a concentração e/ou a toxicidade dos poluentes, pode ser promissor. O objetivo desse trabalho é analisar o comportamento dos diferentes tipos de nutrientes usados para promover o processo de biorremediação.

Análises geoquímicas dos óleos extraídos dos sedimentos, no período de um mês, mostram diferentes comportamentos dependendo do tipo de nutriente usado. A escolha do melhor nutriente é feita considerando a redução dos hidrocarbonetos saturados, compensados pelo aumento relativo dos compostos polares. Os resultados mostram que o fertilizante NPK é mais eficiente, confirmados pela avaliação dos óleos onde aparece uma redução completa dos alcanos normais seguida pelos isoprenóides.

INTRODUÇÃO

A maior parte da exploração de petróleo na costa brasileira ocorre no ambiente marinho. Desta forma, essa região pode ser vulnerável a contaminação por óleo, podendo chegar a atingir praias e afetar os ecossistemas

sensíveis da região, interferindo diretamente nas atividades econômicas como a pesca e o turismo (Mitchell *et al.*, 1993). Durante um derrame, ocorre a atuação dos processos intempéricos sobre a mancha de óleo, alterando suas propriedades físicas e químicas. Dentre esses processos destacam-

se: biodegradação, espalhamento, evaporação, dissolução, dispersão, emulsificação, sedimentação e foto-oxidação (Prince, 1993).

A biodegradação ocorre através da ação de microrganismos, como bactérias e fungos, presentes no ambiente (Alexander, 1981; Atlas, 1981; Crapez, 1982; Slivins e Tremier, 1985). A atuação desse processo pode estar limitada à disponibilidade de nutrientes, abundância das comunidades microbianas, salinidade, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido e distribuição e natureza do óleo derramado.

Biorremediação é a aceleração deste processo, através da adição de microrganismos específicos (bioaugmentação), nutrientes e/ou outras substâncias que acelerem a reprodução de tais microrganismos (bioestimulação), catalisando a reação no meio ambiente contaminado (Rytkonen *et al.*, 1997).

O presente trabalho tem como objetivo principal testar a eficácia de vários nutrientes aplicados à técnica da biorremediação. Os experimentos são simulados de laboratório, derramando óleo em sedimentos costeiros e aplicando nutrientes para estimular a biodegradação. A simulação experimental é efetuada no período de um mês e o seu

monitoramento incluiu análises químicas do óleo usado durante os experimentos.

Unidades de Simulação

Com o propósito de realizar os experimentos de simulação dos derrames de óleo nos sedimentos, construiu-se um galpão de 15 m², na parte externa do laboratório de geoquímica. Este possui cobertura com telhas transparentes e paredes laterais revestidas de tela, permitindo a entrada de ar e luz natural, sob condições de temperatura ambiente, (Figura 1a).

Para a simulação do derrame de óleo em sedimentos costeiros são utilizadas doze provetas de vidro com capacidade de 2L, 50 cm de altura e 8 cm de diâmetro. Para a simulação das marés são adaptadas, na base de cada coluna, uma torneira de vidro com o objetivo de controlar a entrada e a saída de água ao longo da simulação. Em cada torneira, é acoplado um reservatório de água, através de um sistema de vasos comunicantes, responsáveis pela entrada de água no sistema.

O material sedimentar é transferido para as provetas de vidro e após a transferência, introduzem-se 500 mL de água do mar em cada coluna, até o topo dos sedimentos, referente à simulação da maré alta, efetuada duas vezes ao dia, em intervalos de 12 horas.

