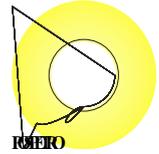




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GEOQUÍMICA:
PETRÓLEO E MEIO AMBIENTE - POSPETRO**



JOANA FERREIRA DA CRUZ

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE SURFACTANTES NO
PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO
BRUTO EM SIMULAÇÕES DE DERRAMES NO MAR**

**SALVADOR
2012**

JOANA FERREIRA DA CRUZ

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE SURFACTANTES NO
PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO BRUTO
EM SIMULAÇÕES DE DERRAMES NO MAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente - POSPETRO, Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Geoquímica do Petróleo e Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Fernando de Souza Queiroz

Co-orientador: Prof. PhD. Jorge Alberto Triguís

Salvador
Março de 2012

C957 Cruz, Joana Ferreira da.

Avaliação da eficiência de surfactantes no processo de biodegradação de petróleo bruto em simulações de derrames no mar / Joana Ferreira da Cruz. - Salvador, 2012.
75 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Fernando de Souza Queiroz.
Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio ambiente, Universidade Federal da Bahia, Instituto de Geociências, 2012.

1. Derramamento de óleo. 2. Petróleo. 3. Agentes ativos de superfícies. 4. Biodegradação. 5. Toxicidade. 6. Geoquímica ambiental.
I. Queiroz, Antônio Fernando de Souza. II. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Geociências. III. Título.

CDU: 550.46:502(8)

Elaborada pela Biblioteca do Instituto de Geociências da UFBA

JOANA FERREIRA DA CRUZ

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE SURFACTANTES NO
PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO
BRUTO EM SIMULAÇÕES DE DERRAMES NO MAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente - POSPETRO, Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Geoquímica do Petróleo e Ambiental.

Defesa Pública: 13/03/2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antônio Fernando de Souza Queiroz – Orientador

Doutor em Geoquímica do Meio Ambiente pela Université Louis Pasteur de Strasbourg, França
Universidade Federal da Bahia

Prof. PhD. Jorge Alberto Triguís – Co-orientador

Doutor em Geoquímica Orgânica pela University of Newcastle Upon Tyne, Inglaterra
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Prof^a. Dr^a. Heiddy Márquez Alvarez

Pós-Doutora em Química Orgânica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil
Universidade Estadual de Feira de Santana

Prof^a. Dr^a. Olívia Maria Cordeiro de Oliveira

Doutora em Geoquímica Ambiental pela Universidade Federal Fluminense, Brasil
Universidade Federal da Bahia

“Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre priorizaram a educação de suas filhas e que sempre me incentivaram na realização dos meus sonhos.”

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo amor e apoio incondicionais e por me ajudarem a tornar possível mais essa realização.

À Dani pelos momentos maravilhosos, pelos cuidados, por sempre me incentivar na busca da minha realização profissional e por se orgulhar de mim em tudo que faço.

Aos meus amigos e familiares que me estimulam a crescer sempre.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antônio Fernando de Souza Queiroz, e à Profa. Dra. Olívia Maria Cordeiro de Oliveira – Coordenadores do POSPETRO – pela oportunidade e pelo constante empenho na busca pela melhoria do Curso.

Ao meu co-orientador, Prof. PhD Jorge Alberto Trigiúis, pela paciência, pelos grandes ensinamentos, pelos conselhos e por acreditar no meu potencial, me incentivando a continuar nessa área.

À minha grande amiga Olguis pela ajuda em todas as etapas deste mestrado, pelos momentos de descontração, pela força nos momentos difíceis e pelas muitas risadas com o portunhol maravilhoso (ailoviu!).

Aos meus amigos geoquímicos do POSPETRO - especialmente Alex, Bomfim, Claudia, Elisângela, Tai e Zaca -, aos professores e a todos que contribuíram com o trilhar dessa caminhada.

Aos “meus” estagiários Marcão e Jessyca que foram indispensáveis no desenvolvimento deste trabalho, tanto nas coletas e monitoramento quanto nas discussões dos resultados, onde também pude aprender um pouquinho de oceanografia. Acredito demais no potencial de vocês!

Aos estagiários e colegas do NEA/LEPETRO/POSPETRO que de alguma forma me ajudaram com os experimentos.

À equipe do laboratório do NEA – Dra. Karina, MSc. Sarah, MSc. Marcos, Gisele, Jorginho, Daniela e Tâmara - pelo apoio na realização das análises.

Aos funcionários do NEA/POSPETRO – Cícero e Naná – por estarem sempre dispostos a nos prestar auxílio.

Ao Prof. Dr. Paulo Mafalda, à Profa. Dra. Marlene Peso-Aguiar e a Walter Andrade, do Instituto de Biologia/UFBA, pela gentileza e confiança em me emprestar alguns equipamentos de monitoramento.

À Profa. Dra. Lília Santos e à Deloar Oliveira, do Departamento de Oceanografia/UFPE, pelo auxílio nas análises toxicológicas.

À Profa. Dra. Norma Gusmão e à Diana Lira, do Departamento de Antibióticos/UFPE, pela realização das análises microbiológicas.

À Rui Lima e José Dias, colaboradores do LAPEG/UNIFACS, pela amostra de petróleo.

À Oxiteno pelo envio da amostra de dispersante químico.

Ao Prof. Dr. Frederico Kronemberger, da COPPE/UF RJ, pelo envio da amostra de biossurfactante.

À CAPES, pela concessão da bolsa, e à Rede RECUPETRO, que disponibilizou recursos que viabilizaram a presente pesquisa.

Muito obrigada a todos vocês!

***“Que nada nos defina. Que nada nos sujeite.
Que a liberdade seja a nossa própria substância.”***

(Simone de Beauvoir)

CRUZ, Joana Ferreira da. **Avaliação da eficiência de surfactantes no processo de biodegradação de petróleo bruto em simulações de derrames no mar.** 75f. 2012. Dissertação (Mestrado em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente) – Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, 2012.

RESUMO

A eficácia de surfactantes químico e biológico, sozinhos e em conjunto com o fertilizante NPK, no auxílio da biodegradação de petróleo cru foi avaliada em simulações de derrame no mar, realizadas em duas campanhas. A eficácia destes produtos foi determinada pela avaliação da degradação do petróleo ao longo do experimento, através de análises geoquímicas; por análises toxicológicas, através da exposição de copépodos aos tratamentos; e por análises microbiológicas, através do isolamento de fungos e bactérias. Na primeira campanha, as análises geoquímicas mostraram que o tratamento de petróleo em conjunto com biossurfactante apontou maior degradação, indicado pela maior redução percentual (19%) do valor da razão $\sum n\text{-alcanos}/(\text{Pr}+\text{Ph})$. Na segunda campanha o tratamento contendo biossurfactante e NPK revelou uma diminuição de 30,8% da razão $\sum n\text{-alcanos}/(\text{Pr}+\text{Ph})$, enquanto o tratamento contendo surfactante químico e NPK revelou uma diminuição de 26,5% da razão $\sum n\text{-alcanos}/(\text{Pr}+\text{Ph})$. Portanto, os resultados geoquímicos para tratamentos com biossurfactante apontaram maior biodegradação no final dos experimentos. Na primeira campanha os tratamentos não foram tóxicos aos copépodos provavelmente devido às baixas concentrações, entretanto na segunda campanha houve um grande efeito letal no tempo inicial, mas não é possível afirmar o que causou este efeito porque não houve análise da amostra contendo apenas petróleo ao longo do experimento. As análises microbiológicas indicaram que ocorreu aumento do número de fungos em relação às bactérias nos tratamentos contendo apenas biossurfactante e biossurfactante em conjunto com NPK, sugerindo que a maior degradação do óleo nestes tratamentos seja pela ação de fungos. As variações dos parâmetros físico-químicos observados na análise de componentes principais (PCA) podem ter sido vantajosas para o maior desenvolvimento dos fungos. Os resultados deste estudo em escala piloto e nas condições experimentais estabelecidas revelaram que é mais indicado o tratamento utilizando biossurfactante conjuntamente com NPK.

Palavras-chave: Petróleo, derrame de óleo, dispersante químico, biossurfactante, biodegradação, toxicidade.

CRUZ, Joana Ferreira da. **Avaliação da eficiência de surfactantes no processo de biodegradação de petróleo bruto em simulações de derrames no mar.** 75f. 2012. Dissertação (Mestrado em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente) – Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, 2012.

ABSTRACT

The efficacy of chemical and biological surfactants, alone and together with NPK fertilizer, in the contribution of biodegradation of crude oil was evaluated in simulated spill at sea, carried out in two campaigns. The effectiveness of these products was determined by evaluating the degradation of oil throughout the experiment, through geochemical analyzes; for toxicological analysis, by exposing copepods to treatment, and for microbiological analyzes, by isolation of fungi and bacteria. In the first campaign, the geochemical analysis showed that treatment of oil together with biosurfactant pointed further degradation, as indicated by a greater percentage reduction (19%) of the ratio values $\Sigma n\text{-alkanes}/(\text{Pr}+\text{Ph})$. In the second campaign, the treatment containing biosurfactant and NPK showed a decrease of 30.8% of ratio $\Sigma n\text{-alkanes}/(\text{Pr}+\text{Ph})$, while the treatment containing chemical surfactant and NPK showed a decrease of 26.5% of the ratio $\Sigma n\text{-alkanes}/(\text{Pr}+\text{Ph})$. Therefore, the geochemical results for treatments with biosurfactant showed higher biodegradation at the end of the experiments. In the first campaign the treatments were not toxic to copepods probably due to low concentrations, however in the second campaign there was a large lethal effect at initial time, but we can not say what caused this effect because there was no analysis of the sample containing only oil throughout the experiment. Microbiological analyzes indicated that there was an increase in the number of fungi in relation to the bacteria in the treatments containing only biosurfactant and biosurfactant together with NPK, suggesting that most of the oil degradation in these treatments is the action of fungi. Variations in the physico-chemical parameters observed in the principal component analysis (PCA) may have been advantageous for the further development of fungi. The results of this pilot scale study and the experimental conditions established revealed that it is more appropriate treatment using biosurfactant with NPK.

Keywords: Oil, oil spill, chemical dispersant, biosurfactant, biodegradation, toxicity.

CRUZ, Joana Ferreira da. **Avaliação da eficiência de surfactantes no processo de biodegradação de petróleo bruto em simulações de derrames no mar.** 75f. 2012. Dissertação (Mestrado em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente) – Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, 2012.

ERRATA

Página	Linha	Onde se lê	Leia-se
35	25	The application of 2mL of the surfactant chemical Ultrasperse II, manufactured by Oxiteno, diluted 1:10 in distilled water was performed according to the manufacturer's instructions, taking into account the volume of spilled oil.	The application of the surfactant chemical Ultrasperse II, manufactured by Oxiteno, was 4% by volume in relation to the volume of oil and diluted in a proportion of 1:10 in distilled water. This dosage was performed according to the manufacturer's instructions.
41	11	3.2 Second Campaign	3.3.2 Second Campaign

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Estrutura química do surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio	18
Figura 1.2 - Estrutura dos ramnolipídeos tipos 1 e 2	19
Figura 2.1 - Processos de intemperismo do óleo em ambientes marinhos	24
Figura 2.2 - A) Aplicação do dispersante químico na mancha de óleo; B) O solvente carrega o surfactante para o óleo; C) As moléculas de surfactante migram para a interface óleo/água e reduzem a tensão superficial; D) As gotículas de óleo são circundadas pelas substâncias surfactantes, estabilizando a dispersão, o que ajuda a promover uma rápida diluição pelo movimento da água; E) As gotas dispersam por mistura turbulenta deixando apenas uma fina camada do óleo na superfície	26
Figura 3.1 - Perfil da fração de n-alcenos do óleo original e do óleo em cada tratamento nos dias 0 e 30, na primeira campanha	40
Figura 3.2 - Fecundidade dos copépodos normalizados pelo controle na primeira campanha, em cada tratamento ao longo dos 30 dias	42
Figura 3.3 - Sobrevivência média dos copépodos normalizados pelo controle na primeira campanha, em cada tratamento ao longo dos 30 dias	42
Figura 3.4 - Perfil de óleo total (<i>whole oil</i>) do óleo original e do óleo em cada tratamento nos dias 0 e 21, na segunda campanha	44
Figura 3.5 - Fecundidade média dos copépodos na segunda campanha, em cada tratamento ao longo dos 21 dias, com os dados relativizados	46
Figura 3.6 - Sobrevivência média dos copépodos na segunda campanha, em cada tratamento ao longo dos 21 dias, com os dados relativizados	47
Figura 3.7 - Número de unidades formadoras de colônias de bactérias e fungos por litro, em cada tratamento, o último dia do experimento	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Caracterização do óleo original e do óleo de cada tratamento nos dias 0 e 30, no primeiro experimento	39
Tabela 3.2a - Relação entre n-alcanos, pristano e fitano no início e ao fim de 30 dias, no primeiro experimento	41
Tabela 3.2b - Redução percentual dos valores das razões entre n-alcanos, pristano e fitano comparando os dias 0 e 30, no primeiro experimento	41
Tabela 3.3 - Caracterização do óleo original e do óleo de cada tratamento nos dias 0 e 21, no segundo experimento	43
Tabela 3.4a - Relação entre n-alcanos, pristano e fitano no fim de 21 dias do segundo experimento	45
Tabela 3.4b - Redução percentual dos valores das razões entre n-alcanos, pristano e fitano comparando os dias 0 e 21 de cada tratamento, no segundo experimento	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Σ n-alcanos	Somatório dos hidrocarbonetos saturados de cadeia longa
°API	Escala que mede a densidade dos líquidos derivados do petróleo
ALAGO	Associação Latino Americana de Geoquímica Orgânica
ANOVA	Análise de variância
ARO	Fração de hidrocarbonetos aromáticos
BDA	Batata dextrose ágar
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CMC	Concentração Micelar Crítica
COPPE	Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa em Engenharia
E_h	Potencial de oxirredução
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
GC-FID	Cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chama
HPAs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
MEOR	Microbial Enhanced Oil Recovery
NPK	Fertilizante composto por nitrogênio, fósforo e potássio
NSO	Fração de compostos polares constituída de resinas e asfaltenos
OD	Oxigênio dissolvido
OMA	Agregado óleo-mineral
P	Tratamento contendo água do mar e petróleo
PB	Tratamento contendo água do mar, petróleo e biossurfactante
PBN	Tratamento contendo água do mar, petróleo, biossurfactante e NPK
PCA	Análise de componentes principais
PD	Tratamento contendo água do mar, petróleo e dispersante químico
PDA	Potato dextrose ágar
PDN	Tratamento contendo água do mar, petróleo, dispersante e NPK
PEQ	Programa de Engenharia Química
Ph	Fitano
pH	Potencial hidrogeniônico

Pr	Pristano
Qualis	Sistema de avaliação de periódicos, mantido pela CAPES
RECUPETRO	Rede Cooperativa em Recuperação de Áreas Contaminadas por Atividades Petrolíferas
SAR	Saturados, Aromáticos e Resinas
SAT	Fração de hidrocarbonetos saturados
Ton	Toneladas
TSA	Trypticase soy agar
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação é composta por 5 seções. Na seção “**Introdução**”, é realizada uma discussão geral acerca da problemática e da hipótese, bem como os principais objetivos do presente trabalho.

Em seguida, na seção “**Aplicação de surfactantes em derrames de óleo no mar: Revisão da literatura**” é apresentado o artigo no formato final submetido à revista científica “*Cadernos de Geociências*”, (Qualis B4). A comprovação da submissão do artigo encontra-se no anexo 1.

Na seção “**Evaluation of the biodegradation process of crude oil with the contribution of surfactants**” é apresentado o artigo no formato final submetido à revista “*Marine Pollution Bulletin*”, Fator de Impacto: 2.359 (Qualis A2 – Internacional; Peso 85 em Geociências). A comprovação da submissão do artigo encontra-se no anexo 2.

Posteriormente, na seção “**Conclusões Gerais**” são feitas considerações finais acerca do trabalho, seguidas de sugestões para novas pesquisas. Na seção “**Referências**” são apresentados todos os autores citados para confecção das seções e dos artigos submetidos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. APLICAÇÃO DE SURFACTANTES EM DERRAMES DE ÓLEO NO MAR: REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Introdução	22
2.2 Técnicas de Remoção do Óleo.....	24
2.3 Surfactantes ou Dispersantes Químicos.....	26
2.4 Surfactantes Biológicos ou Biossurfactantes	28
2.5 Considerações Finais.....	29
2.6 Agradecimentos	30
3. EVALUATION OF THE BIODEGRADATION PROCESS OF CRUDE OIL WITH THE CONTRIBUTION OF SURFACTANTS.....	33
3.1. Introduction.....	34
3.2. Materials and Methods.....	36
3.3. Results and Discussion.....	39
3.4. Conclusion	48
3.5. Acknowledgments.....	48
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	52
5. REFERÊNCIAS.....	55
APÊNDICES.....	61
APÊNDICE 1: Principais acidentes de derrame de petróleo no mar entre 2010 e 2012.....	61
APÊNDICE 2: Parâmetros não conservativos mensurados no tratamento PB durante o segundo experimento.....	63
APÊNDICE 3: Parâmetros não conservativos mensurados no tratamento PBN durante o segundo experimento.....	64
APÊNDICE 4: Parâmetros não conservativos mensurados no tratamento PDN durante o segundo experimento.....	65
APÊNDICE 5: Análise de Componentes Principais (PCA) do tratamento PB, segundo experimento. 66	
APÊNDICE 6: Análise de Componentes Principais (PCA) do tratamento PBN, no segundo experimento.....	67
APÊNDICE 7: Análise de Componentes Principais (PCA) do tratamento PDN, no segundo experimento.....	68
APÊNDICE 8: Médias, normalizadas pelo controle, da fecundidade e sobrevivência dos copépodos, em cada tratamento, ao longo dos 30 dias.....	69
APÊNDICE 9: Análise de variância dos tratamentos e dos tempos, com relação à fecundidade e sobrevivência dos copépodos, em cada experimento.	70
APÊNDICE 10: Resultado do isolamento de bactérias e fungos do segundo experimento.....	71
APÊNDICE 11: Relatório das análises de Nitrogênio Total realizadas no Laboratório do SENAI-CETIND - Bahia.	72
ANEXOS	73
ANEXO 1: Submissão à revista Cadernos de Geociências.....	73
ANEXO 2: Submissão à revista Marine Pollution Bulletin.	74
ANEXO 3: Certificado de apresentação de pôster no XII Workshop da ALAGO.	75
ANEXO 4: Aprovação do resumo estendido submetido ao Rio Oil & Gas Expo and Conference 2012.....	76

1. INTRODUÇÃO

Admitindo como base a teoria orgânica de origem do petróleo, esta substância é derivada de matéria orgânica que se forma em ambientes de baixa energia, onde há condições ambientais ideais e sedimentos ricos em matéria orgânica preservada. Sua composição é basicamente constituída por uma mistura de compostos químicos (hidrocarbonetos), contendo também nitrogênio, enxofre e oxigênio (BRAGA et al., 2005).

