

PAULO HENRIQUE MULLER SARY

BIORREMEDIAÇÃO COMPARATIVA DE PETRÓLEO POR CONSÓRCIO
MICROBIANO EM BIORREACTORES STR E AIRLIFT

JOINVILLE

2012

PAULO HENRIQUE MULLER SARY

BIORREMEDIAÇÃO COMPARATIVA DE PETRÓLEO POR CONSÓRCIO
MICROBIANO EM BIORREACTORES STR E AIRLIFT

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Engenharia de
Processos na Universidade da Região de
Joinville - UNIVILLE.

Orientador: Dra. Andréa Lima dos Santos
Schneider

JOINVILLE

2012

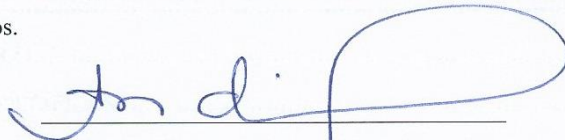
Termo de Aprovação

“Biorremediação comparativa de petróleo por consórcio microbiano em biorreatores STR e Airlift”


por

Paulo Henrique Muller Sary

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos, área de concentração Engenharia de Processos e Tecnologias Limpas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Engenharia de Processos.

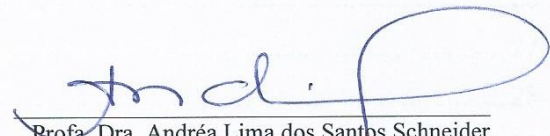


Prof. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
Orientadora (UNIVILLE)




Prof. Dra. Elisabeth Wisbeck
Coordenadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Processos (UNIVILLE)

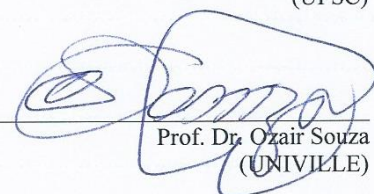
Banca Examinadora:



Prof. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
Orientadora (UNIVILLE)



Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
(UFSC)



Prof. Dr. Ozair Souza
(UNIVILLE)

Joinville, 20 de julho de 2012.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	7
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO.....	13
1 OBJETIVOS.....	15
1.1 OBJETIVO GERAL	15
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 HISTÓRICO DO PETRÓLEO	16
2.2 CONSTITUINTES DO PETRÓLEO	17
2.2.1 IMPUREZAS DO PETRÓLEO.....	20
2.3 ACIDENTES AMBIENTAIS	23
2.4 TÉCNICAS DE REMEDIAÇÃO	26
2.4.1 REMOÇÃO MANUAL/MECÂNICA	27
2.4.2 USO DE ADSORVENTES	28
2.4.3 CONTENÇÃO FÍSICA E RECUPERAÇÃO DO CONTAMINANTE.....	29
2.4.4 QUEIMA DO CONTAMINANTE NO LOCAL AFETADO.....	30
2.4.5 USO DE DISPERSANTES QUÍMICOS	31
2.4.6 BIORREMEDIAÇÃO.....	32
2.4.6.1 Limitações da Biorremediação	34
2.4.6.2 Bioestimulação	35
2.4.6.3 Bioaugmentação	37
2.4.6.4 Landfarming	40
2.4.6.5 Micro-organismos remediadores	40
2.5 REATORES.....	43
2.5.1 REATORES STR (STIRED TANK REACTOR).....	44
2.5.2 REATORES PNEUMÁTICOS.....	47
2.5.2.1 Reator de coluna de bolhas	47
2.5.2.2 Reatores Airlift	48
3 MATERIAL E MÉTODOS	52

3.1	CONSTRUÇÃO DO REATOR	52
3.2	MICRO-ORGANISMO	54
3.2.1	ENRIQUECIMENTO DOS MICRO-ORGANISMOS DE ESTUDO	55
3.2.2	ENRIQUECIMENTO SELETIVO DOS MICRO-ORGANISMOS DE ESTUDO (INÓCULO).....	56
3.2.3	INOCULAÇÃO PELA TÉCNICA DE ESGOTAMENTO	56
3.2.4	IDENTIFICAÇÃO DO CONSÓRCIO MICROBIANO ISOLADO	57
3.3	MEIOS DE CULTIVO E CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO	57
3.3.1	PREPARO DO MEIO DE CULTIVO	57
3.3.2	EXTRAÇÃO DO PETRÓLEO	58
3.3.3	CULTIVO SUBMERSO EM BIORREATOR	59
3.3.4	CRESCIMENTO CELULAR EM BIORREATOR	59
3.3.4.1	Crescimento celular conduzido no reator STR	59
3.3.4.2	Crescimento celular conduzidos em reator airlift de circulação interna.....	60
3.3.4.3	Ensaio de degradação de óleo	61
3.4	MÉTODOS ANALÍTICOS	62
3.4.1	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇUCARES REDUTORES TOTAIS.....	62
3.4.2	DETERMINAÇÃO DE CRESCIMENTO CELULAR.....	62
3.4.3	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE TPH POR CROMATOGRAFIA GASOSA	62
3.5	METODOLOGIA UTILIZADA NOS CÁLCULOS	63
3.5.1	CONCENTRAÇÃO DE MASSA SECA E DE AÇUCARES REDUTORES TOTAIS	63
3.5.2	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS.....	64
3.5.2.1	Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (KLa) em reator STR e airlift	64
3.5.2.2	Fator de conversão de glicose em células (YX/S)	66
3.5.2.3	Velocidade específica de crescimento (μ)	66
3.5.2.4	Produtividade celular máxima (PX)	66
3.5.2.5	Eficiência de remediação	67
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	68
4.1	IDENTIFICAÇÃO DO CONSÓRCIO MICROBIANO ISOLADO.....	68
4.2	CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO CONSÓRCIO MICROBIANO.....	69
4.3	AVALIAÇÃO DO USO DE SURFACTANTE E GLICOSE EM FRASCOS AGITADOS	73
4.4	BIODEGRADAÇÃO DO ÓLEO BRUTO EM REATOR STR E AIRLIFT	77
4.4.1	ENSAIOS CONDUZIDOS EM BIORREATOR STR	78
4.4.2	ENSAIOS CONDUZIDOS EM BIORREATOR AIRLIFT	80
5	CONCLUSÕES	84

PERSPECTIVAS.....	85
REFERÊNCIAS	86
ANEXOS	97

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Remoção manual do óleo.....	28
Figura 2: Aplicação de adsorventes (sólidos hidrofóbicos), em derramamento de óleo.	29
Figura 3: Barreira de contenção de óleo aplicada em acidentes ambientais.	30
Figura 4: Emissão gasosa no processo de queima em mar do óleo derramado.....	31
Figura 5: Mancha marrom de dispersão do óleo após adição de dispersante.....	32
Figura 6: Esquema reacional da dispersão do óleo, após a adição de surfactante.....	32
Figura 7: Estrutura do reator STR.	45
Figura 8: Reator de coluna de bolha.....	48
Figura 9: Configurações de biorreatores airlift mais conhecidas. (a) Tubo aerado central e loop interno ao sistema; (b) cilindro dividido e (c) loop externo do sistema.	49
Figura 10: Aspersores disponíveis para biorreatores airlift:(a) anel perfurado,(b) chuveiro, (c) cruzeta.....	50
Figura 11: Tampa de PVC e (b)Difusor de ar disposto na base do <i>riser</i>	52
Figura 12: Tubos de PVC utilizados na construção.	52
Figura 13: Projeto do biorreator <i>airlift</i> em AutoCAD.....	53
Figura 14: Projeto do Biorreator <i>airlift</i> em Rhinoceros.	54
Figura 15: Amostragem de solo.....	55
Figura 16: Cultivo submerso em frascos agitados com 150 min^{-1} e $30 \text{ }^\circ\text{C}$	58
Figura 17: Disposição dos aparatos na tampa do biorreator STR.	59
Figura 18: a) Fluxo descendente da coluna de ar; b) Fluxo de gás disperso por pedra porosa; c) Disposição dos aparatos na tampa do biorreator airlift.	60
Figura 19: Colônias do consórcio microbiano. Isoladas.....	68
Figura 20: Organização celular do consórcio microbiano.....	69
Figura 21: Gráfico de crescimento do consórcio microbiano em reator STR em meio caldo nutriente adicionado de glicose como substrato à uma concentração de 10 g.L^{-1} . O reator foi agitado em 250 min^{-1} e $3,0 \text{ vvm}$ (volume de ar por volume de meio) e $1,0 \text{ mL}$ polietilenoglicol para evitar a formação de espumas. O inóculo foi adicionada à uma taxa de $10\% \text{ (v/v)}$	70
Figura 22: Gráfico de crescimento do consórcio microbiano em reator Airlift em meio caldo nutriente adicionado de glicose como substrato à uma concentração de 10 g.L^{-1} . O reator foi agitado por meio da alimentação de oxigênio com razão de $3,0 \text{ vvm}$ (volume de ar por volume	

de meio) e 1,0 mL polietileno glicol para evitar a formação de espumas. O inóculo foi adicionada à uma taxa de 10% (v/v).....	71
Figura 23: Percentual de eficiência de biorremediação de petróleo, cultivado em caldo nutriente, 20 g.L ⁻¹ (m/v) de óleo bruto (petróleo) adicionado de glicose 10 g.L ⁻¹ e com ou sem a adição de 100 g.L ⁻¹ (m/v) de Tween 80 por consórcio microbiano.	74
Figura 24: Eficiência de biorremediação de petróleo, em cultivo submerso, em caldo nutriente, 20 g.L ⁻¹ (m/v) de óleo bruto (petróleo) adicionado de glicose 10 g.L ⁻¹ e com ou sem a adição de 100 g.L ⁻¹ (m/v) de Tween 80 por consórcio microbiano.	75
Figura 25: Biorreator STR, montado para experimento de degradação do petróleo.	78
Figura 26: Curva de biorremediação de petróleo e consumo de oxigênio dissolvido em reator STR.	79
Figura 27: Formação de gotículas de óleo no interior de reator.	81
Figura 28 Eficiência de remediação do petróleo.	81
Figura 29 Reator Airlift amostragem de 12 horas de cultivo.	82
Figura 30 Reator Airlift amostragem de 6 dias de cultivo.	82
Figura 31 Reator Airlift amostragem de 18 dias de cultivo.	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análises de petróleos de diferentes reservatórios.....	21
Tabela 2: Limitações da biorremediação.....	35
Tabela 3: Micro-organismos aplicados em biorremediações de diversos contaminantes	41
Tabela 4:Valores médio de Coeficiente de transferência de oxigênio (k_{La}), diferencial de biomassa (Δ_x)*, diferencial média de biomassa (Δ_{xm} **), fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$); a velocidade específica de crescimento (μ); e a produtividade celular (P_X). Para os reatores STR e airlift	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TPH: Total petroleum hydrocarbon (Hidrocarbonetos totais de petróleo)

PAH: Polycyclic aromatic hydrocarbon (Hidrocarboneto aromáticos policíclicos)

STR: stirred tank reactor (reator de tanque agitado)

DQO: Demanda química de oxigênio

pH: Potencial hidrogênioônico

DNS: ácido 3-5 dinitrossalicílico

FID: Flame Ionization Detector (Detector de Ionização de Chama)

X: concentração celular em massa seca (g.L^{-1})

m_0 : Massa seca da membrana filtrante sem células (g)

m_f : Massa seca da membrana filtrante com células (g)

V: Volume de amostra

Abs: unidade de absorção de energia medida em espectrofotômetro

S: concentração de substrato (g.L^{-1})

K_{La} : Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

C^* : concentração de oxigênio dissolvido na saturação (mmol.L^{-1})

C: concentração de oxigênio dissolvido no instante t (mmol.L^{-1})

VT: volume total do biorreator (L)

VR: Volume do tubo de subida do gás “riser” (L)

$Y_{X/S}$: fator de conversão de substrato em células (g.g^{-1})

d_X : diferencial da concentração celular (g.L^{-1})

d_S : diferencial da concentração de glicose (g.L^{-1})

μ : velocidade específica de crescimento (h^{-1})

P_X : produtividade celular ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

X_{\max} : concentração celular máxima (g.L^{-1})

t: tempo de cultivo (h)

ER(%): Eficiência de remediação medido em %

[]₀: Concentração inicial de óleo medido inicialmente ao teste de degradação

[]_t: Concentração no tempo “t” medida nos pontos de amostragem

RESUMO

O petróleo é uma das matérias-primas responsáveis pelo padrão de vida que a humanidade possui hoje. Entretanto as atividades decorrentes do seu manuseio podem impactar o meio ambiente como o vazamento que ocorreu no Navio Exxon Valdez em 1989 no Alasca. Com o intuito de remediar estes derramamentos diversas técnicas foram desenvolvidas para a remoção do petróleo, como o uso de adsorventes, a contenção física, a queima do óleo, o uso de dispersantes químicos e também a biorremediação. A biorremediação é uma tecnologia de tratamento que utiliza espécies microbianas para acelerar a remediação do poluente. Com o objetivo de contribuir para o desenvolvimento desta técnica este trabalho buscou estabelecer o tipo ideal de biorreator para propagação de consórcio microbiano isolado de solo contaminado por hidrocarbonetos. O consórcio microbiano foi amostrado em um solo conhecido contaminado com derivados de petróleo, onde os micro-organismos foram selecionados em caldo nutriente de glicose (10 g.L^{-1}) por 24 horas, seguido do enriquecimento seletivo desses micro-organismos em caldo nutriente acrescido de glicose (10 g.L^{-1}), petróleo a 0,1 % e surfactantes (Tween 80) a 0,5 %. O reator airlift apresentou uma produtividade de células de $0,118 \text{ g.L}^{-1}$, enquanto o STR $0,089 \text{ g.L}^{-1}$. Esta diferença é relacionada ao K_{La} do reator airlift que atingiu $119,37 \text{ h}^{-1}$ e o STR $25,34 \text{ h}^{-1}$. Com as mesmas condições de cultivo, os micro-organismos foram submetidos a testes de remediação. Foram utilizados frascos agitados, o airlift e o reator STR. O meio de cultivo foi composto por caldo nutriente, contendo glicose (10 g.L^{-1}), petróleo (2 %) e surfactante (10 %). Com o tempo de incubação de 20 dias, foram realizadas em frações de 2 dias e as amostras analisadas quanto ao teor de TPH. Para os frascos agitados, o consorcio microbiano atingiu uma eficiência média de 45 % de remoção do petróleo, enquanto que para o reator STR a eficiência de remediação atingiu 55 %. Já para o reator airlift não houve avaliação da eficiência devido à heterogeneidade do meio.

Palavras-chave: Biorremediação, consórcio microbiano, petróleo, reator airlift, reator STR, TPH, cultivo submerso, surfactante.

ABSTRACT

Oil is a commodity responsible for the standard of living that mankind has today. However the activities resulting from handling can impact the environment as the spill that occurred in the ship Exxon Valdez in Alaska in 1989 . In order to remedy these spills various techniques have been developed for removal of oil, such as the use of adsorbents, physical restraint, the burning of oil , the use of chemical dispersants and also bioremediation . The bioremediation is a treatment that uses technology to accelerate the microbial species remediation of pollutants. Aiming to contribute to the development of this technique this study sought to establish the ideal type of bioreactor for the propagation of microbial consortium isolated from soil contaminated by hydrocarbons. The microbial consortium was sampled in soil known to be contaminated with petroleum products, where the microorganisms were selected on nutrient broth glucose (10g.L^{-1}) for 24 hours, followed by the selective enrichment of these micro -organisms in nutrient broth plus glucose (10g.L^{-1}), 0.1 % oil and surfactant (Tween 80) 0.5 % . The airlift reactor showed a productivity of cells 0.118 g.L^{-1} , while the STR 0.089 g.L^{-1} . This difference is related to K_{La} airlift reactor which reached 119.37 h^{-1} and STR 25.34 h^{-1} . With the same culture conditions, the microorganisms were tested for remediation. Mixed flasks were used, the the airlift and reactor STR. The culture medium consisted of nutrient broth containing glucose (10g.L^{-1}), oil (2 %) and surfactant (10 %). With the incubation time of 20 days, were held in two days and fractions of the samples analyzed for TPH content. For shake flasks , the microbial consortium reached an average efficiency of 45 % removal of oil to the reactor while STR remediation efficiency reached 55 % . As for the airlift reactor there was no evaluation of the efficiency due to the heterogeneity of the medium.

Keywords: bioremediation, microbial consortium, oil, airlift reactor, reactor STR, TPH, submerged cultures, surfactant.

INTRODUÇÃO

A indústria do petróleo é certamente, a mais fantástica atividade produtiva organizada em toda a existência do ser humano. A sua utilização está registrada desde os tempos bíblicos (THOMAS, 2004). A utilização industrial deste organomineral foi registrada em 1859, com a perfuração de um poço de óleo no estado da Pensilvânia (LUCCHESI, 1998).

O petróleo é constituído basicamente, por uma mistura de compostos químicos orgânicos (hidrocarbonetos) da cadeia carbônica de tamanho variado sendo classificado como parafínicos, olefínicos, naftênicos, aromáticos e asfálticos (MCCAIN, 1990).

Na indústria petroleira em geral, pelo fato de ser de alto risco, a preocupação ambiental é muito maior. O histórico dos acidentes ambientais da indústria petrolífera iniciou em 1967 quando o petroleiro Torrey Canyon, liberou 119.000 toneladas de óleo cru no mar. Entretanto os pequenos vazamentos, como nos óleos dutos podem atingir cerca de 60 – 80 milhões de litros derramados por ano (TSALIK *et al.*, 2005). Como são frequentes, esses pequenos derramamentos podem ser mais prejudiciais do que os acidentes com petroleiros, pois expõem cronicamente plantas e animais à poluição pelo petróleo (SILVA, 2007).

Pelo motivo destes acidentes ambientais, constantemente estão se desenvolvendo técnicas de remediação de áreas contaminadas. São exemplos destas técnicas a remoção manual, o uso de adsorventes, a contenção física, a queima do contaminante no local afetado, o uso de dispersantes químicos e também a biorremediação.

A biorremediação é uma tecnologia de tratamento de poluentes que utiliza espécies microbianas para acelerar a remediação de poluentes ou sua transformação para formas menos tóxicas. Esta técnica pode ser aplicada “*in situ*”, para situações onde a contaminação é profunda, subterrânea ou sob construções, rodovias, etc, e também “*ex situ*”, que envolve a remoção e tratamento do material contaminado do seu local original (RATTEDGE & KRISTIANSEN, 2001).

Os estudos da biorremediação têm evoluído dia após dias, de forma que novas técnicas e melhores eficiências de tratamento são propostas com frequência. Novos micro-organismos capazes de decompor os compostos xenobióticos vêm sendo utilizados com eficácia.

A própria aplicação destes micro-organismos aliado as tecnologias da engenharia química, como os biorreatores STR e airlift, prometem alta produtividade celular, melhores eficiências de remediação e conseqüentemente o desenvolvimento de um método limpo de tratamento de resíduos.

Este trabalho buscou avaliar os biorreatores na melhor condição de crescimento de um consórcio de micro-organismos, isolados de um solo contaminado, potencialmente degradadores de petróleo e seus derivados.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

- Estabelecer o tipo ideal de biorreator para propagação de consórcio microbiano isolado de solo contaminado por hidrocarbonetos.

1.2 Objetivos Específicos

- Obter micro-organismos degradadores de petróleo a partir de solo contaminado;
- Determinar os parâmetros cinéticos de crescimento do consórcio de micro-organismos cultivados em reator STR e reator airlift;
- Determinar os parâmetros de transferência de massa dos biorreatores;
- Verificar o uso de petróleo como substrato, tendo glicose como co-substrato no crescimento microbiano e na degradação dos hidrocarbonetos;
- Avaliar a eficiência de degradação dos hidrocarbonetos por micro-organismos isolados em reator STR e airlift.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico do petróleo

A indústria do petróleo é, certamente, a mais fantástica atividade produtiva organizada em toda a existência do ser humano. Conhecimento empírico, ciência, tecnologia, engenharia, administração, finanças, são ferramentas essenciais, críticas para o desempenho das empresas petrolíferas. Estas indústrias mobilizam somas gigantescas de recursos econômicos e humanos para sustentar as operações de exploração e produção de óleo e gás, insumos industriais que marcaram indelevelmente o século XX e transformaram, de modo definitivo a vida da humanidade (THOMAS, 2004)

O óleo cru corresponde à fração líquida do petróleo, cuja composição é de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, compostos sulfidrilados, oxigenados e nitrogenados, e alguns metais dissolvidos em água (MACEDO *et al.*, 2003). A palavra petróleo vem do latim *petroleum*, *petrus*, pedra; óleo, *oleum*, do grego *petrelaion*, óleo da pedra. Sua formação tem origem orgânica, isto é, deriva da transformação de substâncias orgânicas, sobretudo da decomposição de organismos marinhos (ROMERO, 2008).

Geralmente, o petróleo depois de formado não se acumula na rocha na qual foi gerado – rocha geradora ou rocha matriz, mas migra sob ação de pressões no subsolo, até encontrar uma rocha porosa, de forma que, se cercada por uma rocha impermeável (rocha selante ou rocha capeadora), aprisiona o petróleo em seu interior. É a partir deste reservatório que o petróleo é extraído, desde que as condições de porosidade da rocha e a quantidade acumulada de material formem uma jazida comercial (KUNERT, 2001).

Segundo Thomas (2004) a utilização do petróleo pelo homem está registrada desde os tempos bíblicos. Na antiga Babilônia, os tijolos eram assentados com asfalto e o betume era largamente utilizado pelos fenícios na calefação das embarcações. Os egípcios utilizavam esse material para embalsamar os seus mortos. Já entre os povos pré-colombianos esse mesmo produto era pioneiramente empregado na pavimentação de estradas (SOUZA, 2011). No Novo Mundo, o petróleo era conhecido pelos índios pré-colombianos, que o utilizavam para decorar e impermeabilizar seus potes de cerâmica (THOMAS, 2004).

Mesmo com a histórica existência do petróleo, a pesquisa sistemática deste organomineral para utilização em bases industriais e comerciais foi iniciada na metade do século passado. O marco inicial foi a perfuração, em 1859, pelo coronel Edwin L. Drake, de um poço no estado da Pensilvânia, Estados Unidos, do qual fluiu petróleo de boa qualidade e de fácil destilação (LUCCHESI, 1998).

A medida que a sua utilização foi difundida, descobriu-se que a destilação do petróleo resultava em produtos que substituíam, com grande margem de lucro, o querosene obtido a partir do carvão e o óleo de baleia, que eram largamente utilizados para iluminação. Estes fatos marcaram o início da era do petróleo. Posteriormente, com a invenção dos motores a gasolina e a diesel, estes derivados até então desprezados, adicionaram lucros expressivos à atividade (THOMAS, 2004).

No Brasil, em meados do século passado, consumiam-se produtos combustíveis de animais como o óleo de baleia, mas a demanda não era grande devido à baixa e irregular distribuição para a população (LUCCHESI, 1998). Contudo, em 1930, o engenheiro agrônomo Manoel Inácio de Bastos, com base em relatos populares da utilização de uma “lama preta”, e em seus próprios experimentos, descobriu a existência de petróleo, em Lobato, bairro suburbano de Salvador (SOUZA, 2011).

A partir de 1953, no governo de Vargas, foi instituído o monopólio estatal do petróleo com a criação da Petrobrás, que deu partida decisiva nas pesquisas do petróleo brasileiro. Desde a sua criação, já foram descobertos poços de petróleo nos estados de Amazonas, Pará, Maranhão, Ceará, Rio Grande do Norte, Alagoas, Sergipe, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná, São Paulo e Santa Catarina. Desde então a produção de petróleo no Brasil cresceu de 750 mil litros diários na época da criação da empresa para mais de 321,47 milhões de litros diários (GLOBO, 2012), graças aos contínuos avanços tecnológicos de perfuração na plataforma continental (THOMAS, 2004).

2.2 Constituintes do petróleo

O petróleo é constituído basicamente, por uma mistura de compostos químicos orgânicos (hidrocarbonetos). Quando a mistura contém maior porcentagem de moléculas pequenas seu estado físico é gasoso (gás natural) e quando a mistura contém moléculas maiores seu estado físico é líquido, nas condições normais de temperatura e pressão (THOMAS, 2004).

O gás natural, hidrocarboneto derivado do petróleo no estado gasoso é uma mistura de hidrocarbonetos leves que ocorrem naturalmente, acompanhados de alguns compostos inorgânicos. O gás natural é encontrado principalmente em reservatórios secos de óleo. Além destes gases no estado natural, também há os gases associados, que por outro lado, estão em contato com e/ou dissolvidos no óleo cru e são co-processados juntamente com este. O principal componente da maioria dos gases naturais é o metano, enquanto que moléculas de hidrocarbonetos lineares não ramificados de maior peso molecular ($C_2 - C_7$) estão usualmente presentes em pequenas quantidades na mistura do gás (HATCH & MATAR, 2000).