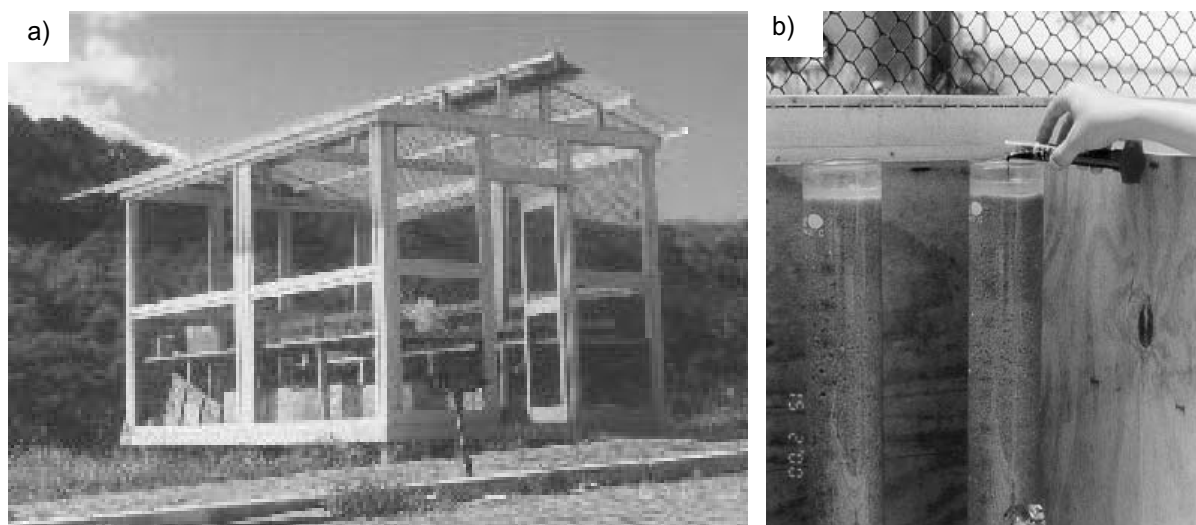


Figura 1: Galpão usado da simulação de derrames de óleo, nas instalações do LENEP/Macaé-RJ (a) e a aplicação do óleo, nas unidades de simulação (b).

A água do mar é aprisionada nas colunas e posteriormente adicionam-se 16 mL de óleo em cada coluna (Figura 1a). O volume de óleo empregado nesta simulação respeita os valores encontrados na bibliografia de 2,8 kg/m² (Rytkonen *et al.*, 1997), ou seja, 16mL de óleo com densidade = 0,89 corresponde a 14 g de óleo.

São montadas unidades de simulação distintas:

- Unidades de Controle, unidades de simulação contendo sedimentos e óleo;
- Unidades de Biorremediação, semelhantes às unidades de controle, mas com a adição de nutrientes. Em cada coluna aplica-se nutrientes em quantidades que perfazem 30% do volume de óleo derramado. A aplicação é realizada 24 horas após o derrame.

Coleta de Sedimentos

A coleta de sedimentos para a simulação é realizada na praia das Dunas, no município de Cabo Frio/RJ. Os sedimentos são amostrados utilizando-se

tubos de PVC, com 7,5 cm de diâmetro e 50 cm de altura, os quais são enterrados na região de intermaré, ao longo da praia (Figura 2). Posteriormente, os tubos contendo os sedimentos são retirados, lacrados e enviados ao laboratório.

A análise morfológica mostra que a maioria dos grãos é achatada, com poucos exemplares alongados e eqüantes. Apresenta baixa esfericidade, variando de arredondados a subarredondados. A textura superficial é polida, provavelmente decorrente do agente transportador. Mineralogicamente observou-se um predomínio de grãos de quartzo límpidos, com a presença de alguns minerais opacos em pequenas proporções, provavelmente constituídos de minerais pesados.

É obtido um resultado em torno de 0,59 o qual caracteriza a seleção dos sedimentos como boa.