O Brasil possui um grande número de bacias sedimentares, onde muitas delas se constituem em reservatórios de petróleo, distribuídas tanto na área continental, *onshore*, como na marítima, *offshore*. Mais da metade da produção brasileira está concentrada na Bacia de Campos, Rio de Janeiro. Com as descobertas na camada abaixo do sal, a Bacia de Santos, em São Paulo, fica no segundo lugar da produção nacional.

A crescente exploração de petróleo em vários países, em especial no Brasil, líder mundial em exploração de petróleo em águas profundas, resulta no surgimento de novos desafios. Esses tem que ser vencidos rapidamente, uma vez que o petróleo tem um papel fundamental na economia brasileira e que mais de 70% do petróleo produzido no país é oriundo de poços localizados na plataforma continental (PEREIRA e AQUINO-NETO, 2000).

Com aproximadamente 8.500 km de costa, os riscos de acidentes com petroleiros no Brasil são grandes e as medidas de contenção para óleos derramados devem estar testadas e aprovadas para serem executadas, quando necessário. O fato de que a maior parte da produção brasileira de petróleo provém do mar torna a região costeira ainda mais vulnerável a acidentes. Não somente a exploração, mas também a produção e o transporte do petróleo estão sujeitos a graves acidentes de derrame de óleo no mar, quase sempre por falha humana. Ao longo dos anos muitos acidentes com derrame de petróleo no mar ocorreram no mundo, mas somente no período entre janeiro de 2010 e fevereiro de 2012 foram noticiados 11 acidentes deste tipo (apêndice 1), o que sinaliza a urgência na tomada de decisão para a escolha da técnica de limpeza mais adequada, de acordo com o tipo do óleo, condições climáticas da região, entre outros fatores.

Uma vez que ocorra um acidente, o comportamento de óleos derramados nos mais diversos ecossistemas, e principalmente no mar, vai depender de sua composição química, e também, da atuação de processos como evaporação, emulsificação, dissolução, biodegradação, foto-oxidação e das interações entre óleo, sedimentos e água. A combinação destes processos é conhecida como intemperismo, o qual reduz a concentração de diferentes grupos de compostos, modificando as características químicas e físicas do petróleo (FLOODGATE,

1984; FINGAS, 1998). Todos estes processos influenciam na escolha dos métodos de contenção de um derramamento.

Em caso de derrames de óleo no mar, devem ser tomadas todas as medidas cabíveis para que o óleo não venha a atingir os sistemas costeiros. As medidas de contingência denominadas mecânicas, as quais removem o óleo da água e dispõem em outro local, podem ser as primeiras a serem colocadas em prática num acidente, ao mesmo tempo em que se pode atear fogo nas manchas, desde que as condições do mar assim o permitam, isto é, desde que a energia das ondas e correntes não seja um obstáculo difícil de ser vencido. Esta prática não é permitida no Brasil. É importante ressaltar que os métodos mecânicos de limpeza de derrames de óleo no mar, tipicamente, não recuperam mais do que 10 a 15% do produto derramado (OTA, 1991).

A fim de favorecer a regeneração das áreas impactadas, tem sido adotado em diversos países o emprego de surfactantes químicos e biológicos como auxiliares no tratamento biológico. A utilização destes compostos promove o aumento da interação interfacial de sistemas água/óleo e promove a dessorção de compostos orgânicos acelerando a degradação microbiana de vários hidrocarbonetos (MULLIGAN et al. 2001; KINGSLEY et al. 2004 apud MILLIOLI, 2009).

Em algumas situações, os surfactantes químicos, também chamados de dispersantes químicos, podem fornecer a única forma de remover significativa quantidade de óleo da superfície, minimizando ou prevenindo prejuízos a importantes recursos sensitivos, em função do seu curto tempo de resposta. Estes surfactantes são formados por um grupo de compostos químicos destinados a serem espalhados sobre filmes de óleos para acelerar o processo natural de dispersão. Os surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica) (figura 1.1), não-iônica ou anfotérica. Alguns exemplos de surfactantes iônicos utilizados comercialmente incluem ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e sais de amônio quaternário (catiônico) (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

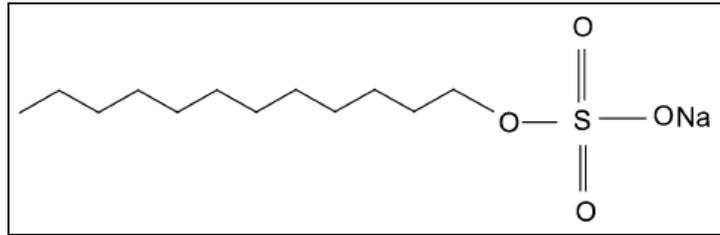


Figura 1.1: Estrutura química do surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (URUM et al., 2004).

Benefícios significativos de ordem ambiental e econômica podem ser atingidos, particularmente quando outras técnicas de respostas no mar são limitadas pelas condições climáticas ou viabilidade de recursos (LI e GARRET, 1998). Seu uso tenta minimizar o prejuízo causado pelo óleo flutuante, por exemplo, com relação às aves, antes que o óleo alcance a linha de costa. Contudo, em comum com todas as opções de respostas a derrames, o uso de dispersantes tem suas limitações e seu uso deverá ser cautelosamente planejado e controlado.

A utilização de dispersantes também dependerá de regulamentações pertinentes por parte de organismos governamentais para sua aplicação. No Brasil, a Resolução CONAMA N° 269/2000 regulamenta o uso de dispersantes químicos em derrames de óleo no mar e restringe sua aplicação a uma distância menor que 2.000 m da costa.

Os biossurfactantes ou surfactantes biológicos são compostos produzidos principalmente pelo crescimento aeróbio de microrganismos através da degradação de vários substratos incluindo carboidratos, hidrocarbonetos, óleos e gorduras ou uma mistura destes (PIRÔLLO, 2006; MESQUITA, 2004 apud MELO, 2011). Os biossurfactantes mais conhecidos são os glicolipídeos, que consistem de carboidratos combinados com ácidos alifáticos ou hidroxialifáticos de cadeia longa. Os ramnolipídeos são os glicolipídeos mais estudados. São formados por uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a uma ou duas moléculas de ácido β -hidroxidecanoico. Os principais glicolipídeos produzidos pela bactéria *P. aeruginosa* são os ramnolipídeos dos tipos 1 e 2 (figura 1.2), Lramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato e L-ramnosil-L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (KRONEMBERGER, 2007).

Os biossurfactantes possuem melhores propriedades que muitos surfactantes químicos e apresentam a vantagem de poderem ser sintetizados a partir de substratos renováveis e possuírem grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular (NEVES et al., 2004 apud MELO, 2011). O principal uso comercial dos

biossurfactantes está na remediação, por causa de sua capacidade em estabilizar emulsões. Isto faz com que ocorra um aumento na solubilidade e na disponibilidade de contaminantes hidrofóbicos, aumentando o potencial para biodegradação (MELO, 2011).

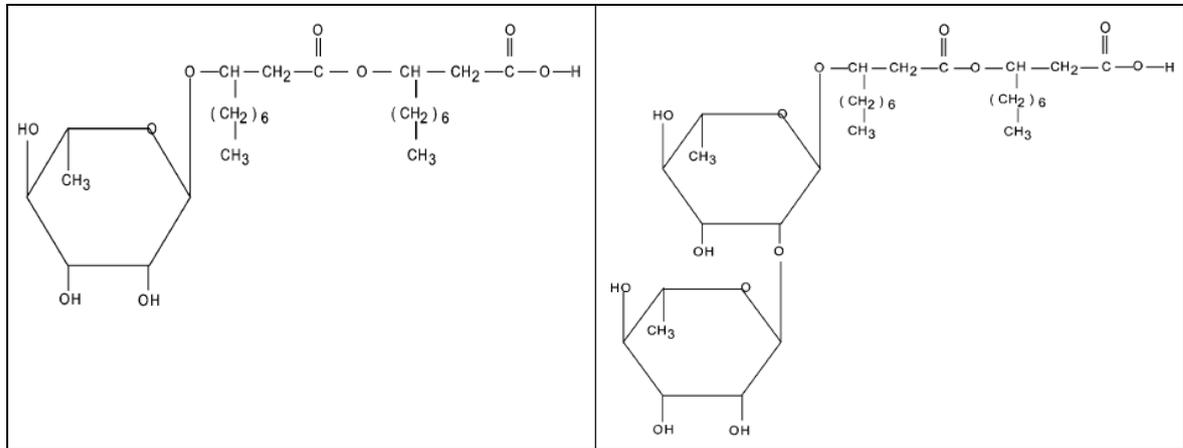


Figura 1.2: Estrutura dos rhamnolípídeos tipos 1 e 2 (URUM et al., 2004).

Rosa (2001) menciona que a adição de nutrientes através do processo de bioestímulo se faz necessária para que os microrganismos acelerem o processo de biodegradação natural do óleo. Pesquisas indicam que o bioestímulo tem potencial para servir como alternativa bastante efetiva na remediação de sedimentos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo devido ao seu baixo custo e evidente aceleração na degradação desses compostos, quando comparado a outras técnicas de remediação. Segundo Rosa (2001) em testes laboratoriais o NPK mostrou-se eficiente como agente bioestimulador na limpeza de derrames de óleo, com relação a alguns dos seus componentes (LIMA, 2010).

O uso de surfactantes como agentes de limpeza em derrames de petróleo pode alterar o comportamento normal de hidrocarbonetos de petróleo, aumentando a sua solubilidade na água, resultando numa maior biodisponibilidade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e interações alteradas entre surfactante, óleo e membranas biológicas. O aumento desta biodisponibilidade dos HPAs pode resultar no aumento da bioacumulação ou em mudanças na disposição metabólica e, conseqüentemente, aumento da toxicidade, diretamente ou através da cadeia alimentar (WOLFE et al., 2001).

Fito e zooplâncton estão amplamente distribuídos no ambiente marinho e, devido à sua mobilidade limitada, tem pouca habilidade para escapar de derramamentos de óleo. Assim, este óleo é adsorvido ou acumulado por organismos de nível trófico inferior e pode ser ingerido e bioacumulado nas espécies de maior nível trófico (WOLFE et al., 2001). Os

organismos bentônicos desempenham importante papel ecológico dentro dos ecossistemas aquáticos, participando das atividades de decomposição da matéria orgânica e da ciclagem de nutrientes no substrato, além de ocupar uma posição importante dentro da cadeia alimentar, sendo uma das principais fontes de alimento para peixes demersais (LANA et al., 1996; NYBAKKEN, 2001 apud GARCIA, 2009).

Os copépodos marinhos harpacticóides bentônicos vêm se destacando em testes letais e subletais de toxicidade devido à abundância no ambiente, facilidade no cultivo em laboratório e a redução de custos do cultivo devido ao seu tamanho (LOTUFO; ABESSA, 2002). O gênero *Tisbe* é um grupo de copépodos bentônicos ecologicamente importante da meiofauna e vem sendo frequentemente utilizado em testes de ecotoxicologia marinha por apresentarem alta sensibilidade a compostos tóxicos (GARCIA, 2009).

A capacidade de degradar hidrocarbonetos do petróleo é apresentada por diversos microrganismos, principalmente fungos e bactérias (RODRIGUES, 2002 apud MELO, 2011). Essa degradação é acelerada e está diretamente relacionada com o aumento da população de microrganismos, presente no ambiente contaminado, que utilizam os hidrocarbonetos como fonte de energia (LIMA, 2010). Rosa (2001) assevera que a biodegradação pode estar limitada à disponibilidade de nutrientes, composição e abundância das comunidades microbianas, salinidade, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido e distribuição e natureza do óleo derramado.

Este trabalho tem a finalidade de avaliar a degradação de petróleo bruto do tipo parafínico sob o auxílio de surfactantes e do bioestímulo, testando a potencialidade do fertilizante NPK como agente acelerador da biodegradação dos componentes de petróleo sob condições experimentais. Além disso, objetiva realizar estudos relacionados ao efeito toxicológico em organismos bentônicos e microbiológicos aos surfactantes e ao NPK, a fim de serem analisadas as suas utilizações em determinadas situações de derrames de petróleo ocasionados em substratos aquosos, concomitante ao monitoramento dos parâmetros físico-químicos das unidades de simulação dos experimentos realizados.

Cada uma destas etapas de pesquisa resultou em artigos científicos, aqui apresentados, que foram submetidos a diferentes periódicos. Adicionalmente, a etapa de levantamento bibliográfico resultou em uma apresentação de pôster no *XII Workshop and Congress* da ALAGO – Associação Latino Americana de Geoquímica Orgânica (anexo 3) e a execução dos experimentos permitiu a aprovação de um resumo estendido submetido ao *Rio Oil & Gas Expo and Conference 2012* (anexo 4).

2. APLICAÇÃO DE SURFACTANTES EM DERRAMES DE ÓLEO NO MAR: REVISÃO DA LITERATURA

Joana Ferreira da CRUZ ¹

Jorge Alberto TRIGUIS ²

Antônio Fernando de Souza QUEIROZ ³

Marcos de ALMEIDA ⁴

Jessyca Beatriz Alves PALMEIRA ⁵

¹ Engenheira Ambiental, Mestranda do Programa de Pós-Graduação Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente - POSPETRO, Universidade Federal da Bahia – UFBA. E-mail: joana.fcruz@hotmail.com

² Geólogo, Dr. em Geoquímica Orgânica. Professor, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. E-mail: triguis@ufba.br

³ Geólogo, Dr. em Geoquímica do Meio Ambiente. Professor Associado, IGEO/UFBA. E-mail: queiroz@ufba.br

⁴ Graduando em Oceanografia – UFBA. Bolsista do Programa PERMANECER no NEA/IGEO/UFBA. E-mail: marcosalmeida.mda@hotmail.com

⁵ Graduanda em Oceanografia – UFBA. Bolsista do Programa PERMANECER no NEA/IGEO/UFBA. E-mail: jessyca.bpalmeira@gmail.com

RESUMO

Os riscos de acidentes com petroleiros no Brasil são grandes e as medidas de contenção para óleos derramados devem estar testadas e aprovadas para serem executadas, quando necessário. Uma vez que ocorra um acidente, o comportamento de óleos derramados nos mais diversos ecossistemas, e principalmente no mar, vai depender de sua composição química, e também, da atuação de processos naturais. Todos estes processos influenciam na escolha dos métodos de contenção de um derramamento. O uso de dispersantes em um derrame no mar

depende da quantidade e tipo do óleo, da proximidade da costa, presença de habitats sensíveis, condições climáticas, entre outros. Os biossurfactantes ainda não são capazes de competir economicamente no mercado com os compostos sintetizados quimicamente, devido aos altos custos de produção. É necessária maior investigação sobre a ação de surfactantes em um nível molecular e suas taxas de aplicação na água.

Palavras chave: Derrame de óleo, dispersante químico, biossurfactante

ABSTRACT

The risks of tanker accidents in Brazil are large and containment measures for oil spills must be tested and approved to run when needed. Once an accident occurs, the behavior of spilled oil in the most diverse ecosystems, and especially at sea, will depend on its chemical composition, and also the action of natural processes. All these processes affect the choice of methods to contain a spill. The use of dispersants in a stroke in the sea depend on the amount and type of oil, near-shore, the presence of sensitive habitats, climatic conditions, among others. The biosurfactants are not yet able to compete economically on the market with the chemically synthesized compounds, due to high production costs. Further research is needed on the effect of surfactants on a molecular level and their application rates in the water.

Keywords: Oil spill; chemical dispersant; biosurfactant

2.1 Introdução

A crescente exploração de petróleo em vários países, em especial no Brasil, líder mundial em exploração de petróleo em águas profundas, resulta no surgimento de novos desafios. Esses tem que ser vencidos rapidamente, uma vez que o petróleo tem um papel fundamental na economia brasileira e que mais de 70% do petróleo produzido no país é oriundo de poços localizados na plataforma continental (Pereira; Aquino-Neto, 2000).