O petróleo cru é classificado quimicamente de acordo com o maior número de moléculas da mistura. Os métodos de classificação usam combinações das palavras parafínicos, olefínicos, naftênicos, aromáticos e asfálticos (MCCAIN, 1990).

Os hidrocarbonetos saturados, também conhecidos como alcanos ou parafínicos (do latim *parafine*, “pequena atividade”, por serem comparativamente inertes), possuem a fórmula geral C_nH_{2n+2} . Os alcanos (n-alcanos, n-parafínicos) são hidrocarbonetos de cadeia linear sem ramificações. Estes compostos são facilmente determinados pela técnica de cromatografia por meio da análise de TPH (Total Petroleum Hydrocarbon). Existem também os alcanos não ramificados, que possuem o mesmo número de átomos de carbono e hidrogênio, como os n-alcanos, são chamados de isômeros. Com o aumento do número molecular dos hidrocarbonetos, o seu respectivo número de isômeros também aumenta, como por exemplo, uma molécula iso-parafínica, é um isômero contendo um grupo metila ligado ao segundo carbono da cadeia linear. O petróleo possui o mais variado número de cadeia, tanto pequenas, quanto médias e grandes (HATCH & MATAR, 2000).

Os hidrocarbonetos insaturados, também denominados de olefinas, também presentes no petróleo bruto, possuem pelo menos uma dupla ou tripla ligação carbono-carbono. Estes hidrocarbonetos, dos quais, os mais comuns são os alcenos, apresentam a fórmula geral C_nH_{2n} . Este grupo de hidrocarbonetos insaturados é extremamente reativo. Por serem biologicamente metabolizados em grande quantidade, dificilmente são preservados na natureza (THOMAS, 2004).

Os hidrocarbonetos cíclicos saturados, normalmente conhecidos como naftênicos (por se encontrarem na fração de petróleo denominada nafta), também fazem parte dos constituintes orgânicos do petróleo. A sua concentração no óleo depende do tipo de petróleo extraído (HATCH & MATAR, 2000). As cicloparafinas ou naftas são classificadas desta forma por meio de sua cadeia do tipo fechada e saturada, podendo também conter ramificações. As estruturas naftênicas que predominam no petróleo são os derivados do ciclopentano e do ciclohexano. Em vários tipos de petróleo podem-se encontrar compostos naftênicos com 1, 2 ou 3 ramificações parafínicas como constituintes principais. Em certos casos, podem-se ainda encontrar compostos naftênicos formados por dois ou mais anéis conjugados ou isolados (NETO & GURGEL, 2008)

Os compostos aromáticos de menor massa molecular estão presentes em pequenas quantidades no petróleo bruto e em outras frações leves do óleo. Os compostos aromáticos mononucleares mais simples como o benzeno (C_6H_6), tolueno (C_7H_8) e xileno (C_8H_{10}) são todos compostos aromáticos encontrados em concentrações variáveis no óleo cru (HATCH & MATAR, 2000). Ao contrário dos compostos insaturados, esses hidrocarbonetos aromáticos leves possuem considerável estabilidade e, devido ao seu pronunciado odor, todos os compostos que contêm o anel benzeno são conhecidos como hidrocarbonetos aromáticos. Nesta classe de hidrocarbonetos, pode ocorrer a presença de compostos aromáticos formados por mais de um anel benzênico, que podem estar isolados, conjugados ou condensados. A determinação destes compostos é facilmente realizada por meio da análise de PAH (Polycyclic aromatic hydrocarbon) em cromatografia. Podem ainda existir compostos mistos, isto é, que apresentam núcleo aromático e radical naftênicos, ou núcleo naftênicos e radical aromático (THOMAS, 2004).

Compostos aromáticos binucleares são encontrados em frações mais pesadas, em comparação aos naftalenos. Outros compostos trinucleares e hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, em combinação com compostos heterocíclicos, são os constituintes mais abundantes do petróleo pesado e dos resíduos do petróleo (HATCH & MATAR, 2000).

A última classe de constituintes é dos asfaltenos. Técnicas de infravermelho e ressonância magnética nuclear mostraram que as macromoléculas asfálticas são constituídas por anéis aromáticos policondensados ligados a cadeias cíclicas e alifáticas, geralmente apresentando grupos funcionais ácidos e básicos, contendo oxigênio, enxofre e nitrogênio. Devida a ampla faixa de peso molecular reportada para os asfaltenos, sugere-se que os mesmos existam no petróleo sob duas formas: (1) dissolvidos, sob a forma de moléculas livres; (2) dispersos coloidalmente, sob a forma de partículas estabilizadas por resinas que se adsorvem sobre as suas superfícies, mantendo-os suspensos no meio (SOUSA, *et al*, 2001).

2.2.1 Impurezas do petróleo

O petróleo, além dos compostos já descritos, de apreciável importância comercial, também possui diversas impurezas, que podem aparecer em toda faixa de ebulição do petróleo, mas tendem a se concentrar nas frações mais pesadas (THOMAS, 2004).

O nível de contaminantes presentes nos óleos correspondem diretamente às características históricas dos ambientes onde foram gerados (Tabela 1). Para tanto, dependendo da pressão e do local em que se encontra o petróleo acumulado, é comum encontrar gás natural ocupando as partes mais altas do interior do reservatório, petróleo na parte intermediária e a água salgada ocupando as partes mais baixas. Isto ocorre muito em função da diferença de densidade e imiscibilidade entre as fases (THOMAS, 2004).

Tabela 1: Análises de petróleos de diferentes reservatórios.

	Petróleo Árabe extra leve	Petróleo Egípcio - Alameen	Petróleo Árabe pesado	Petróleo Egípcio - Bakr-9
Resíduos de Carbono (m%)	2,00	5,10	6,80	11,70
Concentração de enxofre (m%)	1,10	0,86	2,80	3,80
Concentração de Nitrogênio (m%)	0,04	0,12	0,15	-
Concentração de Cinzas (m%)	0,002	0,004	0,012	0,04
Ferro (ppm)	0,40	0,00	1,00	-
Níquel (ppm)	0,60	0,00	9,00	108,00
Vanádio (ppm)	2,20	15,00	40,00	150,00
Ponto de Fluidez (°F)	0,00	35,00	-11,00	55,00
Concentração de ceras parafínicas (m%)	-	3,30	-	-

Fonte: HATCH & MATAR, 2000.

Dentre os contaminantes mais indesejáveis, a água, é sem dúvida, a que causa maiores dificuldades para ser removida, principalmente devido à quantidade ou a forma (emulsionada) em que pode estar presente na fase líquida (KUNERT, 2001).

Segundo Kunert (2001), a água pode causar diversas dificuldades no processo produtivo, como por exemplo:

- Apresenta sais em sua composição, que podem provocar a corrosão e a formação de depósitos inorgânicos nas instalações de produção, transporte e refino;
- As emulsões de petróleo e água apresentam viscosidade muito superior a do petróleo desidratado e afetam as operações de elevação e escoamento.

Dentre os contaminantes presentes no óleo cru o enxofre é o terceiro elemento mais abundante encontrado no petróleo, e sua concentração média é de 0,65% em peso, com uma faixa apresentando valores entre 0,02 e 4,00%. O enxofre ocorre no petróleo nas formas de sulfetos, polissulfetos, benzotiofenos e derivados, moléculas policíclicas com nitrogênio e oxigênio, gás sulfídrico, dissulfeto de carbono, sulfeto de carbonila e enxofre elementar. Tais compostos estão presentes em todos os tipos de petróleo e, em geral, quanto maior a densidade do petróleo, maior será o seu teor de enxofre (THOMAS, 2004).

Petróleos “azedos” possuem uma alta percentagem de sulfetos de hidrogênio. Por causa de diversos compostos orgânicos sulfurados, instáveis termicamente, o sulfeto de hidrogênio é produzido durante o processamento do petróleo. Óleos com altos teores de enxofre são indesejáveis por que os tratamentos para sulfetos de hidrogênio ácidos aumentam os custos de produção (HATCH & MATAR, 2000).

Os compostos nitrogenados são outra classe de constituintes considerados impurezas. Estes possuem uma concentração média de 0,17% em peso, onde a maior concentração se encontra nas frações pesadas. São compostos termicamente estáveis e encontram-se principalmente na forma orgânica. São exemplos de compostos nitrogenados, a piridina, quinolinas, pirróis, compostos policíclicos contendo nitrogênio. Estes são indesejáveis na produção, pois aumentam a capacidade dos óleos em reter água em emulsões, tornando instáveis os produtos de refino, além de contaminar catalisadores (NETO & GURGEL, 2008).

Como os compostos nitrogenados, os oxigenados, aparecem no petróleo de uma forma mais ou menos complexa, tais como ácidos carboxílicos, fenóis, cresóis, ésteres, amidas, cetonas e benzofuranos. De um modo geral, eles tendem a se concentrar nas frações mais pesadas e são responsáveis pela acidez e coloração (ácidos naftênicos), odor (fenóis), formação de gomas e corrosividade das frações do petróleo (THOMAS, 2004).

No petróleo também estão presentes os contaminantes metálicos. Estes minerais encontram-se tanto na forma de sais metálicos dissolvidos na água emulsionada ao petróleo, quanto com compostos complexos concentrados nas frações mais pesadas do petróleo. Os metais mais encontrados são o ferro, zinco, cobre, chumbo, molibdênio, cobalto, manganês, mercúrio, cromo, sódio, níquel e vanádio (NETO & GURGEL, 2008).

Quando o óleo cru é processado, cloretos de sódio e magnésio produzem ácido clorídrico. O vanádio e níquel são venenosos para diversos catalisadores e devem ser removidos para níveis baixos. O processo de extração por solvente é usado para reduzir a concentração dos metais pesados nos resíduos do petróleo (HATCH & MATAR, 2000).

Mesmo depois dos contaminantes terem sido removidos do petróleo, o descarte destes materiais devem estar de acordo com as legislações estaduais e federais, pois segundo o Art. 24 da Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 357 de 2005, “os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água, após o devido tratamento e desde que obedeçam às condições, padrões e exigências dispostos nesta resolução e em outras normas aplicáveis”.

O descarte inadequado da água produzida juntamente com a extração do petróleo implica em efeitos nocivos ao meio ambiente, devido a necessidade de recuperação da área degradada, em custo elevado com ações corretivas e mitigadoras e com penalidades diversas (SILVA, 2000).

2.3 Acidentes ambientais

Na indústria petroleira em geral, pelo fato de ser de alto risco, a preocupação ambiental é muito maior. Um dos maiores danos ambientais que podem acontecer são os grandes derrames de petróleo. Os impactos que este tipo de acidente pode causar são dos mais diversos, e abrangem desde danos econômicos até a inutilização de regiões turísticas. Cada derrame produz um tipo de impacto sobre o meio marinho dependendo das condições ambientais, do tipo de óleo, do volume e do ecossistema atingido (SZEWCZYK, 2006).

Os produtos gerados a partir do petróleo são alguns dos maiores contribuintes para o nosso padrão de vida. As atividades de encontrar e produzir petróleo, entretanto, pode impactar o meio ambiente e os maiores impactos surgem por meio de descartes de resíduos no meio ambiente em concentrações que não são normalmente encontradas. Esses descartes incluem hidrocarbonetos, sólidos contaminados com hidrocarbonetos, água contaminada com uma variedade de sólidos suspensos ou dissolvidos e uma ampla variedade de produtos químicos (REIS, 1996).

Esses descartes são uma consequência do avanço tecnológico sem preocupações ecológicas, que provocaram frequentemente alteração dos elementos naturais, causando por vezes, situações irreversíveis, aniquilando-se bens essenciais à preservação das espécies (COELHO, 2002). No processamento do petróleo, existe uma ampla gama de operações que envolvem desde a extração da matéria-prima, o seu transporte, sua transformação e distribuição, os quais geram resíduos, com alto potencial de influência ao meio ambiente (REIS, J. C, 1996).

No Brasil, o primeiro grande episódio conhecido ocorreu em agosto de 1974, quando o petroleiro Takimya Mary chocou-se com uma rocha no Canal de São Sebastião, litoral norte de São Paulo, causando o vazamento aproximado de 6.000 toneladas de óleo. Um ano após este acidente, em 1975, ocorreu o acidente com o navio Tarik Ibn Zyaid, envolvente o derramamento do mesmo volume de óleo na Baía de Guanabara (CETESB, 2011).

O histórico dos acidentes ambientais iniciou em 1967, quando o petroleiro Torrey Canyon, encalhado entre a zona costeira de Inglaterra e da França, liberou 119.000 toneladas de óleo cru, causando mortandade de aves e prejuízos à pesca e ao turismo (SILVA, M. G., 2007).

Em 24 de março de 1989, o Navio Exxon Valdez, foi responsável por derramamento de petróleo na costa do Alasca. Este em rota de Valdez, no Alasca para Los Angeles, Califórnia, encalhou no recife de Bligh na região do Estreito do Príncipe William, derramou cerca de 20% da sua carga de 53 milhões de galões de petróleo nas seis primeiras horas. Oito dos onze tanques a bordo foram danificados e o petróleo derramado impactaria mais de 1.770 Km da costa do Alasca (CLEVELANDO, 2011).

O acidente do Exxon Valdez é mundialmente conhecido, não pela quantidade de óleo despejado, mas sim pelo impacto causado à biota. Um agravante à mortandade das aves foi que o derramamento ocorreu no início da temporada de migração das aves. Isto acarretou a morte de mais de 350.000 de aves. Somando ao número de animais mortos, mais de 5.500 lontras do mar, 200 focas, também quantidades incontáveis de peixes além das baleias que tiveram de ser sacrificadas por terem sido afetadas pelo derramamento (NOAA, 1992). O frio da região dificultou muito as atividades de remoção e remediação das áreas afetadas.

Outro grande acidente com derramamento de petróleo, com graves consequências ambientais, aconteceu no final de novembro de 2002, com o afundamento de um petroleiro na costa da Espanha, que transportava mais de 77 mil toneladas de óleo. O navio Prestinge, das Bahamas, afundou a 250 quilômetros da região da Galícia. O vazamento atingiu praias e as encostas da Espanha e segundo as organizações ambientais, mais de 15 mil pássaros foram afetados (SBPC/Labjor, 2011).

Com tantos acidentes já presenciados na história do petróleo, os derramamentos não são a única forma de contaminação do ambiente por meio deste produto. Entre as etapas para extração do petróleo, a fase de perfuração consistiu em uma etapa com elevado risco de contaminação ambiental. Desde 1979, a Petrobrás estabeleceu muitas marcas em perfuração e produção em águas profundas. Na Bacia de Campos, atingiu a perfuração 185 metros. Em 1992, ela estabeleceu outro recorde de produção em águas profundas, perfurou e completou o poço Marlim-9, em 780 metros. Em 1994, a Petrobrás quebrou seu próprio recorde ao produzir o Marlim-4, em 1.027 metros (AGUIAR, 2010). Atualmente estão sendo realizados investimentos para extrações de petróleo na camada do pré-sal a uma profundidade de mais de 6.000 metros (VEJA, 2012).

Embora essa nova tecnologia de perfuração de poços de petróleo permita atingir rochas em águas profundas, alguns desafios são encontrados, como baixos gradientes de fratura das formações, elevadas perdas de carga por fricção na linha do choque e alta permeabilidade das formações. Além disso, durante a perfuração de um poço pode ocorrer o influxo indesejável de fluidos, ou seja a situação pode evoluir para uma erupção dos fluidos para fora do poço (AVELAR& RIBEIRO, 2004).

Em abril de 2010, uma plataforma de extração de petróleo Deepwater Horizon, no Golfo do México, operada pela British Petroleum (BP), explodiu e afundou, matando 11 profissionais. Com o acidente, foi gerado um vazamento de óleo a uma profundidade de cerca de 1,5 mil metros. Para conter o vazamento a petroleira britânica realizou diversas tentativas frustradas na contenção do vazamento de óleo, que chegou a 60 mil barris de petróleo diários. Somente no dia 16 de julho, a petroleira britânica afirma ter tido sucesso na contenção do vazamento. De acordo com a petroleira, teria sido despejado o equivalente a 4,9 milhões de barris de petróleo no frágil ecossistema do Golfo do México. Os resultados deste vazamento podem ser previstos devido à experiência já adquirida anos atrás, entretanto com à magnitude do derramamento, novas surpresas podem ser esperadas.

Para entender a magnitude do desastre no Golfo do México, os reflexos deste acidente foram sentidos a milhares de quilômetros, mais especialmente no Rio de Janeiro (LOBO, 2011). Esta possibilidade de contaminação das praias cariocas deixou evidente que à mais de dez anos está parado o Plano Nacional de Contingência (PNC), fundamental para que o país esteja preparado para acidentes como esse (MELLO, 2005).

Aproximadamente 1,48 milhões de toneladas por ano ou 62% do total anual de poluição de óleo no mar são provenientes de atividades em terra. Apenas 10% (7% nas operações e 3% de acidentes) vêm dos navios petroleiros, uma percentagem que diminuiu drasticamente nas últimas décadas (SILVA, 2007).

O aumento de consumo dos derivados do petróleo para as necessidades de energia resultou em um aumento de descargas acidentais de petróleo e seus derivados no meio ambiente. Isso ocorre com certa frequência durante as operações como extração, transporte, armazenamento, refino e distribuição. As contaminações antropogênicas advêm de refinarias e de outros efluentes costais importantes, causando poluição crônica nas cidades costeiras em volta do mundo. As descargas de reservatórios, navios, da exploração fora da costa e das plataformas de produção são essencialmente episódios e ocorrem como derramamentos e descargas de vários tamanhos diferentes (CEITA, 2009).

Em vários países às explorações de petróleo, solos são contaminados com petróleo bruto quase que mensalmente, como resultado do uso de tecnologia de exploração obsoletas. No México, entre 1993 e 1998, ocorreram 686 vazamentos (CIMADES, 1999)

Os vazamentos em oleodutos são uma das causas comuns dos derrames de petróleo. Por exemplo, em 1997 os derramamentos provenientes de oleodutos foram duas vezes mais comuns do que derramamentos provenientes de petroleiros (ETKIN, 1999).

A grande maioria dos derrames de oleodutos é pequena se comparada a desastres ocasionados por navios-tanque, que podem lançar entre 40.000 e 4 milhões de litros de óleo, mas esses “pequenos” derramamentos podem atingir cerca de 60 – 80 milhões de litros derramados por ano (TSALIK *et al.*, 2005). Como são frequentes, esses derramamentos podem ser mais prejudiciais do que os acidentes com petroleiros, pois expõem cronicamente plantas e animais à poluição pelo petróleo (SILVA, 2007).

Os impactos negativos ao ambiente causados por estes vazamentos compreendem, de maneira geral, não apenas a contaminação de solos, subsolos, corpos de água e os danos aos vegetais e animais presentes nas proximidades dos dutos, mas também abrangem a movimentação de terra, a supressão vegetal e o impacto a micro e macro fauna associada, durante os trabalhos de reparo na faixa dos dutos (SILVA, 2007).

Devido a todos os danos já causados por derramamento de óleo bruto, tanto em água quanto em terra, foi necessário o desenvolvimento de diversas tecnologias de tratamento/remediação das áreas afetadas.

2.4 Técnicas de remediação

Entende-se por remediação as técnicas aplicadas para retirar ou diminuir a concentração de contaminantes nos solos ou águas.

Para um processo de limpeza em áreas contaminadas, um importante passo a ser seguido é avaliar o seu potencial de impacto à saúde do ser humano e ao meio ambiente antes de se iniciar a remediação. A avaliação da área também auxilia na determinação do método de remediação a ser aplicado (REIS, 1996)

Avaliações das áreas impactadas são normalmente realizadas em etapas. A primeira é reunir todas as informações antecedentes relevantes ao local. Isto inclui uma revisão nos registros e relatórios, que podem incluir entrevistas com pessoas do local. A partir destas informações a magnitude e a composição do lançamento são estimadas. A próxima etapa é a caracterização do local, cujo objetivo é determinar a localização exata do contaminante, concentrações, extensão da área contaminada e avaliar o potencial do contaminante ao migrar para outras áreas (REIS, 1996).

O reconhecimento aéreo é uma ferramenta usada para avaliar a localização e a extensão das contaminações por petróleo, além de prever a movimentação e o destino das manchas de óleo. Já os planos de remediação ao longo dos litorais ameaçados pode ser realizado visualmente ou por utilização de sistemas de sensoriamento remoto (ITOPF, 2011).

Após a avaliação da área impactada, faz-se necessário a seleção dos métodos de remediação e disposição a serem aplicados. Estes podem ser:

- Remoção manual/mecânica do óleo;
- Uso de adsorventes;
- Contenção física e recuperação do contaminante;
- Queima do contaminante no local afetado;
- Uso de dispersantes químicos;
- Biorremediação.

2.4.1 Remoção manual/mecânica

A remoção manual do óleo é um método de limpeza bastante trabalhoso, porém bastante eficaz em ambientes como costões rochosos, praias e principalmente em locais restritos como junções de rochas, fendas, poças de maré, e até mesmo em áreas como praia de areia. A retirada do óleo é feita manualmente através de utensílios como pás, rodas, baldes, latas, carrinhos de mão, não causando nenhum dano adicional ao ambiente afetado pelo derramamento (SZEWCZYK, 2006). Na Figura 1 é apresentada uma imagem de remoção manual.

Já a remoção mecânica, escolhida com a finalidade de obter maior eficiência na limpeza de praias, onde veículos e máquinas pesadas como tratores e retroscavadeiras são vistos removendo óleo e areia, sendo esta técnica ainda é utilizada com frequência. Além dos efeitos prejudiciais diretos à biota, esse procedimento causa a descaracterização fisiográfica da praia, devido à alteração do seu equilíbrio dinâmico, e causa processos erosivos de intensidade variável, além de produzir uma quantidade desnecessária de resíduos (ITOPF, 2011).



Figura 1: Remoção manual do óleo.

Fonte: LOPES & MILLANELLI, 2011.

2.4.2 Uso de adsorventes

O uso de adsorventes é altamente eficiente para a limpeza ou remoção de óleo em terra ou água, sendo aplicado diretamente sobre o óleo. Os adsorventes se apresentam na forma granular ou envolvidos em tecidos porosos formando “salsichões” ou “almofadas”, podendo adsorver até 25 vezes sua própria massa em petróleo e seus derivados. Os adsorventes sintéticos de óleo não adsorvem água, flutuam e podem ser torcidos e reaproveitados (SZEWCZYK, 2006). A escolha deve ser feita criteriosamente levando-se em conta as características do óleo, do ambiente e do próprio adsorvente (OLIVEIRA & UGARTE, 2004). Na Figura 2 é apresentado uma imagem na qual foi aplicado um adsorvente.



Figura 2: Aplicação de adsorventes (sólidos hidrofóbicos), em derramamento de óleo.

Fonte: MOTTA, 2011.

Após a adsorção, o material hidrofóbico adsorvente, mais o óleo derramado precisam ser removidos mecanicamente para serem destinados para aterro ou co-processamento.

2.4.3 Contenção física e recuperação do contaminante

O skimmer é uma, como gasolina, diesel e outros hidrocarbonetos, em águas e solos degradados.

O uso de barreiras de contenção antes da sua recuperação por “Skimmers” (bomba desenvolvida para efetuar a remoção de contaminantes de petróleo da interface água/óleo) é frequentemente visto como a solução ideal para um vazamento. A aplicação das barreiras, se efetiva, apenas bastaria remover o óleo do ambiente marinho. Infelizmente, essa abordagem sofre uma série de problemas, pois a barreira está contra a natureza do óleo de se espalhar, fragmentar e dispersar sob a influência do vento, ondas e correntes. Devido a estes fatos, a contenção e recuperação do contaminante em mar é relativamente pequena e sua eficiência não passa de 10 a 15% (ITOPF, 2011).

A ação de ventos, ondas e correntes reduz drasticamente a aptidão das barreiras de contenção e dos “skimmers” de recolhimento de óleo. Na prática, a recuperação mais eficiente do óleo derramado é feita sob boas condições meteorológicas. Quando a contenção e a recuperação do óleo for a técnica escolhida para ser utilizada, a primeira atitude a ser tomada deverá ser o lançamento de barreiras de contenção evitando a propagação das manchas no mar. Apesar das diferentes aplicações dos vários tipos de barreiras, os elementos constitutivos normalmente são os mesmos (SZEWCZYK, 2006). Na Figura 3 é apresentada uma aplicação das barreiras de contenção de óleo.



Figura 3: Barreira de contenção de óleo aplicada em acidentes ambientais.

Fonte: ITOPF, 2011.

2.4.4 Queima do contaminante no local afetado

A queima *in-situ* (local afetado) é o termo dado ao processo de queima do óleo em mar, nos locais de derramamento ou áreas próximas. A queima pode ser vista como um simples método que possui um grande potencial de remover quantidades consideráveis de óleo da superfície oceânica (ITOPF, 2011). Para o uso desta técnica devem ser considerados os riscos inerentes a sua aplicação. Alguns critérios devem ser levados em consideração antes de se iniciar a queima, como, a distância da mancha para a embarcação e se existe alguma população próxima ao local, a toxicidade da fumaça que será gerada (Figura 4), os tipo de óleo derramado e os resíduos que poderão ser gerados, as condições meteorológicas e marítimas, entre outros.