Coleta da Água do Mar

A água do mar utilizada ao longo da simulação é coletada na Praia da Tartaruga,

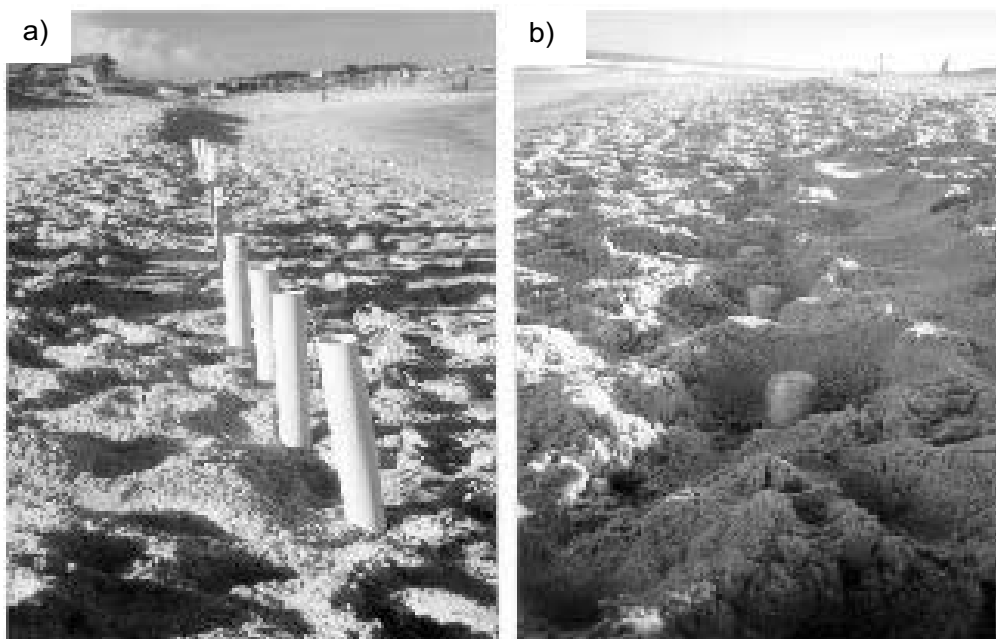


Figura 2 - Coleta de sedimentos na Praia das Dunas, município de Cabo Frio/RJ. Disposição das PVC ao longo do perfil praial (a) e retirada do material sedimentar, até a profundidade de 50 cm (b).

no município de Rio das Ostras/RJ, em intervalos de 48 hs e sempre no mesmo local. Diariamente, efetuam-se medidas do pH das águas coletadas na praia, antes e durante a utilização das mesmas nas simulações. Os valores devem se manter em torno de 8, sendo uma condição favorável ao desenvolvimento de bactérias heterotróficas contidas no ambiente (Bartha, 1996 *apud* Del'Arco, 1999).

As temperaturas máximas e mínimas são medidas ao longo do experimento. Mostram valores elevados, típicos de regiões de climas tropicais, cujos valores médios são em torno de 26 e 15 °C, respectivamente. Esse intervalo de temperatura favorece o desenvolvimento da população microbiana encontrada nas unidades de simulação (Cookson, 1995).

Óleo Bruto

Utiliza-se um óleo leve produzido na Bacia de Campos, do Campo de Albacora, cedido pelo Laboratório de Fluidos da unidade operacional da PETROBRAS/Bacia de Campos (GELAF/PETROBRAS/BC). Esse óleo possui as seguintes propriedades: °API= 26,9; densidade = 0.8892 g/L; viscosidade dinâmica = 54,2 cp.

Através da análise de óleo por cromatografia líquida são determinados os

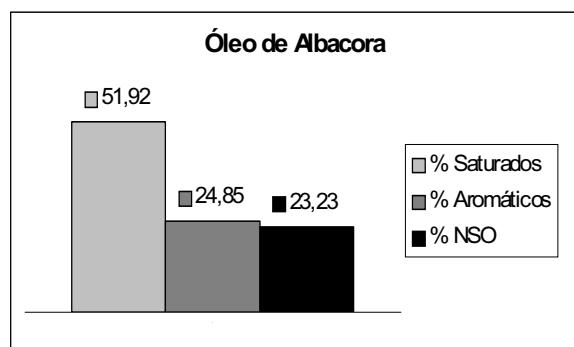


Figura 3: Fracionamento do óleo Albacora por cromatografia líquida.

percentuais das frações de hidrocarbonetos saturados, aromáticos e compostos NSO contidos no mesmo (Figura 3). A escolha de um óleo leve considera o fato do mesmo ser mais facilmente biodegradado pela comunidade microbiana, em função de ser constituído por uma percentagem maior de hidrocarbonetos saturados (> 50%), sendo classificado como um óleo parafínico (Tissot e Welte, 1978). Na análise da fração dos hidrocarbonetos saturados (alifáticos) pela cromatografia gasosa, é obtido o cromatograma mostrado na Figura 4, onde se observa a predominância dos hidrocarbonetos leves o que descaracteriza a atuação do processo de evaporação.

Nutriente

A estimulação da biodegradação de compostos orgânicos por microrganismos presentes no ambiente contaminado pode consistir na adição de nutrientes ricos em nitrogênio e fósforo (Prince, 1993). A escolha dos nutrientes eficazes ao processo de biorremediação deve-se considerar a dinâmica do ambiente contaminado, pois dependendo do grau de energia em que o ambiente está subordinado e da solubilidade desse nutriente em água, este pode ser lavado do sítio de contaminação antes mesmo de ser absorvido pela comunidade microbiana (Rosemberg *et al.*, 1992 *apud* Prince, 1993).