Com aproximadamente 8.500 km de costa, os riscos de acidentes com petroleiros no Brasil são grandes e as medidas de contenção para óleos derramados devem estar testadas e aprovadas para serem executadas, quando necessário. O fato de que a maior parte da produção brasileira de petróleo provém do mar torna a região costeira ainda mais vulnerável a acidentes. Não somente a exploração, mas também a produção e o transporte do petróleo estão sujeitos a graves acidentes de derrame de óleo no mar, quase sempre por falha humana.

Nos últimos anos, vários acidentes com derramamentos de petróleo têm resultado na contaminação de ambientes terrestres e aquáticos. Entre os mais significativos, estão o derramamento de 40.000 m³ de petróleo do navio Exxon Valdez, no Alasca, em 1989, e o vazamento de 300.000 m³ de óleo do petroleiro Braer, no Reino Unido, em 1993 (Santos, 2003, citado por Kronemberger, 2007).

Em janeiro de 2000, a Baía da Guanabara, no Rio de Janeiro, sofreu um desastre ecológico. Cerca de 1.300 m³ de óleo da Refinaria Duque de Caxias vazaram, devido a uma falha no projeto de um oleoduto. Vários ecossistemas associados à região foram afetados pelo derrame de óleo, dentre os quais destacam-se manguezais, praias e costões rochosos (Vieira, 2000). Também, no ano 2000 ocorreu o vazamento de 4.000 m³ de óleo no Estado do Paraná.

A explosão da plataforma petrolífera da BP - British Petroleum em abril de 2010, causou um vazamento estimado de 5 milhões de barris de óleo, aproximadamente 795 milhões de litros, no Golfo do México, na maior tragédia ambiental da história dos Estados Unidos, o que fez acender um sinal amarelo na indústria. O questionamento ocorre no momento em que o Brasil inicia uma empreitada inédita e arriscada: a extração de petróleo no pré-sal, a mais de 300 km da costa e 7.000 m abaixo da superfície, incluindo uma instável faixa de sal de 2.000 m de espessura (O ESTADO DE SÃO PAULO, 2010). Os últimos acidentes mostraram que o Brasil não está preparado para evitar ou conter vazamentos de petróleo: o investimento em

tecnologia preventiva é exíguo e o Plano Nacional de Contingência, embora previsto em lei, nunca saiu do papel (Nogueira, 2011).

Uma vez que ocorra um acidente, o comportamento de óleos derramados nos mais diversos ecossistemas, e principalmente no mar, vai depender de sua composição química, e também, da atuação de processos como evaporação, emulsificação, dissolução, biodegradação, foto-oxidação e das interações entre óleo, sedimentos e água. A combinação destes processos é conhecida como intemperismo (**figura 2.1**), o qual reduz a concentração de diferentes grupos de compostos, modificando as características químicas e físicas do petróleo (Floodgate, 1984; Fingas, 1998). Todos estes processos influenciam na escolha dos métodos de contenção de um derramamento.



Figura 2.1: Processos de intemperismo do óleo em ambientes marinhos. FONTE: Rosa, 2001.

2.2 Técnicas de Remoção do Óleo

Existem muitas formas de limpar o ambiente contaminado por óleo, e a escolha da técnica mais adequada é crucial para a minimização dos impactos ambientais decorrentes.

O método mais comum de contenção é a utilização de barreiras com materiais sorventes poliméricos, com características de alta resistência mecânica e físico-química. As barreiras de contenção possuem a finalidade de conter derramamentos de petróleo e derivados,

concentrando, bloqueando ou direcionando a mancha de óleo para locais menos vulneráveis ou mais favoráveis ao seu recolhimento. Elas também podem ser utilizadas para proteger locais estratégicos, evitando que as manchas atinjam áreas de interesse ecológico ou socioeconômico (Ferrão, 2010).

Os *skimmers* são dispositivos de sucção que flutuam e retiram o óleo da superfície da água. Mas, infelizmente, o método vai de encontro à tendência natural do óleo que é de se espalhar conforme a influência de ventos, ondas e correntes. Esta é a razão principal porque a contenção e a recuperação de óleo em mar aberto dificilmente alcançará proporção maior que 10 a 15% do óleo derramado (Ferrão, 2010).

Queima *in-situ* é o nome dado ao processo de queima do óleo derramado no mar, no local ou próximo ao local do derramamento. Existem vários problemas que limitam o uso desta técnica, incluindo: o perigo da fonte de ignição, a formação de resíduos densos que podem afundar e questões de segurança. Este método ainda não foi regulamentado no Brasil, porém é utilizado há mais de 30 anos em países como Suécia, EUA, Canadá e Inglaterra (Ferrão, 2010).

A técnica da biorremediação pode ser considerada uma alternativa promissora e ecológica na limpeza de ambientes contaminados por petróleo, utilizando microrganismos ou processos microbianos para reduzir a concentração e/ou a toxicidade desses poluentes (Rosa, 2001), entretanto o seu tempo de resposta pode ser longo, o que torna necessária a adição de mecanismos que acelerem este processo, como é o caso dos surfactantes.

Os efeitos positivos mais conhecidos do uso de surfactantes visando o aumento da biodegradação são: aumento da solubilidade dos hidrocarbonetos na fase líquida; dessorção dos hidrocarbonetos sorvidos no solo e a difusão facilitada dos hidrocarbonetos da fase sólida para a fase líquida, aumentando, assim, a disponibilidade do óleo para ação dos microrganismos (Millioli, 2009).

2.3 Surfactantes ou Dispersantes Químicos

Dispersantes químicos são substâncias de natureza orgânica utilizados com a finalidade de reduzir a tensão superficial entre o óleo e a água, aumentando a superfície de contato entre os mesmos, através da formação de gotas de óleo no meio aquoso (**figura 2.2**). Os dispersantes são constituídos por surfactantes, cuja molécula é formada por uma cadeia apolar, com afinidade por óleos e graxas (oleofílica), contendo uma extremidade de forte polaridade, com afinidade pela água (hidrofílica). Além dos surfactantes, os dispersantes também são constituídos por solventes que permitem a sua difusão no óleo.

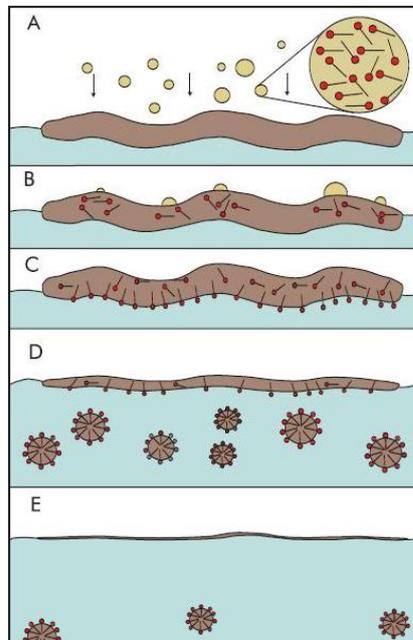


Figura 2.2: A) Aplicação do dispersante químico na mancha de óleo; B) O solvente carrega o surfactante para o óleo; C) As moléculas de surfactante migram para a interface óleo/água e reduzem a tensão superficial; D) As gotículas de óleo são circundadas pelas substâncias surfactantes, estabilizando a dispersão, o que ajuda a promover uma rápida diluição pelo movimento da água; E) As gotas dispersam por mistura turbulenta deixando apenas uma fina camada do óleo na superfície. Fonte: ITOPF, 2011.

A utilização de dispersantes é largamente difundida desde a década de setenta, sendo uma das primeiras estratégias usadas nos casos de derrames de petróleo no mar (Fingas, 1998). Nos

últimos anos têm sido conduzidos estudos com o objetivo de viabilizar o uso de dispersantes, em função do binômio: eficiência *versus* toxicidade (Souza, 2003).

A tomada de decisão do uso de dispersantes em um derrame no mar depende da quantidade e do tipo do óleo ou produto derramado, da proximidade da costa, da presença de populações e habitats sensíveis, das condições climáticas, do mar e dos tipos de dispersantes disponíveis no mercado (Lunel et al. 1995; Etkin, 1998). A aplicação de surfactantes nos derrames ocorridos em águas brasileiras ainda não foi aprovada pelo IBAMA, pois ainda não se conhecem os possíveis impactos de seu uso sobre a fauna e flora marinhas (Souza, 2003).

Quando utilizados apropriadamente, os dispersantes químicos podem se tornar um mecanismo efetivo como resposta a um derrame de óleo. Eles são capazes de rapidamente remover grandes quantidades de certos tipos de óleos da superfície do mar, transferindo-os para a coluna d'água, e ainda podem retardar a formação das persistentes emulsões de água no óleo.

Em comum com outras técnicas, a decisão de utilizar dispersantes deve merecer considerações cuidadosas. A eficiência intrínseca de um dado dispersante é totalmente dependente da sua capacidade de reduzir a tensão interfacial entre o óleo e a água e, assim, dispersar o óleo. Vários parâmetros externos influenciam o desempenho dos dispersantes: as características do óleo, o grau de turbulência ou energia de mistura, a razão dispersante/óleo, a temperatura, o tempo de contato, a espessura da mancha de óleo, as condições climáticas e as sensibilidades ambientais do entorno (Dye; Frydenborg, 1980).

Os dispersantes, em geral, têm pouco efeito sobre óleos viscosos, pois há uma tendência do óleo se espalhar na água antes que os solventes e agentes surfactantes possam penetrar na mancha. A maioria dos produtos atualmente disponíveis possui efeito reduzido se aplicados quando o processo de intemperização já tiver sido iniciado e se a mancha estiver sob o aspecto de emulsão viscosa, como uma “mousse” (Ferrão, 2010).

A energia de mistura é um dos fatores mais importantes que podem afetar a quebra inicial da mancha de óleo flutuante em gotas, assim como o transporte das gotas de óleo na coluna de água (Mukherjee; Wrenn, 2009). A intensidade da energia de mistura turbulenta determina a separação de gotas de óleo de grandes dimensões em pequenas gotículas, e a profundidade de submersão das gotículas (Li et al., 2009). O tamanho médio das gotas de óleo diminui com a intensidade de mistura e tempo de mistura (Mukherjee e Wrenn, 2009).

2.4 Surfactantes Biológicos ou Biosurfactantes

Os biosurfactantes ou surfactantes biológicos são compostos produzidos principalmente pelo crescimento aeróbio de microrganismos através da degradação de vários substratos incluindo carboidratos, hidrocarbonetos, óleos e gorduras ou uma mistura destes (Piróllo, 2006; Mesquita, 2004 citado por Melo, 2011). Começaram a ser utilizados nas últimas décadas e são classificados de acordo com a composição química e sua origem microbiana já que são produtos metabólicos de bactérias e fungos (Millioli, 2009).

Possuem melhores propriedades que muitos surfactantes químicos. Geralmente possuem baixos valores de CMC (concentração micelar crítica) e tensão interfacial na solução aquosa (Banat, 1995 citado por Millioli, 2009). Apresentam a vantagem de poderem ser sintetizados a partir de substratos renováveis e possuem grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular (Neves et al., 2004 citado por Melo, 2011).

O principal uso comercial dos biosurfactantes está na remediação, por causa de sua capacidade em estabilizar emulsões. Isto faz com que ocorra um aumento na solubilidade e na disponibilidade de contaminantes hidrofóbicos, aumentando o potencial para biodegradação (Melo, 2011).

No momento, os biossurfactantes ainda não são capazes de competir economicamente no mercado com os compostos sintetizados quimicamente, devido aos altos custos de produção. Isso é resultado da metodologia ineficiente do bioprocessamento, da baixa produtividade das cepas microbianas e da necessidade do uso de substratos de custo elevado (Kronemberger, 2007).

Em adição ao custo crescente e incerteza no abastecimento de petróleo, que é inclusive utilizado como matéria-prima para a produção de surfactantes por via química, o caráter prontamente biodegradável dos biossurfactantes indica que eles podem ser utilizados para remediar solos impactados com hidrocarbonetos sem a geração de outros problemas ambientais (Fiechter, 1992 citado por Kronemberger, 2007).

Diversas pesquisas vem sendo realizadas na aplicação de biossurfactantes para a recuperação microbiana melhorada de petróleo (*MEOR – Microbial Enhanced Oil Recovery*), já que se estima que somente de 30 a 50% do petróleo pode ser recuperado das jazidas naturais com as técnicas convencionais de bombeamento (Kronemberger, 2007).

2.5 Considerações Finais

A aplicação de surfactantes em acidentes com derrame de petróleo ainda é um tema polêmico, entretanto existe uma necessidade urgente de se desenvolverem novas tecnologias que podem melhorar a utilização operacional destes compostos. Uma melhor compreensão da relação entre os regimes de testes em laboratório e em ambientes naturais pode permitir previsões mais confiáveis para serem feitas durante os incidentes reais. Isso pode exigir mais investigação sobre a ação de surfactantes em um nível molecular e suas taxas de aplicação na água. A evolução nesta área será útil para a reformulação ou elaboração de um Plano de Contingência em países onde as condições semelhantes se aplicam.

2.6 Agradecimentos

Este estudo foi realizado com o apoio financeiro da CAPES e FINEP-Petrobras, através da RECUPETRO – Rede Cooperativa em Recuperação de Áreas Contaminadas por Atividades Petrolíferas.

Referências

BANAT, I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 1-12, 1995.

DYE, C.W.; FRYDENBORG, R.B. Oil dispersants and the environmental consequences of their usages: A literature review. **Florida Department of Environmental Regulation – Technical Series**, v. 5, n. 1, 1980.

FERRÃO, C.M. **Derramamentos de óleo no mar por navios petroleiros**. Monografia (Especialização Executiva em Meio Ambiente), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends in Biotechnology**, v. 10, p. 208-217, 1992.

FINGAS, M.F. The chemistry and physics of oil behaviour at sea: Weathering and incorporation into spill models. In: **Australian U.N. Workshop**, 22p. 1998.

FLOODGATE, G. The fate of petroleum in marine ecosystems. In: **Petroleum Microbiology**, New York: Macmillan Publishing Co., p. 355-398, 1984.

ITOPF – The International Tanker Owners Pollution Federation Limited. Major Oil Spills. Disponível em: <<http://www.itopf.com/information-services/data-and-statistics/statistics/#major>> Acesso 20 fev. 2011.

KRONEMBERGER, F.A. Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em biorreator com oxigenação por contactor de membranas. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 160 p., 2007.

LI, Z.; LEE, K.; KING, T.; BOUFADEL, M. C.; VENOSA, A.D. Evaluating chemical dispersant efficacy in an experimental wave tank: 2 - Significant factors determining in situ oil droplet size distribution. **Environmental Engineering Science**, v. 26, n. 9, 2009.

LUNEL, T.; BALDWIN, G.; MERLIN F. Comparison of meso-scale and laboratory dispersant tests with dispersant effectiveness measured at sea. In: **Proceedings of 18th Arctic and marine oil spill Program Technical Seminar**, Canada. Ottawa, Ont.: Environment Canada, v. 1, p. 629-651, 1995.

MELO, E.G.V. **Avaliação da glicerina bruta na estimulação de bactérias hidrocarbonoclásticas para remediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos**. Dissertação (Mestrado em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente), Universidade Federal da Bahia, 2011.

MESQUITA, A.C. **Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes**. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

MILLIOLI, V.S. **Avaliação da potencialidade da utilização de surfactantes na biorremediação de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

MUKHERJEE, B.; WRENN, B.A. Influence of dynamic mixing energy on dispersant performance: Role of mixing systems. **Environmental Engineering Science**, v. 26, n. 12, 2009.

NEVES, E.; FORGIARINI, E.; SCHOENHALS, M.; CAMPREGHER, N.; GUZZI, R. **Biosurfactantes**. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

O ESTADO DE SÃO PAULO. Sombras sobre a camada do pré-sal. Disponível em: <[http://www.tnpetroleo.com.br/clipping/5662/sombras-sobre-a-camada-do-pre-sal----](http://www.tnpetroleo.com.br/clipping/5662/sombras-sobre-a-camada-do-pre-sal---->)>, Acesso 29 jun. 2010.

PEREIRA, A.S.; AQUINO-NETO, F.R. Estado da arte da cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura. **Química Nova**, v.23, n.3, 2000.

PIRÔLLO, M.P.S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

ROSA, A.P. **Processos de biorremediação na mitigação do impacto ambiental, devido a eventuais derrames de óleo na bacia de campos - experimentos laboratoriais.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Reservatório e Exploração de Petróleo), Universidade Estadual do Norte Fluminense, Macaé – RJ, 145p., 2001.

SANTOS, A.S. **Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*.** Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003.

SOUZA, E.S. **Desenvolvimento de métodos de biorremediação aplicados a derrames de petróleo em água do mar - Testes laboratoriais.** Tese (Doutorado em Engenharia de Reservatório e de Exploração de Petróleo), Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2003.

VIEIRA, M. A lição da baía de todos os males. **Revista Época**, Rio de Janeiro, v. 31, p. 36, 2000.

3. EVALUATION OF THE BIODEGRADATION PROCESS OF CRUDE OIL WITH THE CONTRIBUTION OF SURFACTANTS

Joana F. Cruz ^a; Jorge A. Trigüis ^a; Antônio Fernando S. Queiroz ^a; Olga Lucia V. Barragan ^a; Deloar D. Oliveira ^b; Lilia P. Souza-Santos ^b; Diana D. Lira ^c; Norma B. Gusmão ^c

^a Núcleo de Estudos Ambientais, Departamento de Geoquímica, Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Rua Barão de Geremoabo, s/nº, Ondina, CEP 40170-110, Salvador, Bahia, Brasil.

^b Departamento de Oceanografia, Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, Nº 1235, Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.

^c Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, Nº 1235, Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.