O resíduo gerado é extremamente viscoso e de difícil recuperação no mar e na costa. A maior preocupação é com a possibilidade do resíduo da queima afundar, podendo causar danos às espécies de fundo, sendo a recuperação do local ainda mais difícil (MOTTA, 2011).



Figura 4: Emissão gasosa no processo de queima em mar do óleo derramado.

Fonte: ITOPF, 2011

2.4.5 Uso de dispersantes químicos

Dispersantes são formulações químicas de natureza orgânica que visam emulsionar o petróleo na água sob a forma de pequenas gotículas, com isto, facilitam a biodegradação pela flora e fauna. São constituídos por ingredientes ativos, denominados surfactantes, e por solventes da parte ativa que permitem a sua difusão no óleo. O uso de dispersantes químicos pode evitar a chegada do óleo em locais de maior relevância ecológica e econômica, visando a proteção de recursos naturais e socioeconômicos sensíveis como os ecossistemas costeiros e marinhos. Os dispersantes são potencialmente aplicáveis em situações de derramamento de óleo, porém só deverá ser utilizado se resultar em prejuízo ambiental menor quando comparado por um derrame sem qualquer tratamento, ou se outra medida adicional à contenção não for eficaz (SZEWCZYK, 2006). Nas Figuras 5 e 6 são mostradas a reação dos surfactantes na superfície do óleo e uma imagem aplicação dos dispersantes respectivamente.

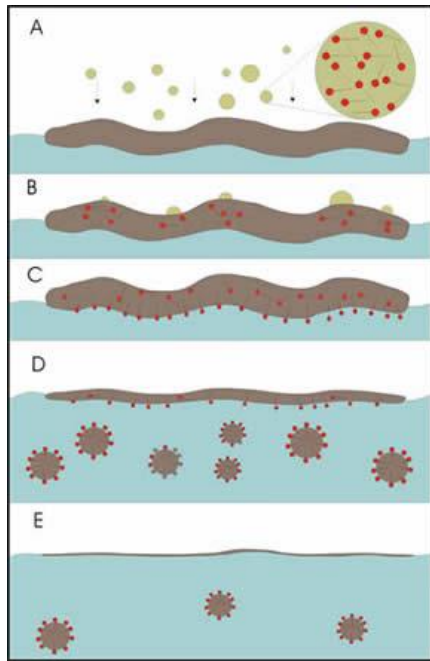


Figura 6: Esquema reacional da dispersão do óleo, após a adição de surfactante.

Fonte: ITOPF, 2011.



Figura 5: Mancha marrom de dispersão do óleo após adição de dispersante.

Fonte: GUARINO, 2011.

Na Figura 5 é apresentado as sequências de dispersão do óleo à medida que um surfactante é adicionada à mancha. A etapa “A”, mostra as gotículas do dispersante pulverizadas sobre o óleo. Na etapa B, o solvente disponibiliza o contato do óleo com o surfactante. Na etapa C, as moléculas de surfactante migram para a interface óleo/água reduzindo a tensão superficial e permitindo que a etapa D aconteça. Nesta etapa, pequenas gotas de óleo se despreendem da mancha. Por final, na etapa E, as gotas se dispersam pela mistura turbulenta, deixando apenas o brilho na superfície da água (ITOPF, 2011).

2.4.6 Biorremediação

A biorremediação é uma tecnologia de tratamento de poluentes que utiliza espécies microbianas para acelerar a remediação de poluentes ou sua transformação para formas menos tóxicas. As abordagens gerais para a biorremediação são: monitorar o processo natural de biorremediação e realizar modificações ambientais tais como adição de nutrientes, aeração, e adição de micro-organismos. Os produtos finais efetivos da biorremediação, como água e dióxido de carbono, são atóxicos e podem ser acomodados no ambiente sem causar danos ao meio ambiente e aos micro-organismos (DEMAIN & DAVIES, 1999).

Após o acidente com o petroleiro Exxon Valdez, em que o óleo derramado atingiu mais de 15% da costa do Golfo do Alasca, e a Guerra do Golfo, que formou mais de 330 lagos de óleo no Kuwait, os processos de degradação biológica (biorremediação), receberam maior atenção. Tais processos surgiram a partir de estudos de decomposição de desintoxicação de pesticidas em solo e mais tarde foram propostos como promissores para a recuperação de áreas costeiras atingidas por derrames de petróleo (SZEWCZYK, 2006).

Uma grande variedade de técnicas biotecnológicas tem sido usadas para o tratamento de áreas contaminadas. A biorremediação “*in situ*” é aplicada em situações onde a contaminação é profunda, subterrânea ou sob construções, rodovias, etc. A biorremediação “*in situ*” de poluentes se desenvolveu principalmente por evitar custos de escavações e por não produzir nenhum composto tóxico, como no tratamento físico-químico “*ex situ*”. A biorremediação “*ex situ*” envolve a remoção do material contaminado do seu local original (RATTEDGE & KRISTIANSEN, 2001).

Para a biorremediação funcionar eficazmente, os micro-organismos exigem um nível suficiente de carbono, nitrogênio, fósforo e oxigênio. Quando ocorre um derramamento de uma grande quantidade de óleo, o carbono torna-se disponível, de forma que os níveis de nitrogênio e fósforo tornam-se limitantes na eficiência do tratamento. A adição de fertilizantes pode ser usada para ajustar o equilíbrio C:N:P e aumentar a taxa de degradação pelos micro-organismos autóctones (micro-organismos presentes naturalmente no ambiente) (ITOPF, 2011).

Em remediações de áreas contaminadas por derramamentos de petróleo, a biorremediação normalmente conjuga-se com outros procedimentos de limpeza. A biorremediação é o resultado da oxidação de certos componentes do óleo derramado, por micro-organismos como bactérias, fungos, algas unicelulares e protozoários. É um mecanismo natural de limpeza e remoção do óleo, cuja eficiência é variável de acordo com as características físicas do próprio óleo, e também do ambiente, como a temperatura, a concentração de micro-organismos, nutrientes e oxigênio dissolvido presente no local (SZEWCZYK, 2006).

A contaminação de solos hidrocarbonetos pode ter conseqüências desastrosas para o ecossistema como a perda da produtividade agrícola, a redução da qualidade da cadeia alimentar com danos a saúde humana e animal e o envenenamento de fontes de água (FUNGARO *et al.*, 2004). Grandes esforços têm sido feitos para integrar conhecimentos que facilitem a reabilitação de solos poluídos, e assim, possibilitar o retorno da funcionabilidade e estabilidade do ecossistema formado (CARNEIRO *et al.*, 2001).

Em programas de recuperação de áreas degradadas, uma das estratégias é a introdução de vegetação com o máximo de diversidade possível. Isto favorece a estabilização de plantas na área e a sucessão vegetal ao longo do processo de restauração (VANGRONSVELD & CUNNINGHAM, 1998).

2.4.6.1 Limitações da Biorremediação

Apesar dos processos de biorremediação serem uma ferramenta muito útil, certamente não é a resposta para todas as remediações aplicáveis mesmo com a adição de nutrientes ou micro-organismos, de forma que a diferença de remediação reside no tempo necessário para que a recuperação seja atingida (ITOPF, 2011).

Embora a ideia da biorremediação seja atraente, seu uso prático é restrito. Em particular, a biorremediação não deve ser usada em óleo na superfície do mar. Apesar de a biorremediação poder melhorar a taxa de degradação das manchas de óleo, o processo ainda é muito lento, de forma que é difícil evitar que a grande maioria do óleo derramado atinja a costa. Esta técnica só deve ser considerada quando a concentração de óleo é baixa e usada como uma técnica de polimento final (REIS, 1996).

O oxigênio necessário para a biodegradação ocorrer só está disponível na interface óleo/água e não dentro do próprio óleo. Como resultado, quando a bioestimulação é utilizada, a quantidade de óleo degradada será maior no óleo disperso na água ou distribuído por meio dos sedimentos. Os materiais removidos das praias juntamente com o óleo deverão ser removidos antes de iniciar a biorremediação (ITOPF, 2011).

Dentro destas características apresentadas é exposto na Tabela 2 as limitações da biorremediação.

Tabela 2: Limitações da biorremediação.

Vantagens	Limitações
biodegrada substâncias perigosas ao invés de apenas transferir o contaminante de um meio para outro	não é uma solução imediata
baixo custo (até 85%) em comparação com demais métodos	necessidade de maior entendimento de seu funcionamento
possível tratamento <i>in situ</i>	método pouco evoluído no Brasil
produtos utilizados não apresentam risco ao meio ambiente e não são tóxicos	acompanhamento durante o processo
tratamento de resíduos considerados de difícil degradação	muitas moléculas não são biodegradáveis
uso em áreas de proteção ambiental, indústria de alimentos, entre outras	substâncias tóxicas ao micro-organismo inviabiliza o tratamento

Fonte: CARVALHO, 2013.

Os resultados dos estudos da biorremediação ao redor do mundo deixam claro que as técnicas convencionais de limpeza dos derramamentos de óleo podem e devem ser complementadas com a biorremediação (SZEWCZYK, 2006).

Os maiores enfoques da biorremediação são a estimulação do crescimento microbiano no local contaminado por meio de nutrientes, biosurfactantes (bioestimulação), a adição de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos adaptados (bioaumentação) (TONINI *et al.*, 2010) e o “*landfarming*”.

2.4.6.2 Bioestimulação

Segundo ATLAS (1993), a bioestimulação consiste na modificação de meio ambiente visando eliminar fatores limitantes ao crescimento e desenvolvimento dos micro-organismos, incrementando, desta forma, a biodegradação dos compostos orgânicos poluentes pela população nativa. Assim, a introdução de nutrientes, surfactantes e também oxigênio, com o objetivo de aumentar a atividade microbiana ou a disponibilidade do poluente, são formas de promover a bioestimulação (BAPTISTA *et al.*, 2003).

A composição química do ambiente contribui para a definição do valor nutritivo do meio. Quando o meio não fornece macro e micronutrientes necessários para o metabolismo celular dos micro-organismos degradadores é necessária a adição destes ao sistema. Como consequência destas adições, a taxa de degradação pode ser aumentada (GAYLARDE *et al.*, 2005).

Leavitt e Brown (1994) fizeram um estudo comparativo entre a bioestimulação e o bioaumento para um caso de tratamento de solo contaminado com óleo cru, empregando microrganismos autóctones e, comparando-se com uma cultura comercial com mistura recomendada de nutrientes. Concluíram que, para algumas aplicações, a bioestimulação de microrganismos autóctones é a melhor escolha, considerando custo e desempenho.

A bioestimulação com a adição de nutrientes e de um surfactante aplicadas ao solo, dobrou a eficiência de biodegradação em termos de mineralização com uma remoção de hidrocarbonetos. Observou-se que a deficiência de nutrientes foi o fator limitante principal do processo de biorremediação e o aumento da eficiência foi proporcionado devido à presença de surfactante Tween 80. O autor sugeriu que este produto foi efetivo em aumentar a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos (MARIANO, 2006).

Outro estudo de bioestimulação foi realizado por Bento e colaboradores (2003). Estes realizaram um teste comparativo entre a atenuação natural monitorada (ANM) e a bioestimulação em um solo contaminado com óleo diesel coletados em Long Beach, California (USA) e Hong Kong (China). Os testes foram realizados em microcosmos, com a adição de 250 mg kg⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ e 100 mg kg⁻¹ de K₂HPO₄. Após 12 semanas de experimento o teste de bioestimulação apresentou aproximadamente 46% de eficiência de remediação, enquanto nas condições de ANM esse parâmetro foi da ordem de 48,7%.

Nascimento e Carvalho (2010) também utilizaram a bioestimulação como técnica de remediação *in situ* para aumentar a capacidade de recuperação da macrofauna bêntica em sedimentos contaminados por óleo. Foram elaboradas diversas condições de experimentação, dentre uma delas a adição de fertilizantes. As amostragens foram realizadas em 0, 5, 15, 30, 60 e 90 dias. Após a tratativa das amostras foi possível observar, já na primeira amostragem, após o início da adição de nutrientes, uma aproximação da macrofauna bentônica das áreas com adição de nutrientes, sugerindo o início da recuperação.

Allebrandt (2009) avaliou o uso de peróxidos na bioestimulação de bactérias endógenas sobre hidrocarbonetos derivados de petróleo em solos contaminados. Os experimentos consistiram em duas células de microcosmos, aos quais foram adicionados ORC (Compostos disponibilizadores de oxigênio) em uma das unidades e peróxido de magnésio na outra. Após 30 dias de experimento a unidade com o MgO_2 mostrou uma redução de 67% para benzeno, 93% de tolueno, 81% de etilbenzeno e 82% de xileno, e os hidrocarbonetos totais de petróleo reduziram 68%, enquanto que para as amostras adicionadas de ORC, houve uma redução de 75% de tolueno, 64% na soma total de xileno, 26% de etilbenzeno, e o benzeno não reduziu, desta forma apresentando reduções menores em comparação ao solo onde foi aplicado o composto de MgO_3 .

O oxigênio também é um fator limitante para a remediação de áreas contaminadas. O seu uso é bastante comum em técnicas como bioventing. Huesemann e Truex (1996) em seu estudo da biorremediação passiva de hidrocarbonetos de petróleo em solos contaminados avaliaram a influência da difusão do oxigênio no solo na eficiência de remediação dos hidrocarbonetos. Os autores estabeleceram uma forte relação da profundidade de penetração do oxigênio e o tempo total para a biorremediação passiva dos hidrocarbonetos do petróleo. Obtiveram uma faixa de eficiência entre 2,5 e 10 ppm de remoção de TPH por dia, de acordo com a distância de penetração do oxigênio.

A bioestimulação é apresentada como uma técnica possível de biorremediação, variando apenas as condições necessárias para uma boa eficiência de remediação para cada área que se deseja tratar. No entanto, há situações onde a adição de nutrientes não é suficiente para promover a remoção de substâncias recalcitrantes. Neste caso a adição de micro-organismos específicos é uma alternativa para a remediação da substância. Esta técnica é também conhecida como bioaugmentação.

2.4.6.3 Bioaugmentação

A biorremediação pode envolver a inoculação da área contaminada com culturas puras ou consórcios microbianos contendo micro-organismos selecionados para a degradação de contaminantes específicos, sendo, nestas condições, denominada bioaugmentação (BEWLEY, 1996).

A adição de micro-organismos isolados, selecionados e até mesmo aclimatados, para melhorar alguma atividade microbiológica específica, tem sido praticada intencionalmente por diversos anos nas mais variadas áreas, incluindo agricultura (herbicidas), tratamento de efluentes (hidrocarbonetos clorados e carbamatos) entre outros. A utilização da bioaugmentação é sustentada por estudos que demonstram, em alguns casos, a baixa eficiência dos micro-organismos autóctones e o aumento da taxa de biorremediação após a adição do micro-organismo competente (VOGEL, 1996).

A reintrodução na matriz contaminada com micro-organismos indígenas diretamente isolados da mesma matriz é também definida como bioaugmentação (VOGEL, T. M., 1996). A aplicação de micro-organismos em locais de derramamento pode resultar na introdução de espécies exóticas no ambiente, resultando em preocupações sobre o seu potencial impacto. No entanto, na maioria dos casos é provável que as espécies introduzidas não vão concorrer efetivamente com as espécies que ocorrem naturalmente (ITOPF, 2011).

Os micro-organismos degradadores de petróleo são amplamente distribuídos em todas as áreas costeiras do mundo e são mais abundantes nas linhas costeiras adjacentes às águas poluídas cronicamente, como as que recebem descargas de efluentes industriais e esgotos não tratados. Nessas áreas a adição de micro-organismos provavelmente não será necessária. Mesmo em regiões onde a comunidade de petróleo degradante é susceptível de ser menos abundante é improvável que o bioaumento irá melhorar significativamente a biodegradação (ITOPF, 2011).

A eficiência da bioaugmentação foi verificada por Xu e Lu (2010), que testaram a remediação de uma área contaminada com óleo cru utilizando as bactérias naturais do ambiente. Os autores utilizaram uma mistura de pó de casca de amendoim como suporte para o desenvolvimento dos micro-organismos. As avaliações foram realizadas em escala laboratorial por um período de 12 semanas e a biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo variaram de 26 a 61%, dependendo das condições de operação e também da técnica aplicada (bioestimulação e bioaugmentação, respectivamente). A maior percentagem de bioaugmentação foi atingida com a adição de 15% (m/m) de células imobilizadas em pó de casca de amendoim.

Outro estudo realizado por Teng e colaboradores (2010) avaliou o potencial de biorremediação de hidrocarbonetos poliaromáticos (PAH) em uma área de contaminação antiga. Os autores coletaram as amostras de solo de uma região a oeste de China, o qual continham um teor de $9.942,91 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de PAH e com utilização da técnica de bioaugmentação e aplicação de *Paracoccus sp.* em microcosmos, pode ser uma estratégia promissora pra a biorremediação de solos com contaminação histórica.

A bioaugmentação com aplicação de um consórcio bacteriano e fúngico foi avaliada por Zhang e colaboradores (2008). Os autores trabalharam com um consórcio de *Enterobacter cloacae* e *Cunninghamella echinulata* e possibilitaram seu crescimento por meio de biomassa como a palha de trigo. Essa biomassa possibilitou um incremento de 170 vezes no número de células bacterianas e 11 vezes para os fungos. Devido ao crescimento aumentado, a concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) foi reduzida em 67% após 45 dias de experimento. O trigo foi cultivado em solo corrigido e o rendimento percentual de produção de grãos ultrapassou 72% do que produtividade de grãos obtida em terras agrícolas normal adjacente ao local de estudo. Os resultados demonstraram a eficácia do bioaumento da palha de trigo no reforço do solo de petróleo e sal contaminado e indicou um alto potencial de aplicação.

Trindade e colaboradores (2005) realizaram um estudo em solos com contaminação antiga e com contaminação recente aplicando técnicas de biorremediação. A bioaugmentação foi estudada com a adição de um consórcio microbiano constituído por dois micro-organismos degradadores de petróleo (*Nocardia nova* e *Rhodotorula glutinis dairenensis*). Estes micro-organismos foram isolados de um solo previamente contaminado com petróleo. Após 41 dias de experimento foi constatada uma eficiência de bioremediação de 2,5% e 7,5% para os solos com contaminação recente e antiga, respectivamente, comprovando assim a dificuldade do tratamento de solos contaminados com uma elevada concentração de petróleo bruto. Além disto, ambos os solos submetidos à biorremediação apresentaram eficiência duas vezes maior que a atenuação natural monitorada.

A bioestimulação também é apresentada como uma excelente técnica de biorremediação de compostos xenobióticos. Esta por mais que em diversos trabalhos apresente uma melhor eficiência de remediação, deve ter sua aplicação muito bem estudada e controlada, para evitar a extinção da microfauna autóctone e conseqüentemente um desequilíbrio ambiental.

2.4.6.4 Landfarming

O *landfarming* é o processo de biorremediação que tenta acelerar o processo natural, é um tipo de depósito, onde os resíduos contaminados são misturados na camada superficial do solo, em local previamente preparado. Esta tecnologia visa favorecer a biorremediação por viabilizar a redução da concentração dos contaminantes no solo por ação de micro-organismos através de operações adequadas de manejo e gestão do solo (PAULA *et al*, 2006). Este processo pode se estender por até três anos antes que à maior parte do óleo tenha sido degradado, embora muitas vezes esse tempo pode ser reduzido pela aeração e a aplicação de fertilizantes (ITOPF, 2011).

O *landfarming* só é susceptível de ser aplicado quando os derramamentos são relativamente pequenos, por causa da grande quantidade de terra necessária. Idealmente a terra selecionada deve ser de baixo valor, localizada bem longe de fontes de água potável e não deve ser permeável. Uma vez que o petróleo tenha sido degradado, o solo pode ser capaz de suportar uma grande variedade de plantas, incluindo árvores e gramíneas (ITOPF, 2011).

2.4.6.5 Micro-organismos remediadores

Rotineiramente, os órgãos ambientais estão se deparando com situação de contaminação das mais variadas. Os estudos da biorremediação têm evoluído dia após dia, de forma que novas técnicas e melhores eficiências de tratamento são propostas com frequência.

Segundo Rosato (1997), há uma grande diversidade taxonômica nos organismos capazes de degradar derivados de petróleo. Alguns micro-organismos foram encontrados em ambientes extremos, como na região da Antártica, mas poucos foram encontrados em ecossistemas com altas temperaturas. Apesar das bactérias serem provavelmente as maiores responsáveis pela biodegradação no ambiente, fungos e leveduras, cianobactérias, algas e mesmo protozoários também apresentam capacidade de degradação. Dentre os derivados de petróleo, os hidrocarbonetos leves, constituintes do petróleo, formados basicamente por carbono e hidrogênio, são alguns dos contaminantes mais biodegradáveis da natureza (ESPOSITO & AZEVEDO, 2004).

Para visualizar o potencial de técnica de biorremediação, na Tabela 3 é apresentado os mais variados tipos de contaminantes e também os diversos micro-organismos que foram empregados na sua remediação.

Tabela 3: Micro-organismos aplicados em biorremediações de diversos contaminantes.

Contaminante	Espécie utilizada
Anéis aromáticos (combustíveis, resíduos industriais)	<i>Pseudomonas, Achromobacter, Bacillus, Arthrobacter, Penicillum, Aspergillus, Fusarium, Phanerocheate</i>
Cádmio (Cd)	<i>Staphylococcus, Bacillus, Pseudomonas, Citrobacter, Klebsiella, Rhodococcus, Aspergillus, Saccharomyces cerevisiae</i>
Chumbo (Pb)	<i>Bacillus</i>
Cobre (Cu)	<i>Escherichia, Pseudomonas, Bacillus</i>
Cromo (Cr)	<i>Alcaligenes, Pseudomonas</i>
Enxofre (S)	<i>Thiobacillus</i>
Derivados do Petróleo	<i>Pseudomonas, Proteus, Bacillus, Penicillum, Cunninghamella</i>
Zinco (Zn)	<i>Rhodococcus, Bacillus</i>

Fonte: TUTIDA & FOGAÇA, 2011.

Farias e colaboradores (2008) realizaram um estudo com o intuito de selecionar linhagens fúngicas que apresentassem capacidade de remoção de metais pesados como cobre, zinco e manganês, empregando galactose como fonte de carbono. Foram testadas 5 linhagens de fungos para os três metais citados. No primeiro teste o fungo *Aspergillus versicolor*, apresentou o melhor desempenho, reduzindo as concentrações iniciais dos contaminante em 12,3%; 31,4% e 15,8% para o cobre, zinco e manganês, respectivamente. Em um estudo subsequente, foram testadas outras fontes de carbono como xilose e maltose. Utilizando a maltose como fonte de carbono *Saccharomyces cerevisiae* apresentou uma eficiência na captação do cobre de 23,3% enquanto o *Aspergillus versicolor* apresentou 36,7% de eficiência de remoção para o zinco. Para a xilose, os resultados apresentados foram muito semelhantes.

Souza e colaboradores (2005) isolaram micro-organismos capazes de degradar o petróleo e seus derivados. Aplicaram duas técnicas distintas de forma que foram encontradas mais de 65 linhagens eficazes na degradação do petróleo. Atualmente são conhecidas cerca de 200 espécies com potencial para degradar os hidrocarbonetos de petróleo, dentre elas destacam-se os gêneros *Pseudomonas, Marinobacter* e *Acinetobacter* (ROCHA, 2008).

Conforme Cerniglia & Perry (1973, *apud* ESPOSITO & AZEVEDO, 2004), alguns fungos possuem capacidade de metabolizar hidrocarbonetos de petróleo. Num dos primeiros estudos sobre fungos degradadores, foram isolados os micro-organismos provenientes de sedimentos estuarino, na costa da Carolina do Norte (EUA), que cresceram em meio de cultura basal, contendo água do mar suplementada com fosfato e nitrogênio. O fungos isolados nessas condições utilizaram o petróleo como fonte de energia e carbono. Entre os fungos selecionados, estavam os fungos mitospóricos *Aspergillus versicolor*, *Cephalosporium acremonium*, *Penicillium* sp. e Zigomiceto *Cunninghamella elegans*

Cerniglia (1997) diz que o fungo não ligninolítico mais extensivamente estudado quanto à sua capacidade degradativa é o zigomiceto *Cunninghamella elegans*. Há vários estudos realizados com este fungo, os quais comprovaram a sua grande versatilidade fisiológica para a degradação de diversos poluentes, incluindo petróleo e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Maciel e colaboradores (2010), demonstraram o uso do fungo em consórcio com outros micro-organismos ao observarem a biodegradação total de óleo lubrificante em menos de 10 horas em condições laboratoriais controladas. Lisowska & Dlugo'nski (2003) trabalharam com a transformação concorrente do cortexolone e do fenantreno (hidrocarboneto poliaromático, de origem petroquímica) e verificaram que na presença de fenantreno a razão entre os produtos de hidroxilação cortexolone foi alterado de 1:5,1 para 1:7,6 na cultura sem fenantreno.

