



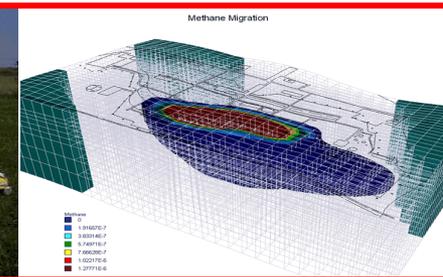
V Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada



Biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo

29/09/2011

Márcio L.B. da Silva, Ph.D.
marcio.silva@cnpqa.embrapa.br





O PROBLEMA

Internacional

- Existem mais de 300 mil áreas impactadas em 12 países da Comunidade Européia (EEA, 2004)
- Nos EUA mais de 317 mil locais foram remediados restando ainda 130 mil (USEPA, 2004)
- No Canadá hidrocarbonetos de petróleo estão presentes em 60% das áreas impactadas (CCME, 2001)



O PROBLEMA

Nacional

- No Brasil há poucas informações sobre a magnitude do problema mas estima-se mais de 20 mil áreas impactadas



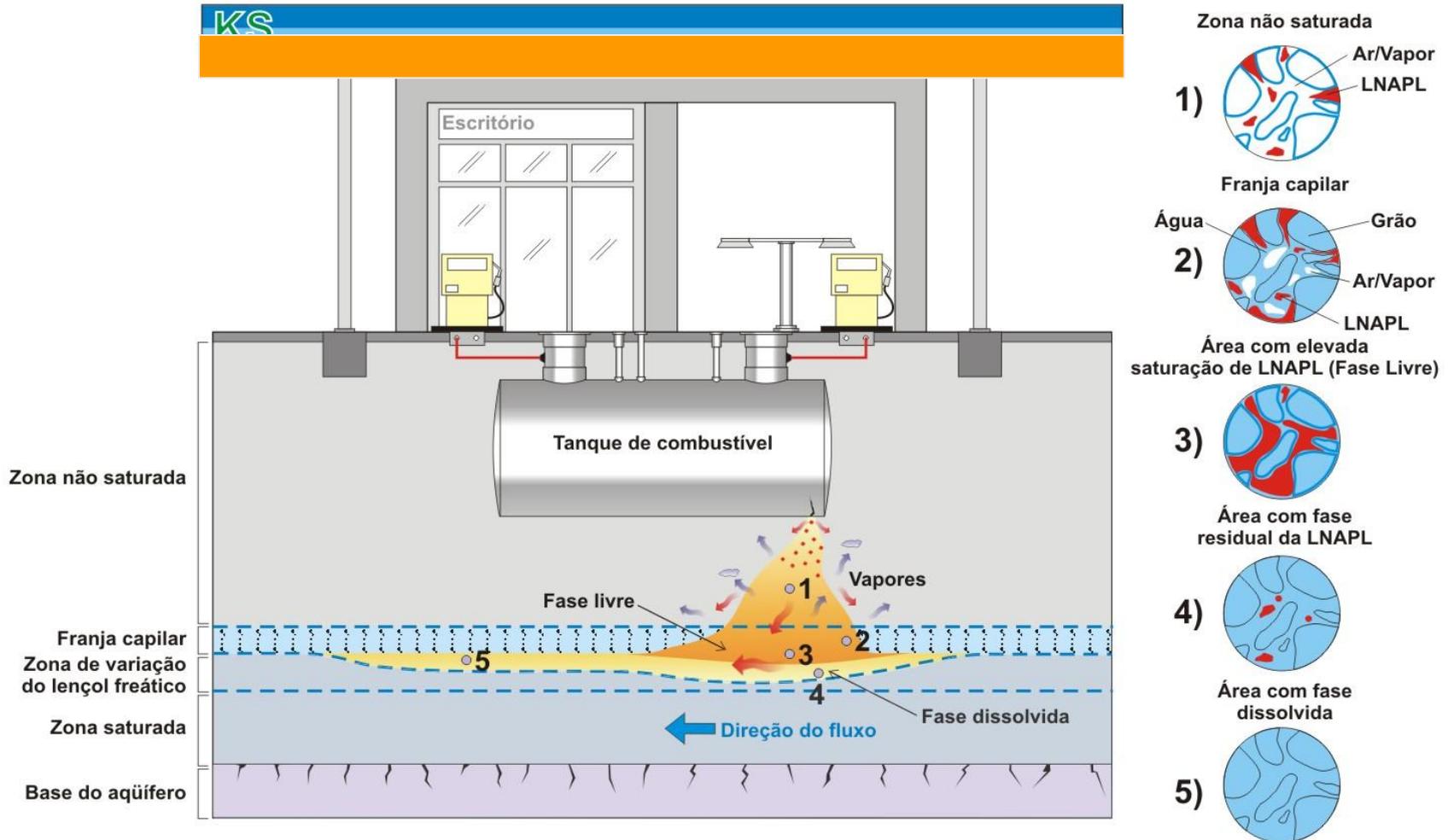
Cenários Potenciais

Nacional

- 9.209 poços de petróleo e gás (92% em terra)
- 13 refinarias - 324 mil m³/dia
- 45 terminais aquaviários e 24 terrestres – 1.147 tanques
- 458 bases e 31.435 postos de serviços
- 420 dutos – 15,1 mil km



Cenário da Contaminação



Principais contaminantes da gasolina e diesel



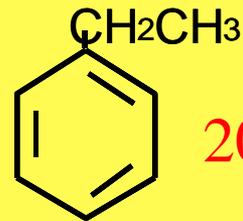
5 μ g/L

Benzeno



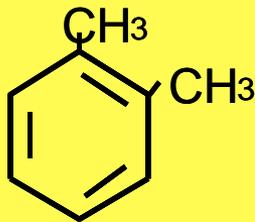
170 μ g/L

Tolueno

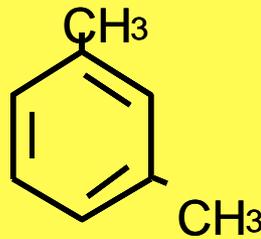


200 μ g/L

Etilbenzeno



o-Xileno



m-Xileno



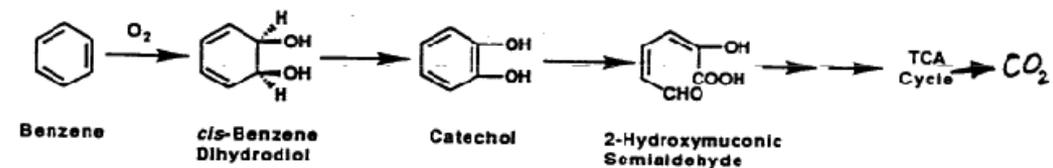
300 μ g/L

p-Xileno

•Portaria 518 12/2005 – Ministério da Saúde

Biorremediação

Processo natural ou controlado no qual processos microbiológicos catalizam compostos poluentes eliminando a contaminação ambiental.



pH

Carbono biodisponível

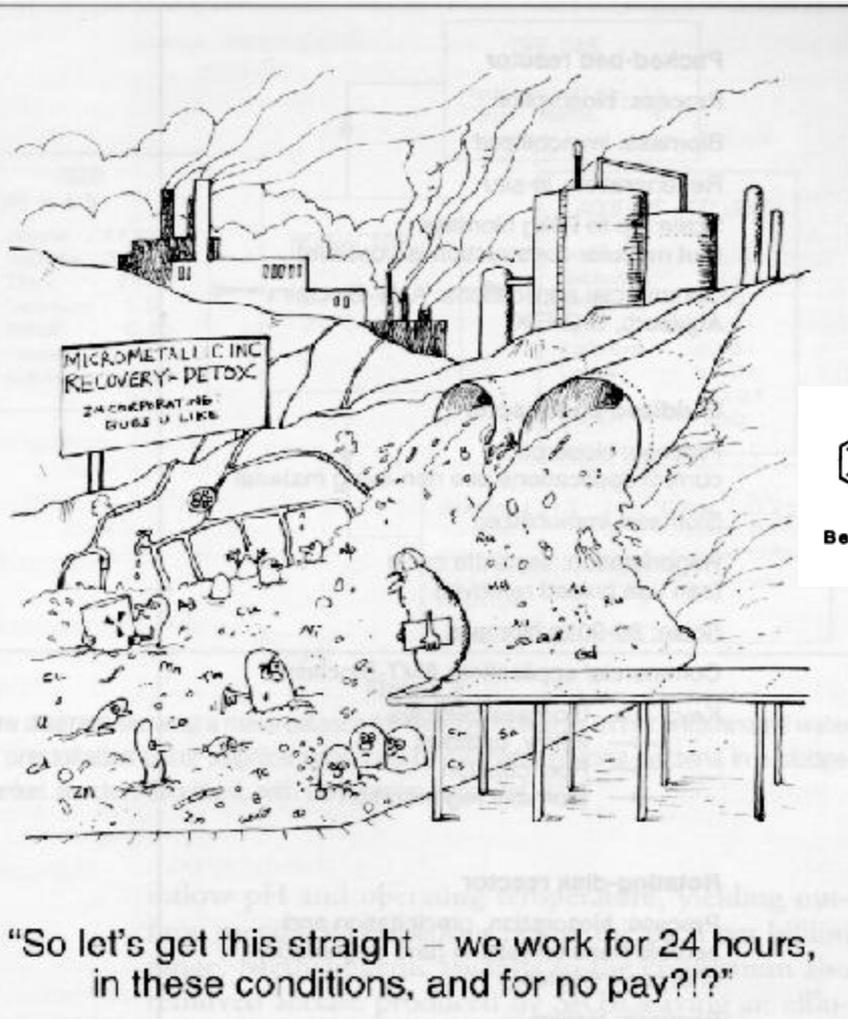
Umidade

Nutrientes

Aceptores de elétrons

Microorganismo(s) específico(s)

Ausência de toxicidade/ inibidores



Biorremediação: O Motivo

- **Técnica rápida e de baixo custo** (*melhor custo-benefício comparado com técnicas de bombeamento do lençol para tratamento ex-situ*)
- **Mínimo destúrbio ambiental** (*geração de mínimo volume de materiais*)
- **Tratamento de compostos hidrofóbicos de difícil remoção do solo**
- **Elimina custos de transporte (aterros industriais)**
- **Não remove água do aquífero**

Biorremediação: Mercado de atuação

- Nos estados Unidos, existem **235 a 355 mil áreas** contaminadas.
- Investimentos de remediação entre **US\$ 6 – 8 bilhões/ ano**.
- *Área de atuação mercadológica promissora*

Bioestimulação

- Adição de aceptores de elétrons (H_2O_2 , O_2 , NO_3 , Fe^{3+} , SO_4) e/ou nutrientes (N, P).
- Pode estar associada a bioagumentação.

Marcio L.B. da Silva et al. (2006). *Water Environment Research*. 78: 2456

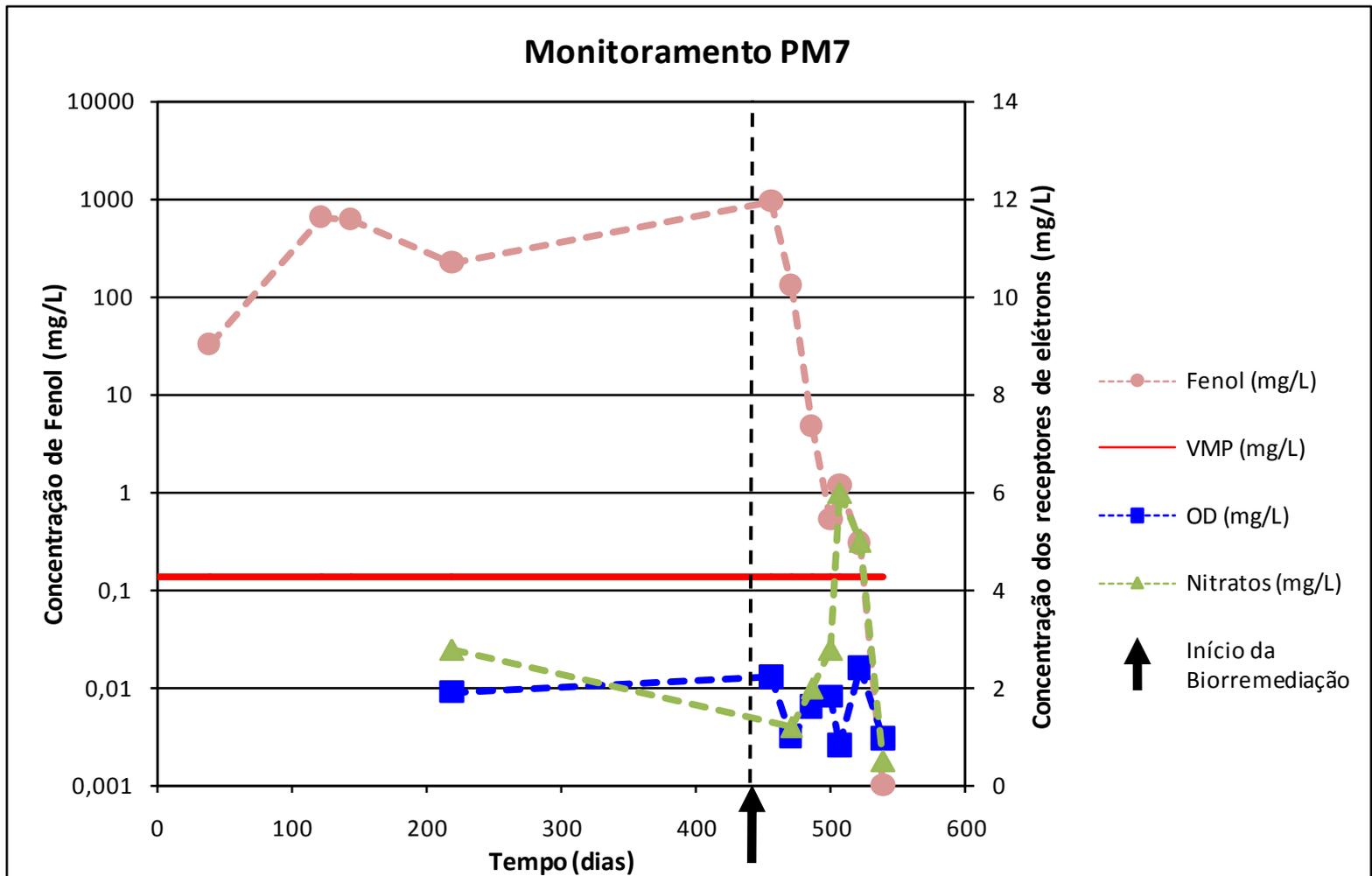
Marcio L.B. da Silva. (2005). *Biodegradation* 16: 105–114