* Corresponding author: Tel: +55 71 3283.8632; Fax: + 55 71 3283.8601; E-mail address: joana.fcruz@hotmail.com (Joana F. Cruz)

Abstract

The effectiveness of biological and chemical surfactants, alone and in conjunction with NPK fertilizer, in crude oil was evaluated in simulations of spill at sea. The effectiveness of these products was determined by evaluating the degradation of oil throughout the experiment, through geochemical analyzes; for toxicological analysis, by exposing copepods to treatments; and for microbiological analyzes, by isolation of fungi and bacteria. Geochemical analyzes showed that simulations containing sea water, oil and biosurfactant, with and without NPK, had higher degradation. Toxicological findings indicated that overall there was no significant difference between treatments with respect to fecundity and survival of the copepods. Therefore, the treatments were not toxic to organisms. Microbiological analysis indicated that there was an increase in the number of fungi in relation to the bacteria in the treatments containing biosurfactant and NPK alone, suggesting that the major

degradation of the oil in these treatments is the action of fungi.

Keywords: Crude oil, oil spill, chemical dispersant, biosurfactant, biodegradation, toxicity

3.1. Introduction

With approximately 8.500 km of coastline, the risk of tanker accidents in Brazil are large and containment measures for oil spills must be tested and approved to run when needed. The fact that most of the Brazilian production of oil from the sea makes the coastal region even more vulnerable to accidents.

In case of oil spills at sea, should be taken all appropriate measures for the oil does not reach the coastal systems. The contingency measures called mechanical, which remove oil from water and put in another place, may be the first to be put into practice in an accident, while it can set fire to the spots, though this practice is not allowed Brazil. Importantly, the methods of mechanical cleaning of oil spills at sea typically do not recover more than 10-15% of spilled (OTA, 1991).

To promote the regeneration of affected areas, has been adopted the use of chemical and biological surfactants as auxiliaries in the biological treatment. The use of these compounds promote increased interfacial interaction system water/oil and promotes the desorption of organic compounds accelerating microbial degradation of various hydrocarbons (Mulligan et al., 2001; Kingsley et al., 2004 cited in Millioli, 2009).

In some situations, chemical surfactants, also called chemical dispersants, may provide the only way to remove a significant amount of oil from the surface, minimizing or preventing damage to sensitive resources important, in terms of its response time. These surfactants are formed by a group of chemicals intended to be spread out on films of oil to accelerate the natural process of dispersion. Significant benefits of environmental and economic can be achieved, particularly when other techniques responses at sea are limited by weather conditions or viability of resources (Li and Garret, 1998). Its use try to minimize harm caused by floating oil, for example, with respect to birds, before the oil reaches the shoreline. However, in common with all the options for responses to spills, the use of dispersants has its limitations and its use should be carefully planned and controlled. The use of dispersants also depend on the relevant regulations by governmental agencies for its implementation.

The biosurfactants, or biological surfactants, are compounds produced by the growth of aerobic microorganisms by degradation of various substrates including carbohydrates,

hydrocarbons, fats and oils or a mixture thereof (Pirôllo, 2006; Mesquita, 2004 cited in Melo, 2011). The biosurfactants have better properties than many chemicals surfactants. Generally have low values of CMC (critical micelle concentration) and interfacial tension in aqueous solution (Banat, 1995 cited in Millioli, 2009). They have the advantage that they can be synthesized from substrates renewable and have great chemical diversity, allowing applications specific to each particular case (Neves et al., 2004 cited in Melo, 2011). The main commercial use of biosurfactants in the remediation is because of its ability to stabilize emulsions. This causes an increase occurs in the solubility and availability of hydrophobic contaminants, increasing the potential for degradation (Melo, 2011).

Rosa (2001) mentions the addition of nutrients through the process of biostimulation is necessary for the microorganisms that accelerate the natural process of biodegradation of the oil. Research indicates that the biostimulation has the potential to serve as a very effective alternative for remediation of sediments contaminated with petroleum hydrocarbons due to its low cost and apparent acceleration in the degradation of these compounds when compared to other remediation techniques. According to Rosa (2001) in laboratory tests the NPK fertilizer proved efficient as an biostimulator in cleaning oil spills, with respect to some of its components (Lima, 2010).

Use of surfactants as agents for cleaning spills of oil can change the behavior of normal hydrocarbons, increasing their solubility in water, resulting in a greater bioavailability and altered interactions between surfactants, oil and biological membranes. The bioavailable fraction can also be increased, resulting in increased bioaccumulation or metabolic changes in the disposition and, consequently, increased toxicity, either directly or through the food chain (Wolfe et al., 2001).

Phyto and zooplankton are widely distributed in the marine environment and, due to their limited mobility, has little ability to escape from oil spills. Thus, this oil is adsorbed or accumulated by lower trophic level organisms and can be ingested and bioaccumulated in higher trophic level species (Wolfe et al., 2001). The benthic organisms play an important ecological role in aquatic ecosystems, participating in the activities of organic matter decomposition and nutrient cycling in the substrate, and occupy an important position within the food chain, being a major source of food for demersal fish. (Lana et al., 1996; Nybakken, 2001 cited in Garcia, 2009).

Marine benthic harpacticoid copepods have been highlighted in testing lethal and sublethal toxicity due to the abundance in the environment, ease of cultivation in the laboratory and reduce costs of cultivation due to its size (Lotufo and Abessa, 2002). The genus *Tisbe*

copepods is a group of ecologically important benthic meiofauna and has been often used in marine ecotoxicology tests due to their high sensitivity to toxic compounds (Garcia, 2009).

The ability to degrade petroleum hydrocarbons is presented by various microorganisms, mainly bacteria and fungi (Rodrigues, 2002 cited in Melo, 2011). This degradation is accelerated and is directly related to the increase of population of microorganisms present in contaminated environment, using hydrocarbons as an energy source (Lima, 2010).

This study aims to evaluate the degradation of crude oil under the action of surfactants and under the influence of biostimulation, testing the capability of NPK fertilizer as an accelerator of the biodegradation of oil components under experimental conditions. Furthermore, studies related to the objective toxicological effect on the microbiological and benthic organisms surfactants and NPK, to be analyzed their uses in some situations up oil spills caused aqueous substrates.

3.2. Materials and Methods

3.2.1 Modeling Experimental

In this study two experiments were developed at laboratory level, carried out in two campaigns, where the second campaign was developed based on analytical and methodological changes required and observed in the first campaign.

In the first campaign, the experiment was conducted in 6 units with a capacity of 30 L simulation, all filled with 15 L of seawater collected in Praia da Paciência, Rio Vermelho, Salvador - Bahia - Brazil and 15mL of crude oil paraffin type ($^{\circ}$ API 28,39; saturated hydrocarbons: 79%; aromatic hydrocarbons: 15%; NSO compounds: 6%) from the Camamu-Almada Basin, Bahia, and were each equipped with one pump for aeration and water turbulence (simulation of sea current).

The application of 2mL of the surfactant chemical Ultrasperse II, manufactured by Oxiteno, diluted 1:10 in distilled water was performed according to the manufacturer's instructions, taking into account the volume of spilled oil. The biosurfactant used, the type ramnolípídeo produced by *Pseudomonas aeruginosa*, produced at the Laboratório de Processos de Separação com Membranas PEQ/COPPE/UFRJ in partnership with Petrobras, was applied without dilution in the volume of 15 mL.

The simulation units were defined as:

1. P1 (control): 15 L of seawater + 15 mL of oil
2. P2 (control): 15 L of seawater + 15 mL of oil (replica)

3. PD1: 15 L of seawater + 15 mL of oil + chemical dispersant
4. PD2: 15 L of seawater + 15 mL of oil + chemical dispersant (replica)
5. PB1: 15 L of seawater + 15 mL of oil + biosurfactant
6. PB2: 15 L of seawater + 15 mL of oil + chemical dispersant (replica)

Were used in the second campaign 09 simulation units with a capacity of 30 L, filled with 15 L of seawater and 10 mL of the same crude oil, as follows:

1. P1 (control): 15 L of seawater + 15 mL of oil
2. PD1: 15 L of seawater + 10 mL of oil + chemical dispersant
3. PD2: 15 L of seawater + 10 mL of oil + chemical dispersant (replica)
4. PB1: 15 L of seawater + 10 mL of oil + biosurfactant
5. PB2: 15 L of seawater + 10 mL of oil + biosurfactant (replica)
6. PDN1: 15 L of seawater + 10 mL of oil + chemical dispersant + NPK
7. PDN2: 15 L of seawater + 10 mL of oil + chemical dispersant + NPK (replica)
8. PBN1: 15 L of seawater + 10 mL of oil + biosurfactant + NPK
9. PBN2: 15 L of seawater + 10 mL of oil + biosurfactant + NPK (replica)

Were used two aeration pumps in each simulation unit. Every two days 5 L water were removed from each simulation unit and replaced by fresh seawater and approximately 1 L of distilled water. Were used 150 mL of biosurfactant.

3.2.2 Geochemical Analyses

The geochemical for assessing the degradation of oil were Liquid Chromatography, SAR method, and Gas Chromatography coupled with a Flame Ionization Detector (GC-FID). In the first campaign surface oil samples of the simulation units were analyzed at days 0 and 30, while in the second campaign, at days 0 and 21. Liquid chromatography is employed in the separation of the major fractions of compounds of the oil: fraction saturated - represented by normal alkanes and branched, and the cycloalkanes; fraction of aromatic hydrocarbons - containing compounds with one or more benzene rings, such as the HPA's; and fraction of polar compounds or NSO - consisting of resins and asphaltenes. Liquid chromatography was performed oil before starting the experiment, in order to characterize it and thus able to assess the degradation during the day, from its fractionation.

Gas chromatography was used in qualitative and quantitative determination of n-alkanes,

isoprenoids pristane (Pr) and phytane (Ph), and total hydrocarbons. The monitoring of the biodegradation of hydrocarbons is done by measuring the ratios of $n\text{-C}_{17}/\text{Pr}$ and $n\text{-C}_{18}/\text{Ph}$, whereas the linear hydrocarbons $n\text{-C}_{17}$ and $n\text{-C}_{18}$ are more easily biodegraded than the corresponding isoprenoids, pristane and phytane (Bragg, 1992 cited in Mcmillen et al., 1993; Brown, 1987 cited in Del'arco, 1999 cited in Rosa, 2001).

3.2.3 Toxicological Analysis

In the first campaign, were collected samples of water from the simulation units on days 0, 1, 7, 15 and 30. In the second campaign aimed to examine toxicologically only treatments of oil in conjunction with biosurfactant (PB), oil in conjunction with chemical surfactant and NPK (PDN) and oil together with biosurfactant and NPK (PBN), in order to observe the effects of a higher concentration of biosurfactant and NPK together with surfactants. Sampling occurred on days 0, 4, 7 and 21.

Toxicity tests were performed according to established by Araujo-Castro et al., (2009) to sediment toxicity test. The samples were thawed in a water cooler at least 12 hours before the test. All parameters were checked and when necessary was done to correct salinity.

Bioassays carried out in triplicate consisted in the exposure of 10 ovigerous females of the copepod *Tisbe biminiensis* to a test solution, consisting of the sample to be tested by adding of microalgae (*Chaetocerus gracilllis*). The concentration of diatomaceous used for the test was 0,2 mg of chlorophyll-a. The bioassay had a variable duration of 4 days for the first campaign and 7 days for the second campaign. Upon completion of the exposure interval established content present in each container was stained with rose bengal and fixed with formaldehyde for subsequent counting. The variables used in the test are fecundity and survival. The data were processed using the statistical software BioStat 5.0®.

3.2.4 Microbiological Analysis

Microbiological analyzes were performed using the technique of membrane filter (Levin et al., 1975) and only in samples from the 21th day of the second campaign. For the isolation of bacteria and fungi in 200 mL water, the samples were filtered through membranes of 0,45 mm in porosity to isolate fungi and the filtrate was refiltered membrane 0,22 mm in porosity to isolate bacteria. The membranes were placed onto TSA (Trypticase Soy Agar) for bacteria and PDA (Potato Dextrose Agar) for fungi and maintained at 30°C for 24 hours (bacteria) and 72 hours (fungi). After this period were counted the number of bacteria and fungi in each

treatment. All isolations were performed in triplicate.

3.3. Results and Discussion

3.3.1 First Campaign

The fractionation samples of the first campaign by liquid chromatography showed that treatment of oil together with biosurfactant (PB) showed an appreciably higher degradation, characterized by decreased percentage of saturated hydrocarbons and increasing the percentage of NSO compounds, as shown in table 3.1.

Table 3.1. Characterization of the original oil and oil in each treatment on days 0 and 30, from the first experiment.

Sample/Treatment	SAT	ARO	NSO
Original Oil	79%	14%	6%
P-0	78%	17%	5%
P-30	80%	13%	7%
PB-0	80%	13%	7%
PB-30	77%	13%	9%
PD-0	78%	17%	5%
PD-30	78%	14%	8%

The results obtained by chromatography of the fraction of the oil saturated generated in each treatment the chromatograms of figure 3.1 and confirm that treatment of oil together with biosurfactant (PB) showed the most degradation, characterized by a greater percentage reduction of the reasons $n\text{-C}_{17}/\text{Pr}$ and $\Sigma n\text{-alkanes}/(\text{Pr}+\text{Ph})$, representing greater degradation between days 0 and 30, as shown in tables 3.2a and 3.2b.

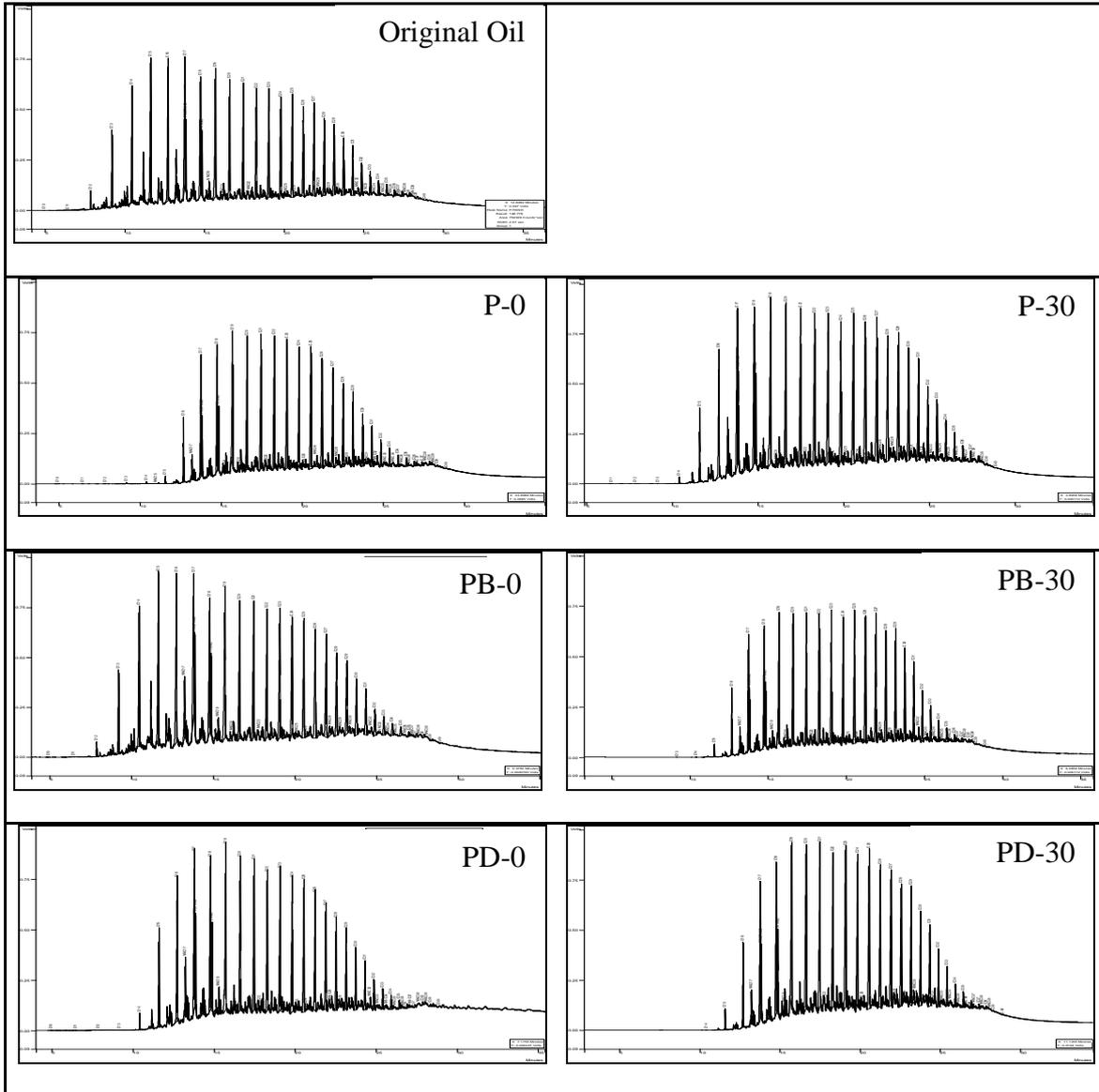


Figure 3.1: Profile of the fraction of n-alkanes of the original oil and the oil in treatments P, PB, PD, on days 0 and 30, in the first campaign.

Table 3.2a: Relationship between n-alkanes, pristane and phytane in the beginning and in the end of 30 days, from the first experiment.