Macedo e colaboradores (2003) avaliaram a capacidade degradadora de nove linhagens de fungos filamentosos isolados de um solo contaminado com petróleo. O estudo foi realizado em kitasato de 250 mL, com 50 g de amostra e 50% de umidade, durante um período de 40 a 42 dias, sem ajuste de pH e com as relações nutricionais de C:N:F de 100:2,17:0,0023. Os resultados da biorremediação do óleo por meio dos fungos mostraram que a linhagem de *Aspergillus versicolor* foi a mais eficiente, pois apresentou um percentual de remediação de 10,80%, enquanto *Aspergillus niger* apresentou 7,33%.

Sary (2009) avaliou a capacidade de remediação de óleo diesel em solo contaminado em um cultivo submerso com *Pleurotus*, com e sem adição de glicose como co-substrato de glicose. Os resultados mostraram uma eficiência de mais de 90% na remediação do óleo diesel em apenas 5 dias de incubação, quando glicose foi adicionada ao cultivo. O uso de co-substrato também foi avaliado por Costa e colaboradores (2007) a partir de consórcio microbiano originalmente presente no petróleo, bioestimulados em biorreatores. Os autores concluíram que o uso da glicose e do sulfato de amônio dobrou a reprodução celular das bactérias na cinética de crescimento do consórcio.

Souza e Trigüis (2005), simularam o derrame de óleo no mar em unidades de vidro, que foram preenchidas com 50 litros de água do mar e avaliaram as alterações das propriedades do óleo frente às intempéries e a ação de micro-organismos estimulados com fertilizante tipo NPK. A frequência de aplicação do fertilizante foi de 2 g nos tempos 0 e 2 dias e 1 g no tempo 4 dias. Foram realizadas amostragens no tanque nos tempos de 0, 2, 4, 7, 14, 21 e 28 dias. Com 28 dias de experimento, obtiveram uma eficiência de remediação aproximada de 100% dos alcanos do petróleo através da bioestimulação.

Jacques e colaboradores (2008) buscaram a remediação de hidrocarbonetos policíclicos com um consórcio bacteriano (*Mycobacterium fortuitum*, *Bacillus cereus*, *Microbacterium* sp., *Gordonia polyisoprenivorans*, *Microbacteriaceae bacterium*), isolado de um landfarming já em operação. O consórcio microbiano degradou uma média 99% de diferentes concentrações de antraceno, fenantreno e pireno, em solo durante 70 dias de incubação. Segundo o autor durante o mesmo período, a população microbiana autóctone do solo não mostrou a mineralização significativa do PAH.

Silva (2007) por meio da técnica de microcosmos remediou derivados de petróleo por meio de diversas técnicas de bioestimulação, de forma que a remoção atingiu até 83,58% de hidrocarbonetos poliaromáticos, 98,35% de hidrocarbonetos alifáticos e 90,4% de óleos e graxas. O autor não identificou as espécies mais eficientes no processo de degradação, mas quantificou o número de unidades formadoras de colônias (UFC) para bactérias (25 a 250 UFC mL⁻¹) e fungos (15 a 150 UFC mL⁻¹).

2.5 Reatores

A Engenharia das Reações Químicas está preocupada com a concepção racional e/ou da análise do desempenho de reatores químicos. Um reator químico é um dispositivo no qual a mudança de composição da matéria ocorre por reações químicas. Estas reações são, normalmente, a mudança mais importante. Um reator, geralmente é o coração de uma substância química em geral ou de um processo bioquímico. A maioria dos processos químicos industriais são operados com a finalidade de produzir produtos químicos tais como amônia e derivados petroquímicos. Os reatores também estão envolvidos na produção de energia como em motores (de combustão interna) e em certas células eletroquímicas (MISSEN *et al* 1998).

Os biorreatores são todos os equipamentos utilizados para converter matérias-primas em produtos utilizando micro-organismos, células animais, vegetais ou enzimas. Micro-organismos e células devem estar constantemente envolvidos num ambiente adequado na tentativa de prover condições ótimas de crescimento. Um biorreator mantém este processo natural provendo condições adequadas como temperatura, pH, substrato, sais nutricionais, vitaminas e oxigênio (para organismos aeróbios), possibilitando que as células cresçam e produzam os metabólitos de interesse (SCHÜGERL, 1987, *apud* CERRI, 2009).

Jacques *et al.* (2007) avaliaram a biodegradação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Avaliaram a eficiência de remoção dos hidrocarbonetos pelas mais variadas técnicas de biorremediação, como biorremediação passiva, bioaugmentação, bioestimulação, compostagem, fitorremediação, landfarming e também por biorreatores. Estes processos de biorremediação apresentaram respectivamente 56% de eficiência em 480 dias, 92% em 360 dias, 90% em 360 dias, 70% em 150 dias, 40% em 45 dias, 55% em 60 dias e por fim 99% em 12 dias.

Os biorreatores possibilitam um aumento da disponibilidade dos contaminantes aos micro-organismos degradadores, a eliminação da heterogeneidade da distribuição dos contaminantes no solo e disponibilidade de oxigênio em abundância, três grandes limitações das biorremediações *in situ* (JACQUES *et al.*, 2007).

Além da aplicação dos reatores, estes podem apresentar diferentes configurações e condições de trabalho, sempre objetivando a melhor eficiência de conversão da reação. Os reatores podem trabalhar tanto em batelada quanto em fluxo contínuo.

2.5.1 Reatores STR (Stired tank reactor)

O reator STR (reator de tanque agitado) é um termo genérico para um tipo de vaso largamente usado em processos industriais. Reatores deste tipo são usados para uma variedade de operações de processos tais como dissolução de sólidos, mistura de produtos, reações químicas, destilação em batelada, cristalização, extração líquido-líquido e polimerização (MISSEN *et al.* 1998).

Um típico reator STR consiste de um agitador e sistemas integrados de aquecimento/resfriamento. Estes vasos podem variar em tamanhos de menos de 1 litro a mais de 15 mil litros. Eles são normalmente fabricados em aço, aço inoxidável, aço revestido de vidro, vidro ou ligas exóticas. Líquidos e sólidos são normalmente carregados via conexões na cobertura do topo do reator. Vapores e gases também são descarregados através de conexões no topo do reator. Já os líquidos são descarregados pelo fundo do tanque (LEVENSPIEL, 1999). Na Figura 7 é apresentada estrutura do reator STR.

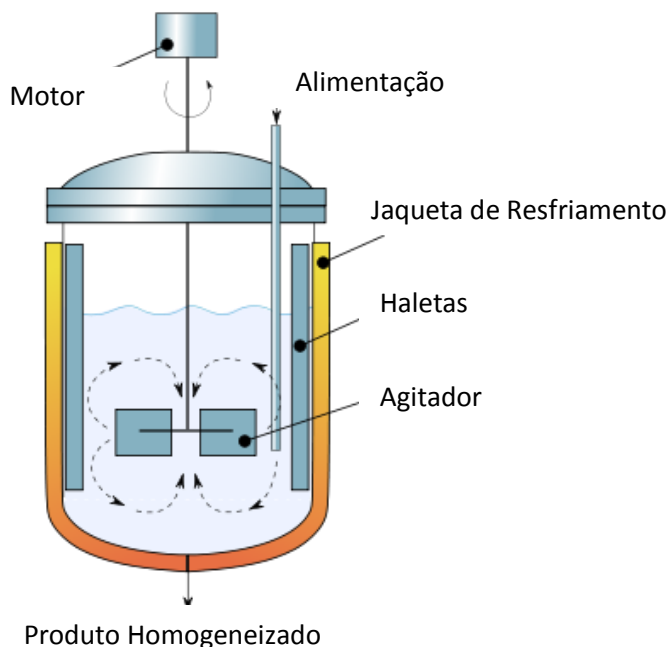


Figura 7: Estrutura do reator STR.

Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/Continuous_stirred-tank_reactor, 2013.

Estes reatores permitem que altas conversões possam ser obtidas, deixando o reagente no reator por longos períodos de tempo. Quando a capacidade de conversão é baixa, esse tipo de processo tem menor investimento de capital, sendo preferíveis quando se está testando um novo produto. Há também uma flexibilidade de operação no mesmo reator, podendo-se obter produtos diferentes e ainda estes reatores são de fácil operação de limpeza e manutenção (PEREIRA, 2011).

As aplicações dos reatores são as mais diversas, onde é extensamente aplicado em processos de pequena escala, em testes de novos processos que ainda não foram completamente desenvolvidos, além da fabricação de produtos onerosos e processos de difícil conversão em operações contínuas.

A eficiência do reator STR também foi avaliada para a remoção de hidrocarbonetos em efluentes industriais. Gargouri *et al* (2011) otimizaram um bioprocesso para tratar efluentes industriais ricos em hidrocarbonetos. Os autores obtiveram um consórcio microbiano composto por espécies variadas como *Bacillus cereus*, *Ochrobactrum intermedium*, *Stenotrophomonas maltophilia* entre outros. Esse consórcio aplicado em reator STR para o tratamento de efluente apresentou eficiências acima de 95% para DQO (Demanda química de oxigênio) e 97% para TPH.

Wang et al (2010) avaliaram o potencial de biodegradação de PAH (Polycyclic aromatic hydrocarbon) por um consórcio microbiano autóctone de um solo agrícola em biorreator. Nos experimentos foram avaliadas diferentes matrizes como solo contaminado e solo agrícola não contaminado. Estes solos foram contaminados com uma mistura de PAHs e aplicados em biorreator para avaliar a eficiência de remediação do consórcio microbiano. Foi constatado que hidrocarbonetos como o naftaleno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno e pireno podem ser totalmente biodegradados pelo consórcio proveniente de em ambos os solos dentro de 40-50 dias, enquanto os demais PAH's foram degradados em diferentes taxas de remediação no final de 170 dias de experimento.

A configuração de aplicação dos reatores STR é variada, onde reações fermentativas e oxidativas podem ser utilizadas. Zamuoche e colaboradores (2007) estudaram a transferência de oxigênio em um reator STR para o tratamento de águas domésticas residuais. Os autores avaliaram o coeficiente global de transferência de oxigênio (K_{La}) em relação a velocidade de agitação e a taxa de alimentação de ar e confirmaram por meio dos experimentos que a velocidade de agitação tem influência mais pronunciada que a taxa de alimentação de ar.

Os fermentadores são um exemplo de reatores bioquímicos STR. Segundo Stanbury *et al*. (1999) as principais funções do fermentador é fornecer um ambiente controlado para o crescimento de micro-organismos ou células animais, para obtenção do produto desejado.

Antes de se optar por este tipo de reator deve-se avaliar todas as etapas limitantes do processo, pois estes reatores apresentam algumas dificuldades na produção em larga escala, sendo seu custo de manutenção alto se considerado o custo de mão-de-obra. Esta mão-de-obra é igual ao tempo perdido durante a alimentação, o esvaziamento e a limpeza (o chamado “tempo morto”), que pode até inviabilizar o processo produtivo.

Devido a estas dificuldades existem outros tipos de reatores disponíveis no mercado. Considerando a aplicabilidade bioquímica, os reatores pneumáticos, estão ganhando muito mercado, devido ao seu diferencial de agitação e oxigenação, aliadas ao baixo consumo de energia.

2.5.2 Reatores pneumáticos

Os reatores pneumáticos são equipamentos onde a homogeneização e a agitação são realizadas apenas pela injeção de gás. Uma das características principais dos biorreatores pneumáticos é a ausência de impelidores e portanto, de agitação mecânica. Desta forma é simplificado o processo de construção e a operação dos biorreatores (CHISTI & MOO-YOUNG, 1989).

O cultivo microbiano geralmente ocorre em biorreatores tipo tanque agitado, que pode gerar um ambiente hostil aos micro-organismos e provocar lise por cisalhamento (ALEKSIEVA & PEEVA, 2000). Possivelmente fatores como este proporcionaram a busca por novas alternativas de biorreatores, como os biorreatores pneumáticos.

Dentre os vários tipos de biorreatores pneumáticos, destacam-se os reatores de coluna de bolhas e airlift.

2.5.2.1 Reator de coluna de bolhas

Usualmente a coluna de bolhas é uma coluna cilíndrica com relação altura/diâmetro 4/6. O gás é injetado na base da coluna por meio de tubos perfurados, pratos perfurados ou vidro sinterizado ou metal injetado micro-poroso. A transferência de oxigênio, agitação e outros fatores de performances são principalmente influenciados pelo fluxo de gás e as propriedades reológicas do fluido (RATTEDGE & KRISTIANSEN, 2001). Na figura 8 é apresentado um esboço de um biorreator de coluna de bolhas.

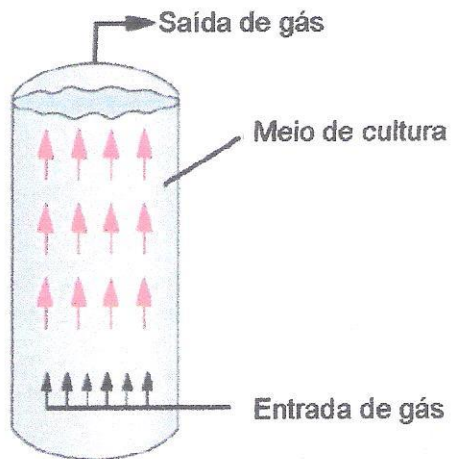


Figura 8: Reator de coluna de bolha.

Fonte: CERRI, 2009

2.5.2.2 reatores airlift

Os biorreatores airlift surgiram com o objetivo de proporcionar o crescimento microbiano, sem provocar a quebra celular (lise) devida à tensão de cisalhamento promovida pelos habituais agitadores dos reatores de tanque agitado. Mais especificamente o reator airlift de circulação interna, que apresenta geometria peculiar na qual o meio reacional é dividido em duas regiões distintas, mas interconectadas, separadas por meio de uma lâmina ou de um tubo concêntrico, onde apenas uma das regiões recebe a injeção de gás (CHISTI, 1989). Na Figura 9 é apresentada as três configurações mais conhecidas de biorreatores airlift.

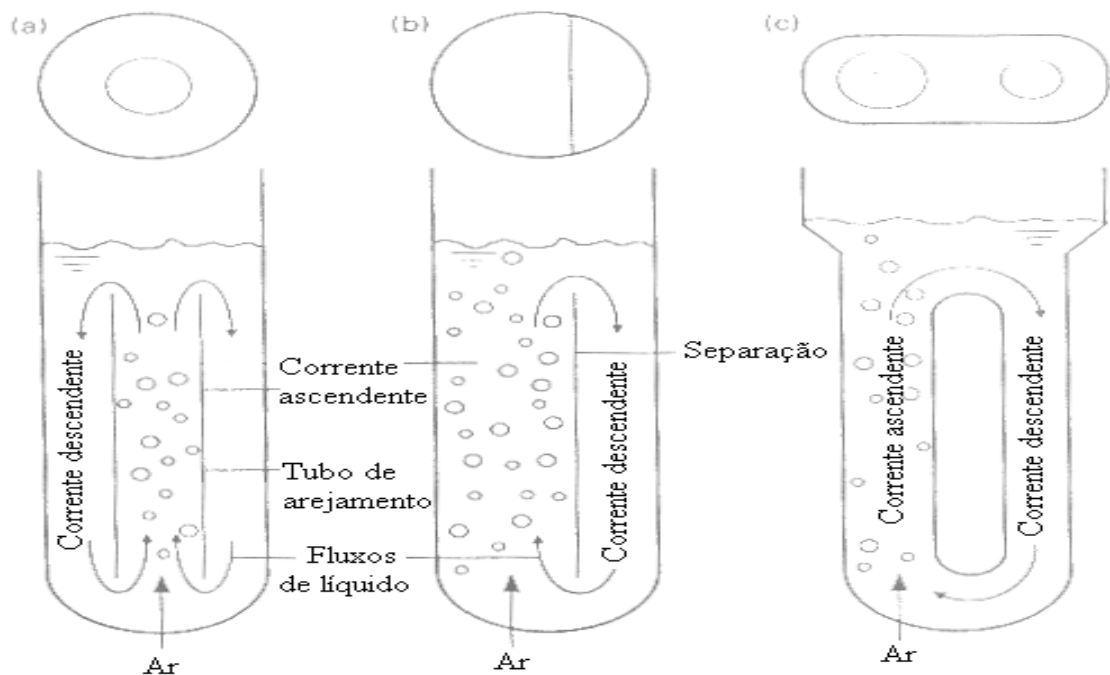


Figura 9: Configurações de biorreatores airlift mais conhecidas. (a) Tubo aerado central e loop interno ao sistema; (b) cilindro dividido e (c) loop externo do sistema.

Fonte: RATTEDGE & KRISTIANSEN, 2001.

Das configurações dos reatores airlift, apenas uma das duas zonas é injetado ar ou outro gás. A zona aerada é conhecida como corrente ascendente e a zona que não recebe nenhum gás é a corrente descendente. A densidade da dispersão gás-líquido na zona da corrente ascendente tende a ser menor do que a densidade do corrente descendente, conseqüentemente o fluxo de dispersão ocorre da zona ascendente para a zona descendente. Algumas vezes as correntes ascendentes e descendentes é um tubo dividido e interconectado pelo topo e pelo fundo do biorreator para formar um loop de circulação externa (Figura 10c) (RATTEDGE & KRISTIANSEN, 2001).

A injeção de gás no biorreator pode ser realizada de diversas maneiras, três delas são apresentadas na Figura 10:

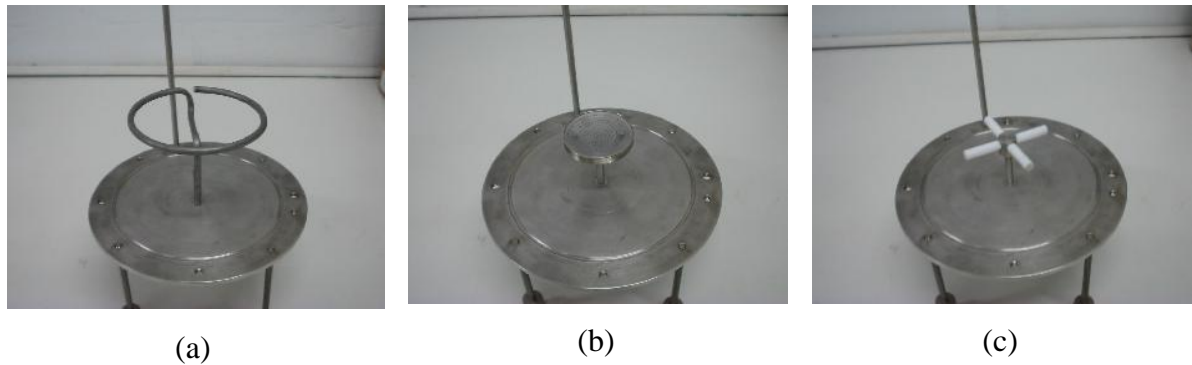


Figura 10: Aspersores disponíveis para biorreatores airlift: (a) anel perfurado, (b) chuveiro, (c) cruzeta.

Fonte: CASSIANO *et al.*, 2011.

Os biorreatores airlift podem ser empregados em cultivos com caldos mais viscosos, ao contrário dos reatores tipo torre ou coluna de bolha, além de não apresentarem grandes problemas com relação à coalescência de bolhas. No entanto, a transferência de massa entre os elementos de fluido é menor que a observada nos biorreatores convencionais (CHISTI, 1989, *apud* THOMASI, 2010).

A utilização destes biorreatores têm sido diversificada. Cassiano e colaboradores (2011) utilizaram o airlift para a produção de ácido clavulânico. Gavrilescu e Roman (1998) pesquisaram a produção de três antibióticos (bacitracina, cefalosporina C e nistatina) em dois biorreatores airlift com circulação externa e um com circulação interna, comparando as suas eficiências com a de biorreatores tipo tanque agitado e aerado. Domingues e colaboradores (2001) utilizaram com sucesso um biorreator airlift com circulação interna de tubo concêntrico em cultivos contínuos de leveduras flocculantes geneticamente modificadas para a produção de álcool a partir de soro de queijo.

Jia *et al* (1997) utilizaram um reator airlift para avaliar o aumento nas taxas de produção por adição de vetores de oxigênio (sais que transmitem oxigênio para o cultivo). Esta avaliação foi realizada por meio do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio para a fração volumétrica do vetor. Quando foram adicionados n-dodecano (vetor) em concentrações de 3% e 2% (v / v) a taxa de transferência atingiu um valor máximo, de forma que com 3% de vetor a concentração de levedura aumentou 20% do que na ausência do vetor de oxigênio.

Os biorreatores airlift estão sendo amplamente estudados quanto a sua aplicação em processos de biorremediação de compostos xenobióticos. Kermanshahi *et al* (2005), avaliaram o potencial biodegradativo de águas subterrâneas contaminadas com hidrocarbonetos de petróleo em biorreactor airlift de célula imobilizada. Os experimentos seguiram em duas etapas, sendo uma delas para a obtenção de um consórcio microbiano eficiente e a segunda etapa na incubação deste consórcio. Sob as condições de biodegradação completa dos hidrocarbonetos, as taxas de biodegradação volumétrica obtidos em biomassa foram de $15 \text{ mgL}^{-1}\text{h}^{-1}$.

Os reatores airlift são caracterizados pela sua alta taxa de oxigenação, a qual é responsável pela agitação e homogeneização do biorreator. Mehrnia e colaboradores (2005) estudaram a transferência de oxigênio (K_{LA}) e a retenção gasosa (ϵ_g) em um biorreator airlift com uma solução de querosene puro e diesel emulsionado com água. Para efeito de comparação os experimentos também foram realizados em água purificada. O aumento do percentual de água na mistura resultou em um decréscimo da retenção gasosa e aumento da viscosidade. Além disto, os valores de K_{LA} diminuíram com o aumento da viscosidade do líquido à base de diesel.

Desta forma este trabalho objetiva avaliar em biorreatores, a melhor condição de propagação de um consórcio microbiano, isolado de um solo contaminado, potencialmente degradador de petróleo e seus derivados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Construção do reator

O reator airlift utilizado nos experimentos descritos foi projetado e construído. Como parâmetros básicos de dimensionamento e construção do reator, foram fixados o volume útil do reator (3 L) e a altura do reator (1,10 m).

Foi construído um reator airlift, onde as Figuras 11 e 12 apresentam etapas construtivas. Os tubos foram recortados transversalmente para a fixação de uma placa de acrílico para a visualização do fluido gasoso em atuação no fluido líquido dentro do biorreator.



Figura 11: Tampa de PVC e (b) Difusor de ar disposto na base do riser.

Figura 12: Tubos de PVC utilizados na construção.

Após a avaliação dos efeitos do dimensionamento proposto na eficiência de dispersão do gás e circulação do líquido, foram analisadas as disposições dos constituintes periféricos no biorreator, tais como: pontos de coleta de amostras, pontos de entradas e saídas de fluidos líquidos e gasosos e pontos de sondas de coleta de dados como temperatura, oxigênio dissolvido e pH. Uma vez definido estes parâmetros de construção, foi executado o projeto do equipamento em AutoCAD e Rhinoceros (Figuras 13 e 14 respectivamente).

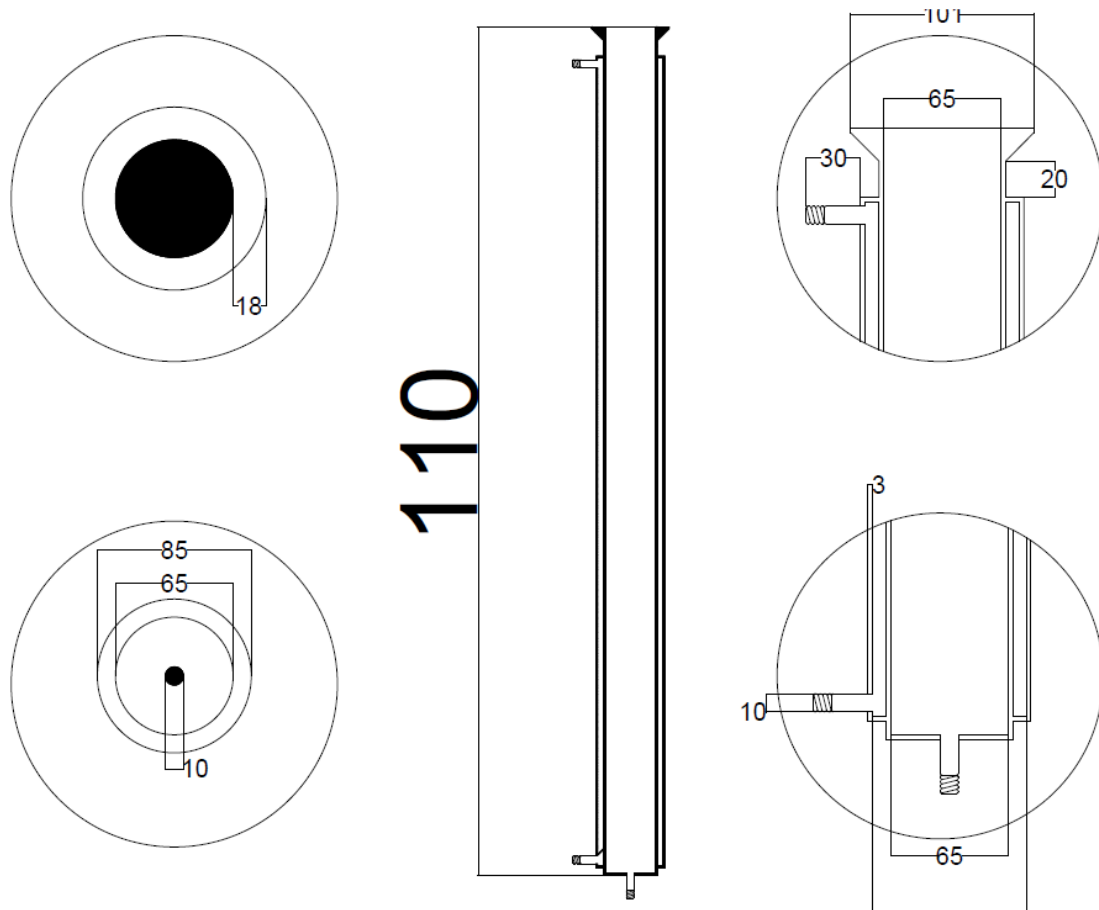


Figura 13: Projeto do biorreator *airlift* em AutoCAD.