Bioestimulação - Biorremediação fenol

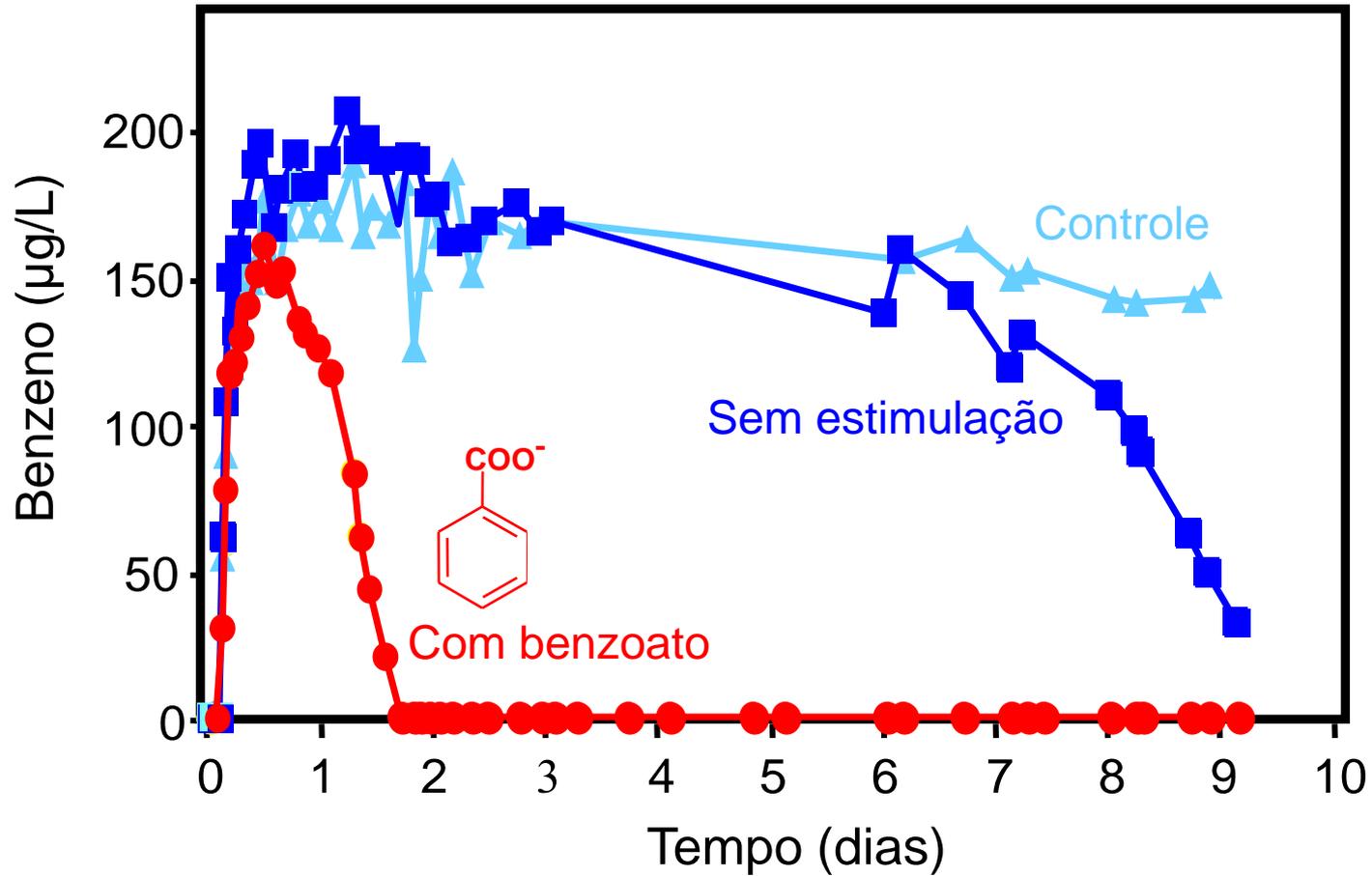


Bioestimulação - Biorremediação fenol



Marcio L.B. da Silva et al. (2011). Ground Water Monitoring and Remediation. Submetido.

Compostos similares estruturalmente



Alvarez P.J.J., L. Cronkhite, and C.S. Hunt (1988). *Environ. Sci. Technol.* 1988; 22(5) 634-639

Bioagumentação

- Adição de bactérias específicas.
- Muito utilizada em áreas contaminadas com solventes clorados (DNAPL).
- Pode estar associada a bioestimulação.

Marcio L.B. da Silva et al. (2006). Water Environment Research. 78: 2456

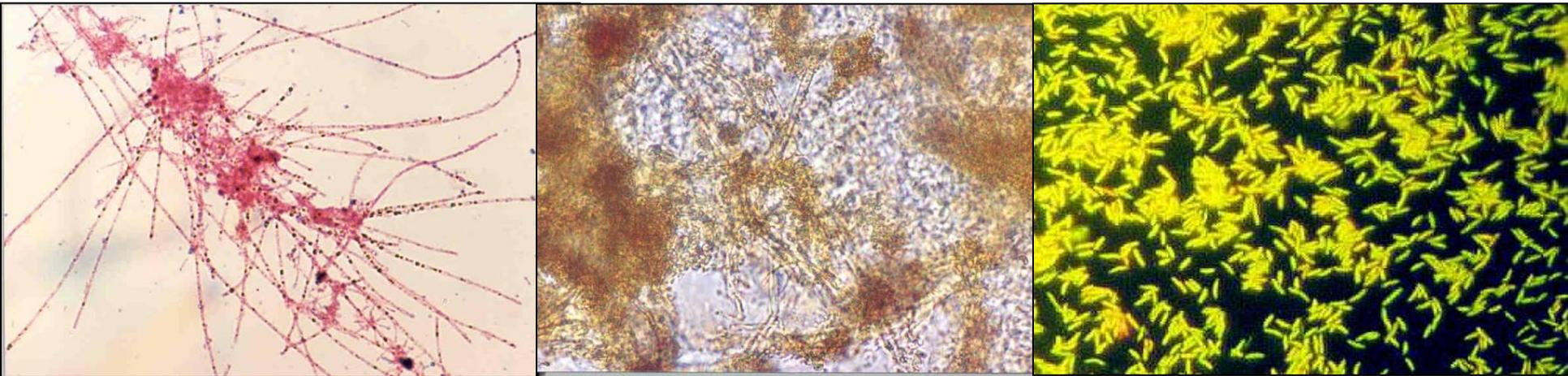


Containers pressurizados são utilizados para transportar o consórcio bacteriano. Bioaugmentação ocorre através da transferência do inóculo diretamente nos poços de injeção. O processo é realizado utilizando pressurização e gases inertes, eg.: N₂

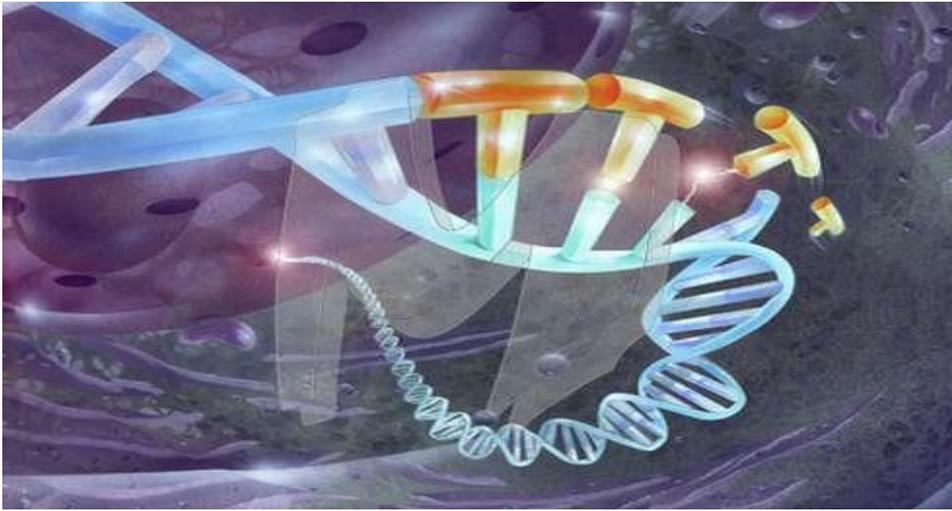


Marcio LB da Silva e Pedro Alvarez (2009) Bioaugmentation. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Verlag Berlin Heidelberg: Springer.

Biologia Molecular e Biorremediação



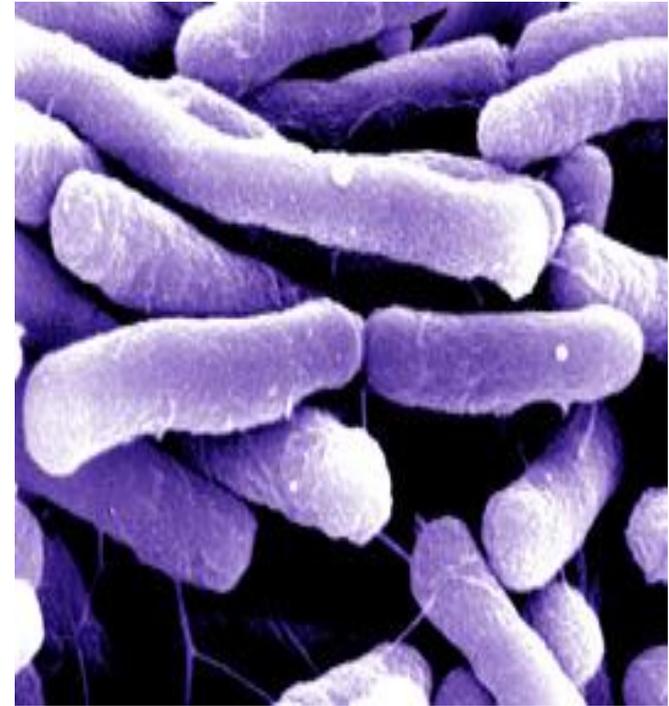
Biologia molecular ?



Pequena parcela de microorganismos do solo podem ser cultivados em laboratório em condições normais (<1%).

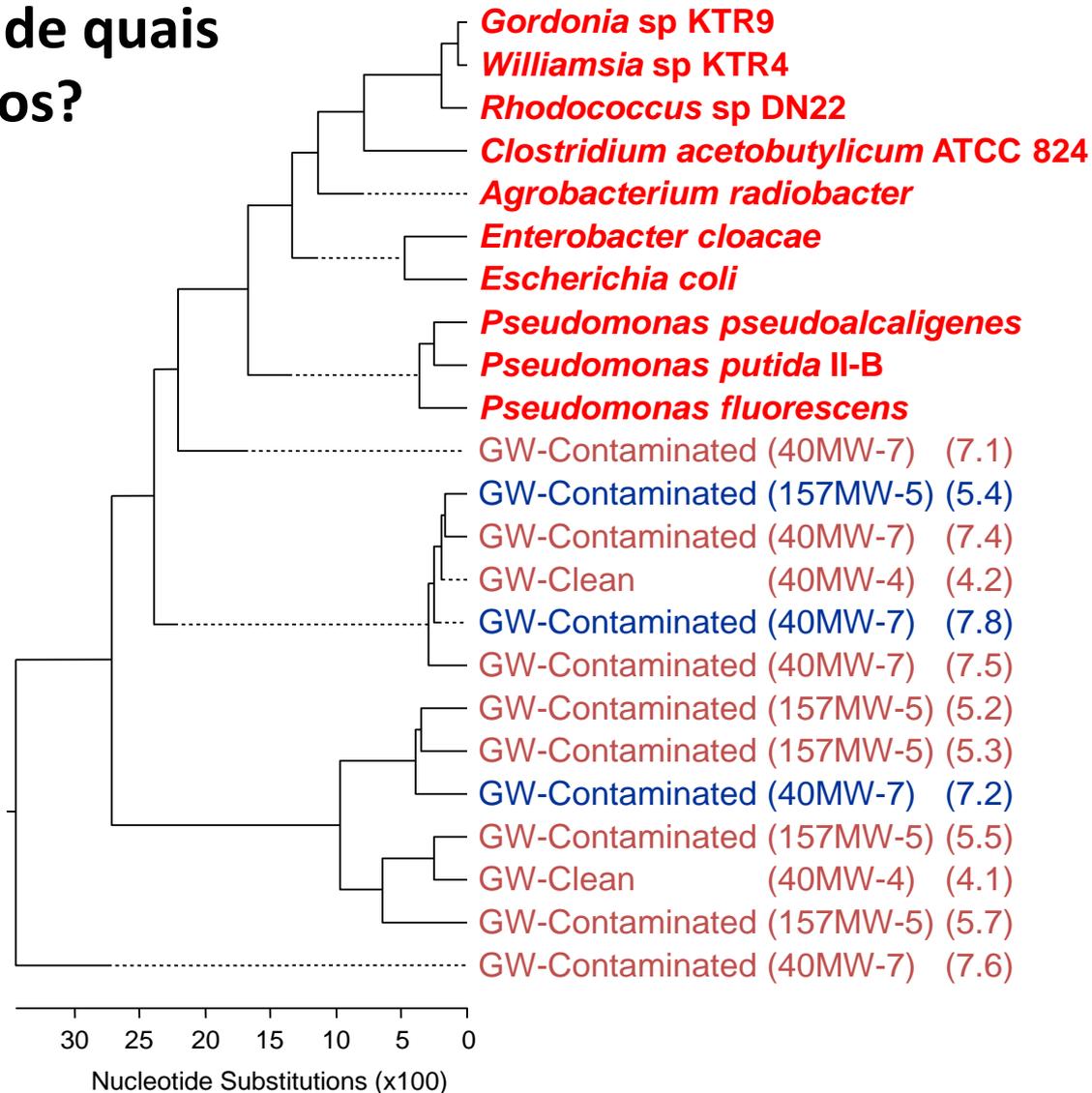
Processo de microbiologia convencional é demorado. Culturas anaeróbicas podem demorar meses para crescer.

Análises moleculares são rápidas (24 horas) e com resultados específicos.

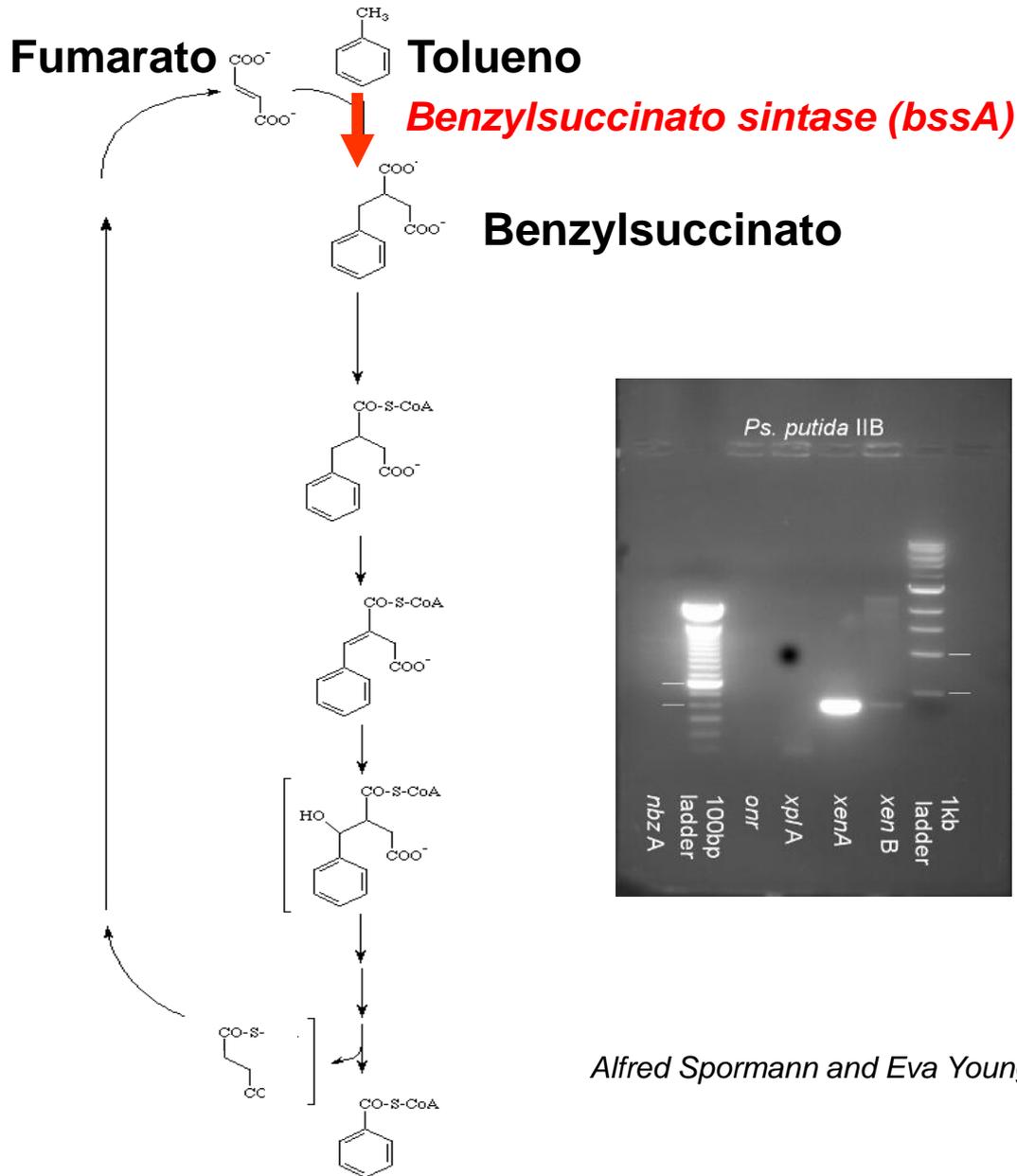


Metagenômica

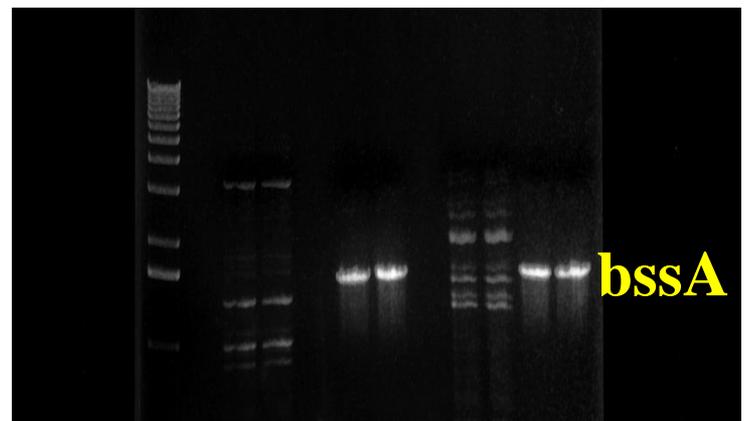
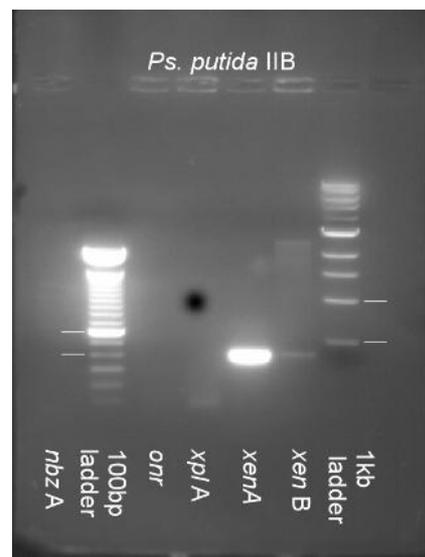
Presença de quais organismos?