Alguns produtos que promovem a biodegradação, começaram a ser comercializados após a utilização dessa técnica na limpeza do derrame do Ntq Exxon Valdez em 1989, no Alaska (Prince, 1993). Entretanto, os testes laboratoriais efetuados com esses produtos consideraram as condições climáticas típicas no hemisfério norte, o que não serve como referência a outras regiões de climas tropicais, como ocorrem no Brasil.

Experimentos feitos sob as condições climáticas da região do litoral do Norte Fluminense do estado do Rio de Janeiro, testam a eficácia de alguns produtos economicamente

viáveis e contendo altos teores de nitrogênio e fósforo, os quais poderiam vir a ser usados como agentes estimuladores da biorremediação.

Com base na bibliografia (Sveum *et al.*, 1991; Merlin *et al.*, 1994; Al-Hadhrami *et al.*, 1997) são utilizados os seguintes produtos como agentes estimuladores da biorremediação:

- Comida de Peixe, produto encontrado no mercado a preços razoáveis, sendo constituído de proteína orgânica, apresentando para a razão N:P valores de 2:47;
- Melaço, subproduto da indústria açucareira e de baixo custo, sendo facilmente encontrado no mercado da região estudada. Esse produto apresenta um teor de fósforo (0,05 %) e de nitrogênio (2,5 %) em termos de proteína bruta;
- Fosfato de Amônia $[(NH_4)H_2PO_4]$, produto químico de fácil aquisição no mercado, porém a preços mais elevados do que os anteriores. A razão de N:P é de 1:1 e por se tratar de um produto químico, deve-se tomar cuidado com a toxicidade deste ao meio ambiente;
- NPK, contendo fosfato de amônia $[(NH_4)_3PO_4]$, sulfato de amônia $[(NH_4)_2SO_4]$

e cloreto de potássio [KCl] nas proporções (N:P:K) de 10:10:10. São fertilizantes de plantas facilmente encontrados no mercado a preços reduzidos.

METODOLOGIA

Cromatografia Gasosa com Detector Ionizado por Chamas (CG/FID)

O cromatógrafo utilizado é um Hewlett Packard (HP), modelo 6890, com injetor automático do tipo *split/splitless* e um detector de ionização por chama (CG/FID, Figura 4). Utiliza-se uma coluna capilar de sílica fundida, marca J & W Scientific DB-5, com fase estacionária fenilmetilsiloxano, de baixa polaridade. A coluna contém 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura de filme, suportando temperatura máxima de 350 °C. Programação utilizada nas análises cromatográficas: volume de amostra injetada = 1 μ L; temperatura do injetor = 280°C; temperatura do detector = 340 °C; programa do forno = 40 a 320°C, a 2,5 °C/