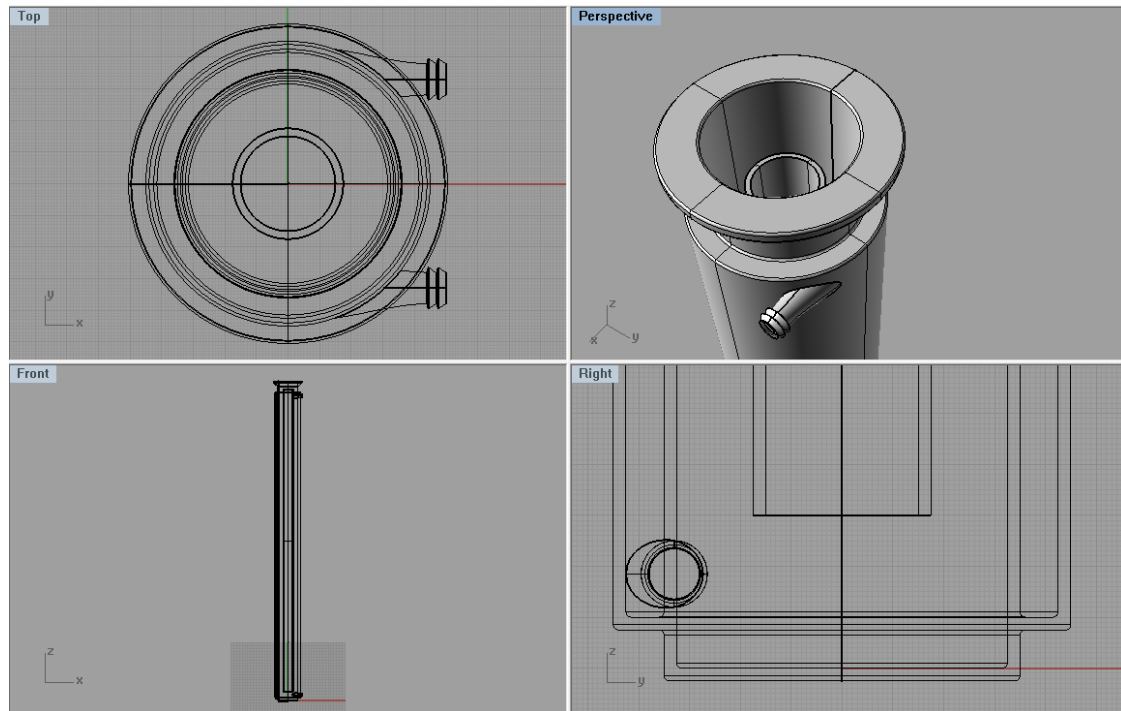


Figura 14: Projeto do Biorreator *airlift* em Rhinoceros.

Com a finalização do projeto e definição das dimensões construtivas, a forja dos dois tubos de vidro boro-silicato ligados concentricamente foi feita pela empresa Quilab Comércio de Materiais para Laboratório LTDA

3.2 Micro-organismo

O consórcio microbiano utilizado nos experimentos foi obtido através da coleta de solo de uma área conhecida contaminada com hidrocarbonetos derivados do petróleo em uma residência vizinha a um posto de combustível. O material foi obtido, conforme estabelece procedimento de coleta de solo do Manual de Gerenciamento de Áreas Contaminadas (CETESB, 2001). Com o auxílio de um trado (Figura 15), foram coletados 5 kg de solo a uma profundidade de 1,5 m. O solo foi acondicionado em recipiente plástico e preservado à 4°C.

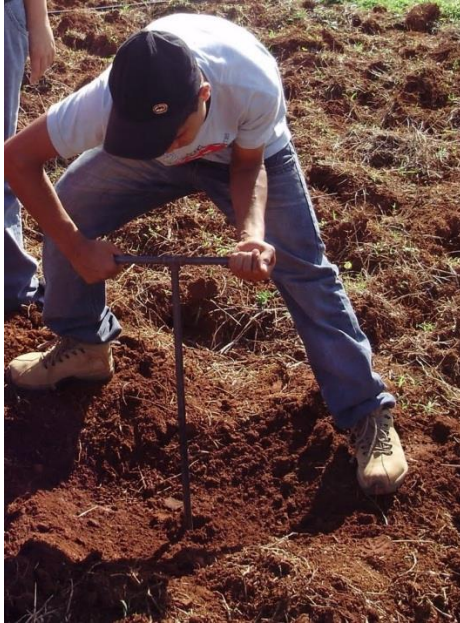


Figura 15: Amostragem de solo.

Fonte: http://jovemaprendiztavinho.blogspot.com/2011_05_01_archive.html, 2011.

3.2.1 Enriquecimento dos micro-organismos de estudo

O enriquecimento do consórcio microbiano foi realizado em seguida à amostragem. Foi preparado 200 mL de um meio contendo caldo nutriente (extrato de carne à 3 g.L⁻¹ e peptona à 5 g.L⁻¹ em um pH de 7,2), adicionado de glicose como substrato à uma concentração de 10 g.L⁻¹. O meio foi preparado em frascos de erlenmeyer de 500 mL e autoclavado à 121 °C e 1 atm, por 20 min. Após o meio atingir a temperatura ambiente, foi adicionado 5% (m/v) da amostra de solo para enriquecimento dos micro-organismos. O cultivo foi conduzido por 24 horas, em agitador orbital com frequência de 150 min⁻¹ e 30 °C.

Após o cultivo, as células foram mantidas em placas de Petri em cultivo de profundidade com meio agar nutriente e armazenados sob refrigeração a 4°C

3.2.2 Enriquecimento seletivo dos micro-organismos de estudo (inóculo)

O enriquecimento seletivo dos micro-organismos degradadores de petróleo foi realizado por cultivo líquido de 200 mL com caldo nutriente, adicionado de glicose na concentração de 10 g.L⁻¹, o óleo bruto de petróleo na concentração de 0,1% (m/v) e surfactante Tween 80 na concentração de 0,5% (m/v). O meio foi preparado em frascos Erlenmeyer de 500 mL e autoclavado à 121 °C e 1 atm, por 20 min.

Após o processo de esterilização em autoclave, aguardou-se o meio atingir a temperatura ambiente e um disco de agar nutriente, obtidos a partir das células mantidas sob refrigeração foi adicionado a cada erlenmeyer.

O cultivo foi conduzido por 24 horas, em agitação à 150 min⁻¹ e 30 °C. Esta solução serviu como pré-inóculo para realização dos experimentos.

3.2.3 Inoculação pela técnica de esgotamento

A cultura dos micro-organismos isolados foi realizada pela técnica de esgotamento com uma alça de níquel/cromo. A cultura consistiu em transferir uma alçada da cultura para o meio sólido em placa estriada. A semeadura foi realizada com a formação de 3 estrias, nas quais inicialmente estriou-se a metade da placa com um movimento de zig-zag com a alça. Assim que atingida esta metade, a placa foi girada 90° e mais ¼ da placa foi estriada, seguida de mais um giro de 90° onde o restante da placa foi estriada.

3.2.4 Identificação do consórcio microbiano isolado

Para a determinação da coloração Gram dos micro-organismos, cada colônia característica foi separada em lâminas e 1 gota de água foi pingada na lâmina para promover o espalhamento dos microrganismos. Ao lado de uma chama de bico de bunsen a água da lâmina foi evaporada. Em seguida, 1 gota de solução cristal violeta foi adicionada e deixada em reação por 1 minuto. Após o tempo de reação, a lâmina foi lavada com água purificada tomando-se o cuidado para não remover as células da lâmina. A seguir, 1 gota de solução de lugol foi adicionada na lâmina e deixada em reação por 1,5 minutos. Novamente a lâmina foi lavada com água purificada. Mais 1 gota de solução acetona/álcool (1:1, v/v) foi adicionada a lâmina, deixada em reação por 30 segundos. Após o tempo de reação, a lâmina foi aproximada da chama de bico de bunsen (cuidadosamente) para evaporar o líquido ainda restante na lâmina.

Após a coloração Gram a lâmina foi observada em microscópio para identificação dos micro-organismos presentes.

3.3 Meios de cultivo e condições de operação

3.3.1 Preparo do meio de cultivo

Os experimentos em frascos agitados foram conduzidos em Erlenmeyers de 500 mL contendo 180 mL de caldo nutriente, 100 g.L⁻¹ (m/v) de Tween 80 e 20 g.L⁻¹ (m/v) de óleo bruto (petróleo) adicionado de glicose 10 g.L⁻¹. A mistura foi homogeneizada e esterilizada em autoclave por 20 min à 121 °C. Após a mistura atingir a temperatura ambiente, 10% (v/v) de inóculo foi adicionado, homogeneizado e incubado por 20 dias. Na Figura 16 é apresentada uma imagem dos frascos cultivados.



Figura 16: Cultivo submerso em frascos agitados com 150 min^{-1} e $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Fonte: Própria, 2011.

A amostragem foi realizada a cada 2 dias de cultivo durante 20 dias. Foram amostrados 2 mL do cultivo a cada ponto de amostragem. Em cada tempo de amostragem, o petróleo foi extraído das amostras com uso de solvente orgânico (diclorometano) e analisado por cromatografia gasosa.

3.3.2 Extração do petróleo

Para a extração do petróleo contido nas amostras, foi utilizado diclorometano como solvente. Em 2 mL de diclorometano puro, foram adicionados 0,5 mL de cada amostra em tubo hermeticamente fechado e agitado em vortex por 5 min. Após a agitação foram adicionados em cada tubo cerca de 4,0 mL de água purificada para a extração do surfactante pela fase aquosa enquanto o petróleo permaneceu na fase orgânica. As amostras foram homogenizadas por inversão e separadas as fases por mais 30 min em centrífuga. Após a separação das fases, a fase orgânica inferior (diclorometano + petróleo) foi transferida para um vial de 2,0 mL para as determinações em cromatografia gasosa. A parte inorgânica (água) foi utilizada para as determinações de açúcar.

3.3.3 Cultivo submerso em biorreator

O meio de cultivo utilizado em ambos os reatores (3L de volume útil) foi constituído de caldo nutriente e glicose 10 g.L^{-1} , sendo esterilizado em autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min. Após resfriamento, os sistemas de controle da CPU (control panel unit) foram conectados aos biorreatores e após a estabilização da temperatura e da concentração de oxigênio dissolvido, o inóculo foi adicionado a uma razão de 10% (v/v) (300 mL) do volume do meio reacional.

3.3.4 Crescimento celular em biorreator

3.3.4.1 Crescimento celular conduzido no reator STR

No reator STR modelo BIOSTAT B Plus (Figura 17), a agitação e aeração foram mantidas em 250 min^{-1} e 3,0 vvm (volume de ar por volume de meio), respectivamente. Para evitar a formação de espuma, 1,0 mL polietilenoglicol foi adicionado. Os processos foram conduzidos em duplicata.



Figura 17: Disposição dos aparatos na tampa do biorreator STR.

As amostras (10 mL) foram retiradas com intervalos de 1 hora durante 26 horas, quando foi observada a fase estacionária de crescimento do consórcio microbiano na curva de crescimento.

3.3.4.2 Crescimento celular conduzidos em reator airlift de circulação interna

Como no cultivo do biorreator STR, o cultivo em biorreator airlift foi efetuada em duplicata, conduzido com volume de 3 L do meio de cultivo já inoculado, adicionando-se 1 mL de polietilenoglicol. Imagens do reator airlift poder ser observadas na Figuras 18.

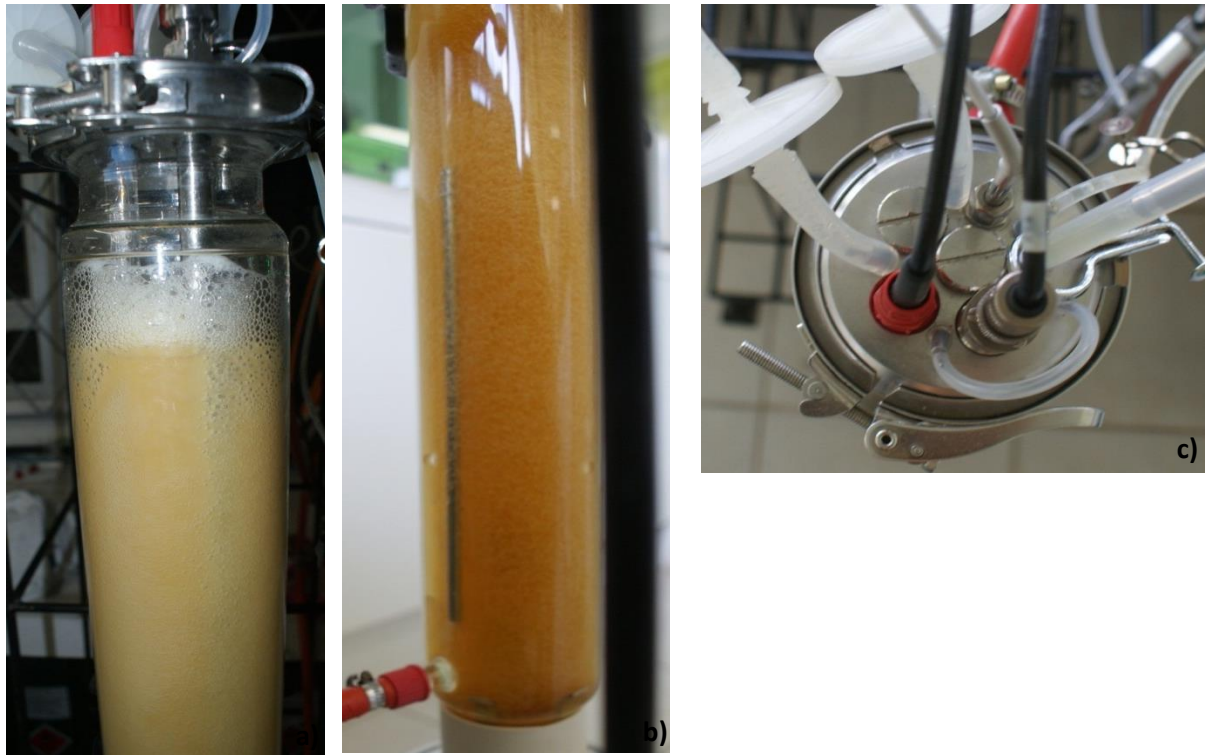


Figura 18: a) Fluxo descendente da coluna de ar; b) Fluxo de gás disperso por pedra porosa; c) Disposição dos aparatos na tampa do biorreator airlift.

As amostras (10 mL) foram retiradas com intervalos de 2 horas durante 26 horas, quando foi observado valores de pO_2 acima de 80% de oxigênio dissolvido.

3.3.4.3 Ensaios de degradação de óleo

O meio de cultivo utilizado em ambos os reatores (3 L de volume útil) foi constituído de caldo nutriente (extrato de carne à 3 g.L⁻¹ e peptona à 5 g.L⁻¹ em um pH de 7,2), adicionado de glicose como substrato à uma concentração de 10 g.L⁻¹, óleo bruto de petróleo (cedido pela Transpetro de São Francisco do Sul) a 20 g.L⁻¹ (v/v), com esterilização em autoclave a 121 °C durante 30 min. Após resfriamento, os sistemas de controle da CPU (control panel unit) foram conectados aos biorreatores e após saturação do meio com O₂. Com a estabilização da temperatura, o inóculo foi adicionado a uma razão de 10% (v/v) (300 mL) do volume do meio reacional.

3.3.4.3.1 Ensaios conduzidos no Reator STR

No reator STR (Figura 17), a frequência de agitação e a aeração foram mantidas em 250 min⁻¹ e 3 L.min⁻¹ (1,0 vvm), respectivamente. Os processos foram conduzidos em duplicata. As amostragens foram realizadas, durante as primeiras 24 horas, a cada 12 horas, e também a cada 2 dias, até completar 20 dias de cultivo. Após a amostragem, o petróleo e a glicose foram extraídos conforme descrito em 3.3.2 Extração do petróleo.

3.3.4.3.2 Ensaios conduzidos em reator airlift de circulação interna

Como no cultivo do biorreator STR, o cultivo no biorreator airlift foi efetuada em duplicata, conduzidas com o volume de 3 L do meio de cultivo já inoculado. O fluxo de entrada de ar de 1 vvm foi inserido no reator pela parte inferior do tubo riser com o auxílio de uma pedra porosa para a dispersão das bolhas de oxigênio. As amostragens foram realizadas, durante as primeiras 24 horas, a cada 12 horas, também a cada 2 dias, até completar 20 dias de cultivo. Após a amostragem, o petróleo e a glicose foram extraídos conforme descrito em 3.3.2 Extração do petróleo.

3.4 Métodos analíticos

Cada cultivo foi monitorado por amostragens periódicas do meio, retirando 10 mL de amostra, para acompanhamento das concentrações de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) e glicose. As amostras foram retiradas da parte inferior dos biorreatores por meio de um tubo inserido na tampa dos mesmos. As amostras foram retiradas e separadas para análise de massa seca e glicose e determinação dos derivados de petróleo por cromatografia.

3.4.1 Determinação da concentração de açúcares redutores totais

A concentração de glicose foi determinada pelo método DNS (ácido 3-5 dinitrossalicílico). As amostras foram diluídas adequadamente de forma que a concentração de substrato se situasse entre os valores da curva padrão cujas concentrações variaram de 0 a 2 g.L⁻¹ de glicose (Anexo 01). 0,5 mL dessa diluição foi acrescentada de 0,5 mL de reagente de DNS. Após tratamento térmico em banho de água a 100 °C por 5 min, os tubos foram resfriados em banho de gelo e adicionados de 5 mL de água deionizada para homogeneização e leitura das absorbâncias a 540 nm em espectrofotômetro de marca Biospectro e modelo Specsol 220.

3.4.2 Determinação de crescimento celular

Além do acompanhamento do crescimento celular por turbidimetria (600 nm), as amostras foram coletadas nos cultivos avaliados e preservadas em geladeira até determinação da massa seca de células. As amostras foram filtradas à vácuo utilizando membranas filtrantes de 0,45 µm previamente secas 24 horas em estufa a 90 °C.

Todas as membranas utilizadas foram secas novamente em estufa a 90 °C por mais 24 horas, em seguida pesadas.

3.4.3 Determinação do teor de TPH por cromatografia gasosa

A determinação do teor de TPH (hidrocarbonetos totais de petróleo) foi realizado em cromatógrafo da marca Agilent modelo 6850, com detector FID (Flame Ionization Detector). A coluna utilizada foi a HP-1 de 30 m de comprimento, 0,52 mm de diâmetro externo e 0,25 µm de espessura de filme.

O método de determinação de TPH contou com uma curva de calibração preparada partir de padrão comercial de marca Accustandard (cromatograma típico encontra-se no anexo). Para a determinação de TPH a separação dos picos dos compostos foi realizada por meio de gradiente de temperatura que inicia a 50 °C, permanece por 2 min e é seguido por uma rampa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ até 300 °C, temperatura esta que permanece por 5 min.

3.5 Metodologia utilizada nos cálculos

3.5.1 Concentração de massa seca e de açúcares redutores totais

A concentração celular (X) foi calculada a partir da Equação 1.

$$X = \frac{(m_f - m_o)}{V} \quad (1)$$

Onde:

- X: concentração celular em massa seca (g.L⁻¹);
- m_o: Massa seca da membrana filtrante sem células microbianas (g);
- m_f: Massa seca da membrana filtrante com células microbianas (g);
- V: Volume de amostra utilizada no ensaio (mL).

Para o cálculo das concentrações de açúcares redutores totais foi empregada a Equação 2.

$$S = \frac{Abs - 0,0235}{0,5575} \quad (2)$$

Onde:

- Abs: é a absorbância medida pelo equipamento (540nm);
- S: concentração de glicose (g.L⁻¹);

3.5.2 Determinação dos parâmetros cinéticos

3.5.2.1 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La) em reator STR e airlift

Para a determinação do k_{La} foi utilizado um biorreator STR BIOSTAT B Plus e sonda de oxigênio calibrada com gás nitrogênio para o “Zero” (menor quantidade de oxigênio dissolvido possível no líquido) considerando na calibração como 0% de oxigênio presente no líquido (OD). Posteriormente alterou-se a corrente de entrada por ar comprimido para a escala máxima de oxigênio presente no líquido, calibrado como 100%. Em seguida, se seguiram os experimentos com uma corrida de determinação do tempo de elevação do OD no líquido de 10% a 80% em triplicata para cada vazão de ar utilizada. A determinação de k_{La} foi feita em duplicata.

A variação de concentração de oxigênio dissolvido com o tempo (SCHNEIDER, 1996), é representado pela Equação 3.

$$\frac{dC}{dt} = K_La(C^* - C) \quad (3)$$

Onde:

- C^* – concentração de oxigênio dissolvido na saturação (mmol.L^{-1});
- C – concentração de oxigênio dissolvido no instante t (mmol.L^{-1});
- k_{La} – Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h^{-1}).

Rearranjando a Equação 3 temos que:

$$\frac{dC}{(C^* - C)} = k_{La} \cdot dt \quad (4)$$

E integrando-a no intervalo $t=0$ e $t=t$

$$\ln \frac{(C^* - C)}{(C^* - C^0)} = k_{La} \cdot t \quad (5)$$

Se $C^0 = 0$ então:

$$\ln\left(1 - \frac{C}{C^*}\right) = -k_L a \cdot t \quad (6)$$

A Equação 5 mantém uma correlação linear entre $\ln\left(1 - \frac{C}{C^*}\right)$ e o tempo, onde o coeficiente angular da reta fornece o valor de $k_L a$. Aplicando os limites de integração temos:

$$t = 0 ; C = \alpha C^*$$

$$t = t ; C = \beta C^*$$

$$\ln\left(\frac{C^* - \beta C^*}{C^* - \alpha C^*}\right) = k_L a \cdot t \quad (7)$$

$$\ln\left(\frac{1 - \beta}{1 - \alpha}\right) = k_L a \cdot t \quad (8)$$

Onde α é 0,1 (10% da concentração de saturação de OD) e β varia de 0,1 a 0,8 (80% da concentração de saturação OD).

Em biorreator airlift deve ter o acréscimo de uma nova base de cálculo visto que sua geometria de circulação de oxigênio é diferente de um biorreator convencional, pelo fato de possuir uma zona de subida de gás e outra zona de decida do mesmo. Portanto a correlação que corrige a geometria do biorreator é descrita na Equação 9.

$$k_L a = \frac{k_L a_R (V_R)}{(V_T)} \quad (9)$$

Onde:

- V_T – Representa o volume total do biorreator (L).
- V_R – Volume do tubo de subida do gás “riser” (L).
- KLa_R – KLa experimental.
- KLa – KLa corrigido conforme sua geometria.

Para o biorreator STR foi utilizada a agitação constante de 250 min^{-1} (escolhida no CPU do biorreator) em todas as medições de tempo em função da vazão volumétrica de gás de 1,0 vvm para os dois biorreatores.

3.5.2.2 Fator de conversão de glicose em células (YX/S)

$$Y_{X/S} = \frac{-dX}{dS} \quad (10)$$

Onde:

- YX/S: fator de conversão de substrato em células (g.g-1);
- dX: diferencial da concentração celular (g.L-1);
- dS: diferencial da concentração de glicose (g.L-1).

3.5.2.3 Velocidade específica de crescimento (μ)

A partir dos perfis de concentração celular, foi possível determinar, em cada instante, as velocidades instantâneas de crescimento microbiano (μ) ($dX.dt^{-1}$).

Dividindo-se as velocidades instantâneas pela concentração celular no ponto obtêm-se as velocidades específicas de crescimento (μ) (Equação 11).