Biomarcador da Biodegradação Anaeróbica do Tolueno

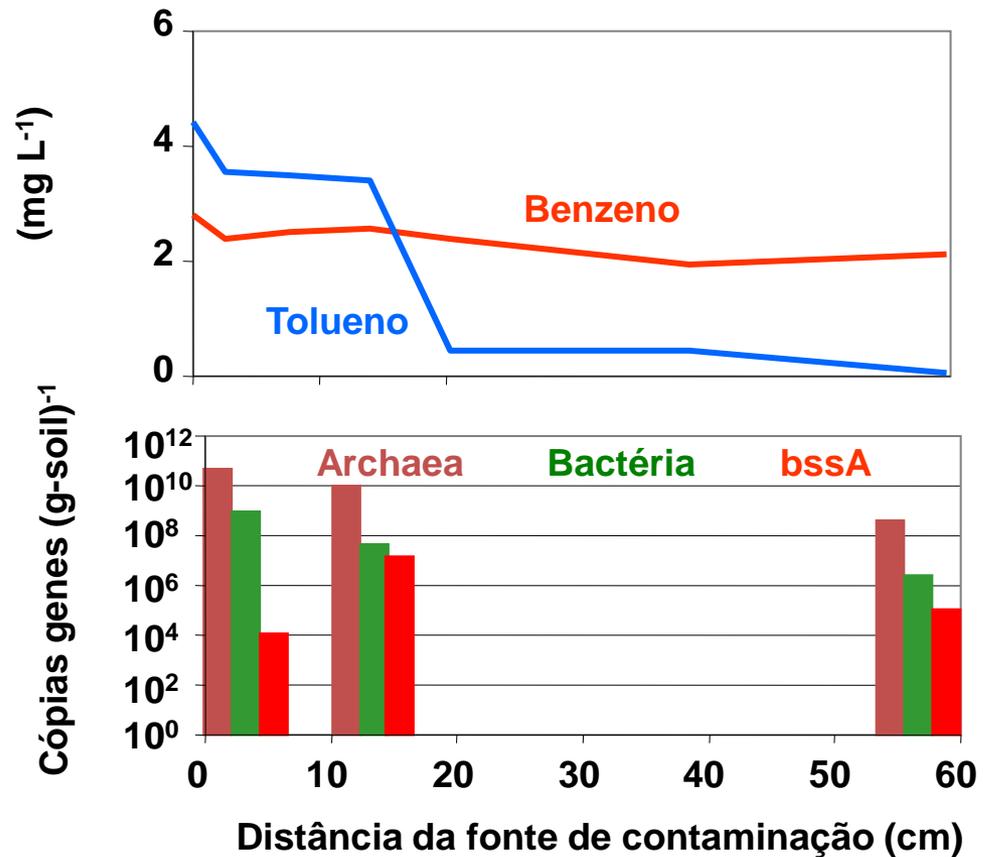


PCR

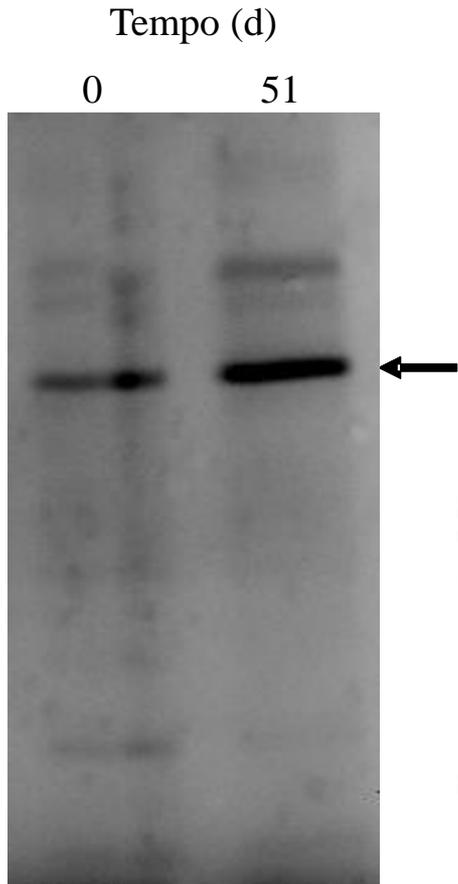


Alfred Spormann and Eva Young

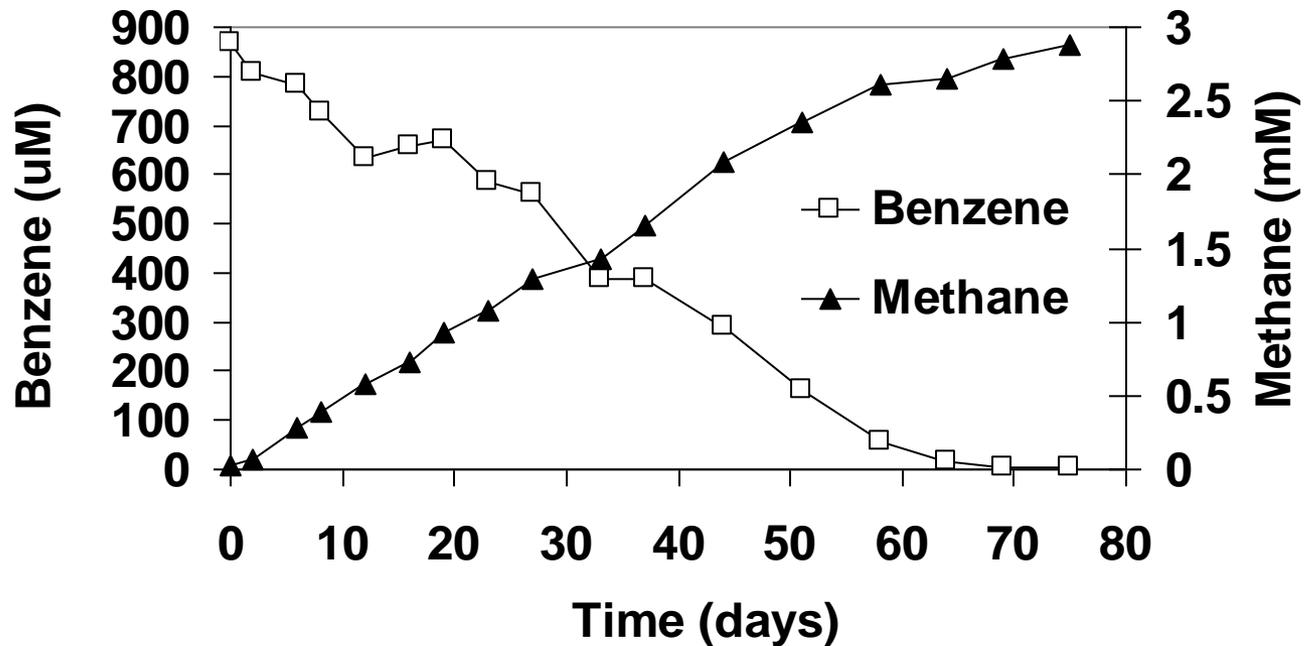
Biomarcador da Biodegradação Anaeróbica do Tolueno



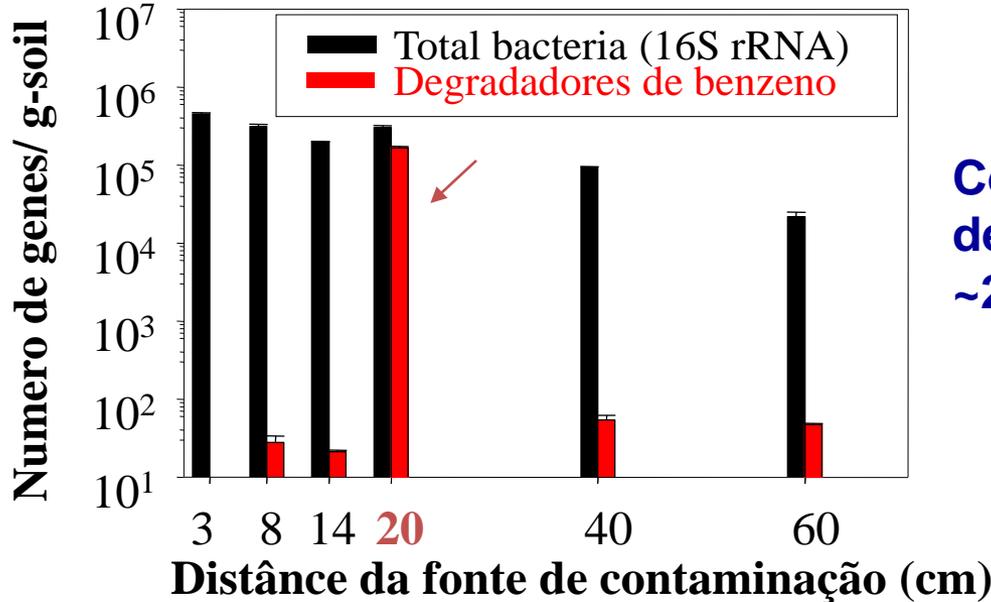
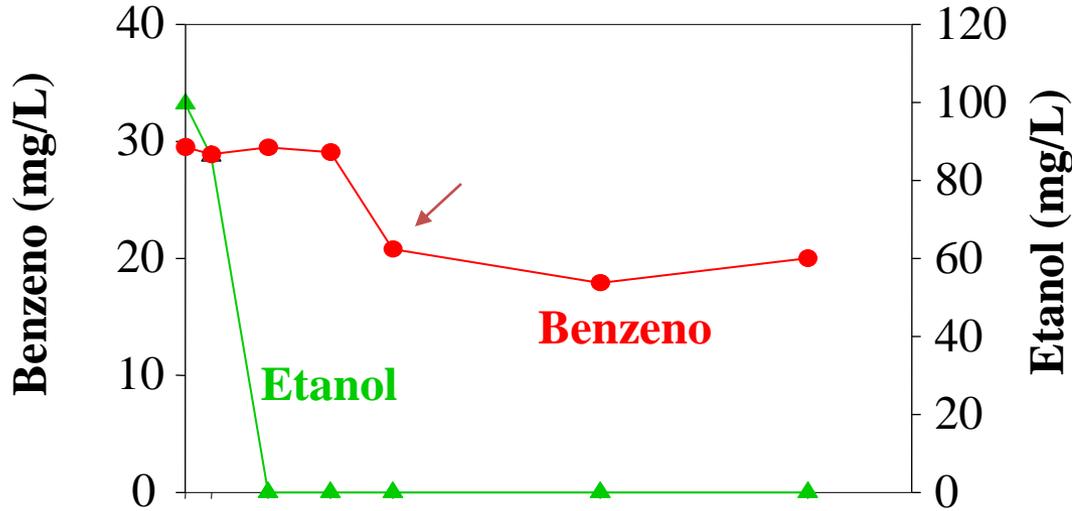
Desenvolvimento de biomarcadores para Biorremediação



Análises de DNA (biomarcador) indicam as espécies bacterianas presentes e ativas na área da contaminação.

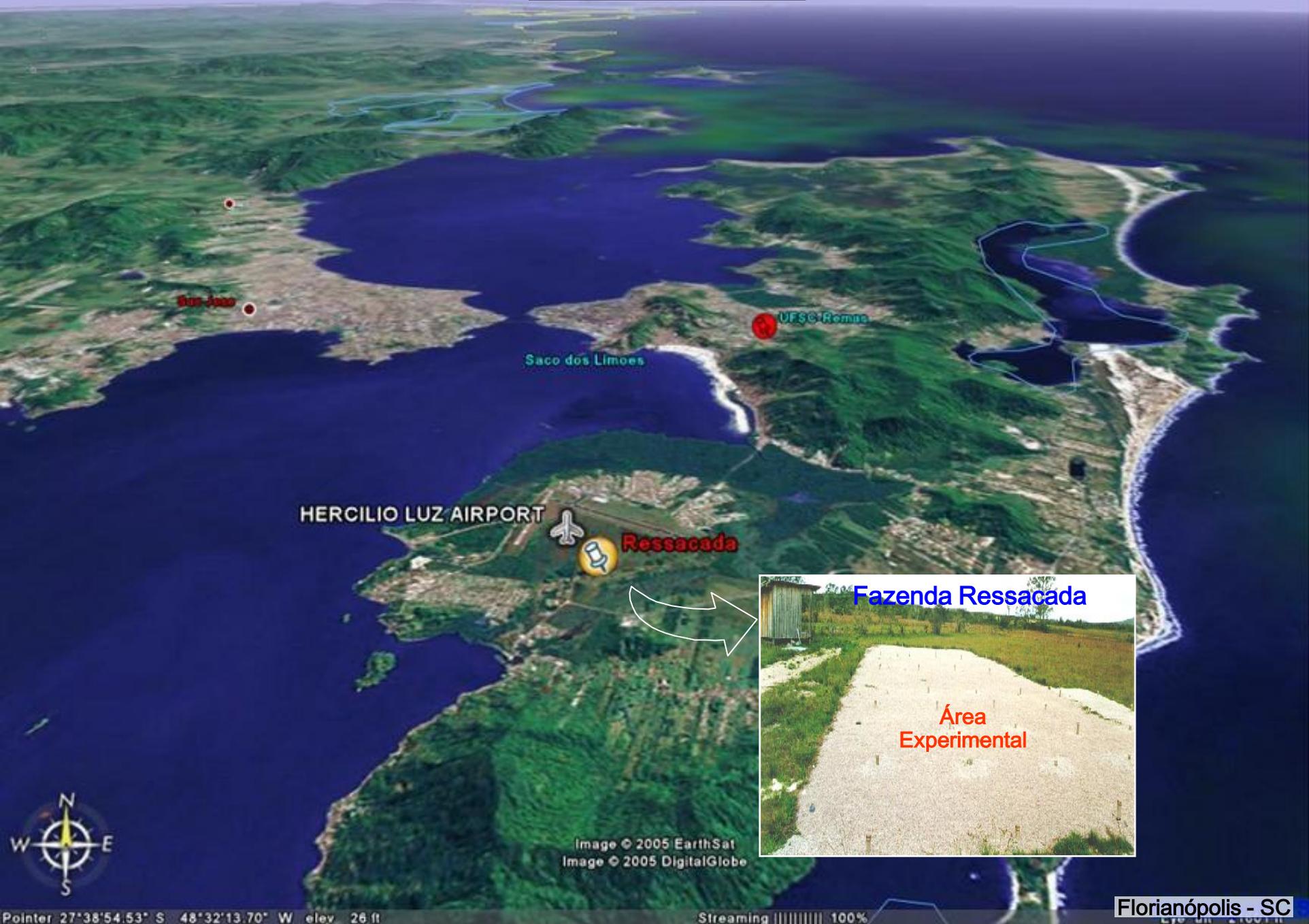


Correlação entre Biodegradação e Concentração de Bactérias Degradadoras



Concentração teórica de degradadores de benzeno:
 $\sim 2.3 \times 10^5$ células/g-soil