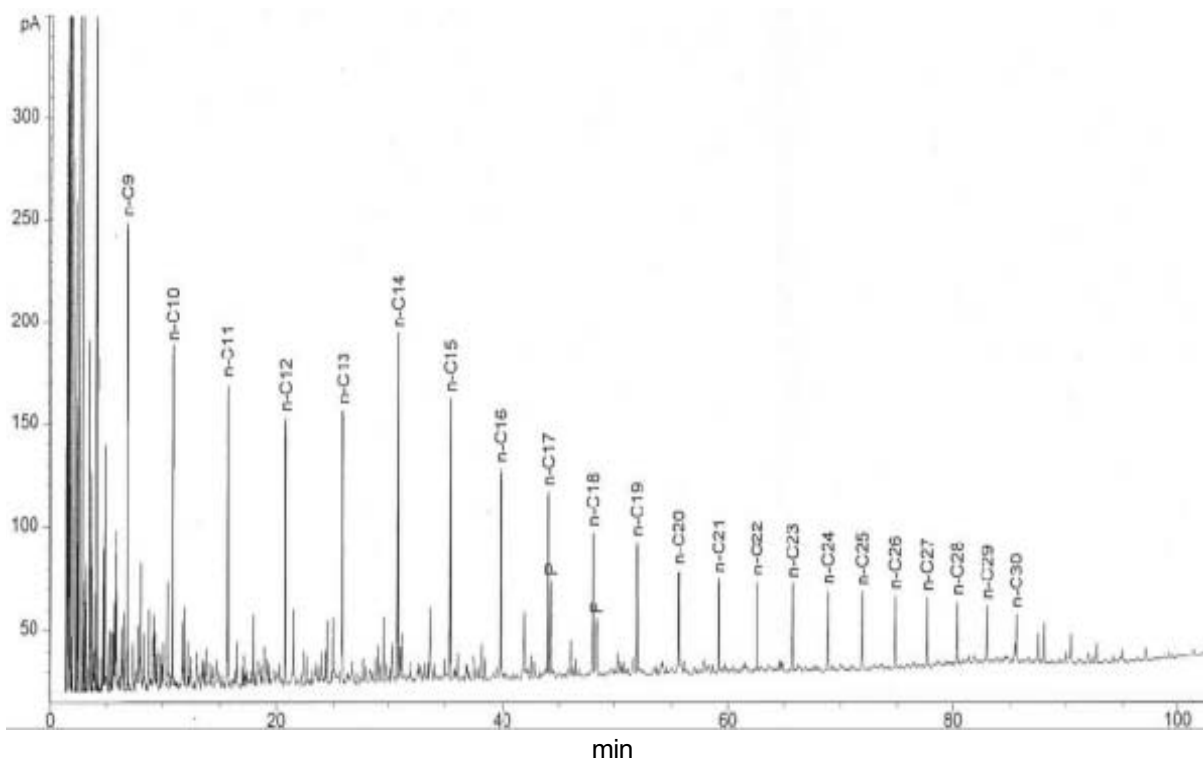


Figura 4: Cromatograma dos hidrocarbonetos saturados do óleo de Albacora.

min; período isotérmico final = 18 min, a 320 °C; gás carreador = hélio, com fluxo de 2,2 mL/min.

Amostragem ao Longo da Simulação

As amostras contendo óleo são retiradas de cada unidade de simulação. A extração do óleo contido nos sedimentos envolve: transferência de 10 g de amostras de sedimentos contendo óleo para frascos com capacidade de 250 mL; adição de 30 mL de

diclorometano (DCM) com agitação manual durante 10 minutos; extração do DCM da solução através do evaporador rotativo, à temperatura de 40 °C; transferência do concentrado para um vial que é levado à capela para que seja secado o resíduo final do DCM; o vial é pesado e se obtém o peso do óleo; o peso do sedimento é obtido através da subtração do peso do sedimento inicial menos o peso do sedimento sem óleo; o peso da água contido nas amostras foi determinado subtraindo