Sample/Treatment	n-C ₁₇ /Pr	n-C ₁₈ /Ph	∑n-alkanes/(Pr+Ph)
Original Oil	3,11	2,74	35,18
P-0	3,32	2,65	18,30
P-30	3,17	2,48	18,32
PD-0	3,32	2,64	18,03
PD-30	3,17	2,53	20,12
PB-0	3,42	2,64	19,26
PB-30	3,09	2,55	22,97

Table 3.2b: Percentage reduction of the values of the ratios between n-alkanes, pristane and phytane comparing days 0 and 30, from the first experiment.

Sample/Treatment	n-C ₁₇ /Pr	n-C ₁₈ /Ph	∑n-alkanes/(Pr+Ph)
P	4,4%	6,2%	0,1%
PD	4,5%	4,2%	11,6%
PB	9,7%	3,7%	19,2%

Statistical analysis of toxicological during the first campaign showed that the treatments of the oil alone (P), oil with dispersant (PD) and oil with biosurfactant (PB) caused no toxic lethal or sublethal to copepoda in any treatment and in none time tested. Relativizing the results obtained with the control and comparing it over time, in all samples there was no effect of the treatment or of time, in other words, throughout the experiment was not found any evidence of toxicity lethal or sublethal (Figures 3.2 and 3.3).

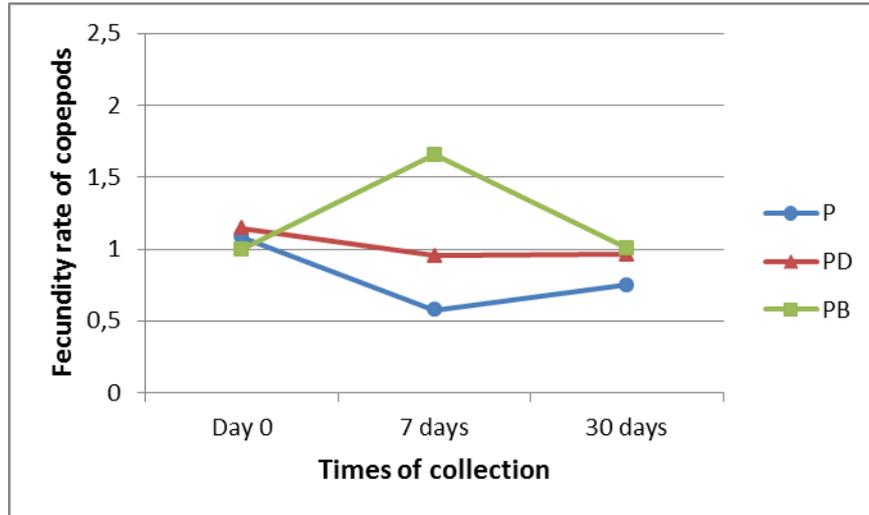


Figure 3.2: Average fecundity of copepods normalized by the control in the first campaign in each treatment over the 30 days. P = oil alone; PD = oil with dispersant; PB = oil with biosurfactant.

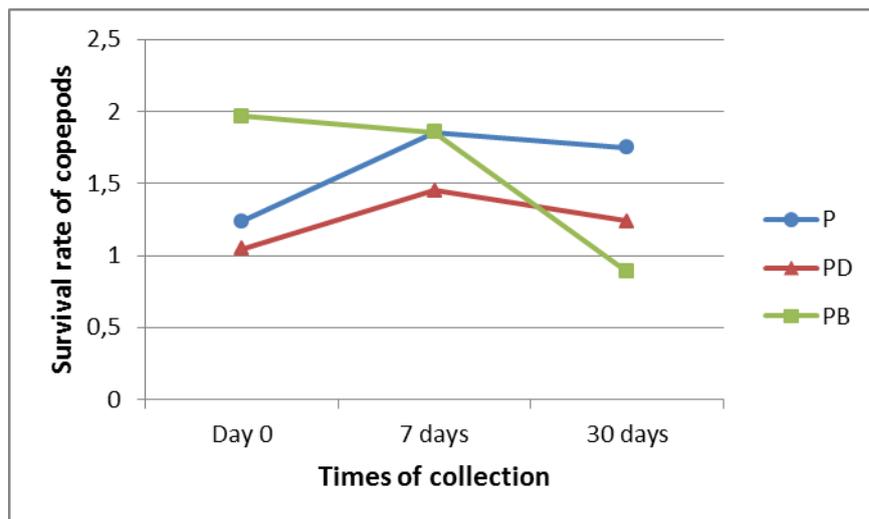


Figure 3.3: Average survival of copepods normalized by the control in the first campaign in each treatment over the 30 days. P = oil alone; PD = oil with dispersant; PB = oil with biosurfactant.

3.2 Second Campaign

The fractionation samples of the second campaign by liquid chromatography showed that treatment containing only oil (P) showed higher degradation, characterized by decreased percentage of saturated and increasing the percentage of NSO compounds, as shown in table

Table 3.3. Characterization of the original oil and oil in each treatment on days 0 and 21, from the second experiment.

Sample/Treatment	SAT	ARO	NSO
Original Oil	81%	13%	7%
P-0	83%	11%	5%
P-21	77%	14%	9%
PB-0	78%	14%	8%
PB-21	80%	13%	7%
PD-0	81%	12%	6%
PD-21	82%	11%	7%
PBN-0	80%	12%	8%
PBN-21	80%	14%	6%
PDN-0	81%	12%	7%
PDN-21	82%	12%	6%

In the first campaign (pilot) the results of gas chromatography may have been masked by the high volatility of saturated hydrocarbons (figure 1), which may have been lost during the performance liquid chromatography. Therefore we can not say if the result is consistent with the execution of the experiment or analysis. For this reason, in the second campaign samples were injected into the chromatograph of the total oil (whole oil) in order to obtain more accurate results.

The results obtained by gas chromatography of the oil in each treatment generated the chromatograms of figure 3.4 and showed the greatest degradation in PBN treatment, characterized by a greater percentage reduction of the reasons $n\text{-C}_{17}/\text{Pr}$, $n\text{-C}_{18}/\text{Ph}$ and $\Sigma n\text{-alkanes}/(\text{Pr}+\text{Ph})$, as shown in tables 3.4a and 3.4b.

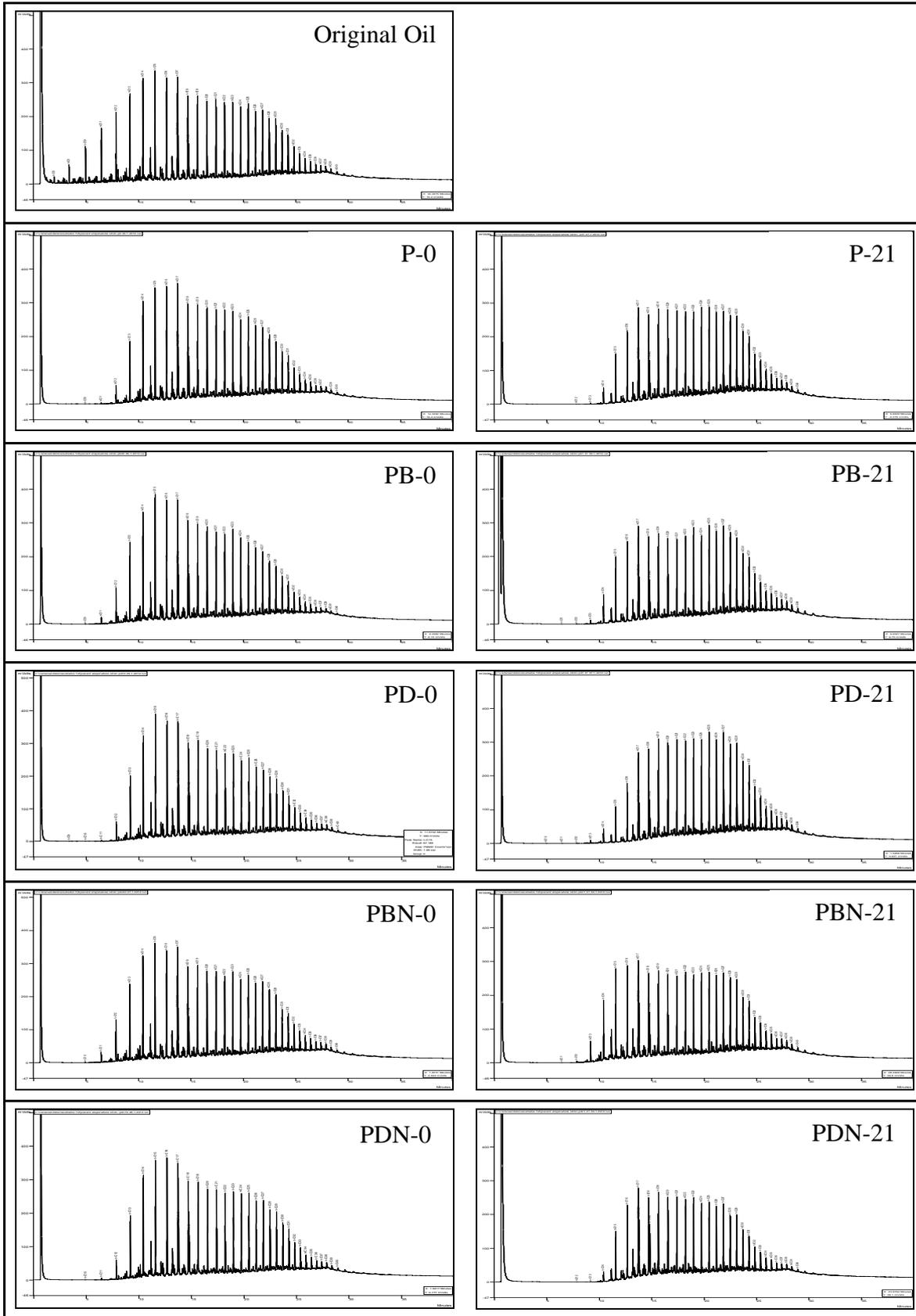


Figure 3.4: Profile whole oil for original oil and oil in the treatments P, PB, PD, PBN and PDN on days 0 and 21, in the second campaign.

Table 3.4a: Relationship between n-alkanes, pristane and phytane the end of 21 days of the second experiment.

Sample/Treatment	n-C ₁₇ /Pr	n-C ₁₈ /Ph	\sum n-alkanes/(Pr+Ph)
Original Oil	3,1048	2,7412	35,18
P-0	3,1026	2,7068	30,89
P-21	2,8922	2,4987	35,29
PD-0	3,1117	2,7278	31,37
PD-21	2,8861	2,4765	32,76
PB-0	3,1142	2,7256	29,17
PB-21	2,7639	2,3527	31,89
PDN-0	3,1236	2,7338	32,28
PDN-21	1,9752	1,7352	23,74
PBN-0	3,1190	2,7504	31,06
PBN-21	1,8476	1,6663	21,49

Table 3.4b: Percentage reduction of the values of the ratios between n-alkanes, pristane and phytane comparing the 0 and 21 days of each treatment, from the second experiment.

Sample/Treatment	n-C ₁₇ /Pr	n-C ₁₈ /Ph	\sum n-alkanes/(Pr+Ph)
P	6,8%	7,7%	-14,3%
PD	7,3%	9,2%	-4,4%
PB	11,2%	13,7%	-9,3%
PDN	36,8%	36,5%	26,5%
PBN	40,8%	39,4%	30,8%

This second campaign has undergone some experimental modifications, such as water exchanged of the simulation units in periodic times; the use of two pumps of aeration; increasing the concentration of biosurfactant; and addition of 4,5g of NPK. Still, the treatments using biosurfactant (PB and PBN) showed the best results from degradation.

In addition to proving the efficiency of bioremediation technique by reducing the concentration of contaminants in the simulation units, it is necessary to demonstrate that the bioremediation does not produce toxic metabolites to the organisms. For that, toxicological and microbiological analyzes were performed only in samples from the treatments using biosurfactant (PB and PBN), to measure the efficiency of different products tested as accelerators of the process of biodegradation of petroleum components.

The toxicological tests, without relativizing the samples with the control sample, showed a significant sub-lethal effect in the treatment PB and PBN, but not lethal effect, only on day 0 (Figure 3.5). Over time this sub-lethal effect disappears. This sub-lethal effect was very intense and shows that for toxicological experiment of the first and second campaign were very different.

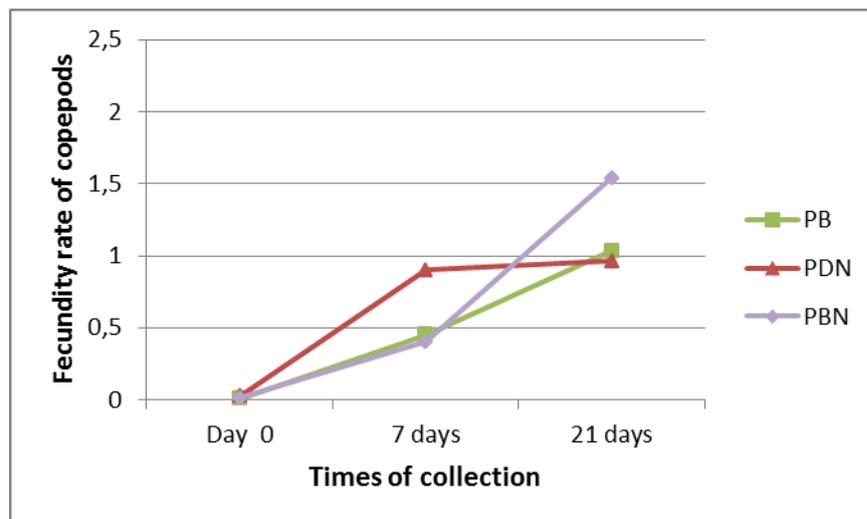


Figure 3.5: Average fecundity of copepods in the second campaign in each treatment over the 21 days, with the relativized data. PB = oil with biosurfactant; PDN = oil with chemical dispersant and NPK; PBN = oil with biosurfactant and NPK.

When the samples were relativized with the control, was applied to a bi-factorial ANOVA, where only time affect the survival and fecundity, but no treatment. The fecundity was rising throughout the time, but no significant difference between treatments, suggesting that over time the effect of sub-lethal initially observed was reduced regardless of treatment used (Figure 3.6).

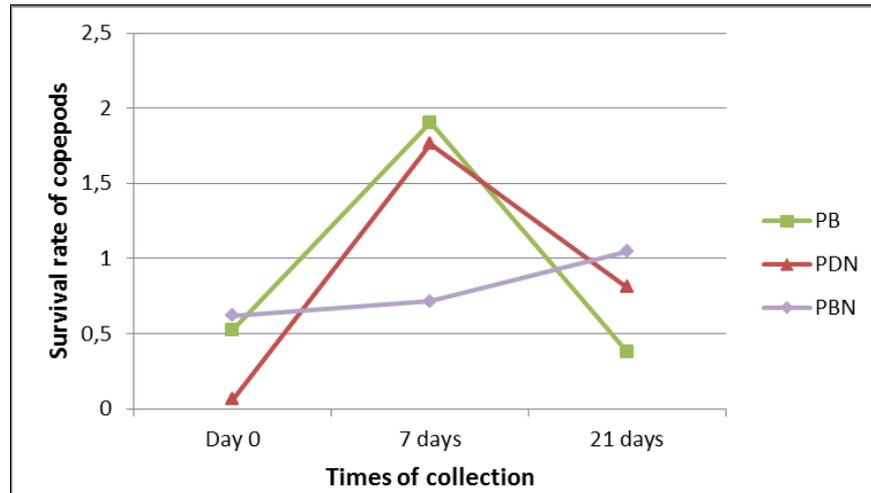


Figure 3.6: Average survival of copepods in the second campaign in each treatment over the 21 days, with the relativized data. PB = oil with biosurfactant; PDN = oil with chemical dispersant and NPK; PBN = oil with biosurfactant and NPK.

Through the microbiological testing, the results showed that at the end of the simulation, the number of bacteria and fungi isolated in samples of all treatments (P, PB, PBN, PD and PDN) ranged between $0,35 \times 10^2$ and $1,15 \times 10^4$ (figure 3.7) and are values lower than those reported by Sutiknowati (2007), who found $4,0 \times 10^4$ and $7,1 \times 10^7$ for hydrocarbons anthracene, phenanthrene, and benzopyrene.

The control of seawater (C) has a higher number of bacteria than fungi and that these values are corroborated by the results Harwati et al. (2007). Regarding the control of seawater with added oil (P) there was a decrease in the number of fungi in relation to the bacteria.

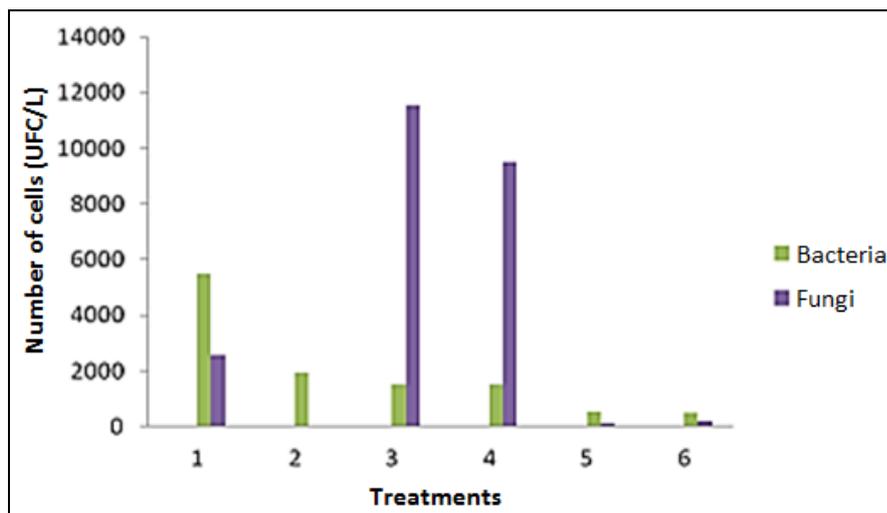


Figure 3.7: Number of colony forming units of bacteria and fungi per liter in each treatment, the last day of the experiment. Legend: 1 = seawater; 2 = seawater + oil; 3 = seawater + oil + biosurfactant; 4 = seawater + oil + biosurfactant + NPK; 5 = seawater + oil + dispersant + NPK; 6 = seawater + oil + dispersant.