Marcio Da Silva and Pedro Alvarez.
Environmental Microbiology. (2006). **9**(1), 72–80



HERCILIO LUZ AIRPORT



Ressacada

UFSC Remas

Saco dos Limões

Fazenda Ressacada

Área Experimental



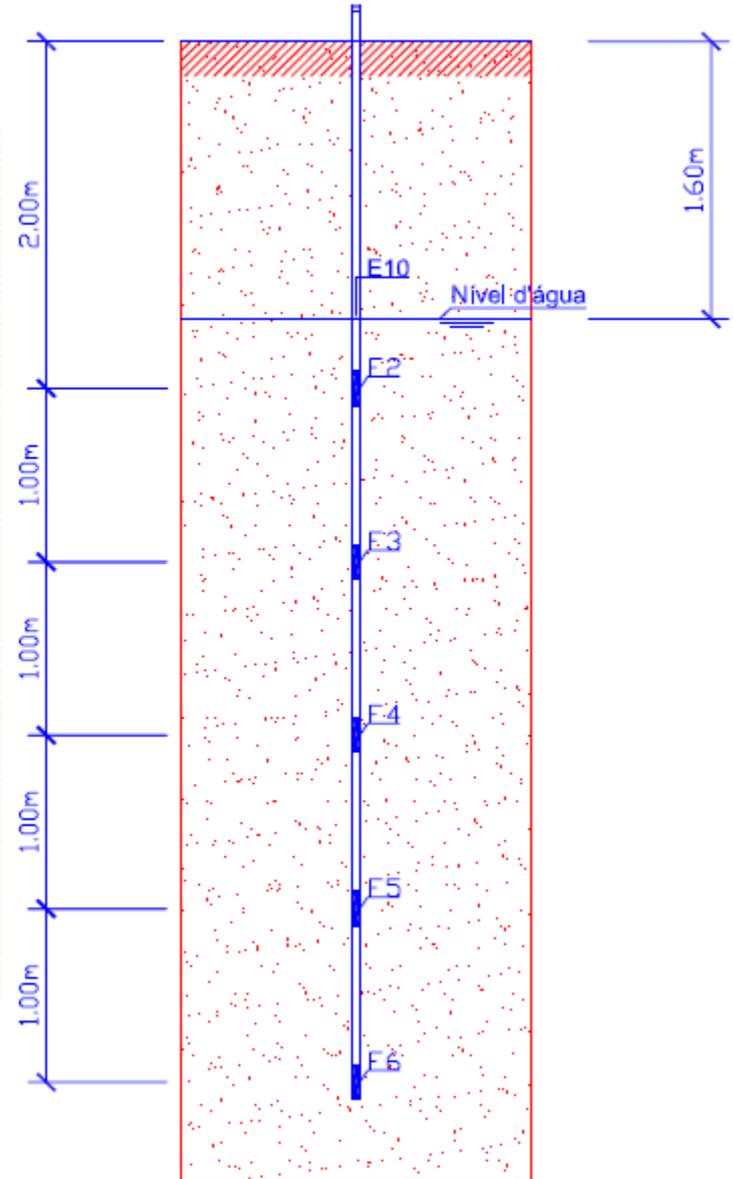
Image © 2005 EarthSat
Image © 2005 DigitalGlobe

Streaming ||||| 100%

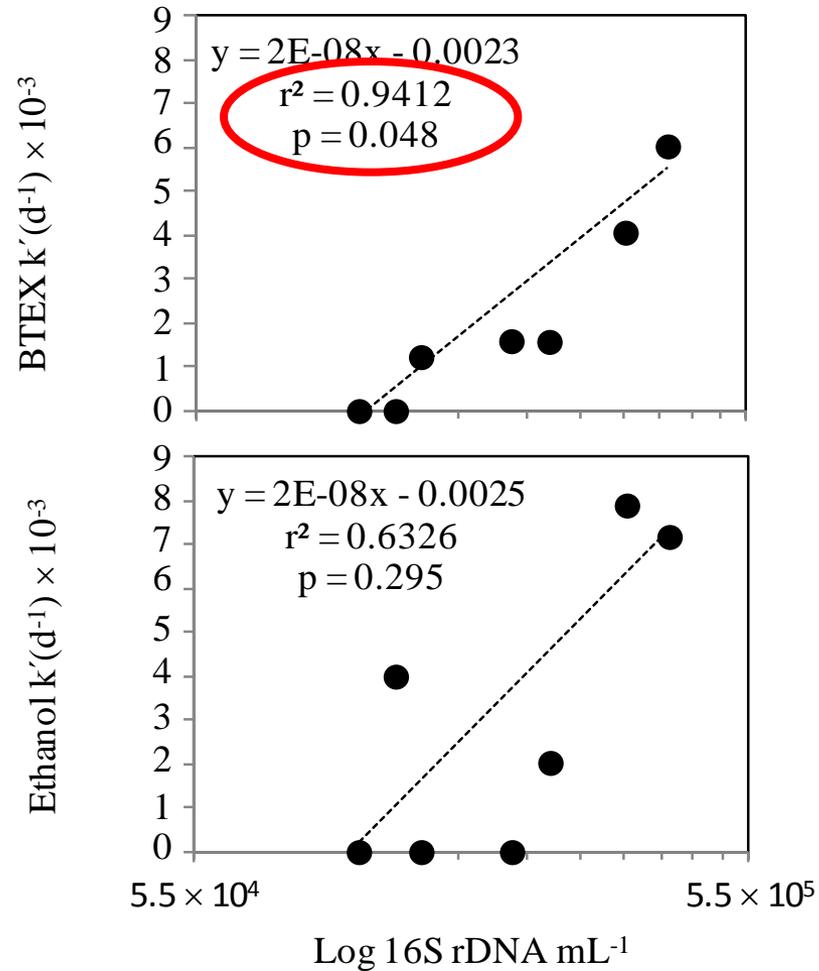
Florianópolis - SC

Pointer 27°38'54.53" S 48°32'13.70" W elev. 26 ft

Biomarcadores no campo



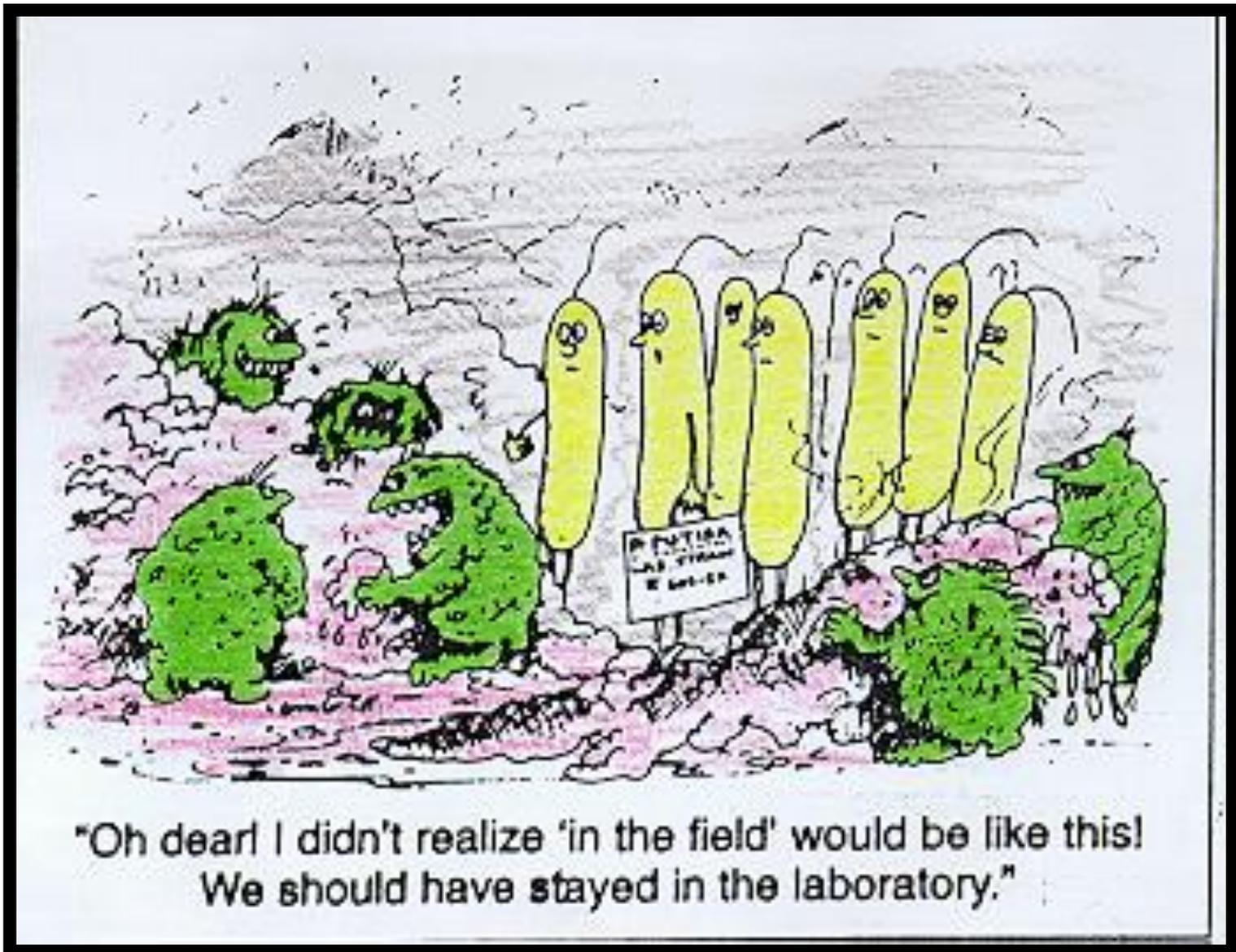
Biomarcadores no campo



Considerações finais

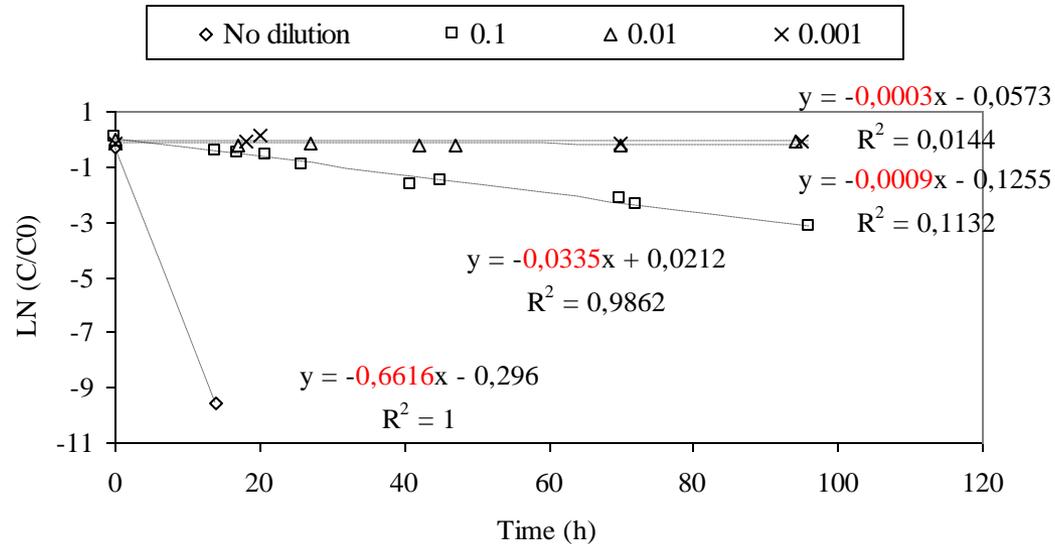
- Microorganismos são capazes de degradar contaminantes químicos, tornando a biorremediação uma técnica favorável e de baixo custo-benefício.
- O sucesso da biorremediação está associado com o nível de conhecimento e técnicas disponíveis - ciência multidisciplinar.
- Biologia molecular de microorganismos é uma ferramenta de análise forense importante para tomada de decisões no planejamento da remediação ambiental.

OBRIGADO !



"Oh dear! I didn't realize 'in the field' would be like this!
We should have stayed in the laboratory."

Análises moleculares podem prever taxas de biodegradação ?



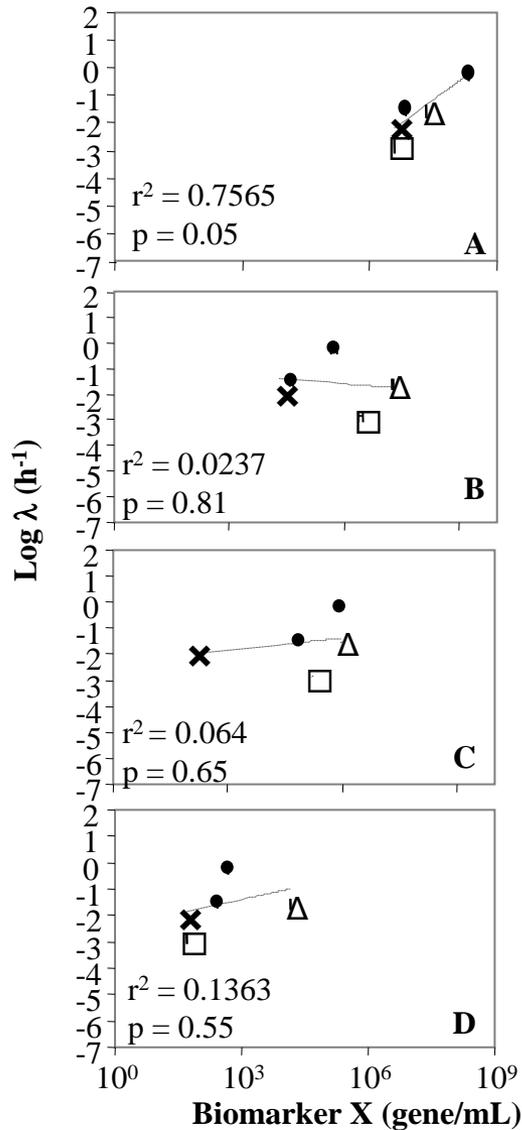
Marcio Da Silva and P. Alvarez. *J. Environmental Engineering* (2008).

Limitações da Tecnologia

- **Poucos laboratórios comerciais conduzem análises biomoleculares**
- **Incerteza comercial limita o interesse**
- **Estas análises somente podem ser conduzidas em laboratórios especializados com instrumentos específicos (UFSC-REMAS)**



Análises Moleculares podem prever taxas de biodegradação ?



Gene Universal
(todas as bactérias)

Gene exclusivo para
Dehalococcoides
(única bactéria conhecida capaz de biodegradar compostos clorados)

Gene catabólico
tceA
(Responsável pela enzima de biodegradação)

Gene RNA
(Indicador do grau de expressão da *tceA*)

Marcio Da Silva and P. Alvarez (2008).