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (11)$$

Onde:

- μ : velocidade específica de crescimento (h-1)
- X: concentração celular (g.L-1)

3.5.2.4 Produtividade celular máxima (PX)

A produtividade em células é utilizada para identificar a quantidade máxima de célula que pode ser produzida por um determinado tempo. A equação 12 apresenta a forma de cálculo.

$$P_X = \frac{X_{max}}{t} \quad (12)$$

Onde:

- PX: produtividade celular (g.L-1.h-1);
- Xmax: concentração celular máxima (g.L-1);
- t: tempo de cultivo (h).

3.5.2.5 Eficiência de remediação

A avaliação da eficiência de remediação do óleo determinada em cada experimento foi realizada com base no valor inicial do experimento, e utilizada a equação 13 para a cálculo em percentual.

$$ER(\%) = \frac{[]_0 - []_t}{[]_0} \times 100$$

Onde:

- ER(%): Eficiência de remediação medido em %;
- []₀: Concentração inicial de óleo medido inicialmente ao teste de degradação;
- []_t: Concentração no tempo “t” medida nos pontos de amostragem.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir deste capítulo serão apresentados os resultados obtidos para avaliar o potencial de biodegradação do petróleo por micro-organismos extraídos de um solo contaminado por derivados de petróleo, em cultivo submerso em reator de tanque agitado (STR) e reator airlift.

4.1 Identificação do consórcio microbiano isolado

Para a identificação do consórcio microbiano utilizado selecionado do solo contaminado, o solo foi inoculado em meio nutritivo por 24 horas. Após este período o líquido foi semeado em placa de ágar nutriente pela técnica do esgotamento com uma alça de níquel/cromo. Após o período de incubação de 24 horas, os micro-organismos constituintes do consórcio apresentaram-se conforme Figura 19.

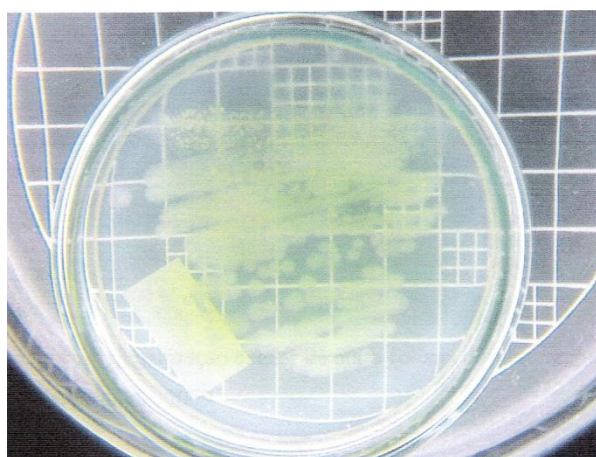


Figura 19: Colônias do consórcio microbiano. Isoladas.

Cada colônia com características macroscópicas visuais diferentes foi isolada e realizado o teste de coloração gram. Ao todo foram selecionadas 6 tipos de colônias distintas identificadas principalmente quando a formação celular. Todas as colônias que foram identificadas foram relacionadas como bacilos gram positivos, com diferentes organizações celular como apresentado nas Figuras 20

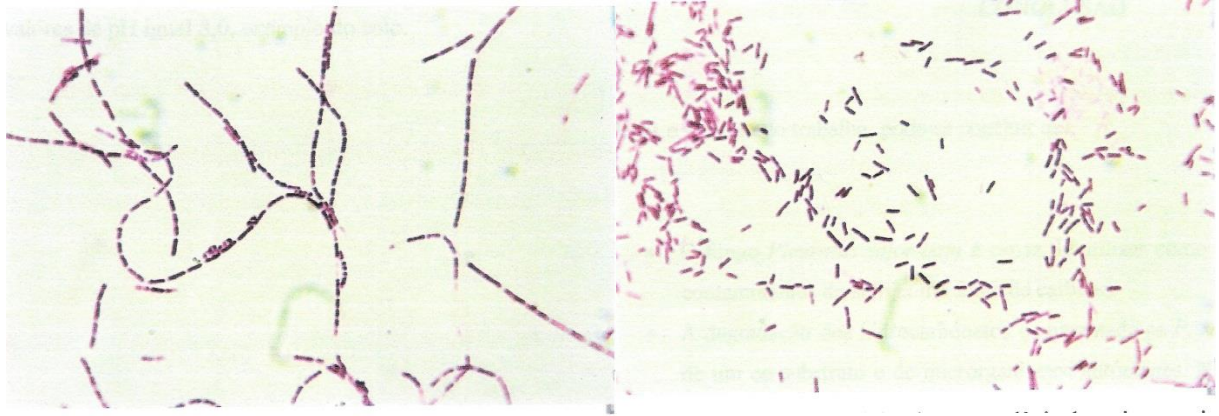


Figura 20: Organização celular do consórcio microbiano.

4.2 Cinética de crescimento do consórcio microbiano

Nas Figuras 21 e 22 é apresentado o perfil de crescimento do consórcio microbiano avaliado em reator STR e airlift, respectivamente.

Os reatores são diferenciados pelo seu tipo de agitação: o STR possui pás rotativas com injeção de ar pela parte inferior do reator, enquanto o Airlift, a agitação é realizada unicamente pelo oxigênio também injetado pela parte inferior do reator. A diferença nas taxas de oxigenação dos reatores foi medida pelo k_{La} .

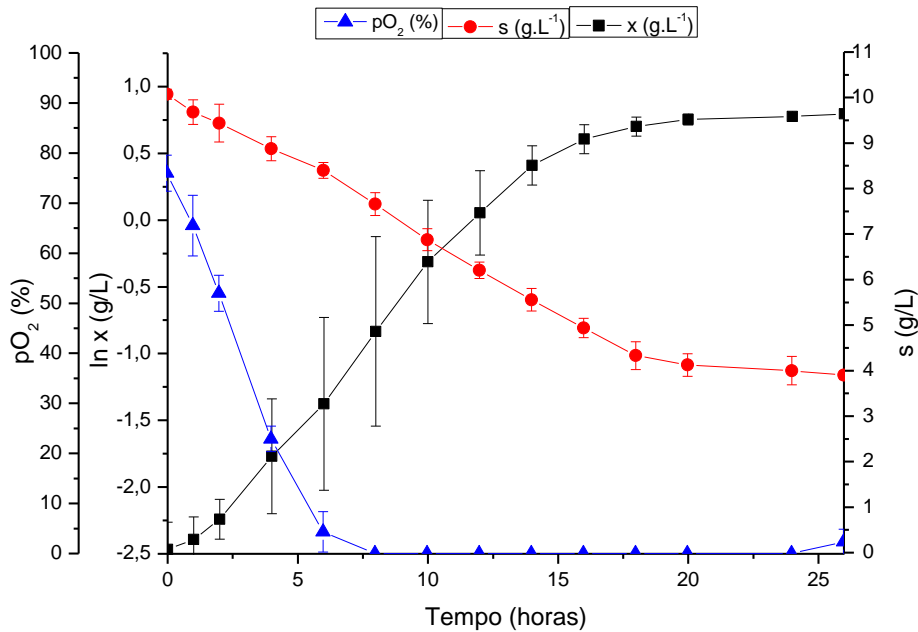


Figura 21: Gráfico de crescimento do consórcio microbiano em reator STR em meio caldo nutriente adicionado de glicose como substrato à uma concentração de 10 g.L⁻¹. O reator foi agitado em 250 min⁻¹ e 3,0 vvm (volume de ar por volume de meio) e 1,0 mL polietilenoglicol para evitar a formação de espumas. O inóculo foi adicionada à uma taxa de 10% (v/v).

O perfil gráfico gerado no crescimento do consórcio microbiano no reator STR sugere uma limitação de oxigênio (pO_2) a partir da 6^a hora de cultivo. A partir deste ponto pode-se atribuir a oxigenação como fator limitante para o crescimento dos micro-organismos. Na curva de densidade celular ($\ln X$) é notado a fase de crescimento seguido da fase estacionária. A fase de crescimento exponencial ocorre durante as 10 primeiras horas de cultivo, quando o substrato tende a 6,5 gL⁻¹, e é observada a estabilização no crescimento celular.

Situação diferente ocorre no reator airlift, para o crescimento celular que apresenta um crescimento exponencial até 8 horas, diferentemente do reator STR que precisou de cerca de 16 horas para estabilizar o crescimento. Em contrapartida, no reator airlift é possível observar 3 velocidades distintas de crescimento. Em relação ao consumo de substrato (glicose), o cultivo apresenta duas fases: a primeira fase que se reporta ao crescimento microbiano em duas velocidades de crescimento e a segunda que acompanha e fase estacionária de crescimento com estabilização do consumo de substrato, semelhante ao observado no reator STR.

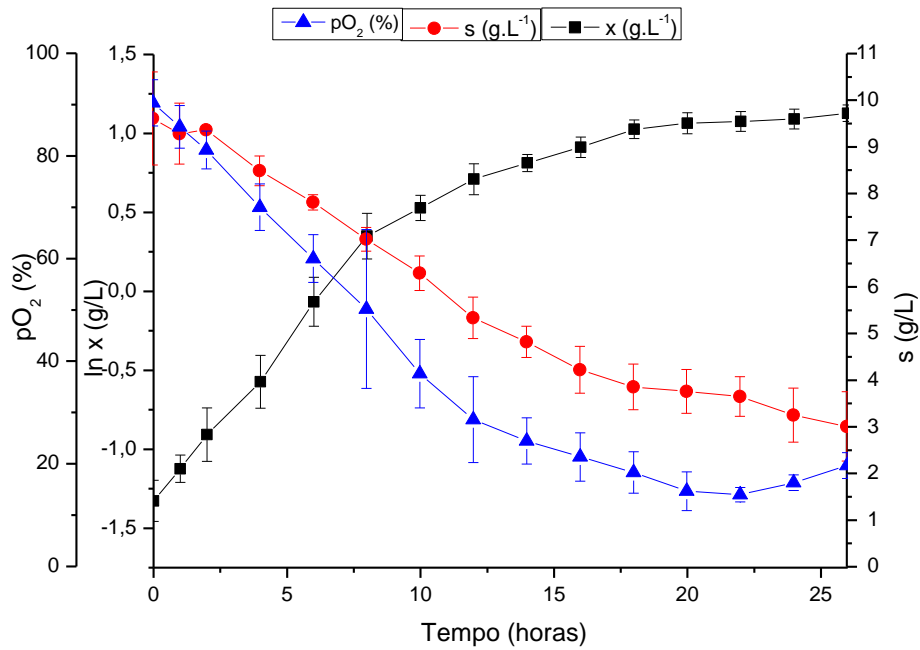


Figura 22: Gráfico de crescimento do consórcio microbiano em reator Airlift em meio caldo nutriente adicionado de glicose como substrato à uma concentração de 10 g.L^{-1} . O reator foi agitado por meio da alimentação de oxigênio com razão de 3,0 vvm (volume de ar por volume de meio) e 1,0 mL polietileno glicol para evitar a formação de espumas. O inóculo foi adicionada à uma taxa de 10%(v/v).

Com as informações apresentadas nas Figuras 21 e 22, foram calculados os parâmetros cinéticos de crescimento do consórcio microbiano para os reatores STR e airlift (Tabela 4).

Tabela 4: Valores médio de Coeficiente de transferência de oxigênio (k_{La}), diferencial de biomassa (Δ_x)*, diferencial média de biomassa (Δ_{xm} **), fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$); a velocidade específica de crescimento (μ); e a produtividade celular (P_x). Para os reatores STR e airlift.

Parâmetro Cinético	Reator STR	Reator Airlift
k_{La} (h^{-1})	$25,34 \pm 1,19$	$119,37 \pm 7,06$
Δ_x	$2,20 \pm 0,07$	$2,83 \pm 0,14$
Δ_{xm}	$1,76 \pm 0,22$	$1,77 \pm 0,16$
$Y_{x/s}$	$0,35 \pm 0,02$	$0,43 \pm 0,02$
μ	$1,52 \pm 0,27$	$1,78 \pm 0,022$
P_x	$0,089 \pm 0,00$	$0,118 \pm 0,01$

*: Variação entre as concentrações de biomassa máxima nos tempos zero e tempo total de cultivo ($g.L^{-1}$);

** : Variação entre as concentrações de biomassa nos tempo zero e o tempo n ($g.L^{-1}$)

Com base nas informações apresentadas na Tabela 4, verifica-se através dos valores de k_{La} que a difusão de ar é indiscutivelmente mais acentuada no reator airlift; entretanto, isto não influencia s na variação de biomassa e no tempo de cultivo. Entretanto, parâmetros como a produtividade, a velocidade específica e o fator de conversão de substrato em biomassa, são mais elevados em comparação aos valores obtidos pelo reator STR.

Considerando o consórcio microbiano usado neste trabalho o desempenho do reator airlift se mostrou mais adequado. Os parâmetros cinéticos foram numericamente maiores para os testes realizados, conforme apresentado na Tabela 4. Este melhor desempenho pode se explicado em função da melhor oxigenação, que favorece a via oxidativa.

Cassiano *et al* (2003) também compararam o crescimento de *Streptomyces clavuligerus* em reatores de tanque agitado e reatores airlift, com o objetivo de produzir ácido clavulânico (AC). Segundo os autores a produção de AC no reator airlift (404,7 mg.L⁻¹) foi próxima à alcançada no melhor cultivo em biorreator convencional (467,0 mg.L⁻¹). Os autores ainda apresentaram melhores valores em biorreator convencional, mas os resultados alcançados para o biorreator airlift aliado às melhores condições de cisalhamento e menor consumo de potência validam a utilização desse sistema em bioprocessos.

Domingos (2009) estudou o crescimento de *Ceriporiopsis subvermispora* em culturas submersas para a produção de inóculo destinados ao processo de biopolpação. No trabalho foram avaliadas condições de crescimento em frascos agitados, reator STR e reator airlift. O reator airlift, segundo o autor, se mostrou mais adequando para o cultivo, pela maior quantidade de biomassa apresentada e também pela maior produtividade, de forma que ao termino do cultivo, proporcionou 14,1 g.L⁻¹ de biomassa, enquanto que os frascos agitados e o reator STR proporcionaram, ao final do cultivo, um acúmulo de biomassa aproximado de 9,0 g.L⁻¹ e 7,0 g.L⁻¹ respectivamente.

Já Silva *et al.* (2007), por meio do estudo da produção de poli-hidroxicanoatos (PHA) para a geração de polímeros biodegradáveis, estudaram o processo de produção do PHA baseados no uso de biorreatores com tanques agitados e com reator airlift. O desempenho dos reatores foi avaliado para a fase de crescimento de *R. eutropha* utilizando glicose. Os resultados obtidos de velocidade específica na fase exponencial e o fator de conversão de glicose em biomassa apresentaram resultados semelhantes ao reator de tanque agitado para as mesmas condições de cultivo.

4.3 Avaliação do uso de surfactante e glicose em frascos agitados

Na Figura 23 é apresentado a eficiência de biodegradação do petróleo com e sem a adição de surfactantes em 20 dias de cultivo do consórcio microbiano. Como pode ser observado, comparando os valores de eficiência de remediação nas duas condições, com o uso de surfactante foi obtida uma eficiência aproximada de 32%, enquanto na sua ausência deste a eficiência atingiu apenas 7%. Este aumento é resultado da ação anfipática do surfactante que reduz a tensão superficial do meio e aumenta a disponibilidade da molécula de petróleo ao micro-organismo.

Os surfactantes por sua vez, por serem um tipo de molécula que apresenta uma característica apolar ligada a outra com característica polar, reduzem as forças intermoleculares de atração entre as moléculas do meio, reduzindo a tensão superficial da solução. A tensão superficial é um efeito físico que ocorre na camada superficial de um líquido que leva a sua superfície a se comportar como uma membrana elástica. As moléculas situadas no interior de um líquido são atraídas uma entre as outras dificultando o contato com outras soluções e também dissolução de outros materiais (DALTIM, 2011).

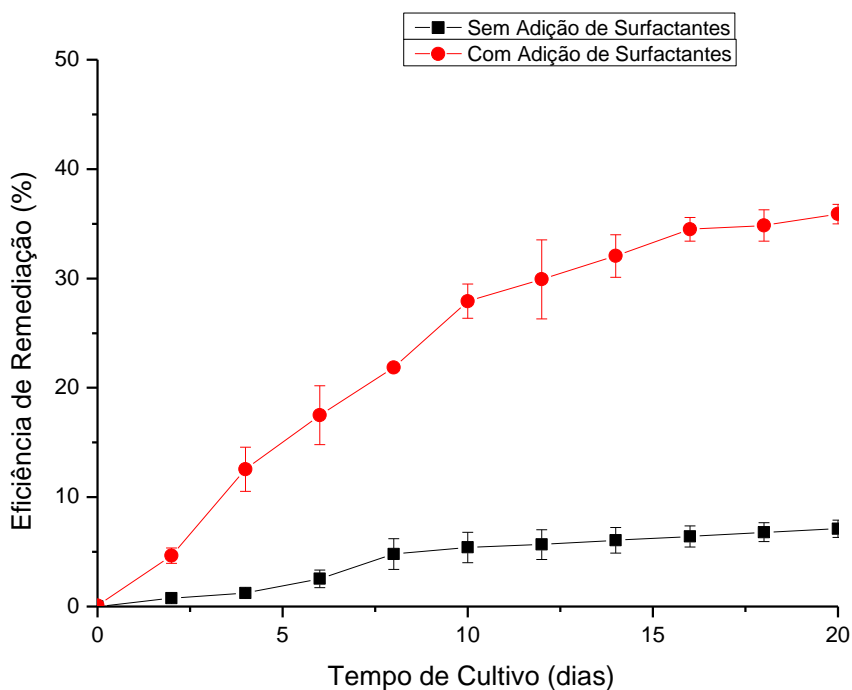


Figura 23: Percentual de eficiência de biorremediação de petróleo, cultivado em caldo nutriente, 20 g.L⁻¹ (m/v) de óleo bruto (petróleo) adicionado de glicose 10 g.L⁻¹ e com ou sem a adição de 100 g.L⁻¹ (m/v) de Tween 80 por consórcio microbiano.

O aumento no percentual de biodegradação com o uso de surfactantes em áreas contaminadas também foi observada por Franzetti *et al* (2008). Os autores avaliaram a eficiência de remediação com soluções com diferentes surfactantes e na ausência deste. Os resultados obtidos variaram de 64% a 91% para as soluções com surfactante e 63% para a solução sem surfactante. Os autores concluíram que o uso de surfactantes representa um valioso método para melhorar o acesso dos micro-organismos aos compostos de baixa solubilidade e recalcitrantes em técnicas de biorremediação.

Também Bardi e colaboradores (2000) estudaram a degradação de hidrocarbonetos por uma população microbiana com surfactante para aumentar a disponibilidade do contaminante. Os surfactantes por aumentar a solubilidade dos contaminantes no meio líquido, possibilitaram acelerar a degradação. Em geral os autores encontraram eficiências próximas a 100% com a utilização de surfactantes em apenas 10 dias de cultivo, enquanto na ausência deste, para o mesmo período de cultivo, atingiram cerca de 30% de eficiência de remediação.

Quanto ao uso de glicose como co-substrato, na Figura 24 é apresentada a eficiência de remediação do petróleo nas condições de cultivo com e sem o uso de glicose.

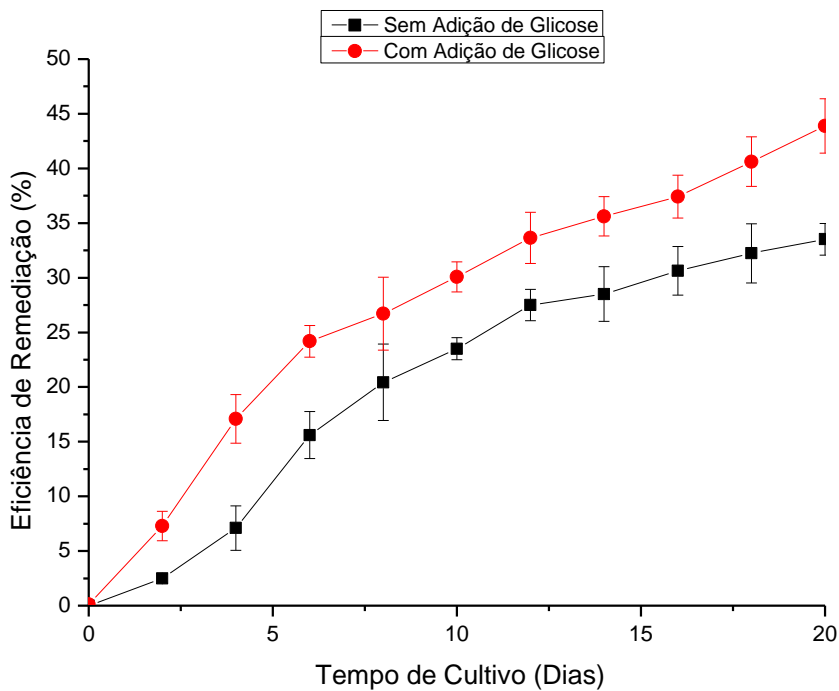


Figura 24: Eficiência de biorremediação de petróleo, em cultivo submerso, em caldo nutriente, 20 g.L⁻¹ (m/v) de óleo bruto (petróleo) adicionado de glicose 10 g.L⁻¹ e com ou sem a adição de 100 g.L⁻¹ (m/v) de Tween 80 por consórcio microbiano.

É possível visualizar que a adição de glicose proporcionou uma melhora de cerca de 28% na remediação.

Rodrigues *et al* (2012) avaliou a ação de *Aspergillus niger* em reator para o tratamento de águas contendo hidrocarbonetos. O cultivo foi realizado em 10 ciclos de 7 dias para a remoção de Benzeno, Tolueno e Xileno. Foram adicionadas porções semanais de glicose, onde após 4 dias de cultivo não foram mais detectadas concentrações dos hidrocarbonetos.

Em estudos anteriores, Sary (2009) também fez uso de glicose como co-substrato para biorremediação de solo contendo óleo diesel por consórcio microbiano acrescido de *Pleurotus sajor caju*. Foram realizados testes de bioestimulação, bioaugmentação e atenuação natural com presença e ausência de co-substrato. Os resultados apresentaram uma eficiência de mais de 99% de remediação do óleo diesel em presença de co-substrato, enquanto na ausência deste a eficiência não ultrapassou 60% para o mesmo período de cultivo. A diferença na eficiência de remediação obtida nestes dois experimentos decorre do uso de solo contaminado com diesel, um produto do beneficiamento do petróleo, no primeiro caso. Este composto xenobiótico é de mais fácil assimilação por ser composto basicamente de cadeias naftênicas, além do consórcio utilizado já estar habituado a presença deste contaminante, ao contrário do experimento com petróleo bruto, no qual se propôs ao mesmo consórcio condições estressantes de crescimento, na presença de uma molécula de difícil assimilação.

Ainda Costa *et al* (2007) trabalharam na obtenção de um consórcio microbiano em meio de cultivos bioestimulados com glicose e sulfato de amônio, o qual acelerou a reprodução celular das bactérias, em comparação com o mesmo meio na ausência destes co-substratos.

Resultados semelhantes a este trabalho quanto ao uso de co-substrato foram obtidos por Rodrigues (2006). Em processo em batelada e contínuo com o uso do fungo *Aspergillus niger* em cultivo submerso para remoção de fenol em água residuária. Os fungos apresentaram maior desenvolvimento nos ensaios contendo glicose, que alcançaram uma remoção média de 100% de fenol no quinto e último dia de experimento, enquanto para os ensaios sem o co-substrato a remoção não ultrapassou de 47%.

Silva *et al.* (2009) também estudaram da influência da glicose como co-substrato em meio aquoso sintético na remoção de corante azo por *Aspergillus niger* em reator em batelada. O estudo foi realizado em diferentes concentrações, sendo a Etapa I (1g/L), Etapa II (0,5g/L) e Etapa III (sem glicose). Em relação à remoção de matéria orgânica solúvel, os percentuais obtidos nas etapas em que a glicose foi adicionada, Etapas I e II, a remoção alcançou, 86% e 71% respectivamente, quando comparadas a etapa III, cuja remoção foi de apenas 5%, comprovando que a adição de co-substrato no meio é significativa para obtenção de melhores eficiências na remoção de matéria orgânica solúvel.

Dessa forma a glicose como um co-substrato propicia aos micro-organismos um substrato mais facilmente assimilável para o crescimento das células até que estas estejam aptas para consumir o composto xenobiótico, portanto o uso de glicose se apresenta como um recurso positivo para a biorremediação de hidrocarbonetos. O aumento de cerca de 30% de eficiência na remediação do petróleo em cultivo submerso, em comparação com os resultados apresentados na ausência de surfactante, obtido neste trabalho justificou a continuidade dos testes de remediação tendo a glicose como co-substrato nos reatores STR e airlift com o uso de surfactante.

4.4 Biodegradação do óleo bruto em reator STR e airlift

Com base nos experimentos realizados em frascos agitados, cujos resultados evidenciaram uma melhora na remediação do petróleo com o uso de surfactantes como agente emulsificante e da glicose como co-substrato, os testes nos biorreatores seguiram a mesma metodologia de preparação do meio de cultivo tanto quanto de inóculo.