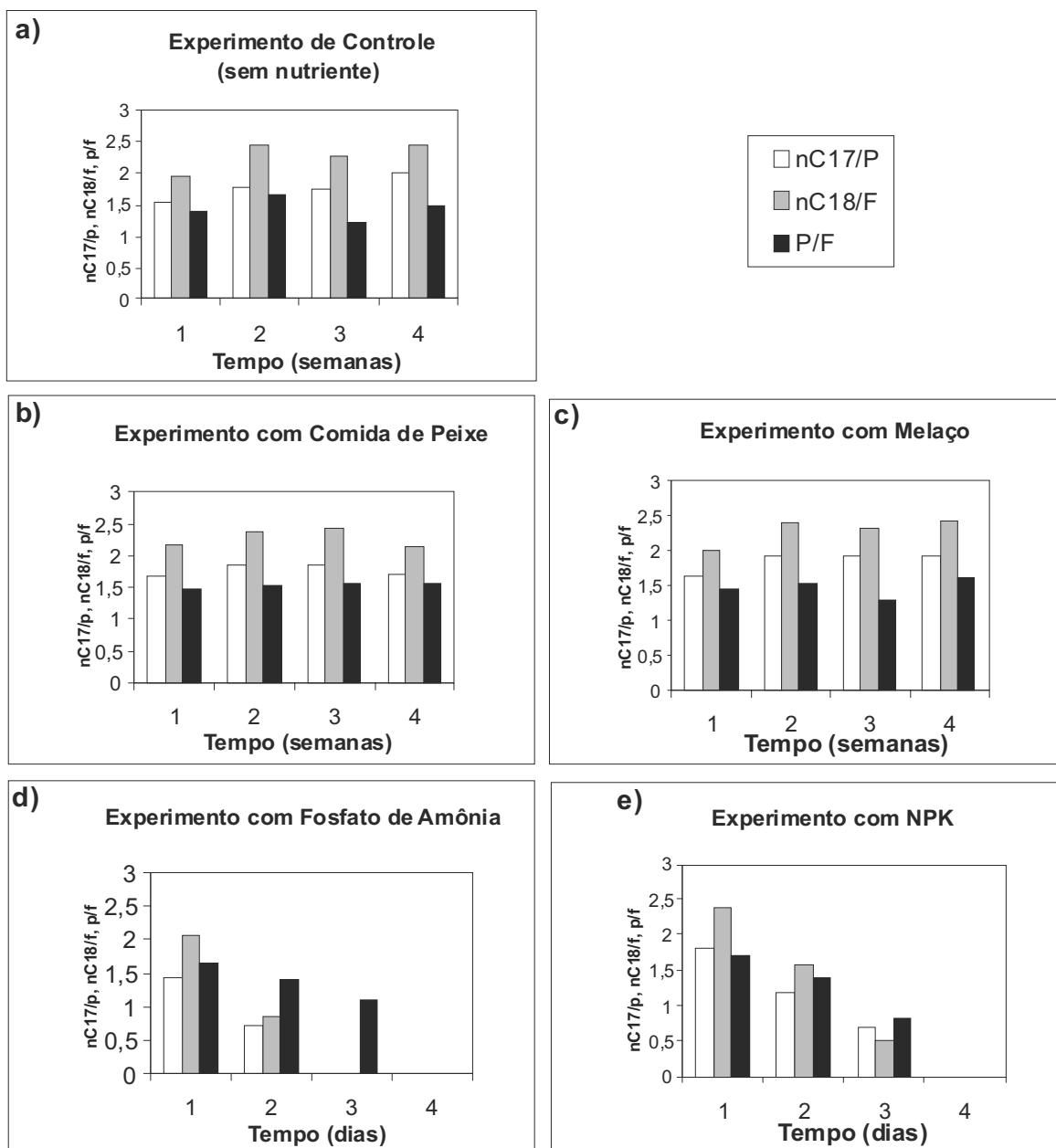


Figura 5: Resultados das razões dos *n*-alcanos e isoprenóides, obtidas através da análise dos óleos extraídos das unidades de controle e de biorremediação. (a) controle; (b) comida de peixe; (c) melaço; (d) fosfato de amônia; (e) NPK.

do peso inicial da amostra (10,0 g), o peso do sedimento e o peso do óleo. Essa etapa da análise é realizada no Laboratório de Química do Centro Federal de Educação Tecnológica, na Unidade de Ensino Descentralizada (CEFET/UNED) em Macaé (RJ).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para as amostras dos óleos provenientes das unidades de controle são comparados com os resultados das amostras dos óleos extraídos dos sedimentos das unidades de biorremediação. Os dados são separados em gráficos, de acordo com o tipo de nutriente empregado o mostrados na Figura 5: (a) controle, ou seja, sem nutrientes; (b) comida de peixe; (c) melação; (d) fosfato de amônia; (e) NPK.

No óleo original (Figura 5a), as razões $n-C_{17}$ /pristano, $n-C_{18}$ /fitano e pristano/fitano se mantêm constantes, indicando que não há alteração química do óleo decorrente de processo de biodegradação (Tissot e Welte, 1978; Peters e Moldowan, 1993; Wang e Fingas, 1994; 1995; Wang *et al.*, 1999).

Nas amostras das unidades de simulação que usam comida de peixe (Figura 5b) e melação (Figura 5c) também não há variações significativas nas razões citadas anteriormente, o que comprova que esses nutrientes não são eficazes na aceleração da degradação dos compostos orgânicos pela população microbiana presente no ambiente contaminado, ou seja, não servem como agentes de biorremediação. Uma das possíveis causas dessa não absorção dos nutrientes pelos microrganismos pode estar associada: a) baixa solubilidade desses compostos em água durante o experimento; b) composição química dos nutrientes com baixas concentrações de nitrogênio e fósforo; c) preferência da população microbiana em metabolizar outros compostos orgânicos como açúcares presentes no melação, ao invés dos hidrocarbonetos (Alexander, 1981).