Custos de Remediação

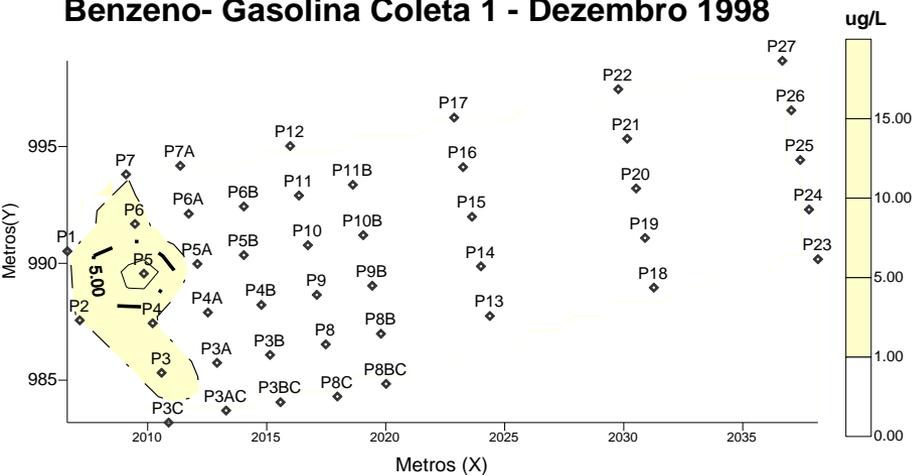


A remediação de aquíferos envolve altos custos e longos períodos de tempo

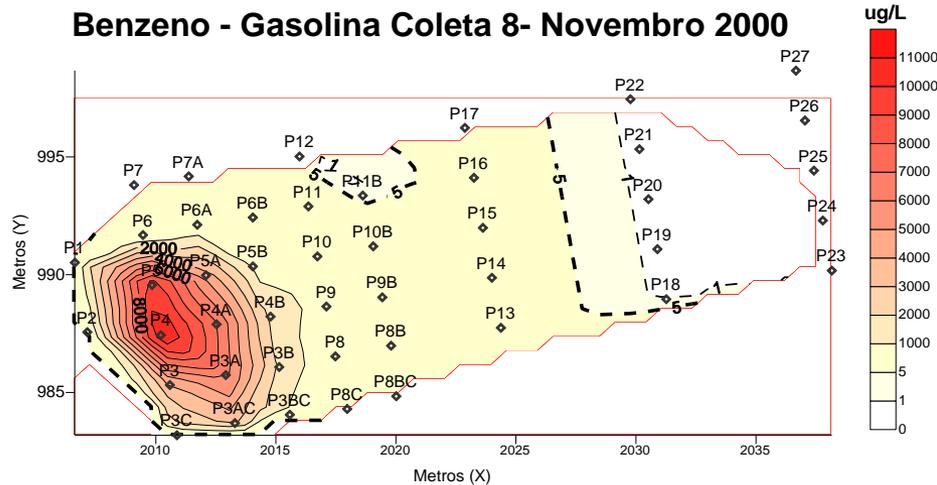


Monitoramento do Benzeno

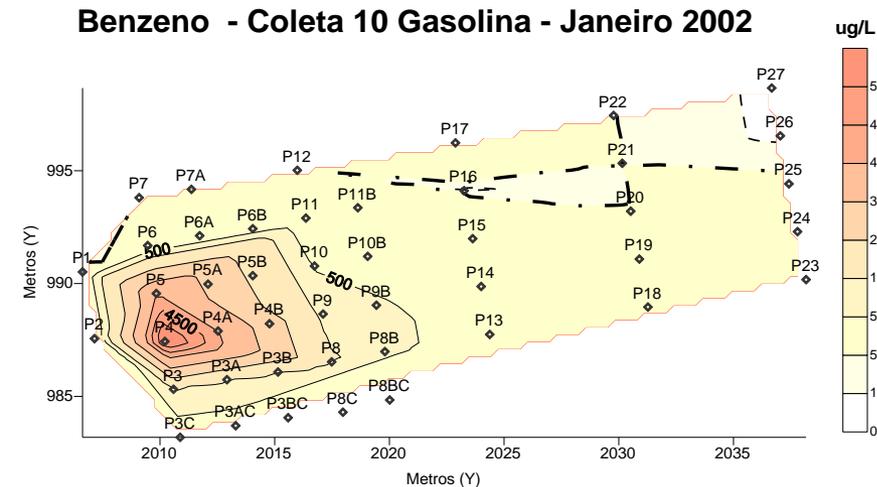
Benzeno- Gasolina Coleta 1 - Dezembro 1998



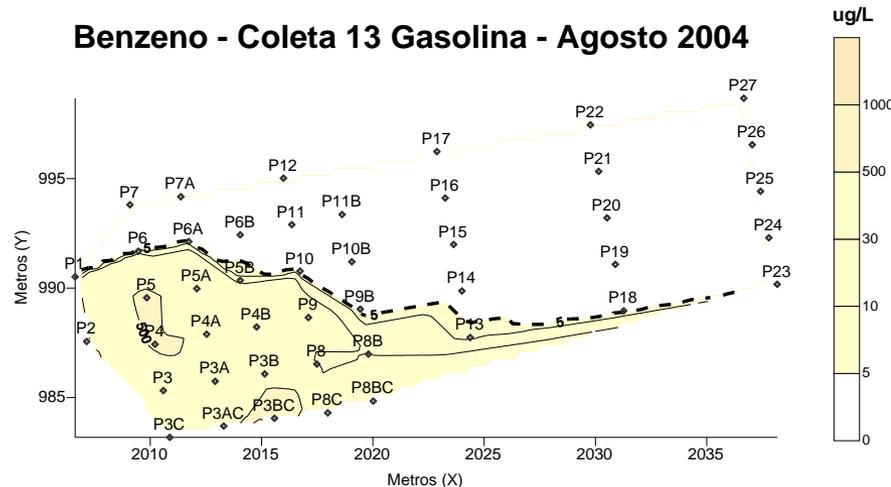
Benzeno - Gasolina Coleta 8- Novembro 2000



Benzeno - Coleta 10 Gasolina - Janeiro 2002

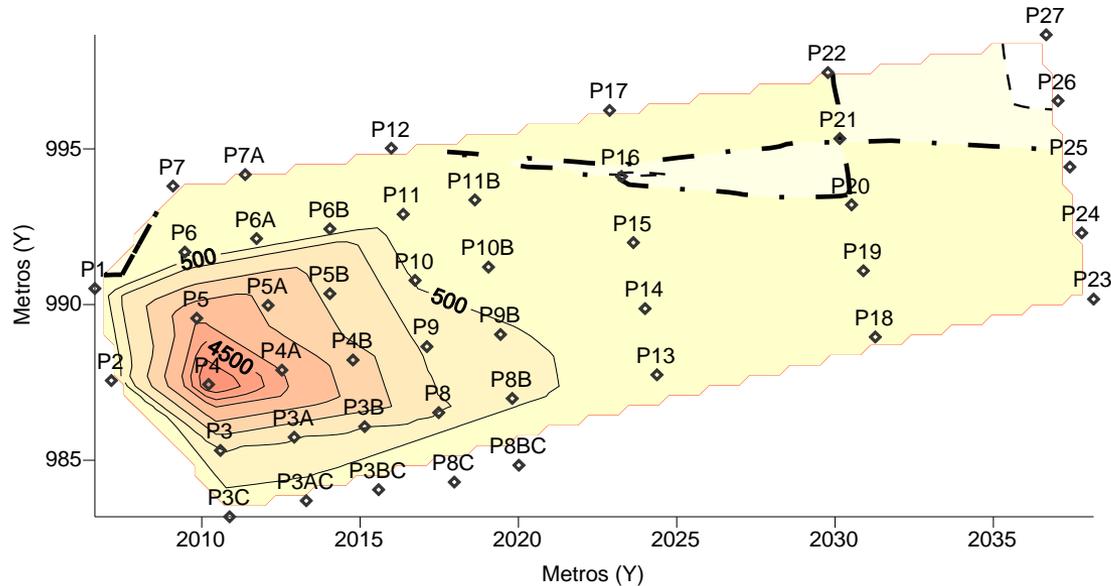


Benzeno - Coleta 13 Gasolina - Agosto 2004



Monitoramento do Benzeno

Benzeno - Coleta 10 Gasolina - Janeiro 2002



Corpo receptor comprometido ?!!

**Necessidade de técnicas de
biorremediação acelerada**



Biorremediação: emediation experienced many up- and downturns

- 1950's: *Microbial infallibility* hypothesis (Gayle, 1952)
- 1970's: Regulatory pressure stimulates development. Adding bacteria to contaminated sites becomes common practice. Failure to meet expectations (e.g., DDT accumulation) prompts a major *downturn*.
- 1980's: It becomes clear that fundamental processes need to be understood before a *successful* technology can be designed. This realization, along with the fear of liability and *Superfund*, stimulates the blending of science and engineering to tackle environmental problems.
- 1990's: Many bioremediation and hybrid technologies are developed. However, decision makers insist on pump and treat, and Superfund is depleted. Poor cleanup record and high costs stimulate *paradigm shift* towards natural attenuation and RBCA.

Current Status of Bioremediation

- We have made significant advances towards understanding the biochemical and genetic basis for *biodegradation*. However, *bioremediation* is still an *underutilized technology*.
- Bioremediation is not universally understood, or trusted by those who must approve it. To take full advantage of its potential, we need to communicate better the capabilities and limitations of bioremediation, and answer:
 - *What is being done in the subsurface, Why, How, and Who is doing what?*
 - *How fast is it being done, and can we control it and make it go faster?*
 - *When can we meet cleanup standards in a cost-effective manner?*
 - *Can we reasonably predict that what we want to happen, will happen?*

EPISTEMOLOGY OF BIOREMEDIATION

episteme = knowledge

Theory of the method and basis we use to acquire knowledge, including the possibility and opportunity to advance fundamental understanding, sphere of action, and the philosophy of the scientific disciplines that we rely upon.

Reductionism:

- System analysis through separation of its components (eliminates complexity to enhance interpretation).
- Based on the premise that a system can be known by studying its components, and that an idea can be understood if we understand its concepts separately.
- Used increasingly in bioremediation research to investigate mechanisms.

Holism:

- The totality of a system is greater than the sum of its parts (synergism & antagonism)

Implications

- Quantitative extrapolation from the lab to the field is taboo. (interpolate but do not extrapolate)
- Rely more on holistic disciplines (e.g., *ecology*, *biogeochemistry*) and iterate more between the field and the lab, between basic and applied research.
- Multidisciplinary Research (interstices)
- *Aurea mediocritas* (San Ignacio de Loyola)

Metabolismo Bacteriano

- **Anabolismo:** Síntese de material celular/ energia.
- **Catabolismo:** Degradação do substrato.
- **Diversidade Metabólica (doadores de elétrons):**

A) Heterótrofos → Carbono orgânico. Ex.: benzeno

B) Autótrofos → Carbono inorgânico. Ex.: CO₂

- **Receptores de eletrons:**

O₂ molecular (aeróbicos)

NO₃⁻/NO₂ (desnitrificantes)

SO₄²⁻/H₂S (Redutores de sulfato)

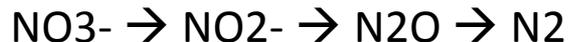
CO₂/CH₄ (metanogenicos/ fermentadores)

Respiração Bacteriana

- **Aeróbica** (1961): Elétron receptor é o oxigênio. $O_2 + 4H \rightarrow 2H_2O$
- **Anaeróbica Obrigatória**: Microorganismos são sensíveis ao oxigênio e morrem na presença deste.
- **Anaeróbicas facultativas**: Usam oxigênio preferencialmente, mas são capazes de mudarem para condições de fermentação ou desnitrificação na ausência de O_2 .

Exemplos de elétrons receptores anaeróbicos:

Desnitrificação:



Redução de sulfato:



Redução de ferro:

$\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ (corrosão, problemas de qualidade de água, gastos em tubulações)

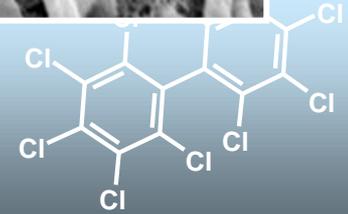
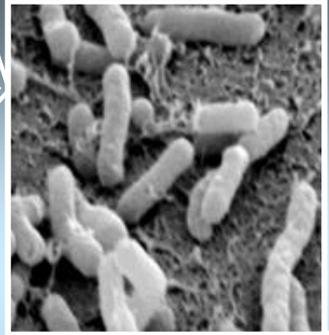
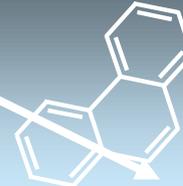
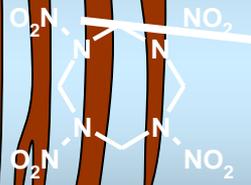
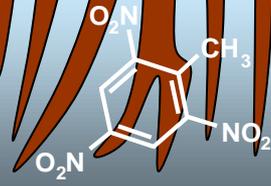
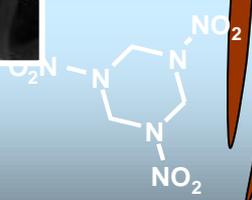
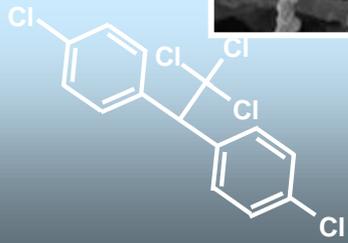
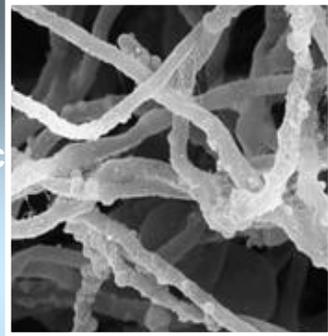
Metanogênica:

Acetoclástica: $\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$

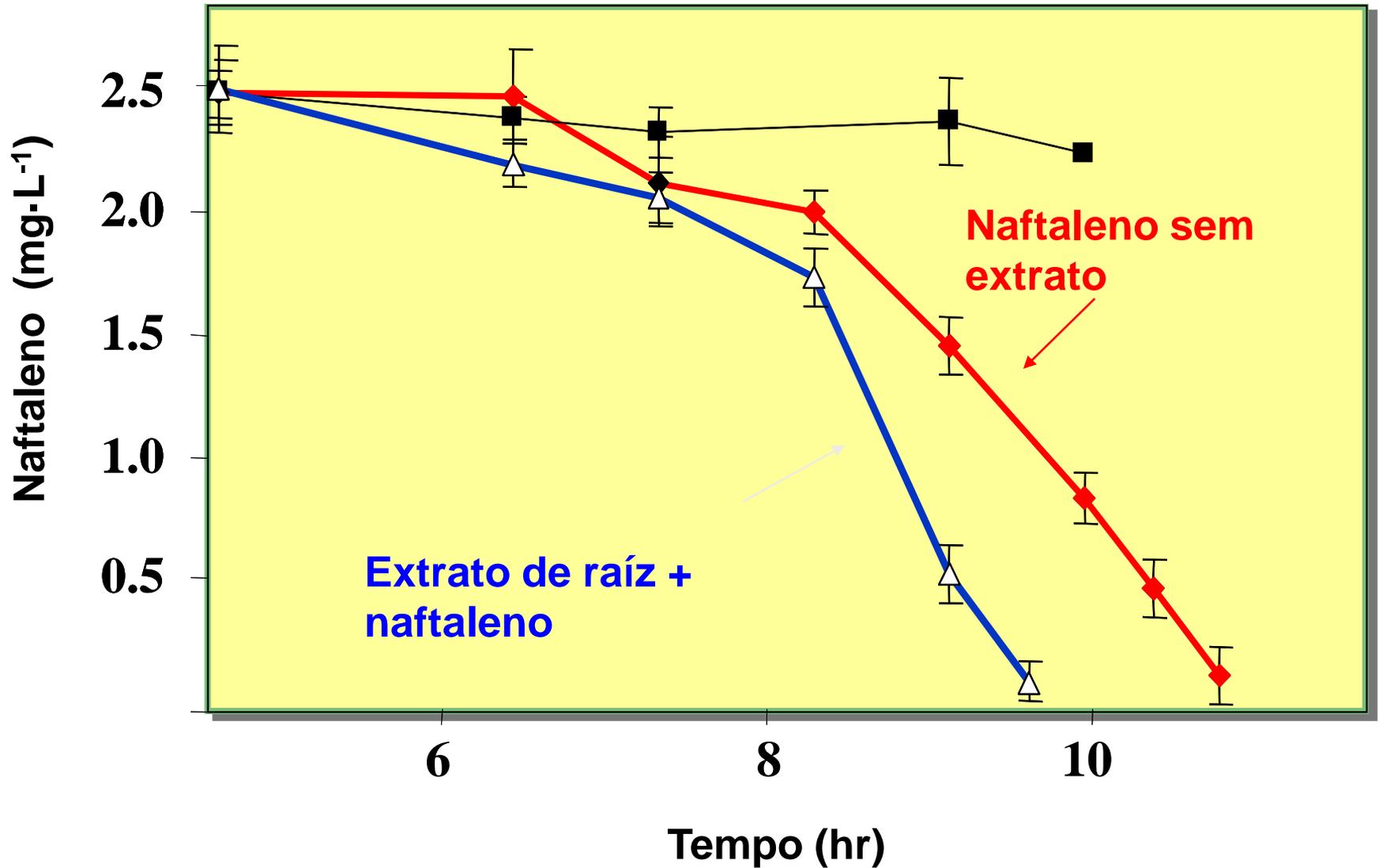
Hidrogenotróficas: $4\text{H}_2 + \text{H}^+ + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{H}_2\text{O}$ (Cultura de arroz; aquecimento global)