Ao iniciar os experimentos de biorremediação em biorreatores, a presença do surfactante Tween 80 à uma concentração a 10%, possibilitou uma redução da tensão superficial do meio de cultivo facilitando a dispersão de ar nos reatores, porém formando espuma, a qual não pode ser controlada.

Desta forma, nos ensaios realizados nos biorreatores, por dificuldades operacionais, não foi possível executar os experimentos com adição de surfactante ao meio de cultivo, pois houve formação de espuma ocasionando perda do meio e causando danos no equipamento. Por este motivo os meios de cultivo foram preparados do mesmo modo do que obtido nos ensaio em frascos agitados, entretanto sem a adição de surfactantes.

Nos biorreatores avaliados, a capacidade de transferência de oxigênio é medida pelo k_{LA} , avaliado a cada experimento. O reator STR apresentou um k_{LA} de $8,48 \text{ h}^{-1}$, enquanto o airlift $46,04 \text{ h}^{-1}$ (os cálculos de k_{LA} são apresentados anexo). Diferentemente dos resultados de k_{LA} obtidos nos ensaios de crescimento celular, os valores de K_{LA} obtidos para os reatores STR e airlift, com meio de cultivo contendo petróleo, foram inferiores.

A seguir serão apresentados os resultados dos ensaios conduzidos no reator STR e no reator airlift.

4.4.1 Ensaios conduzidos em biorreator STR

Na Figura 25 é apresentado uma imagem do reator STR utilizado nos ensaios.



Figura 25: Biorreator STR, montado para experimento de degradação do petróleo.

A homogeneidade do meio foi observada visualmente durante todo o experimento. As amostragens foram realizadas a cada 2 dias e os resultados de percentual de degradação do petróleo, concentração de co-substrato e percentual de oxigênio dissolvido (pO_2) são apresentados na Figura 26.

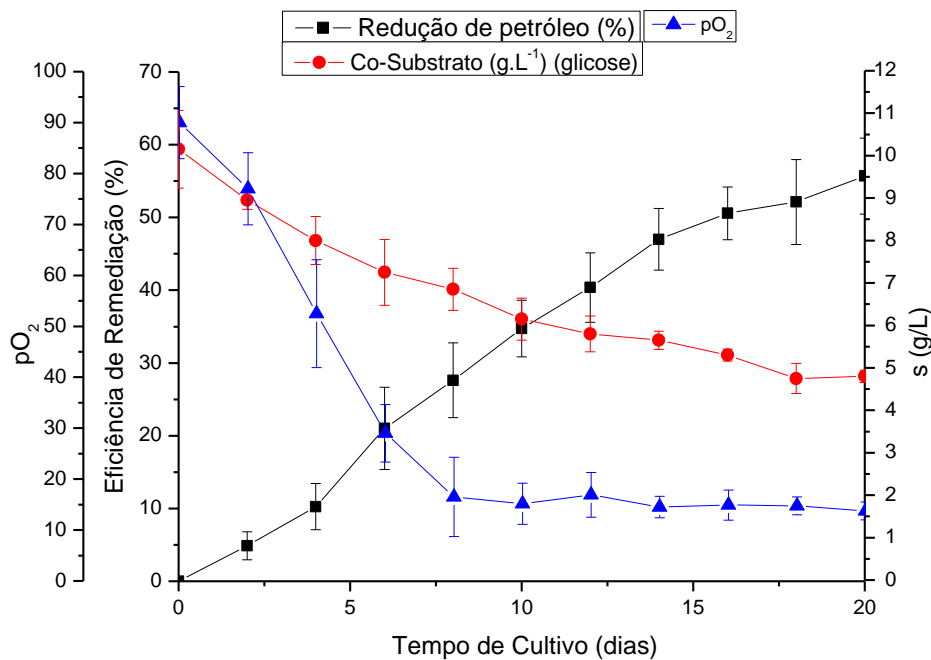


Figura 26: Curva de biorremediação de petróleo e consumo de oxigênio dissolvido em reator STR.

A eficiência de degradação de um constituinte contaminante está muitas vezes relacionado à sua degradabilidade, tanto quanto a quantidade de células microbianas disponíveis para realizar a degradação do composto. Nos experimentos realizados com petróleo no reator STR, não foi possível realizar a quantificação de células em g.L⁻¹, devida presença do óleo bruto.

A eficiência de remediação do petróleo apresentou um resultado superior se comparado com os frascos agitados, onde para o reator STR foi encontrada uma eficiência média de 55,7% de remediação, enquanto para os frascos agitados, na presença de surfactante, foi encontrada uma eficiência de 43,7% para o período de 20 dias do experimento.

Gargouri *et al* (2011) utilizaram um reator de tanque agitado para a biorremediação de um efluente com alta concentração de hidrocarbonetos. Os autores obtiveram um bioprocessamento confiável, no qual a partir de um eficiente consórcio microbiano aclimatado, obtiveram uma taxa de 95% de redução de carbono orgânico dissolvido, enquanto a concentração de hidrocarboneto de petróleo reduziu de 320 mg.L⁻¹ para 8 mg.L⁻¹, ou seja, 97,5% de eficiência de remediação em 225 dias de experimento.

Afim de comparar os dados obtidos por Gargouri *et al* (2011), calculou-se a velocidade global de degradação. O resultado obtido foi de $0,42 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, enquanto o resultado obtido para este trabalho foi $3,25 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. A princípio, isto mostra que o consórcio utilizado neste trabalho foi bastante eficiente na degradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo nas condições de cultivo utilizadas no reator STR. Entretanto a provável diferença entre as composições dos meios de cultivo utilizado em cada um dos trabalhos precisam ser melhor investigados.

Ururahy *et al* (1998) elaboraram um estudo de biorremediação de borras oleosas geradas nas indústrias de refino de petróleo, com base no desempenho de um biorreator de tanque agitado. Os experimentos foram conduzidos em batelada, onde o inóculo utilizado foi um consórcio microbiano nativo da própria borra e previamente adaptado. Após 42 dias de cultivo foram obtidas eficiências médias de 76,8% para óleos e graxas e 97,1% para as parafinas.

Raimundo e Rizzo (2002) utilizaram biorreatores para o tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos. Os autores trabalharam com um reator de lama com uma concentração de 10% de sólidos em suspensão. O conteúdo foi mantido sob agitação por 43 dias, 8 horas por dia. A eficiência de biodegradação dos hidrocarbonetos não ultrapassou 8%, inferior à eficiência de biodegradação obtida pelos frascos agitados de 10%. Essa baixa eficiência foi atribuída ao tempo em que o solo já se apresentava contaminado (acima de 03 anos), resultando substâncias bastante recalcitrantes.

4.4.2 Ensaio conduzido em biorreator airlift

Devido à injeção de ar no fundo do reator, também não foi possível utilizar o surfactante, devido a grande formação de espuma no reator. Como no reator STR, a temperatura do reator foi mantida a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e o condensador à uma temperatura de $5 \text{ }^\circ\text{C}$.

O meio de cultivo com o petróleo manteve-se homogêneo por pelo menos 12 h. Após este período foram identificadas gotículas de petróleo isoladas no reator, conforme mostrado na Figura 27. A formação destas gotículas gera uma heterogeneidade nas amostragens agregando incertezas a todo o experimento, entretanto, estes foram continuados para verificar o comportamento do reator a medida que os dias avançavam. A eficiência de remediação é apresentada na Figura 28.

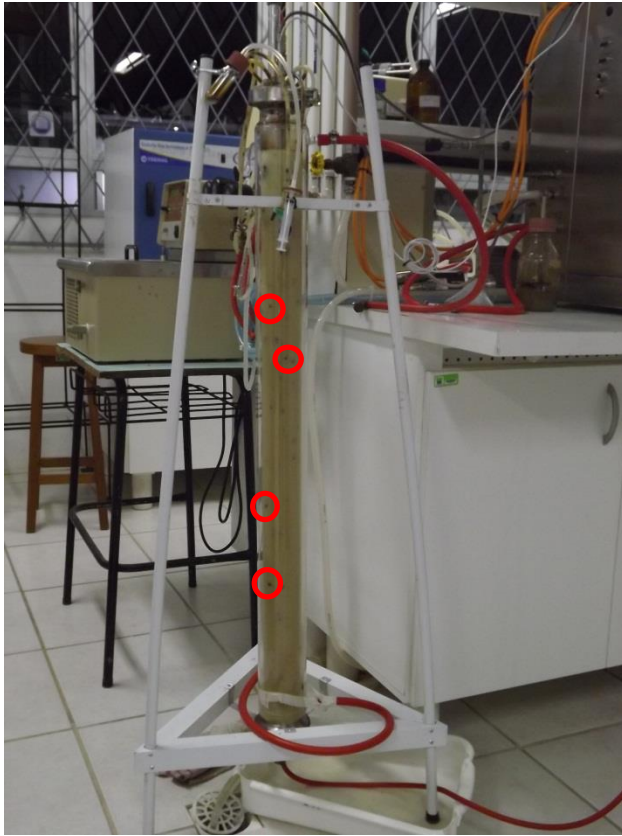


Figura 27: Formação de gotículas de óleo no interior de reator.

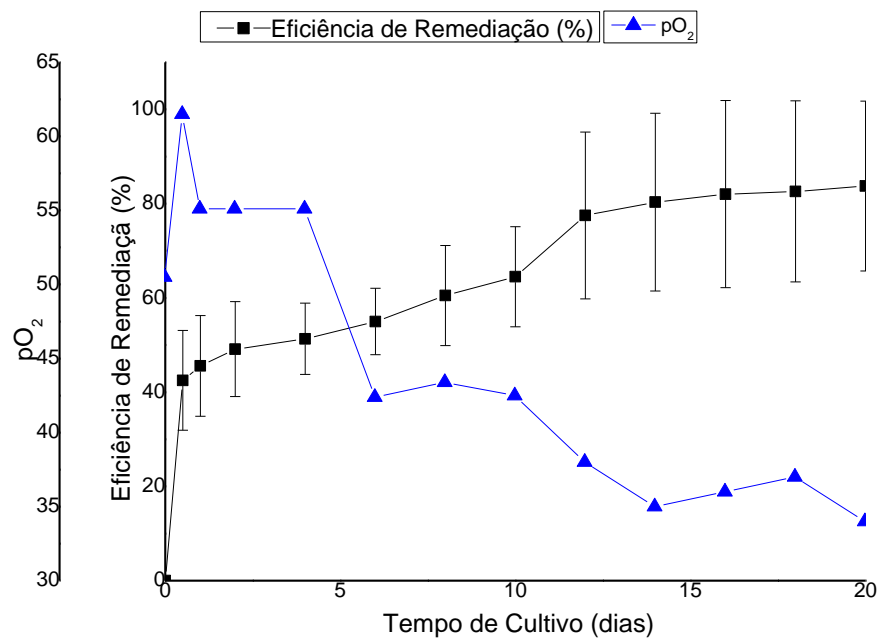


Figura 28 Eficiência de remediação do petróleo.

A medida que o cultivo evoluía, foi observada uma perda do meio de cultivo no reator, enquanto o óleo e o meio de cultivo formavam um sistema bifásico. Com a aglutinação do óleo e a perda do meio de cultivo por evaporação, as quantificações da concentração de óleo não foram confiáveis para avaliar a eficiência do experimento. As Figuras 29 a 31 apresentam uma evolução da evaporação do líquido no reator.



Figura 29 Reator Airlift amostragem de 12 horas de cultivo. Figura 30 Reator Airlift amostragem de 6 dias de cultivo. Figura 31 Reator Airlift amostragem de 18 dias de cultivo.

Mesmo com as dificuldades apresentadas, o reator airlift é muito utilizado para biorremediação de diversos compostos xenobióticos, como hidrocarbonetos em efluentes líquidos industriais ou águas superficiais contaminadas, entre outros.

Saravan *et al* (2009) realizaram o tratamento de efluentes sintéticos contendo hidrocarbonetos fenólicos em biorreator airlift de loop interno de modo contínuo usando *Pseudomonas sp.* A eficiência do reator foi avaliada por meio de variáveis como a retenção hidráulica com os tempos de 4,1 e 8,3 e o fluxo de entrada de alimentação do reator, o qual foi de 5 a 10 mL.min⁻¹. O estudo demonstrou uma completa degradação dos hidrocarbonetos.

Irani e colaboradores (2011) também realizaram experimentos com airlift para avaliar a biodesulfurização do petróleo. Foram usadas células de *Gordonia alkanivorans* como agente biodesulfurizador do diesel, com uma concentração inicial de enxofre de 28 mg.L⁻¹. Foram avaliadas as variáveis como a velocidade de gás e o volume de trabalho. Os melhores resultados foram obtidos para uma velocidade de gás de 2,5 L.min⁻¹ e 6,6 L de volume de trabalho. Nestas condições foi obtida uma eficiência de desulfurização de 50%.

Ainda Oliveira e França (2012) trataram ar contaminado com hexano em um biorreator airlift. Foi utilizado um inoculado com a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* para tratar ar contaminado com hexano a $1,26 \text{ g.m}^{-3}$. Em menos de 15 dias os autores obtiveram em torno de 80% eficiência de remoção do hidrocarboneto quando se empregou a concentração de inóculo de $0,225 \text{ g.L}^{-1}$.

5 CONCLUSÕES

O consórcio microbiano extraído de um meio natural, submetido a um crescimento celular em cultivo submerso em reatores STR e Airlift, apresentou produtividade superior no reator airlift, em comparação ao reator STR. A produtividade celular no reator airlift foi de $0,118 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$, enquanto para o STR chegou a $0,089 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$. O maior resultado obtido pelo reator airlift é devido ao coeficiente de transferência de oxigênio chega a ser 4,5 vezes maior, se comparado ao coeficiente obtido no reator STR.

Conhecendo a cinética de crescimento celular do consórcio microbiano nos dois reatores, o mesmo consórcio foi utilizado para a remediação de petróleo em frascos agitados. Durante o teste de frascos agitados, foram avaliados o uso de surfactante (Tween 80) e glicose, para melhorar a interação do consórcio com o óleo e disponibilizar um substrato facilmente assimilável ao desenvolvimento inicial das células. Foi atestado a melhora na eficiência de remediação do óleo por parte do consórcio, que chegou a mais de 400%, se comparado com o cultivo na ausência de surfactante e glicose.

Definido o meio de cultivo, os testes passaram a ser realizados em biorreatores (STR e airlift). Com a complexidade do meio e a presença de óleo, o coeficiente de transferência de oxigênio baixou em ambos os reatores. Com o uso dos equipamentos e na presença de surfactante, ocasionando a redução da tensão superficial, houve formação de espumas, que não foram controladas com o uso normal dos equipamentos.

Para dar continuidade ao teste, foi removido o surfactante e mantida a glicose como co-substrato. Visualmente foi observada heterogeneidade no reator airlift após 12 horas de cultivo, que se manteve durante os 20 dias de experimento. Desta forma, não foi possível obter amostras significativamente homogêneas para a avaliação da eficiência do consórcio.

Para o reator STR, o meio de cultivo também não continha surfactante, mas por funcionar com um meio de agitação além da injeção de ar, o meio manteve-se homogêneo possibilitando a validação do experimento. Foram obtidos 55,7% de eficiência na remediação do óleo, enquanto que para os frascos agitados, apenas 43,7%.

Por fim, o reator airlift possibilitou um aumento mais rápido da quantidade de células do consórcio microbiano, mas por causa da complexidade do meio de cultivo, este não foi o mais indicado para a remediação do petróleo. No reator STR, obteve-se a melhor eficiência de remediação válida, por manter a homogeneidade do meio.

PERSPECTIVAS

Com os resultados apresentados no trabalho sugere-se buscar um novo surfactante ou variar a concentração do surfactante utilizado neste trabalho, para que possibilite o monitoramento das células microbianas.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, R. O. **Condicionamento e comissionamento dos sistemas elétricos da sonda petrobras II 10000**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Condicionamento) – Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória.
- ALEKSIEVA, P.; PEEVA, L. Investigation of Acid Proteinase Biosynthesis by the Fungus *Humicola lutea* 120-5 in an Airlift Bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology** n° 26, página 402 – 405, 2000.
- ALLEBRANDT, S. R. **Uso de peróxidos na bioestimulação de bactérias endógenas sobre hidrocarbonetos derivados de petróleo em solos contaminados**. 2009. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) – Universidade Santa Cruz do Sul-UNISC, Santa Catarina.
- ATLAS, R. M. **Bioaugmentation to enhance microbial bioremediation**. In: LEVIN, M. A & GEALT, M. A eds. **Biotreatment of industrial and hazardous waste**. McGraw-Hill, páginas 19 – 38, 1993.
- BARDI, L.; MATTEI, A.; STEFFAN, S.; MARZONA, M. Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with β -cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability. **Enzyme and Microbial Technology**, n° 9, 2000.
- BARRERA, L. M.; URBINA, E. C. Removal of Hexavalent chromium by *Trichoderma viride* in an airlift bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology** n° 40, página 107 – 113, 2006.
- BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B.; FRANKENBERGER, W. T. Jr. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology** n° 34, páginas 65 – 68, 2003.
- BEWLEY, R. J. F.; STOTZKY, G.; BOLLAG, J. M. Field Implementation of In Situ Biorremediation: Key Physicochemical and Biological Factors. **Soil Biochemistry**. N.Y, 1996.
- BUMPUS, J. A.; TIEN, M.; AUST, S. D. Oxidation of Persistent Environmental Pollutants by White rot Fungus. **Science**. 1985.
- CAMEOTRA, S. S; SINGH, P. Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. **International Biodeterioration & Biodegradation**. n° 3, 2008.

- CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Estabelecimento de plantas herbáceas em solo com contaminação de metais pesados e inoculação de fungos micorrízidos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. nº 12, 2001.
- CASSIANO, L. C. M. filho; NETO, A. B.; BADINO, A. C. Jr. **Avaliação do Desempenho de Biorreatores “Airlift” para a Produção de Ácido Clavulânico**. Disponível em <www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t138.doc>. Acesso em 13 de mar. de 2011.
- CERNIGLIA, C. Fungal Metabolismo of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Past, Present and Future Applications in Biorremediation. **J. of Ind. Microbiol.** Nº 19, página 324 – 333, 1997.
- CETESB. **O Petróleo da História antiga à História Moderna**. Disponível em <<http://www.cetesb.sp.gov.br/gerenciamento-de-riscos/vazamento-de-oleo/209-vazamento-de-oleo>>. Acesso em 05 de mar. de 2011.
- CEITA, G. O. **Poluição Provocada pelo Petróleo**. Disponível em <http://poluicao_ambiental.vilabol.uol.com.br/seminarios/Poluicao_petroleo.html>. Acesso em 24 de jun. de 2012.
- CEOLIN, N. **A importância do petróleo**. Disponível em <<http://www.coladaweb.com/geografia/a-importancia-do-petroleo>>. Acesso em 14 de fev. de 2011;
- CERRI, M. O. **Hidrodinâmica e Transferência de Oxigênio em Três Biorreatores Airlift de Circulação Interna Geometricamente Semelhantes**. 2009. Monografia (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR.
- CHISTI, Y. **Airlift Bioreactors**, Elsevier Science Publishers Ltd, Belfast, Northern Ireland, 1989.
- CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. Communication to the Editor, On the Calculation of Shear Rate and Apparent Viscosity in Airlift and Bubble Column. **Biorreactors, Biotechnol**, Bioeng. nº 34, páginas 1391 – 1392, 1989.
- CHOU, D. K.; KRISHNAMURTHY, R.; RANDOLPH, T. W.; CARPENTER, J. F.; MANNING, M. C. Effects of Tween 20 and Tween 80 on the stability of Albutropin during agitation. **J Pharm Sci**, 1994.
- CIMADES. **Contingencial ambientales en el estado de Tabasco**. Gobierno del Estado de Tavasco, Villehermosa, 1999.

- CLEVELANDO, C. J. **Exxon Valdez oil spill**. Disponível em <http://www.eoearth.org/article/Exxon_Valdez_oil_spill?topic=58075>. Acesso em 05 de mar. de 2011.
- COELHO, E. B. A. P. **Aspectos Ambientais de uma Refinaria e Respectivas Formas de Controle**. Curitiba: Petrobrás, 2002.
- Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, 1º. Rio Grande do Norte. **Estudo da Interação Asfalteno-Resina em Diferentes Sistemas-Modelo**. Livro de Resumos: Rio Grande do Norte: UFRN, 2001.
- Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, 2. Rio de Janeiro. **Avaliação da bioestimulação em solos argilosos contaminados com petróleo**: livro de resumos: Rio de Janeiro: UFRJ, 2003.
- Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, 3. Salvador. **Isolamento e Seleção de Microrganismos Degradadores de Derivados de Petróleo**. Livro de Resumos. Salvador: UNIFACS, 2005.
- Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, 3. Salvador. **Degradação do Petróleo em Derrames no Mar – Intemperismo X Biorremediação**. Livro de Resumos. Salvador: UNIFACS, 2005.
- Congresso Interno de Iniciação Científica, 12. São Paulo. **Estudo do Controle de Poços em Operações de Perfuração em Água Profundas e Ultraprofundas**: Livro de Resumos: São Paulo: UNICAMP, 2004.
- COSTA, A. F. S.; SILVA, J. R. R.; SANTOS, R. C. M. M.; FARIAS, C. B.; SARRUBO, L. A.; JORDÃO, R. C. C.; SALGUEIRO, A. A. Obtenção de consórcio de microrganismos a partir de amostra de petróleo. **Revista Ciência e Tecnologia**. n.º 1, 2007.
- XXVII Congresso Internacional de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2000, Porto Alegre. **Uso de Reator Sequencial em Batelada para Pós-tratamento de Efluentes de Tratamento Anaeróbio**. Livro de Resumos. Porto Alegre, 2000.
- DALVIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2011.
- DEMAIN, A. L.; DAVIES, J. E. **Manual of industrial microbiology and biotechnology**. 2. ed Washington: ASM, 1999.
- DOMINGOS, M. **Estudo do crescimento de *Ceriporisopsis subvermispora* em culturas submersas para produção de inóculos destinados ao processo de**

biopolpação. 2009. Monografia (Mestrado em Engenharia a) – Escola de Engenharia de Lorena – USP.

- DOMINGUES, L.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J. A. Alcohol Production from Cheese Whey Permeate Using Genetically Modified Flocculent Yeast Cells. **Biotechnology and Bioengineering**, nº 5, páginas 507 – 514, 2001.
- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: Uma Introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004.
- ETKIN, D. S., 1999 **Historical Overview of Oil Spills from All Sources (1960-1998)** disponível em <http://www.environmental-research.com/publications/pdf/spill_costs/papen.pdf>. Acesso em fev. de 2011
- FARIAS, Y. P. M. M.; LEMOS, J. L. S. **Aplicação de microrganismos na remediação de áreas contaminadas por metais pesados**. XVI Jornada de iniciação científica – CETEM, 2008.
- FRANZETTI, A.; GENNARO, P. D.; BESTETTI, G. LASAGNI, M.; PIETA, D.; COLLINA, E. Selection of surfactants for enhancing diesel hydrocarbons-contaminated media bioremediation. **Journal of Hazardous Materials**, nº 3, 2008.
- FUNGARO, D. A.; FLUES, M. S. M.; CELEBRONI, A. P. Estabilização de solo contaminado com zinco usando zeólitas sintetizadas a partir de cinzas de carvão. **Química Nova**, nº4, 2004.
- GLOBO, **Produção de Petróleo no Brasil cai 1,5% em abril, Segundo ANP**. Disponível em <<http://g1.globo.com/economia/noticia/2012/06/anp-producao-de-petroleo-no-brasil-cai-15-em-abril.html>> Acesso em 23 de jun. de 2012.
- GARGOURI, B.; KARRAY, F.; MHIRI, N.; ALOUI, F.; SAYADI, S. Application of a continuously stirred tank bioreactor (CSTR) for bioremediation of hydrocarbon-rich industrial wastewater effluents. **Journal of Hazardous Materials** nº 189, páginas 427 – 434, 2011.
- GAVRILESCU, M.; ROMAN, R. V. Performance of Airlift Bioreactors in the Cultivation of Some Antibiotic Producing Microorganisms. **Acta Biotechnol.** nº 18, páginas 201 – 209, 1998.
- GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. de L.; MANFIO, G. P. Aspectos Biológicos e Técnicos da Biorremediação de Compostos Xenotbióticos. **Revista Biotecnológica**, nº 34, páginas 36 – 43, 2005.