3.4. Conclusion

The toxicological and microbiological effects on the efficiency of surfactants in the degradation of a crude, in treatments with and without NPK fertilizer, were qualitatively and quantitatively evaluated under laboratory conditions in simulated spill at sea. The geochemical results for treatments with biosurfactant had the highest percentage of degradation at the end of the experiment.

Toxicological findings showed that overall there was no significant difference between treatments with respect to fecundity and survival of the copepods. In the first campaign treatment was not toxic, however in the second campaign was a large lethal effect on initial time. Through the observed variables, it is suggested that this response occurred due to the high concentration of biosurfactant.

Microbiological analyzes indicated that there was an increase in the number of fungi in relation to the bacteria in the treatments containing biosurfactant alone and in conjunction with NPK, suggesting that most of the oil degradation in these treatments is the action of fungi. Therefore, under the experimental conditions established in these tests for the degradation of crude oil, is more suitable treatment using biosurfactant with NPK.

Interestingly, the results of tests are based on a specific type of oil which was selected as a model. These data should not be generalized to all types of light oils, some of which may be more or less effective under the same test conditions, due to the effects of different properties for each oil (Canevari et al., 2001 cited in Li et al., 2010).

3.5. Acknowledgments

This study was conducted with financial support from CAPES and FINEP-Petrobras, through RECUPETRO – Rede Cooperativa em Recuperação de Áreas Contaminadas por Atividades Petrolíferas.

References

Araújo-Castro, C.M.V., Souza-Santos, L.P., Torreiro, A.G.A.G., Garcia, K.S. 2009. Sensitivity of the marine benthic copepod *tisbe biminiensis* (copepoda, harpacticoida) to potassium dichromate and sediment particle size. *Brazilian Journal of Oceanography* 57 (1), 33-41.

Banat, I.M. 1995. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. *Bioresource Technology* 51, 1-12.

Bragg, J.R. 1992. Bioremediation for shoreline cleanup following the 1989 Alaskan Oil Spill. Exxon Research & Engineering Co., 1-94.

BROWN, L.R. 1987. Oil-degrading microorganisms. *Chemical Engineering Progress* 1 (1), 35-40.

Canevari, G.P., Calcavecchio, P., Becker, K.W., Lessard, R.R., Fiocco, R.J. 2001. Key parameters affecting the dispersion of viscous oil. In: 2001 International Oil Spill Conference. Washington, DC: American Petroleum Institute, p. 4217–4221.

Del'arco, J.P. 1999. Degradação de hidrocarbonetos por bactérias e fungos em sedimento arenoso. Thesis (Doctorate in Tecnologia dos Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ, Rio de Janeiro, 169 pp.

Garcia, K.S. 2009. Biodisponibilidade e toxicidade de contaminantes em sedimentos na porção nordeste da Baía de Todos os Santos. Thesis (Doctorate in Geociências), Universidade Federal Fluminense, 120pp.

Harwati, T.U.; Kasai, Y.; Kodama, Y.; Susilaningsih, D.; Watanabe, K. 2007. Characterization of diverse hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Indonesian seawater. *Microbes Environ* 22, 412–415.

Kingsley, U.; Pekdemir, T.; Mehmet, Ç. 2004. Surfactant treatment of crude oil contaminated soil. *Journal of Colloid and Interface Science* 276, 456–464.

Lana, P.C.; Camargo, M.G.; Brongim, R.A.; Isaac, V.J. 1996. O bento da costa brasileira: Avaliação crítica e levantamento bibliográfico (1856-1996). Rio de Janeiro: Fundação de Estudos do Mar (FEMAR), 432pp.

Levin, M.A.; Fischer, J.R.; Cabelli, V.J. 1975. Membrane filter technique for enumeration of enterococci in marine waters. *Appl. Microbiol* 30, 66–71.

Li, M.; Garrett, C. 1998. The relationship between oil droplet size and upper ocean turbulence. *Marine Pollution Bulletin* 36 (12), 961-970.

Li, Z.; Lee, K.; King, T.; Boufadel, M.C.; Venosa, A. D. 2010. Effects of temperature and wave conditions on chemical dispersion efficacy of heavy fuel oil in an experimental flow-through wave tank. *Marine Pollution Bulletin* 60, 1550–1559.

Lima, D.F. 2010. Biorremediação em sedimentos impactados por petróleo na Baía de Todos os Santos, Bahia: Avaliação da degradação de hidrocarbonetos saturados. Dissertation (Master in Geologia), Universidade Federal da Bahia, Brazil.

Lotufo, G.R.; Abessa, D.M.S. 2002. Testes de toxicidade com sedimento total e água intersticial estuarinos utilizando copépodos bentônicos. In: Nascimento, I.A.; Sousa, E.C.P.M.; Nipper, M. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações para o Brasil. São Paulo: Artes Gráficas e Industriais, 151-162.

Mcmillen, S.J.; Kerr, J.M.; Gray, N.R. 1993. Microcosm studies of factors that influence bioremediation of crude oils in soil. *Exploration & Production Environments Conference*, Texas - USA, SPE 25981, 389-400.

Melo, E.G.V. 2011. Avaliação da glicerina bruta na estimulação de bactérias hidrocarbonoclásticas para remediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos. Dissertation (Master in Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente), Universidade Federal da Bahia, Brazil.

Mesquita, A.C. 2004. Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes. Thesis (Doctorate in Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Millioli, V.S. 2009. Avaliação da potencialidade da utilização de surfactantes na biorremediação de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo. Thesis (Doctorate in Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Mulligan, C.N.; Yong, N.R.; Gibbs, F.B. 2001. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology* 60, 271-380.

Neves, E.; Forgiarini, E.; Schoenhals, M.; Campregher, N.; Guzzi, R. Biosurfactantes. 2004. Available in <http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_grad2004/biosurfactantes/BIOSURFACTANTES.htm> Access in 08 dec. 2011.

Nybakken, J.W. 2001. Marine Biology: An ecological approach. Harper Collins College Publishers, (5) 462 pp.

OTA – Office of Technology Assessment. 1991. Biorremediation for marine oil spills – Background paper. Washington, DC: U.S. Government Printing Office.

Pirôllo, M.P.S. 2006. Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos. Dissertation (Master in Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, Brazil.

Rodrigues, D.F. 2002. Caracterização polifásica da biodiversidade de isolados degradadores de poluentes xenobióticos na Baixada Santista. Dissertation (Master in Microbiology), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brazil.

Rosa, A.P. 2001. Processos de biorremediação na mitigação do impacto ambiental, devido a eventuais derrames de óleo na bacia de campos - experimentos laboratoriais. Dissertation (Master in Engenharia de Reservatório e Exploração de Petróleo), Universidade Estadual do Norte Fluminense, Macaé – RJ, Brazil, 145pp.

Sutiknowati, L.I. 2007. Hydrocarbon degrading bacteria: isolation and identification. Makara Seri Sains 11 (2), 98-103.

Wolfe, M.F.; Schwartz, G.J.B.; Singaram, S.; Mielbrecht, E.E.; Tjeerdema, R.S.; Sowby, M.L. 2001. Influence of dispersants on the bioavailability and trophic transfer of petroleum hydrocarbons to larval topsmelt (*Atherinops affinis*). Aquatic Toxicology 52, 49–60.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Na primeira campanha, as análises geoquímicas mostraram que o tratamento de petróleo em conjunto com biossurfactante (PB) apontou maior degradação, indicado pela maior redução percentual (19%) do valor da razão $\sum n\text{-alcanos}/(\text{Pr}+\text{Ph})$. Entretanto, os resultados da cromatografia gasosa podem ter sido mascarados pela alta volatilidade dos hidrocarbonetos saturados, que podem ter sido perdidos durante a cromatografia líquida.

Na segunda campanha foram injetados no cromatógrafo amostras do óleo total (*whole oil*), a fim de se obter resultados mais precisos. Os resultados reafirmaram o potencial do tratamento utilizando biossurfactante, mas neste caso o resultado pode ter sido influenciado pelo bioestímulo, devido à adição de NPK em alguns tratamentos contendo os surfactantes, já que o tratamento contendo surfactante químico e NPK também foi satisfatório. O tratamento contendo biossurfactante e NPK (PBN) revelou uma diminuição de 30,8% da razão $\sum n\text{-alcanos}/(\text{Pr}+\text{Ph})$, enquanto o tratamento contendo surfactante químico e NPK (PDN) revelou uma diminuição de 26,5% da razão $\sum n\text{-alcanos}/(\text{Pr}+\text{Ph})$. Ainda assim, os resultados geoquímicos para tratamentos com biossurfactante apontaram maior biodegradação no final dos experimentos.

Os resultados toxicológicos apontaram que no geral não houve diferença significativa entre os tratamentos com relação à fecundidade e sobrevivência dos copépodos. Na primeira campanha os tratamentos não foram tóxicos, entretanto na segunda campanha houve um grande efeito letal no tempo inicial. Diante das variáveis observadas, sugere-se que esta resposta tenha ocorrido em função da alta concentração de biossurfactante.

As análises microbiológicas indicaram que ocorreu aumento do número de fungos em relação às bactérias nos tratamentos contendo apenas biossurfactante (PB) e biossurfactante em conjunto com NPK (PBN), sugerindo que a maior degradação do óleo nestes tratamentos seja pela ação de fungos já que eles sobrevivem e crescem em meios com concentração elevada de compostos recalcitrantes e são capazes de utilizá-los como fonte de energia (SANTAELLA et al., 2009).

As análises de nitrogênio total na água no último dia da segunda campanha em todos os tratamentos (apêndice 11) apresentou a maior parte dos resultados abaixo do limite de detecção (<1,6 mg/L), porém revelaram que os tratamentos contendo surfactante químico e NPK (PDN) e biossurfactante com NPK (PBN) apresentaram o mesmo valor (2,7 mg/L), o que permite sugerir um indício de bioestímulo.

As análises de componentes principais (PCA) dos parâmetros físico-químicos na água das unidades de simulação, da segunda campanha, evidenciaram que no início do experimento os parâmetros que mais influenciaram nos tratamentos PB e PBN foram temperatura e E_h , enquanto no último dia estes parâmetros praticamente não influenciaram, mas sim a salinidade, o oxigênio dissolvido e o pH (apêndices 5 e 6, respectivamente). No tratamento PDN, o resultado no tempo inicial foi influenciado pelo E_h e salinidade, enquanto no tempo final houve maior influência do pH, oxigênio dissolvido e temperatura (apêndice 7). Estas variações podem ter sido vantajosas para o maior desenvolvimento dos fungos, já que podem adaptar-se às mais variadas concentrações de oxigênio, podendo utilizar tanto o oxigênio livre como o oxigênio combinado, e dependendo da concentração deste elemento no meio em que se encontram, utilizam-se de rotas metabólicas alternativas (desnitrificação e amonificação), além da respiração aeróbica convencional (TAKAYA, 2002).

Portanto, os resultados deste estudo em escala piloto e nas condições experimentais estabelecidas revelaram que é mais indicado o tratamento utilizando biossurfactante conjuntamente com NPK.

É interessante notar que os resultados dos testes são baseados em um tipo específico de petróleo que foi selecionado como modelo. Estes dados não devem ser generalizados a todos os tipos de óleos leves, alguns dos quais podem ser mais ou menos eficazes sob as mesmas condições de ensaio, devido aos efeitos de diferentes propriedades de cada óleo (CANEVARI et al., 2001 apud LI et al., 2010).

Mais pesquisas sobre o uso de surfactantes químicos e biológicos no Brasil são necessárias para elucidar algumas questões relacionadas com a aceleração da biodegradação pela influência desses produtos.

Sugestões para trabalhos futuros:

- Realizar simulações com diferentes tipos de óleo;
- Proceder estudos detalhados em local com circulação de correntes de ar, comparando os resultados dos tratamentos com relação à velocidade da degradação;
- Testar gradativamente a quantidade dos surfactantes a ser aplicada, realizando periodicamente análises toxicológicas e microbiológicas até atingir uma proporção ideal para auxílio na biodegradação de óleos com características similares e/ou diferentes ao utilizado neste estudo;

- Realizar diariamente análise de nitrogênio total em água nas simulações com NPK para que se possa avaliar a eficácia do bioestímulo, além de quantificar o residual deste produto (se houver) e inferir se pode impactar ainda mais o meio (eutrofização).
- Proceder análises da fração de óleo solúvel em água para investigar a concentração ao longo do tempo e correlacionar com a toxicidade.
- Identificar as espécies de fungos e bactérias isoladas nos meios de cultura a fim de se trabalhar com o bioaumento das espécies com maior potencial biodegradador de hidrocarbonetos.
- Avaliar se há influência positiva ou negativa dos surfactantes na formação dos Agregados óleo-mineral (OMA), que são entidades microscópicas compostas de óleo e minerais aglutinados que são estáveis durante períodos de semanas em água salgada (LE FLOCH et al., 2002). A formação de OMA aumenta a dispersão do óleo encalhado nos sedimentos costeiros, uma vez que reduz eficazmente as propriedades adesivas do óleo residual (OWENS, 1999 apud SANTOS, 2010), promovendo assim a dispersão do petróleo derramado, sendo importante processo para a regeneração natural de regiões litorâneas impactadas por derrames de óleo.

5. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, F.C. **Caracterização geoquímica de óleos das Bacias Camamu-Almada e Jequitinhonha, Bahia**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

ARAÚJO-CASTRO, C.M.V.; SOUZA-SANTOS, L.P.; TORREIRO, A.G.A.G.; GARCIA, K.S. Sensitivity of the marine benthic copepod *Tisbe biminiensis* (copepoda, harpacticoida) to potassium dichromate and sediment particle size. **Brazilian Journal of Oceanography**, v.57, n. 1, p.33-41, 2009.

BANAT, I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 1-12, 1995.

BRAGA, B.; HESPANHOL, I; CONEJO, J.G.L.; MIERZWA, J.C.; BARROS, M.T.L.; SPENCER, M.; PORTO, M.; NUCCI, N.; JULIANO, N.; EIGER, S. **Introdução à engenharia ambiental**. São Paulo: Pearson Pratices Hall, 2005. 318p.

BRAGG, J.R. **Bioremediation for shoreline cleanup following the 1989 Alaskan Oil Spill**. Houston: Exxon Co., 1992. 94p.

BROWN, L.R. Oil-degrading microorganisms. **Chemical Engineering Progress**, v. 1, n. 1, p. 35-40, 1987.

CANEVARI, G.P., CALCAVECCHIO, P., BECKER, K.W., LESSARD, R.R., FIOCCO, R.J. Key parameters affecting the dispersion of viscous oil. In: 2001 INTERNATIONAL OIL SPILL CONFERENCE, 2001, Florida. **Proceedings of the 2001 International Oil Spill Conference**. Washington, DC: American Petroleum Institute, 2001, p. 4217-4221.

DEL'ARCO, J. P. **Degradação de hidrocarbonetos por bactérias e fungos em sedimento arenoso**. Tese (Doutorado em Tecnologia dos Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ, Rio de Janeiro, 169p., 1999.

DYE, C.W.; FRYDENBORG, R.B. Oil dispersants and the environmental consequences of their usages: A literature review. **Florida Department of Environmental Regulation – Technical Series**, v. 5, n. 1, 1980.

FERRÃO, C.M. **Derramamentos de óleo no mar por navios petroleiros**. Monografia (Especialização Executiva em Meio Ambiente) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends in Biotechnology**, v. 10, p. 208-217, 1992.

FINGAS, M.F. The chemistry and physics of oil behaviour at sea: weathering and incorporation into spill models. In: MARPOLSER 98: MARINE METEOROLOGY AND RELATED OCEANOGRAPHIC ACTIVITIES, 44, 1998, Australia. **MARPOLSER 98 - Metocean Services for Marine Pollution Emergency Response Operations**. Australia: WMO/TD, 1998. p. 91-112.

FLOODGATE, G. **The fate of petroleum in marine ecosystems**. In: Petroleum Microbiology, R. M. Atlas. New York: Macmillan Publishing Co., 1984. p. 355-398.

GARCIA, K.S. **Biodisponibilidade e toxicidade de contaminantes em sedimentos na porção nordeste da Baía de Todos os Santos**. Tese (Doutorado em Geociências), Universidade Federal Fluminense, 120p., 2009.

HARWATI, T.U.; KASAI, Y.; KODAMA, Y.; SUSILANINGSIH, D.; WATANABE, K. Characterization of diverse hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Indonesian seawater. **Microbes Environ**, v. 22, p. 412–415, 2007.

ITOPF – The International Tanker Owners Pollution Federation Limited. Major Oil Spills. Statistics. Disponível em: <<http://www.itopf.com/information-services/data-andstatistics/statistics/#major>>, Acesso em: 20 fev. 2011.

KINGSLEY, U.; PEKDEMIR, T.; MEHMET, Ç. Surfactant treatment of crude oil contaminated soil. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 276, p. 456–464, 2004.

KRONEMBERGER, F.A. **Produção de rhamnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em biorreator com oxigenação por contactor de membranas**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 160 p., 2007.