Homoacetogênicas: $4\text{H}_2 + \text{H}^+ + 2\text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 4 \text{H}_2\text{O}$

Rizorremediação associada a fitorremediação



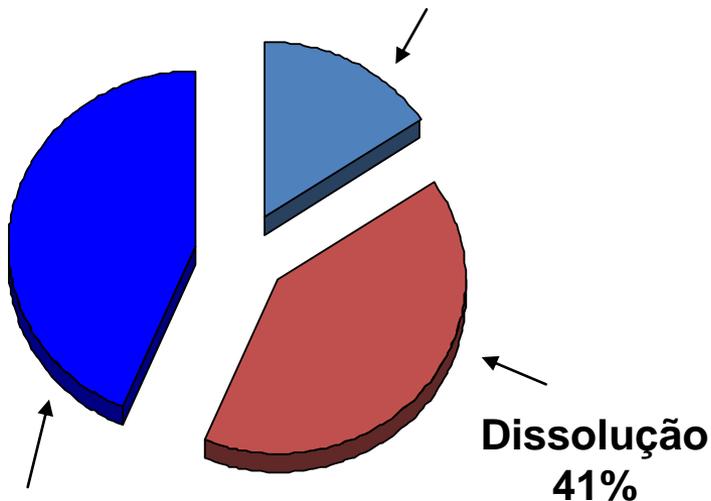
Rizodeposição estimula degradação de naftaleno



Comparação bioestimulação versus Bioestimulação com bioaugmentação

Biostimulação

Decloração
(TCE+DCE+VC+Eteno) 16%

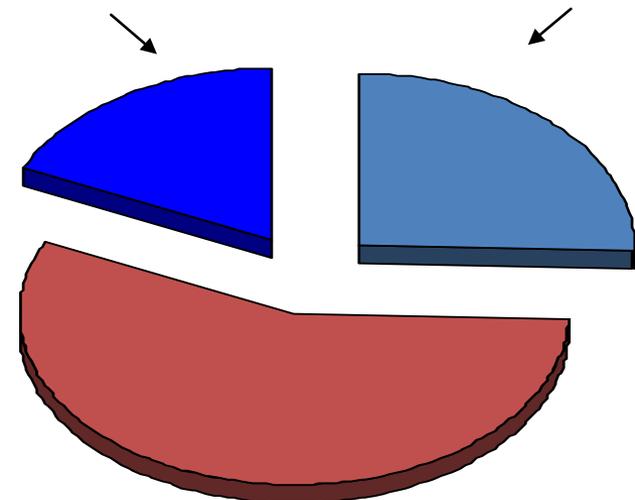


PCE remanescente 43%

Bioestim. + Bioaugmentação

PCE remanescente 18%

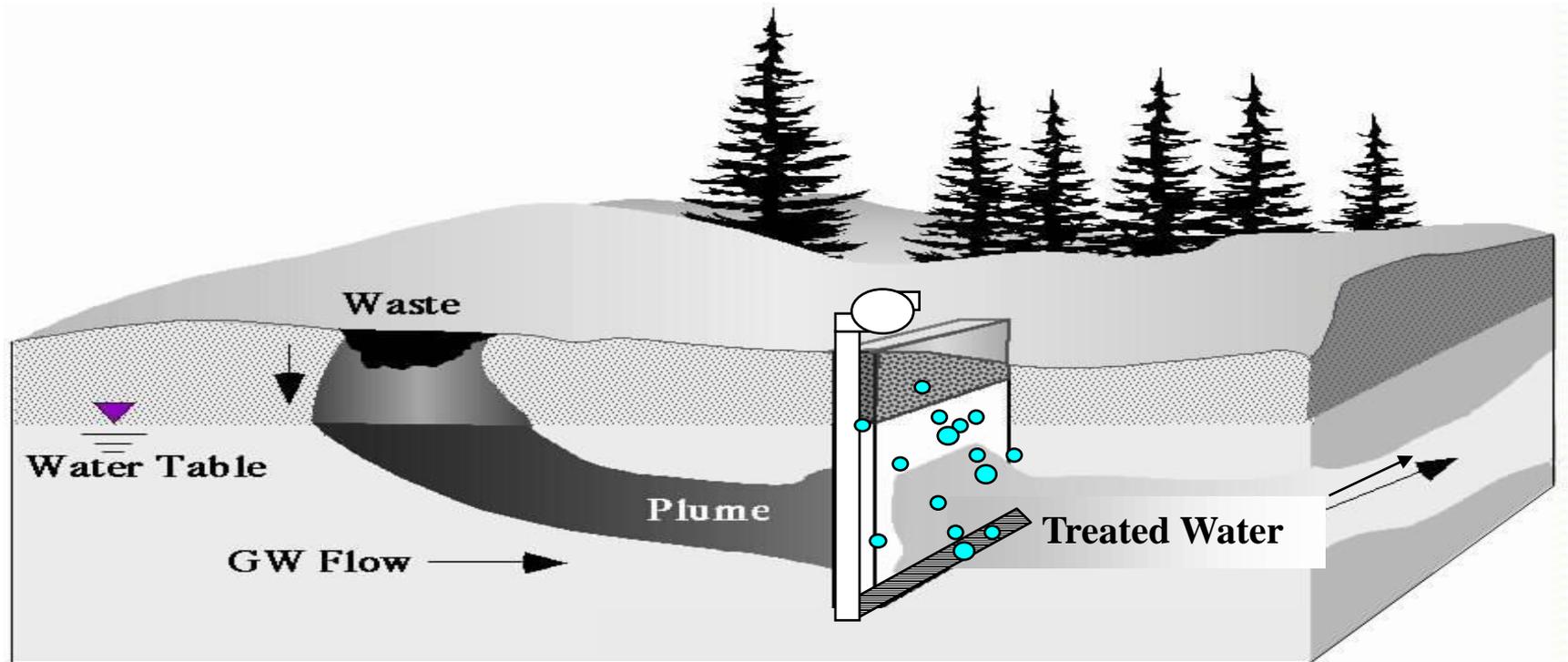
Decloração
(TCE+DCE+VC+Eteno)
25%



Dissolução
57%

Barreiras Reativas

- Método físico de contenção que previne o transporte hidráulico e controla o movimento da pluma de contaminação.
- Zona biologicamente ativa é criada após a barreira. Nessa área se injetam nutrientes e/ou e- receptores, e ar comprimido para estimular biodegradação dos BTEX.



Landfarming



Compostagem/ biopilhas

Bioremediation

BioSiteSM System is a safe, cost-effective method for remediating the contaminated soils in quantities of 1000 yards or more. After being placed in a ventilated biopile, soil is treated with a blend of selected chemicals and microorganisms that naturally break the toxins down into less harmful compounds. After treatment, treated soils can be safely landfilled or taken off-site for other uses.

- 1 Soil is unloaded at a staging area adjacent to the pile. Materials are fingerprinted and inspected for any foreign matter collected during the excavation process.
- 2 Loader places soil onto pile.
- 3 A blend of special chemicals and organisms is added.
- 4 A synthetic cover is applied to control emissions and humidity.
- 5 Perforated pressure piping adds air to the pile.
- 6 Perforated vacuum piping removes air from the pile.
- 7 Recirculated air is periodically monitored to determine the rate of treatment.

10 Instruments monitor the pressure and temperature of the pile core.

8 The blower assembly circulates air through the perforated pipe aeration system.

9 The de-mister (knock out drum) collects the condensate.

The NEW Waste Management.

WM
WASTE MANAGEMENT



Histórico da Biorremediation

- 600 AC** Romanos construíram sistema de esgotos e lagoas de tratamento
- 1880's** Digestão anaeróbica de esgoto/ Filtragem Trickling para tratamento esgoto doméstico
- 1908** Stormer isola a bactéria *Bacillus hexavarbovorum* em virtude da habilidade em crescer utilizando tolueno e xileno
- 1914** Tratamento do lodo ativado de esgoto doméstico
- 1930's** Tratamento biológico de vários resíduos industriais
- 1972** Primeiro caso de biorremediação *in situ* - Richard Raymond em derramamento de gasolina. Patente do processo obtida em 1974

Quais as novidades ?

- Tecnologia e geração de novos compostos xenobióticos e recalcitrantes
- Complexidade do meio contendo compostos xenobióticos
 - Rejeitos industriais
 - Chorume
 - Contaminação subterrânea e lençol freático

Contaminantes frecuentemente encontrados

TABLE 1.13 The Most Common Hazardous Waste Occurrences

No. 1 Petroleum hydrocarbons

Major contaminants:

BTEX compounds

Benzene

Toluene

Ethylbenzene

Xylene

Aromatics

Heterocyclic aromatics

No. 2 Halogenated aliphatic compounds

Major contaminants:

Trichloroethylene

1,1,1-Trichloroethane

Tetrachloroethylene

cis-trans-1,2-Dichloroethylene

1,1-Dichloroethane

No. 3 Industrial waste lagoons and wood preservation

Major contaminants:

Creosote

Polynuclear aromatics

Pentachlorophenol

Nitrogen heterocyclic aromatics

Aromatics

TABLE 1.12 Chemical Compounds and Wastes That Have Been Bioremediated

Acetone	Industrial wastes
Acrylonitrile	Isopropyl acetate
Animal fats and grease	Methanol
Anthracene	Methylene chloride
Benzene	Methylethyl ketone
Benzo(a)pyrene	Methylmethacrylate
<i>t</i> -Butanol	2-Methylnaphthalene
Butylcellosolve	Monochlorobenzene
Chrysene	Naphthalene
Coal tar	Pentadecane
Crude oil	Petroleum hydrocarbons (miscellaneous)
2,4-D	Phenanthrene
1,2-Dichloroethane	Phenols
Diesel fuel	Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs)
Dodecane	Pyrenes
Ethylacrylate	Stoddard solvent
Ethylbenzene	Styrene
Ethylene glycol	Tetrahydrofuran
Fatty amines	Toluene
Fluoranthene	Trichloroethylene (TCE)
Gasoline	1-Tridecene
Hexadecane	Xylene
Hexane	

Quais compostos estão sendo biorremediados?

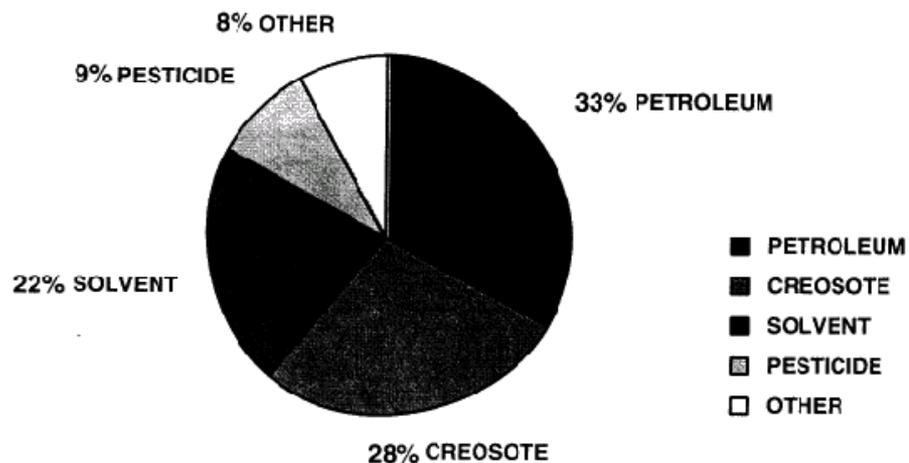


Figure 1.7 Major waste types remediated by bioremediation. (U.S. EPA/540/N-93/001.)

Requerimentos para biorremediação (biodegradação)

1. Existência do potencial catabólico.

Compostos xenobióticos podem ser biodegradados somente se organismos possuírem sistemas enzimáticos que catalizem e convertam o composto em metabólitos e produtos intermediários ou substratos de uso comum em outros processos metabólicos.

Quanto maior a diferença estrutural entre o composto xenobiótico e os constituintes de organismos vivos, menores as chances de biodegradação e transformação do xenobiótico ou menor a taxa de transformação.

TABLE 14.7

**Persistence of herbicides
and insecticides in soils**

Substance	Time for 75–100% disappearance
Chlorinated insecticides	
DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis-(<i>p</i> -chlorophenyl)ethane]	4 years
Aldrin	3 years
Chlordane	5 years
Heptachlor	2 years
Lindane (hexachlorocyclohexane)	3 years
Organophosphate insecticides	
Diazinon	12 weeks
Malathion	1 week
Parathion	1 week
Herbicides	
2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)	4 weeks
2,4,5-T (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid)	20 weeks
Dalapin	8 weeks
Atrazine	40 weeks
Simazine	48 weeks
Propazine	1.5 years

Requerimentos para biorremediação (biodegradação)

2. Presença do organismo no ambiente.

Ex.: Biodegradação do benzeno em condições metanogênicas são pontuais.

Requerimentos para biorremediação (biodegradação)

3. Composto deve estar acessível ao organismo (biodisponibilidade).

a) Aspectos físico-químicos.