Nos resultados das razões $n-C_{17}$ /pristano, $n-C_{18}$ /fitano e pristano/fitano, obtidos através dos óleos extraídos das amostras dos sedimentos das colunas de biorremediação que utilizam fosfato de amônia como nutriente, há uma redução significativa dos índices de biodegradação, principalmente das razões de $n-C_{17}$ /pristano e $n-C_{18}$ /fitano (Figura 6D). Tais resultados comprovam a atuação do processo de biodegradação ao longo da simulação com a redução inicial dos alcanos lineares leves, seguido dos alcanos lineares pesados, restando apenas os isoprenóides, os quais também mostram sinais de biodegradação pela redução dos valores do índice pristano/fitano ao longo do experimento.

Os ensaios laboratoriais efetuados por Wang e Fingas (1994), nos quais são aplicados nutrientes comercialmente produzidos, mostram resultados semelhantes aos obtidos no experimento com fosfato de amônia, exibindo uma redução expressiva nas razões $n-C_{17}$ /pristano e $n-C_{18}$ /fitano, indicando a atuação da biodegradação. Portanto, pode-se obter algum sucesso com o uso de fosfato de amônia como agente estimulador da biorremediação em ambientes costeiros contaminados por óleo.

A efetividade da absorção desse produto pela população microbiana degradadora de petróleo, pode ser decorrente da maior concentração dos teores de nitrogênio e fósforo do fosfato de amônia, com relação ao melação e comida de peixe. Entretanto, deve-se lembrar que o fosfato de amônia é um produto químico comercial com custo relativamente alto, assim sua aplicação pode não ser economicamente viável. A busca de um produto que possua fosfato de amônia na sua formulação, mas que possa ser adquirido a preços mais baixos, viabilizaria o uso a técnica da limpeza e biorremediação nos casos reais de derrames de óleo em ambientes costeiros. Assim, utiliza-se NPK como agente bioestimulador, cujo fertilizante mostra-se eficiente na estimulação da biodegradação, pela redução das razões

$n\text{-C}_{17}$ /pristano, $n\text{-C}_{18}$ /fitano e pristano/fitano (Figura 6E).

A redução das razões $n\text{C}_{17}/p$ e $n\text{C}_{18}/f$, obtidas nas unidades submetidas a biorremediação (Figura 6E), corroboram a ordem crescente de susceptibilidade dos hidrocarbonetos ao ataque microbiano proposto por Brown (1987), Bradford e Krishnamoorthy (1991), e Peters e Moldowan (1993) onde os alcanos lineares são mais susceptíveis a biodegradação que os alcanos ramificados. Segundo experimentos efetuados por Restle (1983), a biodegradação mostra-se mais eficiente nas n -parafinas, principalmente de tamanhos menores, seguidas das isoparafinas e de hidrocarbonetos aromáticos.

CONCLUSÕES

A interpretação dos resultados obtidos cumpre o seu objetivo inicial que seria encontrar um nutriente usado para estimular o processo de biodegradação, ou seja, o

nutriente capaz de acelerar o desenvolvimento de bactérias usadas na mitigação de impactos ambientais costeiros, gerados por derrames de óleo. Dentre os principais resultados encontramos a maior diminuição dos alcanos lineares, comparado aos isoprenóides, corroborando a idéia de susceptibilidade de biodegradação. Considera-se que ao final da simulação há uma degradação completa dos n -alcanos e uma degradação parcial dos isoprenóides, pôde-se classificar a biorremediação como moderada, atingindo o nível 5 na escala de classificação feita por Peters e Moldowan (1993).

AGRADECIMENTOS

À FINEP/CTPETRO pelo financiamento a este projeto. Os autores agradecem a Dra. Antônia Volpon e Dra. Silvana Barbanti do CENPES/PETROBRAS por auxiliarem no desenvolvimento desse projeto e pelas sugestões técnicas propostas. Ao CENPES/PETROBRAS pelo apoio ao desenvolvimento desta pesquisa.