LANA, P.C.; CAMARGO, M.G.; BRONGIM, R.A.; ISAAC, V.J. **O bento da costa brasileira: Avaliação crítica e levantamento bibliográfico (1856-1996)**. Rio de Janeiro: Fundação de Estudos do Mar (FEMAR), 1996. 432p.

LE FLOCH, S.; GUYOMARCH, J.; MERLIN, F.X.; STOFFYN-EGLI, P.; DIXON, J.; LEE, K. The influence of salinity on oil–mineral aggregate formation. **Spill Science and Technology Bulletin**, v. 8, n. 1, p. 65–71, 2002.

LEVIN, M.A.; FISCHER, J.R.; CABELLI, V.J. Membrane filter technique for enumeration of enterococci in marine waters. **Appl. Microbiol**, v. 30, p. 66 – 71, 1975.

LI, M.; GARRETT, C. The relationship between oil droplet size and upper ocean turbulence. **Marine Pollution Bulletin**, v. 36, n. 12, p. 961-970, 1998.

LI, Z.; LEE, K.; KING, T.; BOUFADEL, M. C.; VENOSA, A.D. Effects of temperature and wave conditions on chemical dispersion efficacy of heavy fuel oil in an experimental flow-through wave tank. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, p. 1550–1559, 2010.

LI, Z.; LEE, K.; KING, T.; BOUFADEL, M.C.; VENOSA, A.D. Evaluating chemical dispersant efficacy in an experimental wave tank: 2 - Significant factors determining in situ oil droplet size distribution. **Environmental Engineering Science**, v. 26, n. 9, 2009.

LIMA, D.F. **Biorremediação em sedimentos impactados por petróleo na Baía de Todos os Santos, Bahia**: Avaliação da degradação de hidrocarbonetos saturados. Dissertação (Mestrado em Geologia), Universidade Federal da Bahia, 2010.

LOTUFO, G.R.; ABESSA, D.M.S. Testes de toxicidade com sedimento total e água intersticial estuarinos utilizando copépodos bentônicos. In: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. **Métodos em ecotoxicologia marinha**: aplicações para o Brasil. São Paulo: Artes Gráficas e Industriais, 2002. p. 151-162.

LUNEL, T.; BALDWIN, G.; MERLIN F. Comparison of meso-scale and laboratory dispersant tests with dispersant effectiveness measured at sea. In: 18TH ARCTIC AND MARINE OIL SPILL PROGRAM TECHNICAL SEMINAR, 18, 1995, Canada. **Proceedings of 18th Arctic and Marine Oil Spill Program Technical Seminar**. Ottawa, Ont.: Environment Canada, 1995. p. 629-651.

MCMILLEN, S.J.; KERR, J.M.; GRAY, N.R. Microcosm studies of factors that influence bioremediation of crude oils in soil. In: EXPLORATION & PRODUCTION ENVIRONMENTAL CONFERENCE, 1993, Texas – USA. **Papers of the Exploration & Production Environmental Conference**. Texas: Society of Petroleum Engineers, 1993. p. 389-400.

MELO, E.G.V. **Avaliação da glicerina bruta na estimulação de bactérias hidrocarbonoclasticas para remediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos**. Dissertação (Mestrado em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente), Universidade Federal da Bahia, 2011.

MESQUITA, A.C. **Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes**. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

MILLIOLI, V.S. **Avaliação da potencialidade da utilização de surfactantes na biorremediação de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

MUKHERJEE, B.; WRENN, B.A. Influence of dynamic mixing energy on dispersant performance: Role of mixing systems. **Environmental Engineering Science**, v. 26, n. 12, 2009.

MULLIGAN, C.N.; YONG, N.R.; GIBBS, F.B. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, v. 60, p. 271-380, 2001.

NEVES, E.; FORGIARINI, E.; SCHOENHALS, M.; CAMPREGHER, N.; GUZZI, R. **Biosurfactantes**. 2004. Disponível em < http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_grad2004/biosurfactantes/BIOSURFACTANTES.htm > Acesso em: 08 dez. 2011.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

NOGUEIRA, D. País não está preparado para acidentes ambientais. O Globo – Economia. 2011. Disponível em: <http://oglobo.globo.com/economia/pais-nao-esta-preparado-para-acidentes-ambientais-3278440_>>. Acesso em: 26 jan. 2012.

NYBAKKEN, J.W. **Marine Biology**: An ecological approach.. 5. ed. San Francisco: Harper Collins College Publishers, 2001. 462 p.

O ESTADO DE SÃO PAULO. Sombras sobre a camada do pré-sal. Disponível em: <[http://www.tnpetroleo.com.br/clipping/5662/sombras-sobre-a-camada-do-pre-sal----](http://www.tnpetroleo.com.br/clipping/5662/sombras-sobre-a-camada-do-pre-sal---->)>, Acesso em: 29 jun. 2010.

OTA – Office of Technology Assessment. **Biorremediation for marine oil spills – Background paper**. Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 1991. 36p.

OWENS, E.H. The interaction of fine particles with stranded oil. **Pure and Applied Chemistry**, v.71, p. 83–93, 1999.

PEREIRA, A.S.; AQUINO-NETO, F.R. Estado da arte da cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura. **Química Nova**, v.23, n.3, 2000.

PIRÔLLO, M.P.S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2006.

RODRIGUES, D.F. **Caracterização polifásica da biodiversidade de isolados degradadores de poluentes xenobióticos na Baixada Santista**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

ROSA, A.P. **Processos de biorremediação na mitigação do impacto ambiental, devido a eventuais derrames de óleo na bacia de campos - experimentos laboratoriais**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Reservatório e Exploração de Petróleo), Universidade Estadual do Norte Fluminense, Macaé – RJ, 145 p., 2001.

SANTAELLA, S.T.; SILVA JÚNIOR, F.C.G.; GADELHA, D.A.C.; COSTA, K.O.; AGUIAR, R.; ARTHAUD, I.D.B.; LEITÃO, R.C. Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus niger*. **Eng Sanit Ambient**, v. 14, n. 1, p. 139-148, 2009.

SANTOS, A.S. **Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa***. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003.

SANTOS, D.R. **Investigação da interação óleo-mineral agregados (OMA) em ambientes costeiros sob influência de diferentes salinidades: subsídio a procedimentos de remediação de derrames de petróleo**. Monografia (Graduação em Geologia), Universidade Federal da Bahia, 54 p., 2010.

SOUZA, E.S. **Desenvolvimento de métodos de biorremediação aplicados a derrames de petróleo em água do mar - testes laboratoriais**. Tese (Doutorado em Engenharia de Reservatório e de Exploração de Petróleo), Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2003.

SUTIKNOWATI, L.I. Hydrocarbon degrading bacteria: isolation and identification. **Makara Seri Sains**, v. 11, ed. 2, p. 98-103, 2007.

TAKAYA, N. Dissimilatory nitrate reduction metabolisms and their control in fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 6, p. 506-510, 2002.

URUM, K.; PEKDEMIR, T.; ÇOPUR, M. Surfactants treatment of crude oil contaminated soils. **Journal of Colloid and Interface Science**, n. 276, p. 456–464, 2004.

VIEIRA, M. A lição da baía de todos os males. **Revista Época**, Rio de Janeiro, v. 31, p. 36, 2000.

WOLFE, M.F.; SCHWARTZ, G.J.B.; SINGARAM, S.; MIELBRECHT, E.E.; TJEERDEMA, R.S.; SOWBY, M.L. Influence of dispersants on the bioavailability and trophic transfer of petroleum hydrocarbons to larval topsmelt (*Atherinops affinis*). **Aquatic Toxicology**, v. 52, p. 49–60, 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE 1: Principais acidentes de derrame de petróleo no mar entre 2010 e 2012.

DATA	LOCAL	CAUSA	QUANTIDADE ESTIMADA
23 de janeiro de 2010	Port Arthur, a 150 km de Houston	Colisão entre duas embarcações, um navio-tanque de 182 metros de comprimento que transportava petróleo e um navio-guindaste que rebocava uma barcaça.	1.700 ton (aproximadamente 1.921.000L)
20 de abril de 2010	Golfo do México	O vazamento que durou 106 dias começou na sequência de uma explosão e de um incêndio na plataforma Deepwater Horizon, da BP, que extraía mais de um milhão de litros de petróleo por dia. Cerca de 800.000 litros de petróleo por dia vazaram sem parar do poço. Este foi considerado o pior vazamento de petróleo da história dos Estados Unidos.	5 milhões de barris (aproximadamente 795.000.000L)
16 de julho de 2010	Mar Amarelo na China	Explosão de um oleoduto submarino.	1,5 mil ton (aproximadamente 1.695.000L)
16 de março de 2011	Arquipélago de Tristão da Cunha, no Atlântico Sul	Vazamento de um navio cargueiro naufragado, que encalhou na ilha, atingindo pelo menos 20 mil pinguins de espécie em extinção.	Mais de 800 ton (aproximadamente 904.000L)
17 de agosto de 2011	Mar do Norte	Derrame de petróleo numa plataforma do Mar do Norte, a 180 km de Aberdeen (Escócia).	218 ton (aproximadamente 246.340L)
05 de outubro de 2011	Costa Neo-Zelandesa	Vazamento devido ao encalhe de um navio liberiano carregado de contêineres após colisão com uma barreira de corais na baía da Nova Zelândia.	350 ton (aproximadamente 395.500L)
08 de novembro de 2011	Bacia de Campos, RJ	A Chevron Brasil, através de dados fornecidos por um veículo submarino operado à distância, informou que a fonte da mancha foi o óleo proveniente de uma falha na superfície do fundo do mar, localizada próxima ao Campo Frade.	Segundo a Chevron Brasil, cerca de 2,4 mil barris (aproximadamente 381.600L) . Segundo a ANP, 3 mil barris (aproximadamente 477.000L)

20 de dezembro de 2011	Nigéria	O vazamento ocorreu quando um navio da Shell estava sendo carregado com óleo. O chefe da Agência Nacional de Detecção e Resposta Vazamentos de Óleo nigeriana afirmou que o país dispunha de 210 toneladas de dispersante prontas para diluir o petróleo.	A Shell afirma que vazaram “menos de 40 mil barris” (aproximadamente 6.360.000L)
31 de janeiro de 2012	Bacia de Santos, SP	Rompimento na coluna de produção do FPSO Dynamic Producer, da Petroserv / Ventura	160 barris (aproximadamente 25.440L)
26 de janeiro de 2012	Tramandaí, RS	Vazamento de petróleo em uma monobóia da Transpetro, Petrobras. O acidente ambiental aconteceu quando o navio grego Elka Aristotle acoplou na monoboia 602 da Transpetro, a 6 km da costa, e, no momento de transferir o óleo para o duto, houve o derramamento no mar.	Não divulgado
13 de fevereiro de 2012	Bacia de Campos, RJ	Vazamento de óleo em uma tubulação de um equipamento em cima da plataforma P-53, situada a cerca de 95 quilômetros da costa fluminense. A produção do poço onde ocorreu o problema foi interrompida, e o vazamento contido. A Petrobras informou que parte do óleo foi recolhido. Por ter vazado um volume pequeno e por ser uma camada muito fina do óleo não foi possível fazer o recolhimento. Por causa disso, foi decidido o uso de dispersantes mecânicos pelos barcos de apoio.	30 barris (aproximadamente 4.770L)

APÊNDICE 2: Parâmetros não conservativos mensurados no tratamento PB durante o segundo experimento.

Dia do monitoramento	pH	Eh	Temperatura	Salinidade	OD	Condutividade
1°	7,66	-46	27,9	39,5	5,3	45,6
4°	7,60	-44	27,4	40,0	5,9	46,4
5°	7,67	-51	27,5	41,0	6,6	46,4
6°	7,66	-48	27,9	38,5	6,1	44,3
7°	7,64	-47	26,7	39,5	6,5	36,8
8°	7,63	-46	28,3	39,5	5,3	46,2
11°	7,73	-52	27,4	39,0	5,5	45,6
18°	7,82	-58	28,7	39,0	6,3	45,3
19°	7,82	-57	28,0	40,0	6,4	45,3
20°	7,81	-56	27,3	40,5	6,7	45,0
21°	7,86	-60	26,3	41,0	7,1	45,9

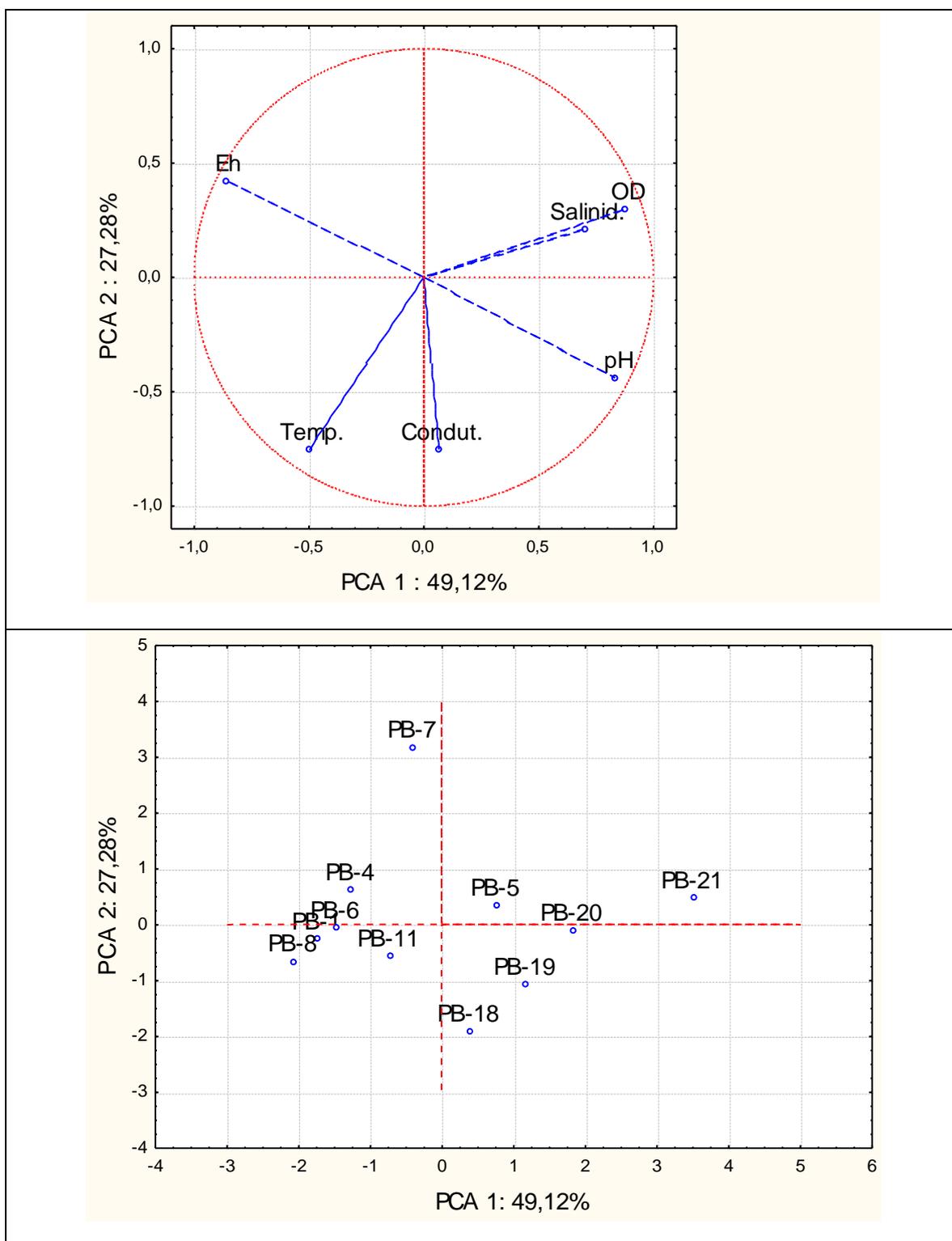
APÊNDICE 3: Parâmetros não conservativos mensurados no tratamento PBN durante o segundo experimento.