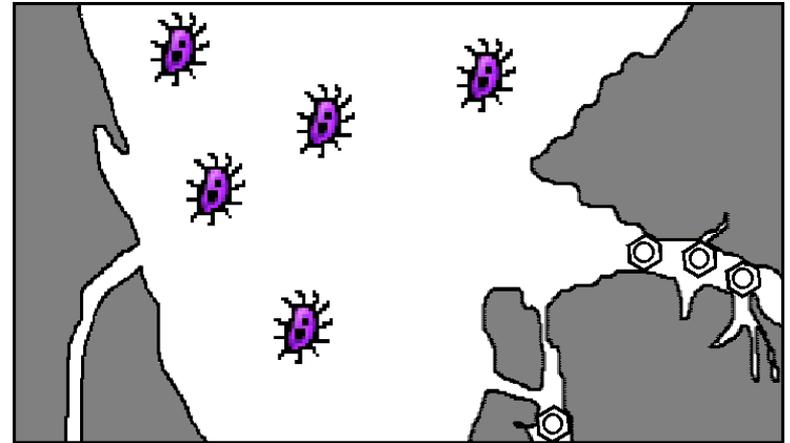
Desorção, dissolução, difusão, transporte de massa

b) Aspectos bioquímicos

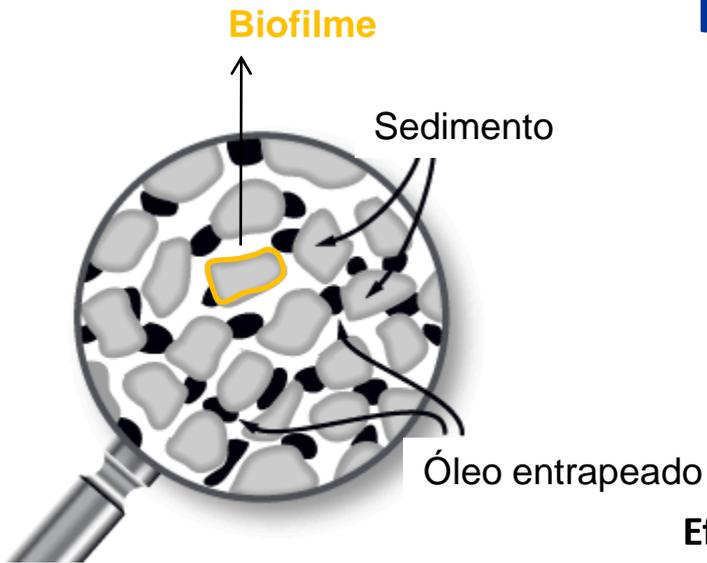
Permeabilidade da membrana (importante para enzimas intracelulares), biosurfactantes

Transferência de massa governa biodisponibilidade

- Dissolução da fase orgânica (e.g., NAPLs)
- Difusão pelos poros
- Desorção da superfície
- Transporte para o receptor
- Assimilação intracelular
- Tensão interfacial
- ***Qual destes fenômenos é limitante ao processo?***

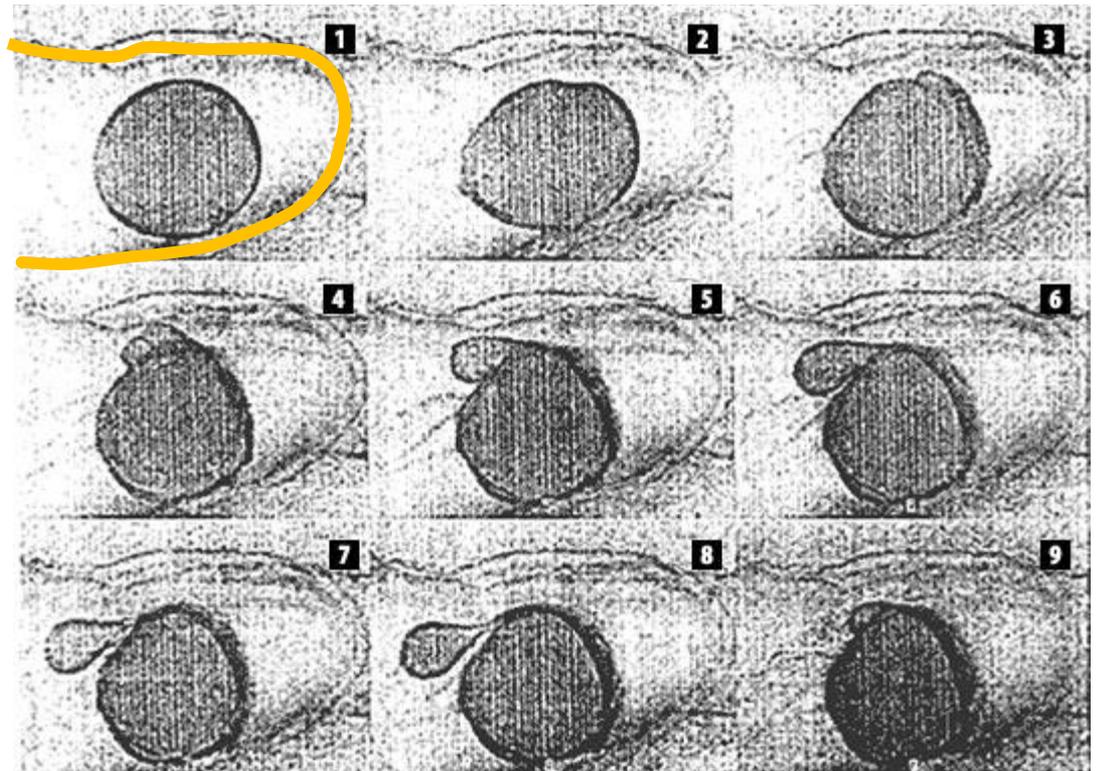


Recuperação avançada de petróleo por métodos microbiológicos (MEOR)



Efeito de biosurfactantes na solubilização/ biodisponibilidade

Biofilme

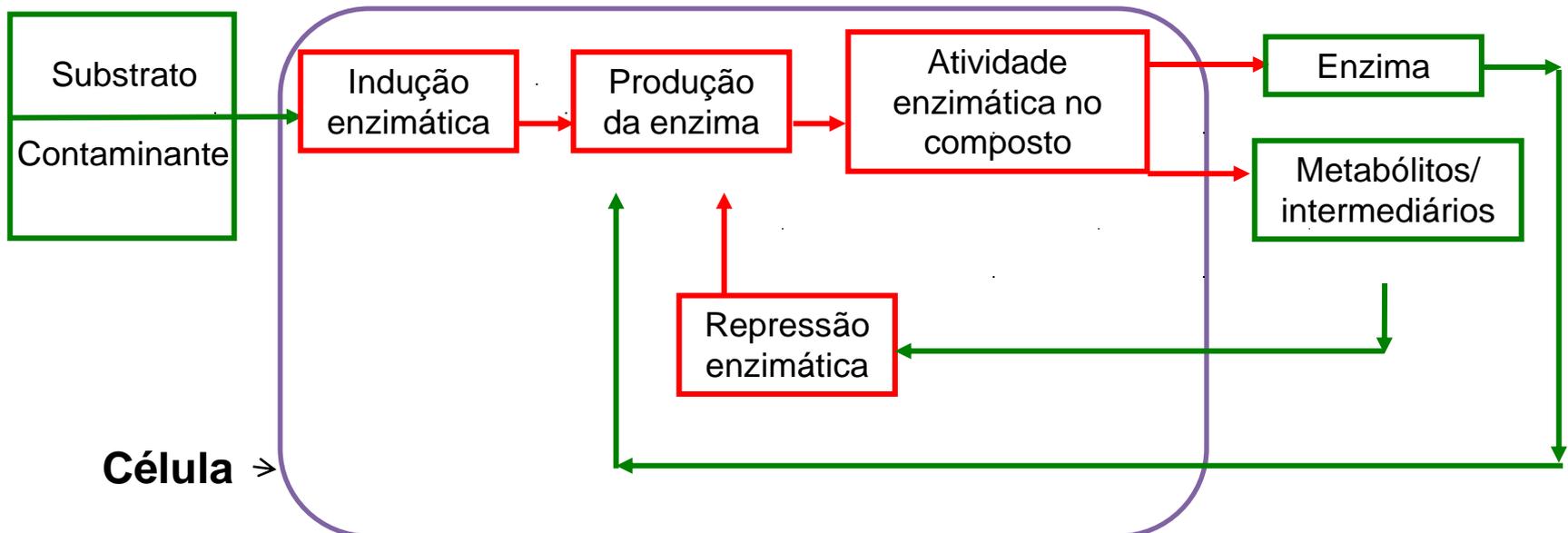


Requerimentos para biorremediação (biodegradação)

4. Se enzimas responsáveis não são constitutivas, estas devem ser induzidas – Plasmídeos e transferência de genes (TDO)

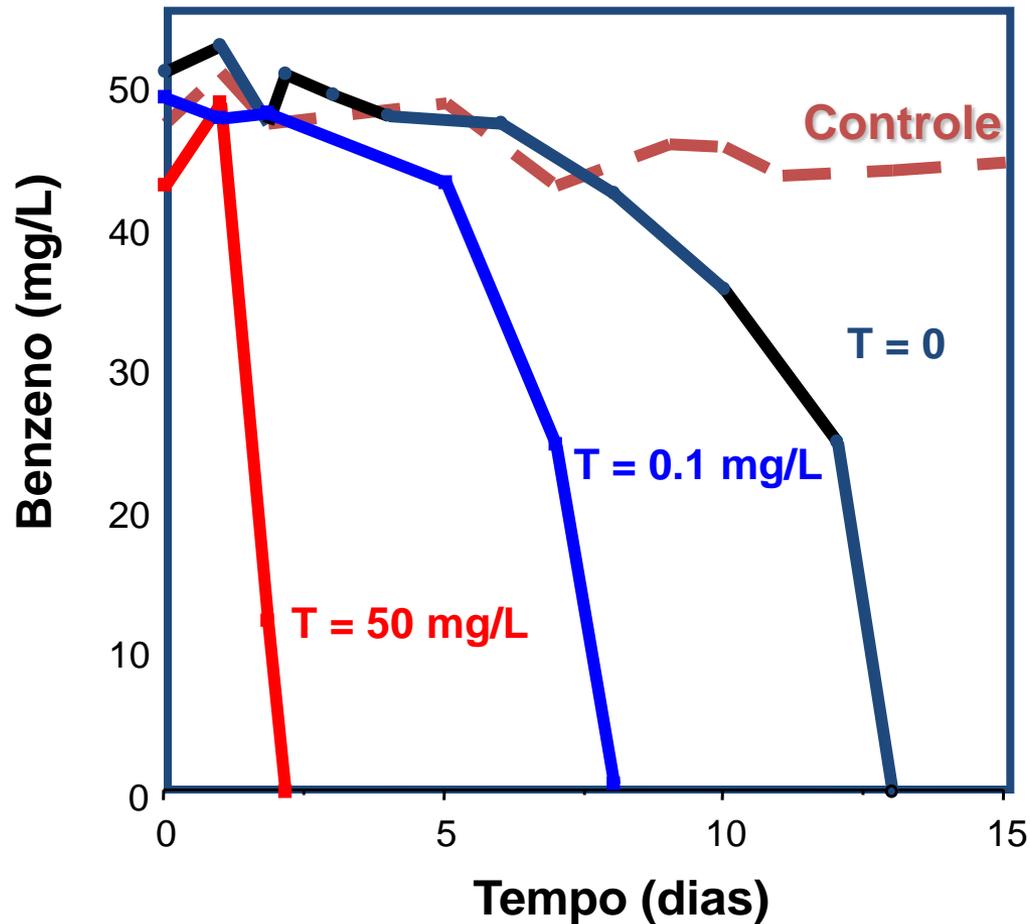
Indutor(es) devem estar presentes acima de uma concentração limite (e.g., $[T] > 50 \text{ ug/L}$)

Reação catalizada por microorganismo

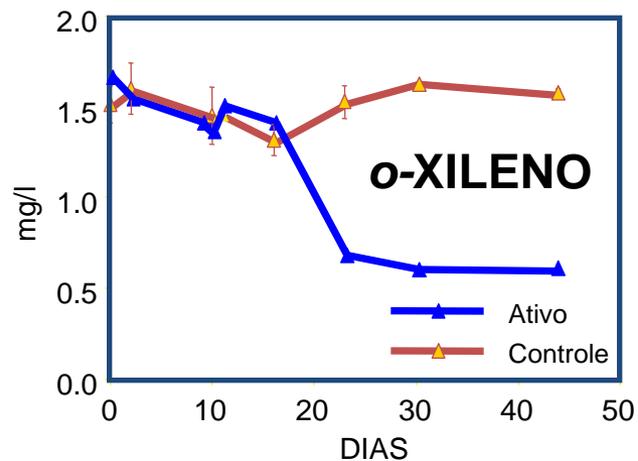
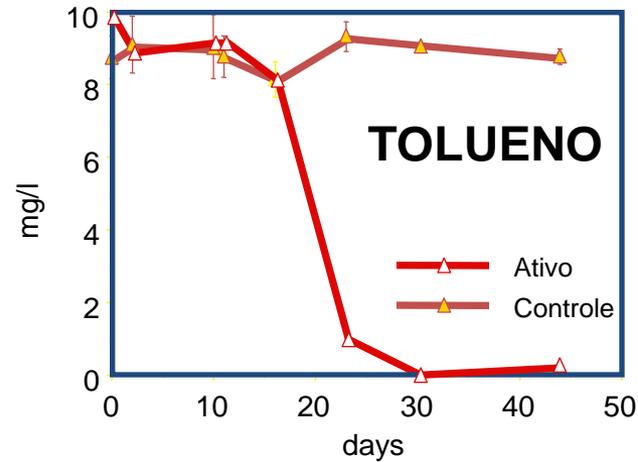


Biodegradação do benzeno por *Pseudomonas* CFS-215.

Indução enzimática pela presença do tolueno



Biodegradação cometabólica do *o*-xileno por redutoras de nitrato capazes de degradar tolueno

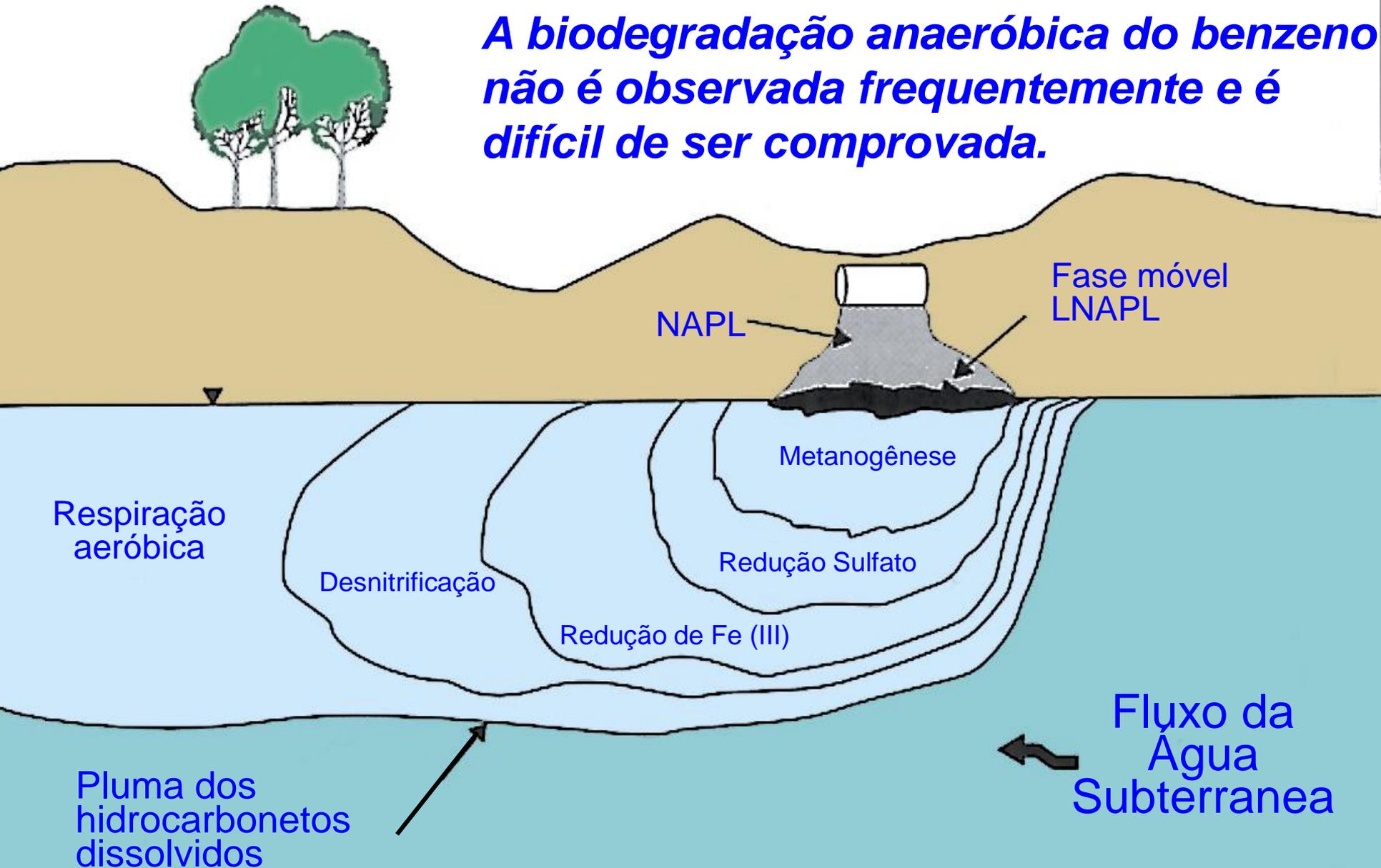


Requerimentos para biorremediação (biodegradação)

5. **Condições ambientais favoráveis ao crescimento das espécies e enzimas de interesse.**
 - a) *Presença do substrato que sirva como fonte de energia (anabolismo e catabolismo).*
 - b) *Presença de aceptores de elétrons (Respiração celular) e nutrientes (N, P). Exemplo, O_2 para reações oxidativas e H_2 para transformações redutoras. Os elétrons aceptores governam o metabolismo e as reações específicas.*
 - c) *Presença de água (80% da capacidade do solo ou 15% H_2O massa/massa) é ideal para remediação da zona não saturada do solo. Mínimo de 40% da capacidade do solo é recomendado.*

Aceptores de elétrons são utilizados em sequência. Aqueles com maior potencial de oxidação são utilizados preferencialmente:

A biodegradação anaeróbica do benzeno não é observada frequentemente e é difícil de ser comprovada.