BIBLIOGRAFIA

- ALEXANDER, M. (1981) Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science*, 2(11): 132-138
- AL-HADHRAMI, M. N., LAPPIN-SCOTT, H. M., FISHER, P. J. (1997) Studies on the biodegradation of three groups of n -alcanes in the presence of molasses and mineral fertilizer by *Pseudomonas aeruginosa*. *Marine Pollution Bulletin*, 34(11):969-974
- ATLAS, R. M. (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiology*, 45(1): 180-209
- BARTHA, R. (1996) Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. *Microbial Ecology*, 12(1): 155-172
- BRADFORD, M. L., KRISHNAMOORTHY, R. (1991) Consider bioremediation for waste site cleanup. *Chemical Engineering Progress*, 87(2): 80-85
- BROWN, L. R. (1987) Oil-degrading microorganisms. *Chemical Engineering Progress*, 1(1): 35-40.
- COOKSON, T. (1995) *Bioremediation Engineering: Design and Application*. McGraw-Hill Inc, New York, 525p.
- CRAPEZ, M. A. C. (1982) Isolement à Partir du Sol et Bactéries Aérobiees Sporullées Dégradant Composés Aromatiques. Tese de Doutorado. Université D'Aix-Marseille II, França, p. 1-76

- DEL 'ARCO, J. P. (1999) Degradação de Hidrocarbonetos por Bactérias e Fungos em Sedimento Arenoso. Tese de Doutorado. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, Rio de Janeiro, 169p.
- MERLIN, F. X., LEE, K., SWANNEL, R., OUTDOT, J., BASSERES, A., RELLY, T., CHAUERY, C., DALMAZZONE, C., SVEUM, P. (1994) Protocol for experimental assessment of bioremediation agents on a petroleum polluted shoreline. *In: Proceeding of the 17th Arctic and Marine Oilspill Program (AMOP) Technical Seminar*, 1:465-478
- MITCHELL, G. I. P., MUCHE, D., XIMENEZ, M. S., HARRIS, S., NASSAR, C. (1993) Programa Ambiental da Bacia de Campos. Petrobrás, Vol. 1, 169p.
- PETERS, K. E., MOLDOWAN, J. M. (1993) *The Biomarker Guide: Interpreting Molecular Fossil in Petroleum and Ancient Sediments*. Vol. 1, Prentice Hall Press, N. Jersey, 361p.
- PRINCE, R. C. (1993) Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Microbiology*, 19(4): 217-242
- RESTLE, A. (1983) Eude de nouveaux marqueurs biologiques dasns des petroles biodegrades: cas naturels e. simulations in vitro. Tese de Doutorado. L' universite Louis Pasteur de Strasbourg I, 218p.
- ROSEMBERG, E., LEGMANN, R., KUSHMARO, A., TAUBE, R., ADLER, E. Z. (1992) Petroleum biorremediation – a multiphase problem. *Biodegradation*, Vol.3, p.337-350
- RYTKONEN, J., ITAVAARA, M., PAULSEN, J. E. (1997) The Improvement of oil biodegradation on the shoreline. *In: Proceedings of the 7th International Offshore and Polar Engineering Conference*, Honolulu, USA, 2(1): 25-30
- SLIVINS, A., TREMIER, B. (1985) La biodégradation des hydrocarbures. *La Recherche*, 171(16): 1344-1352
- SVEUM, P., FAKSNESS, L. G., RAMSTAD, S. (1991) Bioremediation of oil-contaminated shorelines: the role of carbon in fertilizers. *Hydrocarbon Bioremediation*, 1(2):163-174.
- TEIXEIRA NETO, A. S. (1980) *Manual de Sedimentologia*. DIVEN/SEPES/Petrobrás, Bahía, Vol.1, 194p.
- TISSOT, B. P., WELTE, D. H. (1978) *Petroleum Formation and Occurrence. A New Approach to Oil and Gas Exploration*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Vol.1, 540p.
- WANG, Z. & FINGAS, M. (1994) Study of the effects of weathering on the chemical composition of light crude oil. *In: Proceeding of the 17th Arctic and Marine Oilspill Program (AMOP) Technical Seminar*, 1(1): 133-171
- WANG, Z., FINGAS, M. (1995) Differentiation of the source of spilled oil and monitoring of the oil weathering process using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 712(1): 321-343
- WANG, Z., FINGAS, M., PAGE, D. S. (1999) Oil spill identification. *Journal of Chromatography A*, 843(1): 369-411

(Footnotes)

¹To whom the correspondence should be sent: anabela@lenep.uenf.br.