Dia do monitoramento	pH	Eh	Temperatura	Salinidade	OD	Condutividade
1°	7,53	-38	28,1	39,5	5,2	45,7
4°	7,42	-32	27,6	40,0	5,6	46,6
5°	7,40	-31	28,0	40,8	5,6	46,6
6°	7,51	-38	27,8	39,0	5,1	46,0
7°	7,54	-39	26,7	40,0	6,2	45,9
8°	7,46	-35	28,4	41,3	4,9	46,9
11°	7,67	-48	27,6	39,5	5,7	46,4
18°	7,74	-52	29,8	39,0	6,0	44,2
19°	7,74	-52	28,7	39,5	6,4	44,9
20°	7,74	-52	27,4	40,0	6,5	44,1
21°	7,81	-57	27,3	40,8	7,0	45,6

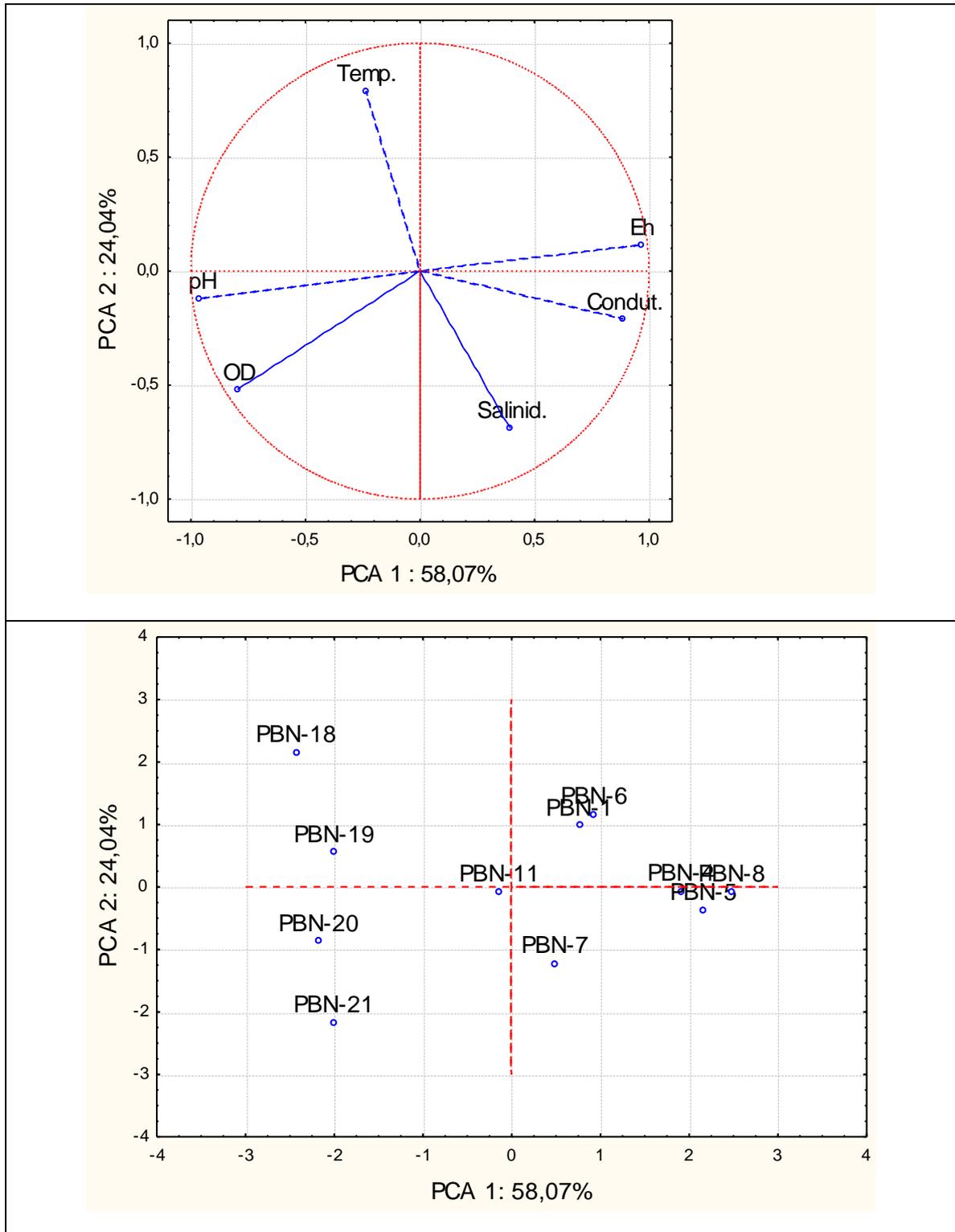
APÊNDICE 4: Parâmetros não conservativos mensurados no tratamento PDN durante o segundo experimento.

Dia do monitoramento	pH	Eh	Temperatura	Salinidade	OD	Condutividade
1°	7,44	-38	27,9	41,0	5,2	46,2
4°	7,59	-43	28,0	40,5	6,4	47,5
5°	7,60	-44	27,9	40,5	6,8	47,5
6°	7,63	-46	28,4	39,5	6,7	45,2
7°	7,53	-39	26,8	40,0	6,1	40,6
8°	7,66	-48	28,8	40,3	5,7	46,4
11°	7,70	-51	27,6	38,5	5,6	45,9
18°	7,86	-60	29,6	39,3	6,8	44,7
19°	7,95	-65	28,3	40,0	7,1	45,6
20°	7,86	-60	27,7	39,5	7,1	42,2
21°	7,90	-62	27,7	41,0	7,2	45,7

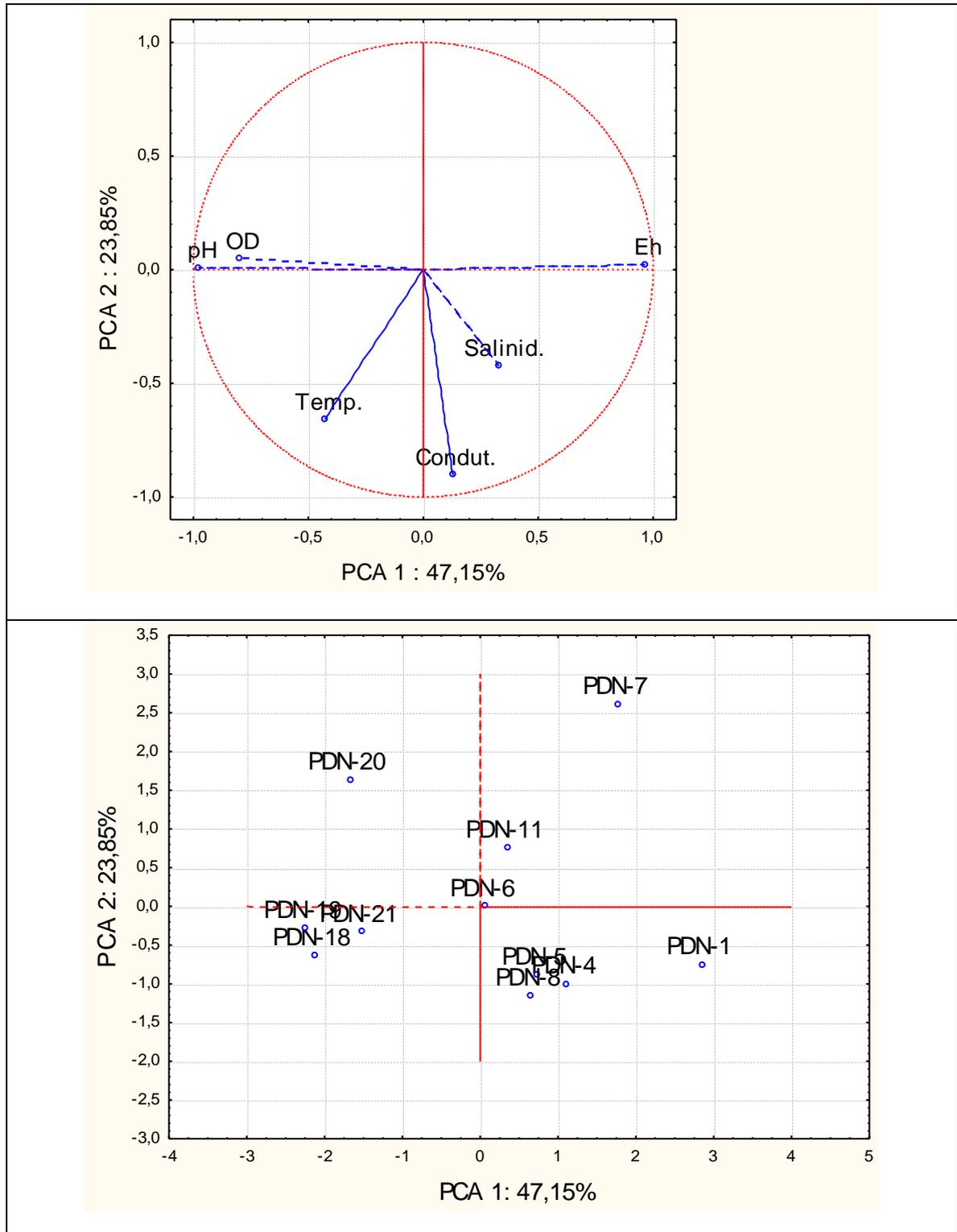
APÊNDICE 5: Análise de Componentes Principais (PCA) do tratamento PB, segundo experimento.



APÊNDICE 6: Análise de Componentes Principais (PCA) do tratamento PBN, no segundo experimento.



APÊNDICE 7: Análise de Componentes Principais (PCA) do tratamento PDN, no segundo experimento.



APÊNDICE 8: Médias, normalizadas pelo controle, da fecundidade e sobrevivência dos copépodos, em cada tratamento, ao longo dos 30 dias.

- PRIMEIRA CAMPANHA

Fecundidade Média

	Dia 0	7° dia	30° dia
P	1,0836	0,57529043	0,748436
PD	1,1428	0,95285969	0,96403
PB	0,9960	1,65437891	1,006479

Sobrevivência Média

	Dia 0	7° dia	30° dia
P	1,236559	1,85483871	1,747312
PD	1,048387	1,45161290	1,236559
PB	1,967742	1,85483871	0,887097

- SEGUNDA CAMPANHA

Fecundidade Média

	Dia 0	7° dia	21° dia
PB	0,0061	0,453252033	1,03252
PDN	0,0271	0,900406504	0,964431
PBN	0,0112	0,401422764	1,538618

Sobrevivência Média

	Dia 0	7° dia	21° dia
PB	0,523809524	1,904762	0,380952381
PDN	0,063492063	1,761905	0,80952381
PBN	0,619047619	0,714286	1,047619048

APÊNDICE 9: Análise de variância dos tratamentos e dos tempos, com relação à fecundidade e sobrevivência dos copépodos, em cada experimento.

	1ª CAMPANHA		2ª CAMPANHA	
	TRATAMENTOS	TEMPOS	TRATAMENTOS	TEMPOS
FECUNDIDADE	F = 3,3959	F = 0,2242	F = 0,2269	F = 12,6023
	p=0,10298	p=0,875104	p=0,803174	p=0,002074
SOBREVIVÊNCIA	F = 1,3569	F = 0,8992	F = 1,1865	F = 3,2253
	p=0,326883	p=0,504214	p=0,354719	p=0,074437

APÊNDICE 10: Resultado do isolamento de bactérias e fungos do segundo experimento.

TRATAMENTO	BACTÉRIAS	FUNGOS
Água do mar	$5,49 \times 10^3$	$2,56 \times 10^3$
P (água do mar + petróleo)	$1,94 \times 10^3$	$0,35 \times 10^2$
PB (água do mar + petróleo + biossurfactante)	$1,51 \times 10^3$	$1,15 \times 10^4$
PBN (água do mar + petróleo + biossurfactante + NPK)	$1,5 \times 10^3$	$9,5 \times 10^3$
PDN (água do mar + petróleo + dispersante + NPK)	$5,55 \times 10^2$	$1,05 \times 10^2$
PD (água do mar + petróleo + dispersante)	$4,85 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$

APÊNDICE 11: Relatório das análises de Nitrogênio Total realizadas no Laboratório do SENAI-CETIND - Bahia.



SENAI - Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial
CETIND - Centro de Tecnologia Industrial Pedro Ribeiro
 Av. Luiz Tarquínio Pontes, 938, Aracui, Lauro de Freitas-BA, CEP 42700-000
 www.cetind.fieb.org.br, CNPJ 03.795.071/0004-69
 Comercial: Tel. 71 3287-8265 / 8244 Fax 3287-8276 e-mail:
 laboratorio@cetind.fieb.org.br
 Outras informações: Tel. 71 3287-8280 / 8240 / 8255 / 8289 e-mail:
 admLaboratorio@cetind.fieb.org.br

Qualidade
NBR ISO/IEC 17025
ISO 9001

Relatório de Ensaios MQV N° 7585/11

Revisão 00

Empresa:	Universidade Federal da Bahia (aiandtituto de Geociências)	Fax:	
Proposta:	MQV 2149/11	CNPJ:	15.180.714/0001-04
Endereço:	Rua Barão de Jeremoabo S/N	e-mail:	joana.fcruz@hotmail.com; queiroz@ufba.br
Contato(s):	Antônio Fernando Queiroz/ Joana Cruz	Telefone:	(71) 8897-4597
Amostras:	Águas do mar - Porto da Barra / Instituto de Geociências - UFBA	Recepção:	26/12/11

		Parâmetro	Nitrogênio Total
		Unidade	mg/L
		Método	EN 050 QGI
		LQM	1,6
		Data do ensaio	29/12/11
Código da amostra	Nome da amostra	Data de coleta	Resultado
7585/11-01	Água do mar PT-01 - Amostra água do mar	26/12/11	<1,6
7585/11-02	Água do mar PT-02 - Amostra PBN1	26/12/11	2,7
7585/11-03	Água do mar PT-03 - Amostra PBN2	26/12/11	<1,6
7585/11-04	Água do mar PT-04 - Amostra PB2	26/12/11	<1,6
7585/11-05	Água do mar PT-05 - Amostra PBN1	26/12/11	2,7
7585/11-06	Água do mar PT-06 - Amostra PB1	26/12/11	<1,6
7585/11-07	Água do mar PT-07 - Amostra PDN2	26/12/11	<1,6
7585/11-08	Água do mar PT-08 - Amostra PD2	26/12/11	<1,6
7585/11-09	Água do mar PT-09 - Amostra PD1	26/12/11	<1,6
7585/11-10	Água do mar PT-10 - Amostra P	26/12/11	<1,6

Legenda

LQM: Limite de Quantificação do Método.

Informações de Coleta

Coleta efetuada pelo cliente.
 Chuvas nas últimas 24h: Não
 Condição do tempo: Bom
 Amostragem: Composta

Preservação e distribuição dos itens de ensaio (por amostra)				
Código da preservação	Código do Laboratório	Descrição resumida da preservação	Quantidade aproximada	Recipiente
SP	QGI	Acido Sulfurico (pH<2)	200mL	Plástico/Vidro

Lauro de Freitas, 30 de dezembro de 2011.

A. Ferreira
 Adriana C. Ferreira, Dra.
 Químico
 CRQ BA 07100528

Documento verificado e aprovado por meios eletrônicos

Os resultados expressos neste relatório referem-se apenas às amostras analisadas. O prazo para o armazenamento das contra-provas válidas das amostras é de 07 (sete) dias corridos após a emissão do relatório de ensaios.

Os dados analíticos serão mantidos em arquivo pelo período de 05 (cinco) anos; após este período, os mesmos serão descartados.

Este relatório só deverá ser reproduzido na sua totalidade. O CETIND se isenta de qualquer responsabilidade pela reprodução parcial do mesmo.

RF-LBW-005 rev. 00

Página: 1/1

ANEXOS

ANEXO 1: Submissão à revista Cadernos de Geociências.

[GeoCad] Agradecimento pela Submissão

Manoel Jerônimo Cruz <cadernosdegeociencias@gmail.com>

 Foram removidas as quebras de linha extras desta mensagem.

Enviada em: ter 28/02/2012 13:15

Para: Joana Ferreira da Cruz

Joana Ferreira da Cruz,

Agradecemos a submissão do seu manuscrito "APLICAÇÃO DE SURFACTANTES EM DERRAMES DE ÓLEO NO MAR: REVISÃO DA LITERATURA" para CADERNOS DE GEOCIÊNCIAS. Através da interface de administração do sistema, utilizado para a submissão, será possível acompanhar o progresso do documento dentro do processo editorial, bastando logar no sistema localizado em:

URL do Manuscrito:
<http://www.portalseer.ufba.br/index.php/cadgeoc/author/submission/5778>
Login: joanafcruz

Em caso de dúvidas, envie suas questões para este email. Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de transmitir ao público seu trabalho.

Manoel Jerônimo Cruz
CADERNOS DE GEOCIÊNCIAS

CADERNOS DE GEOCIÊNCIAS
<http://www.portalseer.ufba.br/index.php/cadgeoc>

 Mais informações sobre: Manoel Jerônimo Cruz. 

ANEXO 2: Submissão à revista Marine Pollution Bulletin.

Submission Confirmation

ees.mpb.0.1783dd.c2d083d3@eesmail.elsevier.com em nome de Marine Pollution Bulletin <mpb@elsev

 Foram removidas as quebras de linha extras desta mensagem.

Enviada em: **ter 28/02/2012 15:31**

Para: joana.fcruz@hotmail.com

Marine Pollution Bulletin

Title: Evaluation of the biodegradation process of crude oil with the contribution of surfactants

Authors: Joana Cruz; Jorge Alberto Trigüis ; Antônio Fernando Queiroz; Olga Lucia Barragan; Deloar Oliveira ; Lilia Souza-Santos; Diana Lira; Norma Gusmão Article Type: Research Paper

Dear Ms. Joana Cruz,

Your submission entitled "Evaluation of the biodegradation process of crude oil with the contribution of surfactants" has been received by Marine Pollution Bulletin.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/mpb/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal. Please do not hesitate to contact me if you have any queries.

Kind regards,

Marine Pollution Bulletin

 Mais informações sobre: Marine Pollution Bulletin.



ANEXO 3: Certificado de apresentação de pôster no XII Workshop da ALAGO.



ANEXO 4: Aprovação do resumo estendido submetido ao Rio Oil & Gas Expo and Conference 2012.

Status do Trabalho			
Instruções Enviar Trabalho Status do Trabalho Cadastro de Autores			
RIOOIL2012 - Trabalhos Submetidos			
Cód	Título	Autor de Contato	Situação
1703	Avaliação da Efetividade Versus Efeitos de Surfactantes em Simulações de Derrame de Óleo no Mar Bloco: A - BLOCO I - EXPLORAÇÃO & PRODUÇÃO Tema: AA - EXPLORAÇÃO Sub-tema: AAF - Desafios tecnológicos e ambientais Sinopse: RIOOIL2012_1703_sinopse_rio_oil_qa.pdf (25KB 18/01/2012 23:56)	Joana Ferreira da Cruz	 
PENDÊNCIAS: 3 autores não enviaram o Copyright pelo Sistema.			
Legenda:  =Sinopse Aprovada  =Aguardando o Trabalho			