- HATCH, L. F.; MATAR, S. **Chemistry of Petrochemical Processes 2 ed.** Texas: Gulf Publishing Company, 2000.
- HUESEMANN, M. H.; TRUEX, M. J. The role of oxygen diffusion in passive bioremediation of petroleum contaminates soils. **Journal of Hazardous Materials** n° 51 páginas 93 – 113, 1996.
- IRANI, Z.A.; MEHRNIA, M. R.; YAZDIAN, A.; SOHEILY, M.; MOHEBALI, G.; RASEKH, B. Analysis of petroleum biodesulfurization in an airlift bioreactor using response surface methodology. **Bioresource Technology** n° 102, 2011.
- ITOF. **Handbook 2011/12** International Tanker Owners Pollution Federation Limited, 2011.
- JACQUES, R. J. S.; OKEKE, B. C.; BENTO, F. M.; TEIXEIRA, A. S. PERALBA, M. C.; CAMARGO, F. A. O. Microbial Consortium Bioaugmentation of a Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Contaminated Soil. **Elsevier: Bioresource Technology** n° 99, páginas 2637 – 2643, 2008.
- JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, n° 4, páginas 1192 -1201, 2007.
- JIA, S.; WANG, M.; KAHAR, P.; PARK Z.; OKABE, M. Enhancement of yeast Fermentation by addition of oxygen vectors in air-lift bioreactor. **Journal of Fermentation and Bioengineering** n° 2, páginas 176 – 178, 1997.
- KERMANSHAHI, A.; KARAMANEV, D.; MARGARITIS, A. Biodegradation of petroleum hydrocarbons in an immobilized cell airlift bioreactor. **Water Research** n° 39, páginas 3704–3714, 2005.
- KUNERT, R. Processamento Primário de petróleo. Rio de Janeiro: **Escola de Ciência e Tecnologia E&P**, 2001.
- LEAVITT, M.; BROWN, K. L. Biostimulation versus bioaugmentation – three case studies. In: HINCHEE, R. E., ALLEMAM, B. C., HOEPEL, R. E. E., MILLER, R. N. (1994). **Hydrocarbon bioremediation**. Lewis Publishers. Boca Raton, FL. 72p., 1994.
- LEVENSPIEL, O. **Chemical Reaction Engineerring 3rd ed.** Nova York: John Wiley & Sons, 1999.
- LISOWSKA, K.; DLUGO`NSKI, J. Concurrent Corticosteroid and phenanthrene transformation by filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology** n° 85, páginas 63 – 69, 2003.

- LOPES, C. F.; MILLANELLI, C. C. **Limpeza de Ambientes Costeiros Atingidos por Óleo.** Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/artigos/artigos/limpeza.pdf>. Acesso em 09 de mar. de 2011.
- LOBO, F. **Rio Estuda Prevenção de Acidentes com Petróleo.** Disponível em <http://www.oeco.com.br/salada-verde/23900-rio-estuda-prevencao-de-acidentes-com-petroleo>. Acesso em 08 de mar. de 2011.
- LUCCHESI, C. F. **Estudos Avançados: Petróleo.** Rio de Janeiro, PETROBRÁS, 1998.
- MACEDO, R. C.; BERVERT, V. H. C.; LEMOS, J. L. S.; TRINDADE, P. V. O.; RIZZO, A. C. L. **Biorremediação de Solos Impactados por Óleo Cru Utilizando Fungos Filamentosos.** Nilópolis: CEFETEQ, 2003.
- MACIEL, C. C. S.; TAKAKI, G. M. C.; GUSMÃO, N. B. Potencialidade de fungos filamentosos em degradar óleos lubrificantes. **Revista Eletrônica de Biologia** n° 3, páginas 58 – 64, 2010.
- MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel.** Tese (Doutorado em Geociência e Meio Ambiente) – Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Campus de Rio Claro, 2006.
- MCCAIN, W. D. **The Properties of Petroleum Fluids** 2 ed. Oklaroma: PennWall Publishing Company, 1990.
- MEHRNIA, M. R.; TOWFIGHI, J.; BONAKDARPOUR, B.; AKBARNEJAD, M. M. Gas hold-up and oxygen transfer in a draft-tube airlift bioreactor with petroleum-based liquids. **Biochemical Engineering Journal** n° 22, páginas 105–110, 2005.
- MELLO, A. J. P., Considerações legais sobre elaboração de um plano de contingência para vazamentos de óleo no Brasil. **Vértices**, n° 1/3, 2005.
- MELLO, J. M. M. **Biodegradação dos compostos BTEX em um reator com biofilme.** 2007. Dissertação (Mestrado em engenharia química) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.
- MISSEN, R. W.; MIMS, C. A.; SAVILLE, B. A. **Introduction to Chemical Reaction Engineering and Kinetics.** Toronto: John Wiley & Sons, 1998.
- MOTTA, L. D. Q. **Saiba Mais Sobre Como é Feito a Remoção do Petróleo.** Disponível em <http://ecoil-leonardo.blogspot.com/2010/10/saiba-mais-sobre-como-e-feito-remocao.html>. Acesso em 09 de mar. de 2011.

- NASCIMENTO, M. P. C., CARVALHO, M. L. B. **Efeito da biorremediação *in situ* (bioestimulação) sobre a capacidade de recuperação da macrofauna bêntica em sedimentos contaminados por óleo.** X JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX 2010 – UFRPE: Recife, 18 a 22 de outubro.
- National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). **Summaries of Significant U.S. and International Spills, 1967 – 1991.** Washington: NOAA / Hazardous Material Response and Assessment Division, 1992.
- NETO, A. A. D.; GURGEL, A. **DEQ 370 – Refino de petróleo e petroquímica.** Rio Grande do Sul: UFRS – Departamento de Engenharia Química, 2008.
- NICODEMOS, R. M.; LIMA, A. M.; ASSIS, A. J. **Produção de Hidrogênio a partir da Fermentação de Compostos Orgânicos.** Uberlândia: XII Seminário de Iniciação Científica, 2008.
- OLIVEIRA, F. J. S.; FRANÇA, F. P. **Tratamento de ar contaminado com hexano em biorreator tipo airlift.** Disponível em <http://www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t408.doc>. Acesso em 20 de abr. de 2012.
- PAULA, A.M.; SOARES, C. R. F. S.; SIQUEIRA, J. O. “**Biomassa, atividade microbiana e fungos micorrízicos em solo de landfarming de resíduos petroquímicos**”, Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v. 10, n. 2, pp. 448-455, 2006.
- PEREIRA, M. A. **Reator Batelada.** Disponível em <<http://www.marco.eng.br/reatores/reatorbatelada.html>>. Acesso em 12 de mar. de 2011.
- PRAVE, P.; FAUST, U.; SITTIG, W. **Fundamentals of biotechnology.** Weihenim: VCH, 1987.
- RAIMUNDO, R. S.; RIZZO, A. C. L.; TRINDADE, P. V. O. **Avaliação das técnicas de bioaumentação e bioestimulação no tratamento de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo.** Comunicação Técnica à 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas-MG, 2003.
- RATTEDGE, C.; KRISTIANSEN, B. (Edit.). **Basic biotechnology.** 2.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2001.
- REIS, J. C. **Environmental Control in Petroleum Engineering.** Houston, Texas: Gulf Publishing Company, 1996.

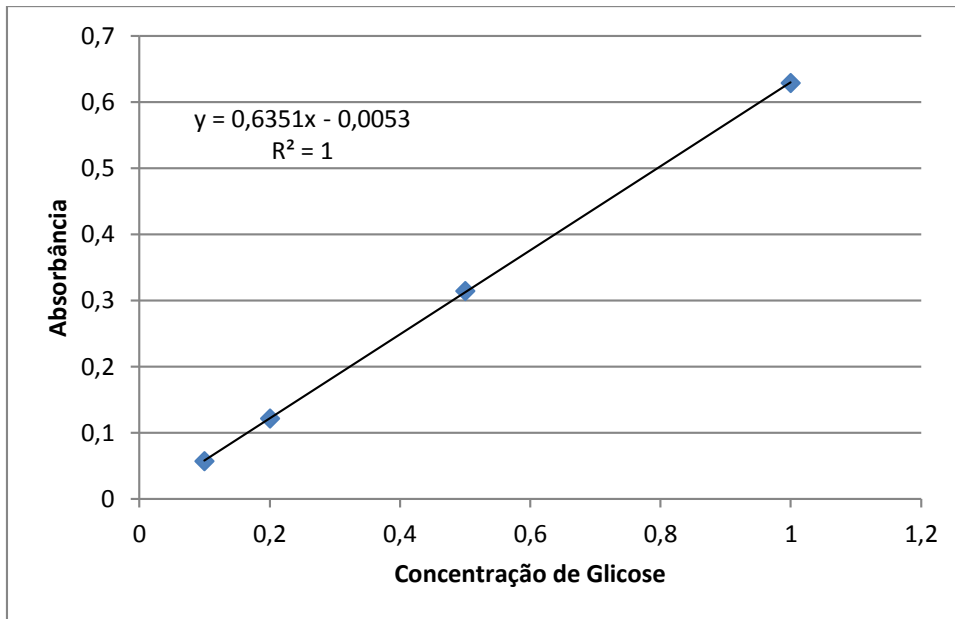
- Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 6., 2005, Rio de Janeiro. **Remoção Biológica de Fenol e Nitrogênio Amoniacal de Efluentes em Reator Batelada Sequencial**. Livro de Resumos. Rio de Janeiro: UNICAMP, 2005.
- ROCHA, L.L. **Estudo de comunidades bacterianas de solos do manguezal da Barra Grande, Icapui (CE) e seleção de cepas com potencial para degradar hidrocarbonetos**. 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado em ciências marinhas tropicais) – Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Ceará.
- RODRIGUES, K. A. **Uso de Reatores Biológicos com Fungos para Remoção de Fenol de Água Residuária Sintética**. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, 2006.
- RODRIGUES, K.; OLIVEIRA, P. C. C.; AMARAL, F. W.; SIQUEIRA, J. P. S.; ARAÚJO, R. S.; WANDERLEY, C. R. P.; MARINHO, G. **Tratamento de água com hidrocarbonetos aromáticos por uso de reator em bateladas sequenciais com inoculo fúngico**. Engenharia Sanitária e Ambiental. Volume nº17 – nº 2. Rio de Janeiro, Apr. a Jun. de 2012.
- ROMERO, F. **Patrôleo**. Petrobrás – Guia do estudante do Petróleo. Outubro de 2008.
- ROSATO, Y. B. Biodegradação do petróleo In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Org.) **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: EMBRAPA, página 307 – 334, 1997.
- SARAVANAN, P.; PAKSHIRAJAN, K.; SAHA, P. Treatment of phenolics containing synthetic wastewater in an internal loop airlift bioreactor (ILALR) using indigenous mixed strain of *Pseudomonas* sp. under continuous mode of operation. **Bioresource Technology** nº 100, 2009.
- SARY, P. H. M. **Utilização de *Pleurotus sajous caju* na Biorremediação de Solo Contaminado com Óleo Diesel**. 2009. Monografia (Bacharelado em Engenharia Química) – Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE.
- SBPC/Labjor. **O Petróleo e a Agressão ao Meio Ambiente**. Disponível em <<http://www.comciencia.br/reportagens/petroleo/pet09.shtml>>. Acesso em 05 de mar. de 2011.
- SCHMIDELL, W. **Agitação e Aeração em Biorreatores**. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnology Industrial, vol. 3 (Processos Fermentativos e Enzimáticos)**. cap. 14, página 277 – 331, 2002.

- SILVA, C. R. R. **Água Produzida na Extração de Petróleo**. 2000. Monografia (Curso de Especialização e Tecnologias Ambientais na Indústria) – Escola Politécnica, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Salvador.
- SILVA, M. G. **Biorremediação de Solo Contaminado por Petróleo por Diferentes Técnicas de Bioestimulação**. 2007. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio Grande – UFRG.
- SILVA, K. M. L.; MARINHO, G.; WANDERLEY, C. R. P.; MARINHO, G.; RODRIGUES, K. Degradação de Corante AZO em Efluente Sintético de Indústria Têxtil por *Aspergillus Niger* NA 400 EM. **Conexões Ciência e Tecnologia** n° 1, páginas 24 – 33, 2010.
- SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; ROCHA, R. C. S.; TACIRO, M. K.; PRADELLA, J. G. C. Produção Biotecnológica de Poli-hidroxicarboxilatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Quim. Nova**, n° 7, página 1732 – 1743, 2007.
- SILVA, R. F. **Introdução à Biorremediação**. Minicurso de biorremediação de petróleo – 24° Congresso de Microbiologia, 2007.
- SCHNEIDER, A. L. S. **Estudo da Produção de Inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907**. 1996. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina.
- SOUZA, R. **História do Petróleo no Brasil**. Disponível em <<http://www.brasilecola.com/brasil/historia-do-petroleo-no-brasil.htm>>. Acesso em 26 de fev. de 2011.
- STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of Fermentation Technology**. 2. ed Oxford: Butterworth-Heinemann, 1999.
- SZEWCZYK, S. B. O. **Processo Envolvidos em um Derramamento de Óleo no Mar**. Rio Grande – RS. Doutorado do curso de Oceanografia Física, 2006.
- TENG, Y.; LUO, Y.; SUN, M.; LIU, Z.; LI, Z.; CHRISTIE, P. Effect of bioaugmentation by *Paracoccus* sp. strain HPD-2 on the soil microbial community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged contaminated soil. **Bioresource Technology** n°101, página 3437 – 3443, 2010.
- THE INTERNATIONAL TANKER OWNERS POLLUTION FEDERATION LIMITED. **Clean Up and Response**. Disponível em <<http://www.itopf.com/spill-response/clean-up-and-response/>>. Acesso em 09 de mar. de 2011.

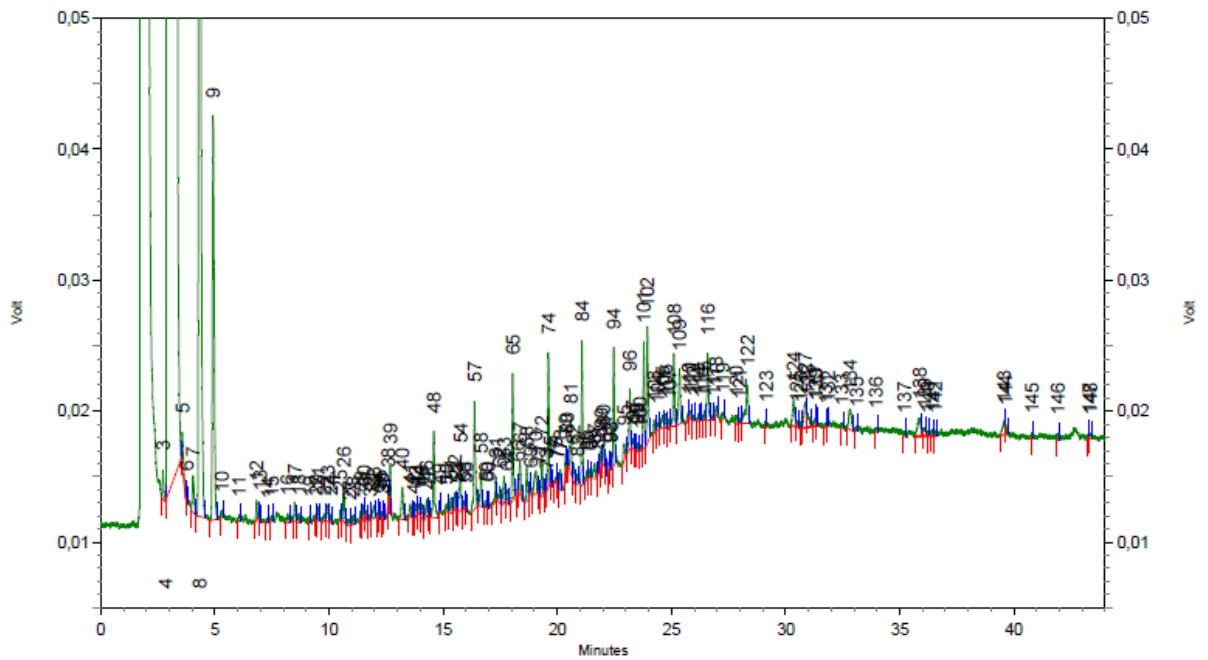
- THOMAS, J. E. **Fundamentos de Engenharia de Petróleo**. Rio de Janeiro: Interciência – 2 ed.: PETROBRÁS, 2004.
- THOMASI, S. S. **Avaliação de Parâmetros de Desempenho de Três Modelos de Biorreatores Pneumáticos de Bancada**. 2010. Monografia (Pós-Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR.
- TONINI, R. M. C. W.; REZENDO, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e Biorremediação de compostas de petróleo por bactérias: Revisão. **Oecologia Australis** n° 14, página 1025 – 1035, 2010.
- TRINDADE, P.; SOBRAL, L.; RIZZO, A.; LEITE, S.; SORIANO, A. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. **Chemosphere** n° 58, página 515 – 522, 2005.
- TSALIK, S., SCHIFFRIN, A., 2005 **Reportando o Petróleo**, Open Society Institute, New York-USA.
- TUTIDA, D.; FOGAÇA, R. **Como Funciona a Contaminação dos Solos**. Disponível em <<http://ambiente.hsw.uol.com.br/contaminacao-dos-solos6.htm>>. Acesso em 11 de mar. de 2011.
- UFRB. **Biorremediação Microbiana**. Disponível em <http://www.ufrb.edu.br/mapeneo/index2.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=52&Itemid=31>. Acesso em 09 de mar. de 2011
- UFRJ. **Perfuração em Águas Profundas na Costa do Brasil**. Disponível em <<http://acd.ufrj.br/multimin/mmp/textos/cap6p/Perf.%20Costa.htm>>. Acesso em 05 de mar. de 2011.
- UNICAMP. **O que é o petróleo**. Disponível em <http://www.cepetro.unicamp.br/petroleo/index_petroleo.html>. Acesso em 14 de fev. de 2011;
- VEJA, **Tamanho do Desafio**. Disponível em <http://veja.abril.com.br/030908/popup_brasil01.html>. Acesso em 26 de jun. de 2012.
- VOGEL, T. M. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. **Current Opinion in Biotechnology** n° 7, página 311 – 316, 1996.
- XU, Y.; LU, M. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. **Journal of Hazardous Materials** n° 183, páginas 395 – 401, 2010.

- WANG, C.; WANG, F.; WANG, T.; BIAN, Y.; YANG, X.; JIANG, X. PAHs biodegradation potential of indigenous consortia from agricultural soil and contaminated soil in two-liquid-phase bioreactor (TLPB). **Journal of Hazardous Materials** n° 176, páginas 41 – 47, 2010.
- ZAMUOCHE, R.; BENCHEIKH-LEHOCINE, M.; MENIAI, A. H. Oxygen transfer and energy saving in a pilot-scale batch reactor for domestic wastewater treatment. **Desalination** n° 206, páginas 414 – 423, 2007.
- ZHANG, D.; YANG, Y.; LEAKEY, J. E. A.; CERNIGLIA, C. E. Phase I and phase II enzymes produced by *Cunninghamella: elegans* for the metabolism of Xenobiotics. **FEMS Microbiology Letters** n° 138, páginas 221 – 226, 1996.
- ZHANG, K.; HUA, X.; HAN, H.; WANG, J.; MIAO, C.; XU, Y.; HUANG, Z.; ZHANG, H.; YANG, J.; JIN, W.; LIU, Y.; LIU, Z. Enhanced bioaugmentation of petroleum- and salt-contaminated soil using wheat straw. **Chemosphere** n° 73, páginas 1387 – 1392, 2008.

ANEXOS

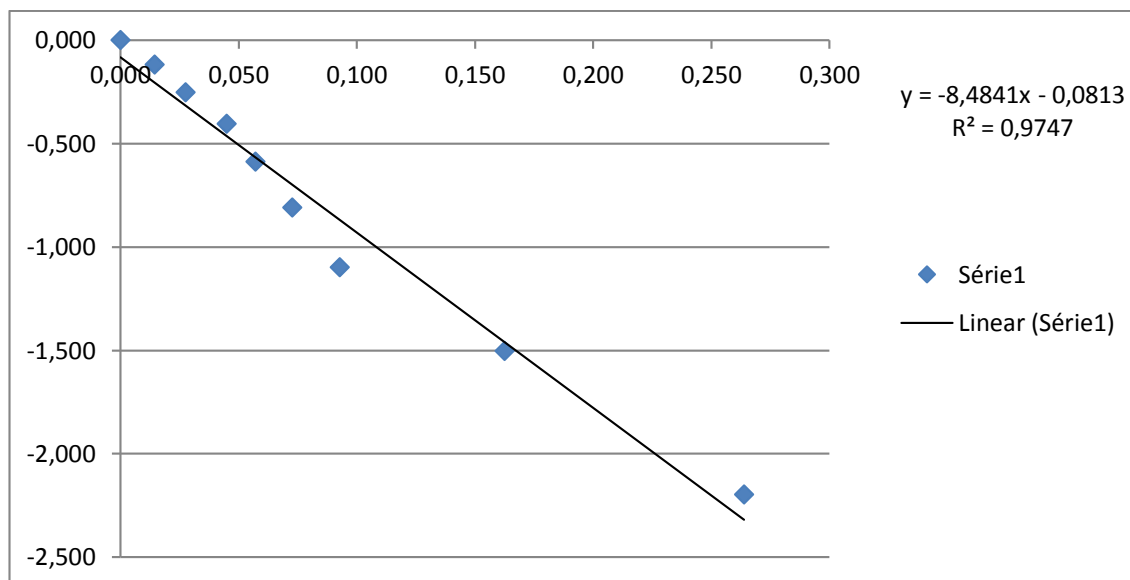


Anexo 1: Curva de calibração de glicose pelo método de DNS.



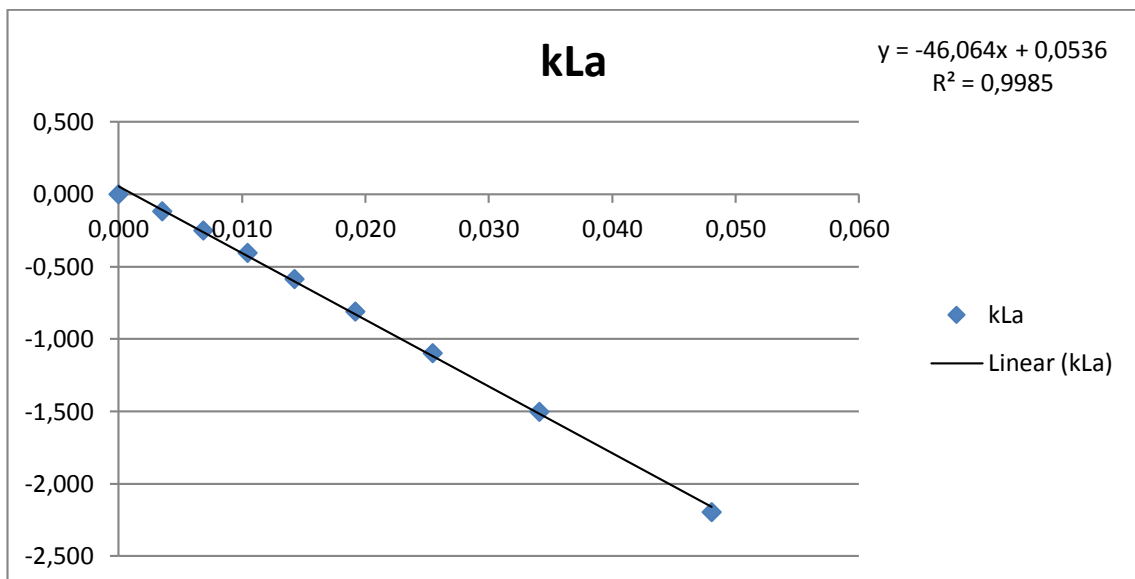
Anexo 2: Cromatograma de determinação de hidrocarbonetos totais de petróleo.

Cálculo k_La - Reator STR					
Oxigênio dissolvido	Medidade de Tempo (S) - Rep 01	Medidade de Tempo (S) - Rep 01	Medidade de Tempo (S) - Rep 01	Média de Tempo (h)	$\ln(1-B)/(1-a)$
0,1	0	0	0	0,000	0,000
0,2	25	60	71	0,014	-0,118
0,3	33	118	146	0,028	-0,251
0,4	87	177	220	0,045	-0,405
0,5	128	230	258	0,057	-0,588
0,6	207	277	301	0,073	-0,811
0,7	248	347	406	0,093	-1,099
0,8	422	634	700	0,163	-1,504
0,9	810	940	1100	0,264	-2,197



Anexo 3: Cálculo k_La do reator STR.

Cálculo kLa - Reator Airlift					
Oxigênio dissolvido	Medidade de Tempo (S) - Rep 01	Medidade de Tempo (S) - Rep 01	Medidade de Tempo (S) - Rep 01	Média de Tempo (h)	Ln (1-B)/(1-a)
0,1	0	0	0	0,000	0,000
0,2	14	12	12	0,004	-0,118
0,3	26	24	24	0,007	-0,251
0,4	40	36	37	0,010	-0,405
0,5	54	50	50	0,014	-0,588
0,6	74	67	66	0,019	-0,811
0,7	99	90	86	0,025	-1,099
0,8	137	118	113	0,034	-1,504
0,9	205	169	145	0,048	-2,197



Anexo 4: Cálculo k_{La} do reator Airlift.