Requerimentos para biorremediação (biodegradação)

5. Condições ambientais (continuação).

- d) Temperatura adequada (*taxa cinética dobra a cada $\Delta T = +10^{\circ}\text{C}$*).
- e) pH adequado (específico a cada espécie) (6-9).
- f) Ausência de substâncias tóxicas (*e.g., precipitação de metais pesados, diluição do contaminante, peróxido de hidrogênio*).
- g) Ausência de compostos preferencialmente biodegradáveis que não são alvo da biodegradação (*etanol na gasolina ?*).

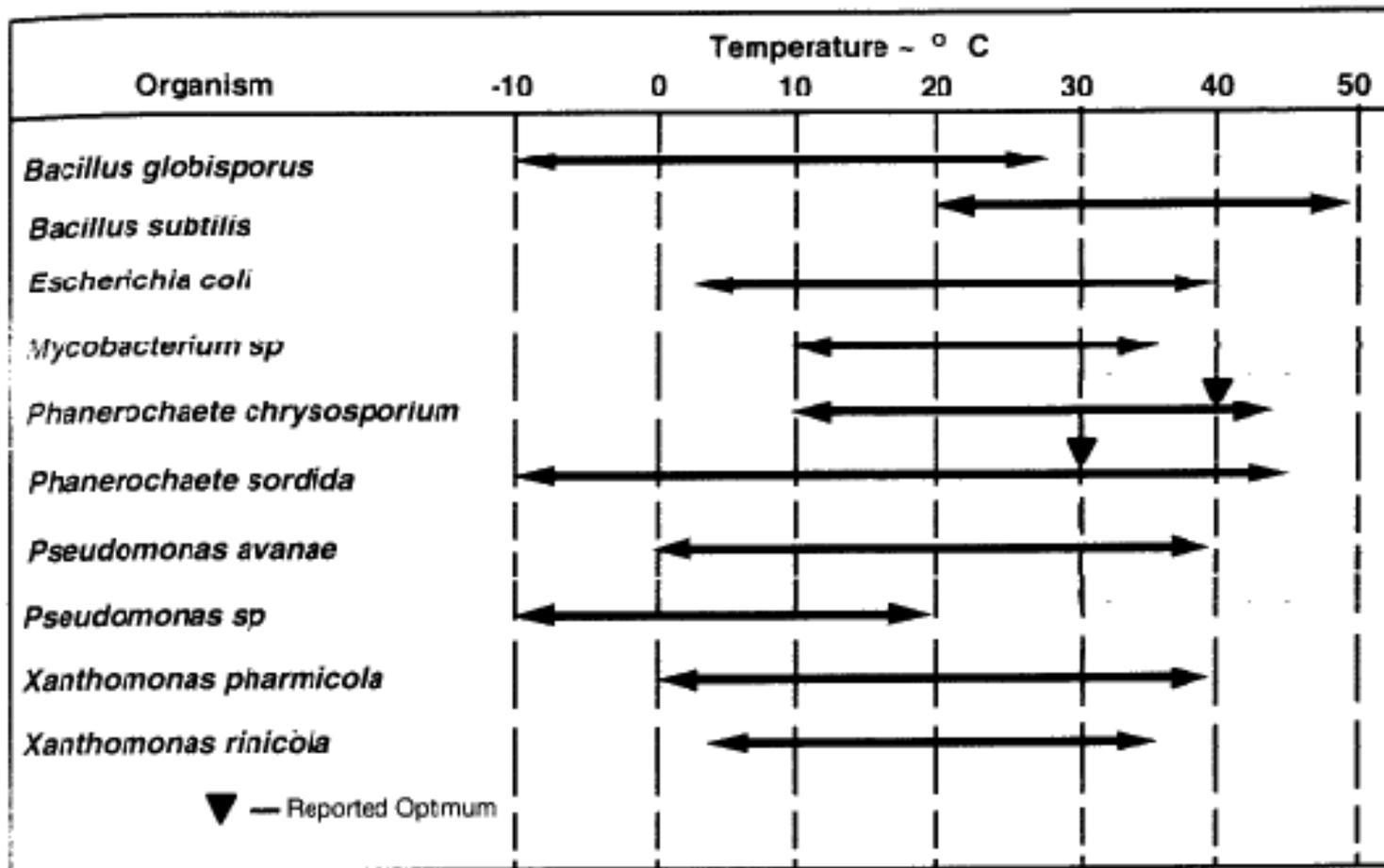


Figure 3.11 Temperature growth range of certain microorganisms. (Stanier, 1986; Heitkamp, 1988; Lamar, 1990.)

Requerimentos para biorremediação (biodegradação)

6. Tempo.

Sem intervenção humana (engenharia e biotecnologia), o tempo de meia-vida do benzeno na água subterrânea é > 100 dias nos casos mais favoráveis !

Biorremediação = taxa de remoção > taxa de migração do contaminante

Aclimação

Quando microorganismos são expostos ao xenobiótico, existe um tempo característico (lag) para adaptação e crescimento ou desenvolvimento de consórcio específico. Até atingir biomassa significativa, remoção do contaminante pode não ser observada por métodos analíticos.

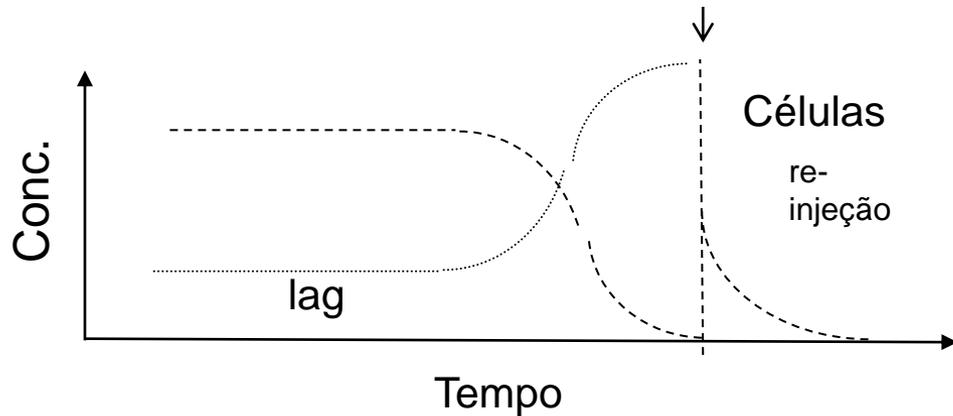


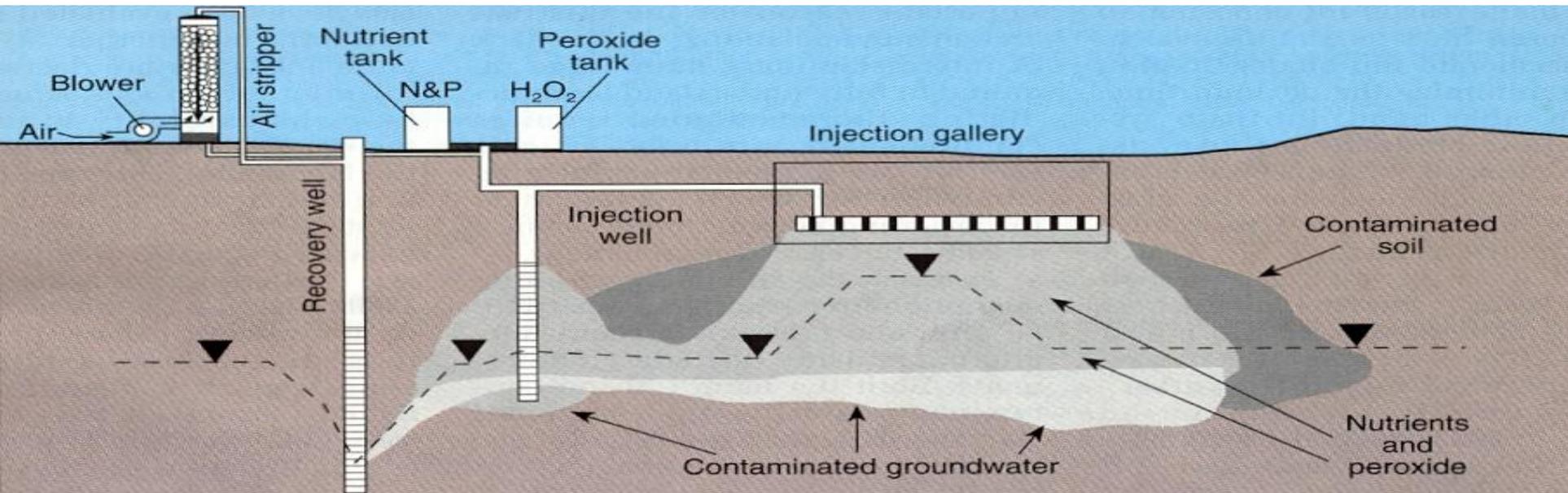
TABLE 3.1
Lengths of Acclimation Phases for Several Organic Compounds

Chemical	Environment	Length of acclimation phase	Reference
Several aromatics	Soil	10–30 h	Kunc and Macura (1966)
Dodecyltrimethylammonium chloride	Fresh water	24 h	Ventullo and Larson (1986)
4-Nitrophenol	Water–sediment	40–80 h	Spain and Van Veld (1983)
Amitrole	Soil	7 days	Riepma (1962)
Chlorinated benzenes	Biofilm	10 days–5 months	Bouwer and McCarty (1984)
DNOC	Soil	16 days	Hurle and Rademacher (1970)
PCF	Stream water	21–35 days	Pignatello <i>et al.</i> (1986)
Mecoprop	Enrichments	30–37 days	Lappin-Scott <i>et al.</i> (1986)
NTA	Estuary	50 days	Pfaender <i>et al.</i> (1985)
Halobenzoates	Sediment (anaerobic)	3 weeks–6 months	Linkfield <i>et al.</i> (1989)
2,4,5-T	Soil	4–10 weeks	Rosenberg and Alexander (1980)
Several	Groundwater	>16 weeks	Wilson <i>et al.</i> (1986)

Exemplos de engenharia de sistemas de biorremediação

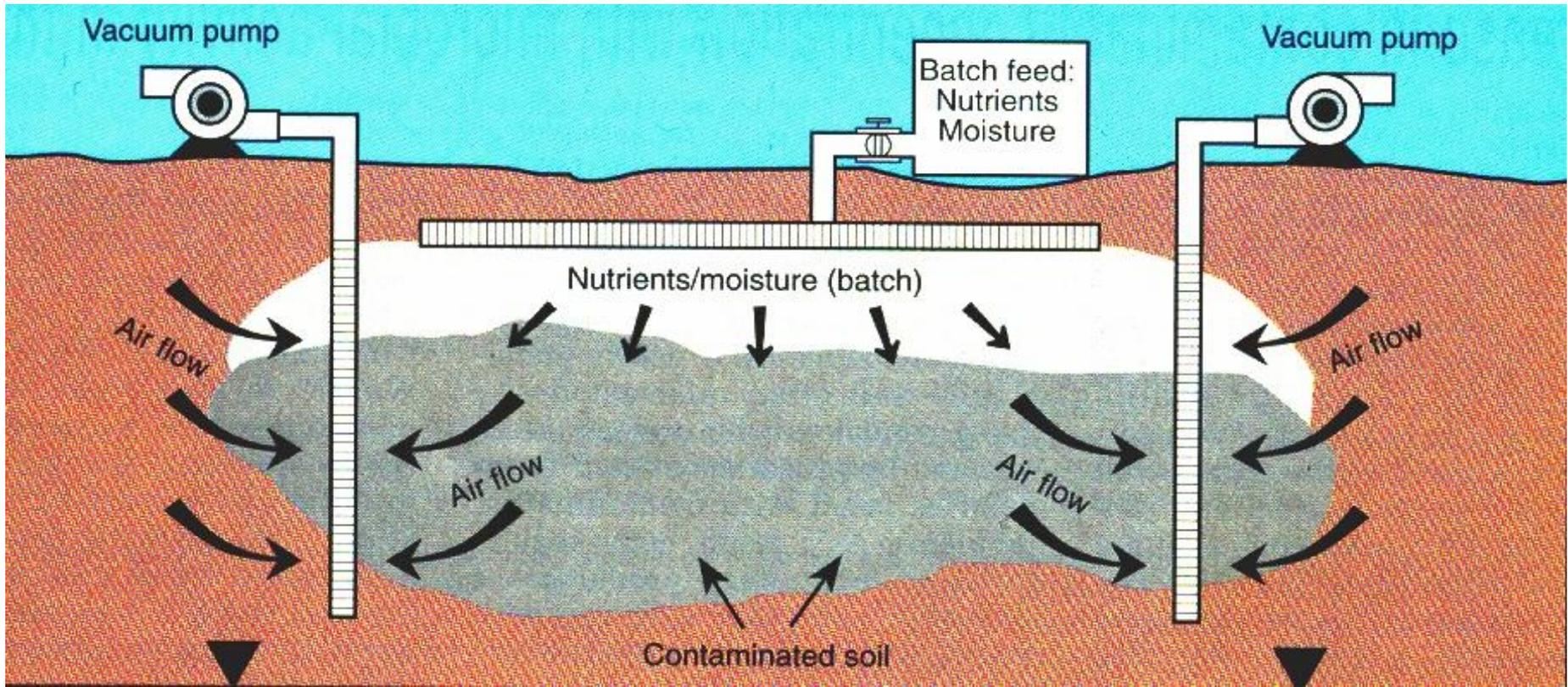
Sistemas de recirculação de água

- Biorremediar BTEX na zona saturada (Raymond)
- Água é extraída por bombeamento e tratada ex situ (carvão ativado, ou biodegradação), e reciclada ao sistema.
- Bioestimulação com nutrientes é possível.
- Entupimento perto dos poços de injeção e galerias de infiltração podem ser problemáticos (crescimento de biomassa, precipitação de minerais). Usando injeção em pulsos reduz entupimento (pode ser utilizado agentes como Cl_2 , H_2O_2).



Bioventing

- Usado para remediar aquíferos contaminados com pluma de BTEX localizada na zona não saturada
- Bombeamento de ar na zona não saturada
- Água é adicionada com nutrientes para prevenir ressecamento do solo e estimular biodegradação.



Air Sparging

- Injeção de ar comprimido diretamente na zona saturada contaminada para estimular biodegradação aeróbica. Remove vapores de BTEX na zona não saturada e sua captura por bombeamento.
- Pouco efetiva em solos de baixa permeabilidade, onde o solo prende ou desvia o fluxo de ar.

(c) A system for treating regions above and below the water table (air sparging)

